

N E W S

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 1, Number 31 (2016), 15 – 18

**PREPARATION OF DIAGNOSTICUMS
FOR PESTE DES PETITUS RUMINANTS
LABORATORY TEST-SYSTEMS**

**Zh. K. Koshemetov¹, A. V. Sukhorukov¹, Kh. B. Abeuov², R. Z. Nurgaziev³,
A. R. Sansyzbay¹, B. M. Ismagambetov¹**

¹Republican state enterprise «Research institute of problems of biological safety»
of the Committee of science of the Ministry of education and science of the Republic of Kazakhstan,

²Republican state enterprise «Kazakh agrarian national university»
of the Ministry of agriculture of the Republic Kazakhstan,

³Kyrgyz National Agrarian university named after K. I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyzstan.
E-mail: koshemetov2008@mail.ru; abeuov_khairulla@mail.ru; knau-info@mail.ru; Sansyzbai-ar@mail.ru

Keywords: plague of shallow ruminants, laboratory diagnostics antigen, whey, immunoglobulin, conjugate, reaction of diffusive precipitation, enzymoimmunoassay.

Abstract. We developed the methods for preparation of such diagnosticums as antigen, serum, antibody and conjugate for diffusion precipitation reaction and ELISA to detect peste des petitus ruminants.

ПОЛУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ПРИ ЧУМЕ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

**Ж. К. Кошеметов¹, А. В. Сухоруков¹, Х. Б. Абеуов², Р. З. Нургазиев³,
А. Р. Сансызбай¹, Б. М. Исмагамбетов¹**

¹РГП «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК,

Жамбылская область, Кордайский район, пгт Гвардейский, Казахстан,

²РГП «Казахский аграрный национальный университет» МСХ РК, Алматы, Казахстан,

³Кыргызский национальный аграрный университет им. К. И. Скребнико, Бишкек, Кыргызстан

Ключевые слова: чума мелких жвачных животных, лабораторная диагностика антиген, сыворотка, иммуноглобулин, конъюгат, реакция диффузионной преципитации, иммуноферментный анализ.

Аннотация. Разработаны способы приготовления диагностических препаратов (антиген, сыворотка, иммуноглобулин и конъюгаты) для постановки реакций диффузионной преципитации (РДП) и иммуноферментного анализа (ИФА) при чуме мелких жвачных животных.

Введение. Лабораторная диагностика инфекционной чумы мелких жвачных животных основана на выделении вируса, его идентификации, исследовании сывороток крови переболевших животных в РДП, РСК, РН и ИФА. Применяется также метод флюoresцирующих антител в культуре клеток и биопроба на овцах [1-6].

При использовании лабораторных тест-систем для постановки диагноза на инфекционные болезни животных и птиц особую роль играют входящие в набор диагностические компоненты.

Целью нашей работы являлось приготовление диагностических препаратов для лабораторных тест-систем, применяемых при постановке диагноза на чуму мелких жвачных животных.

Материалы и методы исследований. В процессе проведения экспериментальных исследований был использован штамм Кентау-7 вируса чумы мелких жвачных животных, а также овцы полутонкорунной породы в возрасте до 1 года.

Для выделения гамма-глобулиновой фракции из специфических сывороток крови и очистки антигена вируса чумы мелких жвачных животных использовали следующие методы: спиртовой метод Кона, трехкратное осаждение сульфатом аммония с последующим очищением через ДЕАЕ – целлюлозу, хлористого натрия.

Результаты исследований и их обсуждение

Для наработки антигена вируса чумы мелких жвачных животных использовали первично-трипсинизированные культуры клеток почки ягненка (ПЯ) с заражением в монослоем и инкубированным в течение 7 суток при 37°C.

После 7 суток производили снятие монослоя культуры клеток ПЯ стерильным шпателем.

Для приготовления концентрированного антигена (кратность концентрации от первоначального объема 10, 50, 100 и 200 раз) суспензии подвергали центрифугированию при 5000 об/мин в течение 30 мин и в осадок добавляли физиологического раствора. В дальнейшем активность антигенов исследовали в РДП. Результаты представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, полученный специфический антиген вируса чумы мелких жвачных животных, приготовленный по третьему и четвертому способу, оказался более активным, активность которого в РДП составила 1:32.

