

## NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 6, Number 36 (2016), 27 – 30

**Zh. K. Koshemetov, B. M. Khairullin, A. R. Sansyzbay, Kh. B. Abeuov, V. M. Matveeva**RSE "Scientific Research Institute for Biological Safety Problems" CS MES RK, Gvardeyskiy village,  
Kazakh National Agrarian University, Almaty, Kazakhstan**OBTAINING DIAGNOSTIC ANTIGEN OF «O» TYPE FMD VIRUS  
FOR SEROLOGIC REACTIONS****Abstract.** We developed the preparation technology of lapinized antigen of «O» type FMD virus on the basis of “O-Belek 2001” strain for serologic tests.**Keywords:** foot and mouth disease, type, antigen.

УДК 619:616-07/619.3

**Ж. К. Кошеметов, Б. М. Хайруллин, А. Р. Сансызбай, Х. Б. Абеуов, В. М. Матвеева**РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК,  
пгт. Гвардейский,  
НАО «Казахский национальный аграрный университет» МСХ РК, Алматы, Казахстан**ПОЛУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО АНТИГЕНА  
ВИРУСА ЯЩУРА ТИПА «О»  
ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ****Аннотация.** Разработана технология приготовления препарата лапинизированного антигена вируса ящура типа «О» на основе штамма «O<sub>1</sub>-Белек 2001», пригодного для постановки серологических тестов.**Ключевые слова:** ящур, тип, антиген.**Введение.** Чувствительность, специфичность и воспроизводимость серологических тестов находится в прямой зависимости от качества применяемых диагностических препаратов. А качество препаратов складывается из их активности и специфичности.Исходя из этого, целью наших исследований являлась разработка технологии изготовления препарата лапинизированного антигена вируса ящура типа «О» на основе штамма «O<sub>1</sub>-Белек 2001», пригодного для постановки серологических тестов.**Материалы и методы исследований.** В работе использовали вирус ящура типа «О» штамм «O<sub>1</sub>-Белек 2001», выделенный в очаге эпизоотии ящура в Кыргызской Республике в 2000 г. и прошедший 11 пассажей в организме 1-2-суточных крольчат-сосунов.**Культивирование вируса** проводили на клинически здоровых 1-2 суточных крольчатах-сосунах, путём заражения их в дозе 2 мл лапинизированным вирусом «O<sub>1</sub>-Белек 2001» подкожно в область верхней трети шеи. Крольчат выдерживали в термальной комнате при температуре 24-26°C в течение 26-35 ч. Для приготовления вирусосодержащей суспензии брали тех крольчат, у которых были выражены типичные клинические признаки - агональное состояние, полный паралич и парезы передних и задних лапок.**Вирусосодержащую суспензию** готовили следующим образом - крольчат умерщвляли, очищали от шкуры, отсекали голову, а скелетную мускулатуру гомогенизировали в размельчителе

тканей (РТ) в течение 5 мин. и ресуспендировали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) с рН 7,4-7,6 до 10% конечной концентрации. Полученную вирусосодержащую суспензию однократно замораживали при температуре - 20°C не менее 5 ч., оттаивали, осветляли центрифугированием при 3000 об/мин. в течение 30 мин. Надосадочную жидкость инактивировали в водяной бане при температуре 58-60°C в течение 40 мин. и исследовали в РСК. Для приготовления антигена использовали вирусосодержащие суспензии с активностью в РСК не ниже 1:4.

**Очистка вирусосодержащей суспензии.** Очистку суспензии проводили с использованием хлороформа в конечной концентрации 30% в течение 30 мин., гомогенизируя в размельчителе тканей (РТ), а затем озвучивали эту суспензию на ультразвуковом дезинтеграторе в течение 30 сек. Суспензию осветляли центрифугированием при 5000 об/мин. в течение 30 мин., осадок отбрасывали.

**Инактивирование вирусосодержащей суспензии.** Инактивирование суспензии проводили воздействием формальдегида в 0,2% конечной концентрации в течение 48 ч. при 26-28°C, при периодическом перемешивании (через каждые 2 ч.).

**Определение безвредности.** Безвредность приготовленной инактивированной вирусосодержащей суспензии проверяли на белых мышатах-сосунах 5-6 сут. возраста и 1-2 сут. крольчатах-сосунах. Мышатам суспензию вводили подкожно в дозе 0,2мл, а крольчатам в дозе 1мл. Суспензия считалась безвредной, если мышата и крольчата не заболели в течение 48 ч. после их заражения.