Получение специфической сыворотки при чуме мелких жвачных животных проводили на овцах. Для получения специфических сывороток против вируса чумы мелких жвачных животных в качестве антигена использовали материалы, приготовленные различными способами, а также при гипериммунизации животных были испытаны разные схемы гипериммунизации.

Таблица 1 – Активность и специфичность приготовленных антигенов вируса КЛО

№ способа	Способы приготовления антигенов	Результаты в РДП	
		СС	СН
1	Антиген специфический серия 1, кратность концентрации 10 раз	1:4	–
2	Антиген специфический серия 2, кратность концентрации 50 раз	1:8	–
3	Антиген специфический серия 3, кратность концентрации 100 раз	1:32	–
4	Антиген специфический серия 4, кратность концентрации 200 раз	1:32	–
5	Нормальный антиген – приготовленный из монослоя не зараженных культур клеток ПЯ	–	–

1. «–» – отрицательный результат. 2. «СС» – специфическая сыворотка. 3. «СН» – сыворотка нормальная.

Вирусспецифическую суспензию вводили подкожно и внутривенно в возрастающих дозах 5-10 см³ в комплексе с сапонином и интервалом между инъекциями 7 сут. Сапонин применяли из расчета 0,0015% в конечной концентрации. После каждого введения исследовали активность сывороток в РДП. Обескровливание животных проводили на 7 сут после последнего введения антигена вируса. Результаты опыта представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Активность полученных сывороток с использованием разных материалов

Материал, используемый для гипериммунизации овец	Доза материала, интервал и кратность введения антигена			Активность сывороток в РДП	
	доза, см ³	интервал, сут	кратность		
				АгС	АгН
Вируссодержащая суспензия (на ПЯ)	5	7	1	–	–
	7	7	2	–	–
	10	7	3	1:4	1:2
Антиген специфический серия 2, кратность концентрации 50 раз	3	7	1	–	–
	5	7	2	1:4	–
	7	7	3	1:8	–
Антиген специфический серия 3, кратность концентрации 100 раз	3	7	1	1:2	–
	3,5	7	2	1:16	–
	5	7	3	1:32	–
Антиген специфический серия 4, кратность концентрации 200 раз	5	7	1	1:2	–
	10	7	2	1:8	–
	5	7	3	1:32	–

«–» – отрицательный результат.

По результатам таблицы 2 видно, что специфические сыворотки, полученные на овцах к вирусу чумы мелких жвачных животных на основе очищенного вируссодержащего материала в РДП показали неспецифический фоновый уровень.

В результате, используя антигены серий 3 и 4, кратность концентрации 100 и 200 раз, нам удалось получить на овцах активную специфическую сыворотку к вирусу чумы мелких жвачных животных, активность которой в РДП составила 1:32.

Выделение иммуноглобулинов из гипериммунных вирусспецифических сывороток при чуме мелких жвачных животных проводили следующими методами: ступенчатое многократное осаждение альбумина и иммунных глобулинов различными концентрациями охлажденного этилового спирта по Кону, трехкратное высаливание сульфатом аммония при 40%, 35% и 33%-ной степени насыщенности раствора методом хлористого натрия [7].

Активность исходных сывороток и выделенных из них иммуноглобулинов исследовали в РДП. Результаты проведенных исследований представлены в таблице №3.

Как свидетельствуют данные таблицы 3, из специфических сывороток чумы мелких жвачных животных более активные иммуноглобулины получены спиртовым методом по Кону и сернокислым аммонием с последующей очисткой препарата целлюлозой и сефадексом, после высаливания сернокислым аммонием и методом хлористого натрия не приводят к желаемому результату, так как активность иммуноглобулинов теряется до 1:4 и 1:8.

Таблица 3 – Активность вирусспецифических сывороток и гамма-глобулинов

Сыворотка специфическая	Исходная активность сывороток в РДП	Активность выделенных иммуноглобулинов в РДП				
		по Кону	(NH ₄) ₂ SO ₄			Методом хлористого натрия
			без очистки	очистка целлюлозой	очистка сефадексом	
Чумы мелких жвачных животных	1:8	1:16	1:8	1:32	1:16	1:2

Для приготовления вирусспецифических конъюгатов использовали вирусспецифические иммуноглобулины при чуме мелких жвачных животных с активностью в РДП 1:16.