**Осаждение и концентрирование антигена.** Осаждение антигена из очищенной и инактивированной вирусосодержащей суспензии проводили добавлением в неё сухой соли сернокислого аммония в количестве 27г на 100мл или сухого ПЭГ с М.м.6000 в 7-10% конечной концентрации. Суспензии с адсорбентами выдерживали в течение 24-48 часов при 4-6°C, образовавшийся осадок отделяли с помощью центрифугирования при 5000об/мин в течение 30 минут и ресуспендировали в 40-50 кратном объёме ЗФР. Приготовленный препарат антигена диализовали в течение 48 часов в ЗФР при 4-6°C.

**Иммуноферментный анализ (ИФА), реакция связывания комплемента (РСК) и реакция диффузионной преципитации (РДП)** ставили согласно действующим наставлениям по их постановке и применению.

**Определение содержания белка.** Содержание белка в препаратах вируса ящура определяли по методу Лоури.

### **Результаты исследований и их обсуждение**

В экспериментах по выращиванию вируса ящура штамма «О<sub>1</sub>-Белек-2001» в организме 1-2 сут. крольчат-сосунов установлено, что более активная, с титром в РСК 1:4 и выше 10%-ная вирусосодержащая суспензия была приготовлена на крольчатах-сосунах, забитых в агональном состоянии при полном параличе и парезе всех лапок и ярко выраженных внутренних паталого-анатомических изменениях (сильное наполнение мочевого пузыря, увеличение печени и расширение желудка). Активность приготовленных вирусосодержащих суспензий в РСК составила от 1:2 до 1:8.

Для получения активных, специфичных и безвредных антигенов вируса ящура, пригодных для постановки таких серологических тестов как РСК, РДП и ИФА необходима очистка тканевых суспензий от балластных белков, их инактивирование, осаждение и концентрирование.

Согласно данным литературы по очистке вируса ящура, наиболее широко применяемым и доступным для этих целей химическим реагентом является хлороформ в различных концентрациях, при этом очистка тканевых суспензий от балластных белков достигает 80% [1-6]. Известно, что в суспензиях богатых белками, вирионы вируса ящура часто могут находиться в агрегатах с частицами белков, которые их маскируют. Работами ряда авторов установлено, что воздействие ультразвука на вирус ящура не приводит к изменению его биологических свойств. Исходя из вышесказанного, мы в своих исследованиях использовали очистку вируса ящура хлороформом в концентрациях от 10 до 30% и очистку суспензий хлороформом с последующим воздействием ультразвуком в течение 30 секунд. Очищенные препараты вируса ящура исследовали в РСК, а также определяли процент очистки суспензии по содержанию белка до очистки и после очистки. Результаты этих исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнительная оценка активности в РСК и чистоты лапинизированных суспензий вируса ящура, очищенных разными способами

№ п/п	Активность исходной лапинизированной суспензии в РСК	Обработка 10% раствором хлороформа в течение 30 мин		Обработка 30% раствором хлороформа в течение 30 мин		Обработка 30% раствором хлороформа в течение 30 мин и ультразвуком 30 сек.	
		активность в РСК	% очистки по белку	активность в РСК	% очистки по белку	активность в РСК	% очистки по белку
1	1:2-1:4	1:2	51	1:2-1:4	67	1:2	77
2	1:2-1:4	1:2-1:4	53	1:2-1:4	63	1:2-1:4	75
3	1:2-1:8	1:4-1:8	53	1:2-1:8	66	1:4-1:8	81
4	1:4-1:8	1:2-1:8	50	1:4-1:8	67	1:2-1:8	79
5	1:4-1:8	1:4-1:8	45	1:4-1:8	63	1:4-1:8	77
6	1:4-1:8	1:4-1:8	45	1:4-1:8	69	1:4-1:8	80
7	1:4-1:8	1:4-1:8	47	1:4-1:8	69	1:4-1:8	81

Как видно из результатов таблицы 1, активность препаратов антигена вируса ящура не снижается при применении для очистки разных концентраций хлороформа, а наиболее высокий процент очистки суспензии от балластных белков наблюдался при применении 30% раствора хлороформа в сочетании с ультразвуком.