Для конъюгации вирусспецифических антител использовали пероксидазу хрена производства фирмы *Biozyme Laboratories Limited* (Украина) с чистотой RZ 2,3 и активностью по белку от 200 Ед./мг.

Активность приготовленного иммунофероксидазного конъюгата составила в ИФА 1:800.

Выводы. В результате проведенных исследований нам удалось приготовить специфичные и активные диагностические препараты (антитела, сыворотки, иммуноглобулины и конъюгаты) для РДП и ИФА при диагностике чумы мелких жвачных животных.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бакулов И.А., Котлярев В.М. Мировая эпизоотическая ситуация по болезням диких животных // Материалы междунар. науч.-практич. конф. 16-18 апр. 2002 г., г. Покров 2002.
- [2] Lefevre P.C. et al. Serological evidence of peste des petits ruminants in Jordan // Vet. Rec., 1991, 128, 110.
- [3] Perl S. et al. Peste des petits ruminants (PPR) of sheep in Israel: case report // Israel J. Vet. Med., 1994, 49(2), 59-62
- [4] Shaila M.S. et al. Peste des petits ruminants in India // Vet. Rec., 1989, 125, 602.
- [5] Taylor W.P., Albusaidy S., Barrett T. The epidemiology of peste des petits ruminants in the Sultanate of Oman // Vet. Microbiol., 1990, 22, 341-352
- [6] Manual of standards for diagnostic tests and vaccines // Office International Des Epizooties, 1996.
- [7] Фримель Г. Иммунологические методы. – Москва: «Медицина».–1987.- С. 390-412.

REFERENCES

- [1] Bakulov IA Kotliarov VM The world epizootic disease situation of wild animals // Materials of Int. scientific and practical. Conf. 16-18 April. 2002 Pocrov of city 2002.
- [2] Lefèvre P.C. et al. Serological evidence of peste des petits ruminants in Jordan // Vet. Rec., 1991, 128, 110.
- [3] Perl S. et al. Peste des petits ruminants (PPR) of sheep in Israel: case report // Israel J. Vet. Med., 1994, 49(2), 59-62
- [4] Shaila M.S. et al. Peste des petits ruminants in India// Vet. Rec., 1989, 125, 602.
- [5] Taylor W.P., Albusaidy S., Barrett T. The epidemiology of peste des petits ruminants in the Sultanate of Oman // Vet. Microbiol., 1990, 22, 341-352.
- [6] Manual of standards for diagnostic tests and vaccines // Office International Des Epizooties, 1996.
- [7] Frimel G. Immunological methods. Moscow: "Medicine", 1987. P. 390-412.

ҰСАҚ КҮЙІС ҚАЙЫРАТЫН МАЛДАР ОБАСЫНА ЗЕРТХАНАЛЫҚ ТЕСТ-ЖҮЙЕСІН ҚОЮ УШИН ДИАГНОСТИКАЛЫҚ ПРЕПАРАТТАРДЫ АЛУ

**Ж. К. Қошеметов¹, А. В. Сухоруков¹, Х. Б. Әбеуов², Р. З. Нұргазиев³,
А. Р. Сансызбай¹, Б. М. Исағамбетов¹**

¹БФМ ФК «Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ФЗИ» РМК,

²ҚР АШМ «Қазақ ұлттық аграрлық университеті» РМК,

³К. И. Скрябин атындағы Қыргыз ұлттық аграрлық университеті, Бішкек, Қыргызстан

Тірек сөздер: ұсақ күйіс қайыратын малдар обасы, зертханалық диагностика, антиген, қан сарысы, иммуноглобулин, конъюгат, диффузды преципитация реакциясы, иммунды ферменттік талдау.

Аннотация. Ұсақ күйіс қайыратын малдар обасына диффузиялық преципитаттық реакциясы мен иммунды ферменттік талдау әдістерін қою үшін диагностикалық препараттарды (антиген, сарысу, иммунды глобулин и конъюгаттар) дайындау әдістері жасалынып шығарылды.

Поступила 19.01.2016г.

Материалы и методы. В 2014-2015 гг., в Алматинской области проведено обследование посевов на наличие бактериальных болезней на томате и картофеле.

Отобранные образцы анализировались путем выделения возбудителя болезни в чистую культуру с дальнейшей идентификацией в формате FLASH.

Изоляцию возбудителей бактериозов проводили на картофельно-глюкозном агаре и селективной питательной среде SMSA, посредством инкубирования в термостате при температуре 28°C в течение 3-х суток.

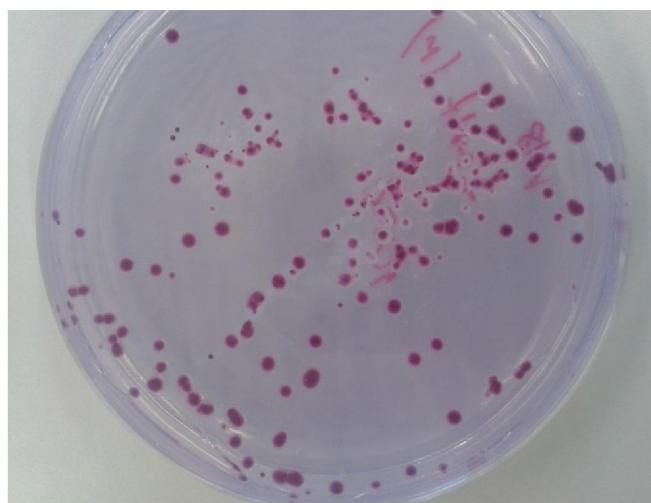
Выделение ДНК проводили на амплификаторе «Терцик» с помощью набора «Проба ГС» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»), следуя протоколу фирмы производителя.

Метод основан на использовании для лизиса клеток – гуанидинатиоцоната и последующей сорбции ДНК на носителе. После отмычки в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она легко снимется с помощью элюирующего раствора. Регистрацию уровня флуоресценции в реакционной смеси проводили после окончания ПЦР с помощью детектора «Джин». При амплификации специфических ПЦР-продуктов флуоресцентное излучение детектировалось от красителя FAM (длина волны возбуждения/излучения 470/514 нм), а о результатах амплификации с ВК судили по флуоресценции красителя HEX (длина волн возбуждения/излучения 532/580 нм) [4].

Уровень флуоресценции в фоновых пробирках принимался за единицу, а величина специфического сигнала и сигнала ВК рассчитывалась программой в единицах фона: сигнал HEX(ВК) больше 2,5 принимался за положительный (+); сигнал Fam(Специфики) больше 2,1 регистрировался как положительный (+), менее 1,75 -отрицательный (-), а между 1,75 и 2,5 - сомнительный (?); при значениях сигнала «ВК» и «Специфики» меньше 1,75 результат считался недостоверным. В сведениях об образцах приведены названия анализируемых штаммов, «К+» - положительный контроль (ДНК *Ralstoniasolanacearum*) из диагностического набора, «К-» - образец прошедший этап выделения ДНК.

Результаты исследований. Из 220 проанализированных образцов патоген был обнаружен только в 10 случаях, что составило 4,5%. Таким образом, при визуальном осмотре образцов практически не было выявлено явных симптомов заболевания.

При пересеве на SMSA среде с КГА лишь единичные образцы дали рост плоских колоний бактерий с неправильными краями, с характерными красными завитками в центре (рисунок). По морфологическим и культуральным признакам бактерии были схожи с *Ralstonia solanacearum*.



Колонии бактерии – *Ralstonia solanacearum* на среде SMSA

Ralstonia solanacearum поражает более 200 видов растений, принадлежащих к 53 различным ботаническим семействам, а наиболее восприимчивыми к патогену являются растения из семейства пасленовых [5].

Заболевание картофеля *Ralstonia solanacearum* вызывает бурую гниль, которая имеет статус карантинного вредного организма, а на помидоре возбудитель вызывает бактериальный вилт.