Для получения безопасных в ветеринарно-санитарном отношении антигенов необходима инактивация возбудителя болезни. Для этого в вирусологической практике применяются различные химические инактиваторы - формальдегид, производные этиленмина, пропилактон и другие [3]. В данных исследованиях применяли инактивацию очищенных суспензий формальдегидом в 0,2% конечной концентрации с экспозицией этих суспензий в течение 48 часов при 26-28°C с периодическим перемешиванием (через каждые 2 ч.). Проверка на безвредность проинактивированных суспензий показала, что белые мышата-сосуны и 2-сут. крольчата не заболели в течение 2-3 сут. после их заражения этими суспензиями. Для снятия антикомплементарности вируссодержащие суспензии были дополнительно прогреты при 58°C в течение 1 часа. Для повышения активности антигенов необходимо их концентрирование из вируссодержащей суспензии. Согласно данным литературы для концентрирования антигенов вируса ящура применяются ПЭГ-6000, гексаметафосфат натрия, сернокислый аммоний, ацетон и др. [6-9].

В наших исследованиях были испытан метод концентрирования антигенов сернокислым аммонием в 27% конечной концентрации в суспензии в течение 24-48 часов при 4°C. Осаждённые центрифугированием осадки антигенов ресуспендировали в 40-50 кратном объеме ЗФР с рН 7,4-7,6.

В результате проведенных исследований было приготовлено 5 серий антигена вируса ящура типа О, на основе штамма «О<sub>1</sub>-Белек-2001», которые были проверены на активность в РСК и ИФА. Результаты этих исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Активность антигенов вируса ящура типа О в серологических тестах

№ п/п	Активность исходной лапинизированной суспензии в РСК	Способ получения антигена	Активность в РСК	Активность в ИФА
1	1:2-1:4	Осаждение сернокислым аммонием, 40- кратной концентрации	1:32	1:2048
2	1:4	Осаждение сернокислым аммонием, 40- кратной концентрации	1:32	1:2048
3	1:4-1:8	Осаждение сернокислым аммонием, 40- кратной концентрации	1:32	1:2048
4	1:4-1:8	Осаждение сернокислым аммонием, 50 - кратной концентрации	1:64	1:4096
5	1:4-1:8	Осаждение сернокислым аммонием, 50- кратной концентрации	1:128	1:4096

Как видно из результатов таблицы №2, приготовленные серии антигена вируса ящура типа О на основе штамма «О<sub>1</sub>-Белек-2001» с использованием сернокислого аммония имеют активность в РСК с 1:32 до 1:128 и в ИФА соответственно с 1:2048 до 1:4096. Приготовленные антигены специфичны и не дают перекрестных реакций с сыворотками типов А, Азия-1 и С.

**Заключение.** В результате проведённых исследований разработана технология приготовления активного и типоспецифичного антигена вируса ящура О на основе штамма «О<sub>1</sub>-Белек-2001», выделенного в очаге эпизоотии ящура в Кыргызской Республике в 2000 г., пригодного для постановки серологических тестов. Приготовленные серии антигена были с успехом применены при постановке лабораторных серологических тестов (РСК, РДП, РНСК и ИФА) во время проведения диагностической экспертизы и типирования возбудителя болезни в многочисленных пробах патологического материала и сыворотках, доставленных в 2001-2006 гг. из различных очагов эпизоотий вируса ящура в Республиках Казахстан, Кыргызстан и Таджикистан.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бурдов А.Н. и др. Ящур // ВО "Агропромиздат". – 1990. – С. 123-134.
- [2] Гусев А.А. Ящур и через 100 лет после открытия возбудителя остается мировой проблемой // Пробл. инфекц. патологии с.-х. животных. – Владимир, 1997. – С. 13-15.
- [3] Кругликов Б.А., Бойко А.А. Эпизоотия ящура - пример биологических катастроф // Пробл. инфекц. патологии с.-х. животных. – Владимир, 1997. – С. 65-66.
- [4] Foster M., Cook A., Cedillo L. & Parkhouse RME. Serological and cellular immune responses to non-structural proteins in animals infected with FMDV // Veterinary Quarterly. – 1998. – 20(S2). – S28-S307.
- [5] Самуилов В.Д. Иммуноферментный анализ // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 12. – С. 9-15.
- [6] Мамадалиев С.М., Троицкий Е.Н., Матвеева В.М., Хайруллин Б.М., Керембекова У.Ж., Кошеметов Ж.К., Касенов М.М., Сарсенбеков М.Н., Кондыбаева Ж.Б. Результаты исследований по постановке диагноза на заболевание крупного рогатого скота в Восточно-Казахстанской области // Биотехнология. Теория и практика. – 2000. – № 3-4. – С. 87-88.
- [7] Хайруллин Б.М., Касенов М.М., Сарсенбеков М.Н., Матвеева В.М., Мамадалиев С.М., Троицкий Е.Н. Эпизоотический мониторинг ящура в Казахстане // Проблемы биологической и экологической безопасности. Международная конференция 23-24 мая 2000. – Россия, Оболensk. – С. 150-151.
- [8] Kitching R.P., Barnett P.V., Donaldson A.I., Mackay D.K.J. Foot and mouth disease. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines: Lists A and B diseases of mammals, birds and bees. – Paris: OIE, 2001. – P. 77-92.
- [9] Хайруллин Б.М., Матвеева В.М., Касенов М.М., Волгин Е.Н. Очистка вируса ящура типа А штамм "Таласский" // Развитие Международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний. Тезисы докладов 8-10 сентября 2004. – Россия, Новосибирск, 2004. – 284 с.

#### REFERENCES

- [1] Burdov A.N., et al. Foot and mouth disease // VO "Agropromizdat". 1990. P. 123-134.
- [2] Gusev A.A. Foot and mouth disease, and 100 years after the discovery of the causative agent is a worldwide problem // Problems. infection. Pathology of agricultural animals. Vladimir, 1997. P. 13-15 .
- [3] Kruglikov B.A., Boyko A.A. FMD epizootic - an example of biological disasters // Probl. infection. Pathology of agricultural animals. Vladimir, 1997. P. 65-66.
- [4] Foster M., Cook A., Cedillo L. & Parkhouse RME. Serological and cellular immune responses to non-structural proteins in animals infected with FMDV // Veterinary Quarterly. 1998. 20 (S2). P. 228-307.
- [5] Samuilov V.D. ELISA // Soros Educational Journal. 1999. N 12. P. 9-15.
- [6] Mamadaliev S.M., Matveeva V.M., Khayrullin B.M., Kerembekova U.Zh., Koshemetov J.K., Kassenov M.M., Sarsenbekov M.N., Kondybaeva J.B. The results of studies on the diagnosis of the disease on cattle in the East Kazakhstan region // Biotechnology. Theory and practice. 2000. N 3-4. P. 87-88.
- [7] Khayrullin B.M., Kassenov M.M., Sarsenbekov M.N., Matveev V.M., Mamadaliev S.M. Epizootic monitoring of foot and mouth disease in Kazakhstan // Problems of biological and ecological safety. International Conference May 23-24, 2000. Russia, Obolensky. P. 150-151.
- [8] Kitching R.P., Barnett P.V., Donaldson A.I., Mackay D.K.J. Foot and mouth disease. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines: Lists A and B diseases of mammals, birds and bees. Paris: OIE, 2001. P. 77-92.
- [9] Khayrullin B.M., Matveev V.M., Kassenov M.M., Volgin E.N. Cleaning FMD virus type A strain of "Talas" // Development of international cooperation in the field of infectious diseases. Abstracts September 8-10, 2004. Russia, Novosibirsk, 2004. 284 p.

**Ж. К. Қошеметов, Б. М. Хайруллин, А. Р. Сансызбай, Х. Б. Абеуов, В. М. Матвеева**

РМК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ҒК БҒМ ҚР, Гвардейск қ.т.п;  
Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы, Қазақстан

#### СЕРОЛОГИЯЛЫҚ РЕАКЦИЯЛАР ҮШІН АУСЫЛ ВИРУСЫНЫҢ О ТИПІНЕ АНТИГЕН АЛУ

**Аннотация.** Серологиялық реакцияларды қоюға жарамды аусыл вирусының «О<sub>1</sub>-Белек 2001» штамы негізінде лапинденген антиген дайындау технологиясы жасалынып шығарылды.

**Түйін сөздер:** аусыл, тип, антиген.