

NEWS

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

ISSN 2224-526X

Volume 4, Number 34 (2016), 30 – 32

**AN IMMUNE ASCITES FLUID AGAINST
THE VIRUS PLAGUE OF PESTE DES PETITS RUMINANTS**

Zh.K. Koshemetov, B.M. Khairullin, A.R. Sansyzbay, Kh.B. Abeuov

RSE "Scientific Research Institute for Biological Safety Problems" CS MES RK, village, Gvareyskiy
Kazakh national agrarian university, Almaty

Key words: PDPR, immune ascites fluid, enzyme immunoassay, the reaction diffusion precipitation, complement fixation.

Abstract. The results of experiments on the production of active immune ascites fluid to a purified preparation of the virus plague of peste des petits ruminants (PDPR) in mice methods for RDP, RCF and ELISA are given in this work.

УДК: 619.578.832.1:598.2:657.082.26

**ПОЛУЧЕНИЕ ИММУННОЙ АСЦИТНОЙ ЖИДКОСТИ
ПРОТИВ ВИРУСА ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ**

Ж.К. Кошеметов, Б.М. Хайруллин, А.Р. Сансызбай, Х.Б.Абеуов

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК,
пгт. Гвардейский,
НАО «Казахский национальный аграрный университет» МСХ РК

Ключевые слова: чума мелких жвачных животных (ЧМЖЖ), иммунная асцитная жидкость (ИАЖ), иммуноферментный анализ (ИФА), реакция диффузионной преципитации (РДП), реакция связывания комплемента (РСК)

Аннотация. В работе представлены результаты экспериментов по получению активной иммунной асцитной жидкости к очищенному препарату вируса чумы мелких жвачных животных на мышах для методов реакций диффузионной преципитации, реакции связывания комплемента и иммуноферментного анализа.

Введение

Для Республики Казахстан при наличии многочисленных путей миграции диких животных, перегонов домашнего скота и выпасов сельскохозяйственных животных, большую опасность представляет распространение такого особо опасного инфекционного вирусного заболевания, как чума мелких жвачных животных (ЧМЖЖ). ЧМЖЖ в последние годы распространяется из стран Африки на Ближний Восток. ЧМЖЖ является эпизоотическим заболеванием овец и коз, наиболее важным сдерживающим фактором в увеличении поголовья мелкого рогатого скота [1].

В настоящее время для диагностики ЧМЖЖ применяют различные серологические и генетические методы: РДП, РСК, реакция нейтрализации (РН), метод флуоресцирующих антител (МФА), иммуноэлектроосмосфорез (ИЭОФ), иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция (ПЦР) [2]. Наиболее простым в исполнении и легко воспроизводимым в полевых условиях являются РДП и РСК, но эти реакции менее чувствительные. Остальные, такие как РН и МФА являются длительными, трудоёмкими и требуют для постановки чувствительных культур клеток. ПЦР – наиболее чувствительный метод из всех вышеперечисленных, но требует для постановки специальных условий и оборудования [2].

Получение объективных результатов при постановке вышеуказанных тест-систем для диагностики вируса ЧМЖЖ в основном зависит от активности и специфичности иммунных антительных препаратов. В этом отношении ИАЖ мышей является более продуктивным источником получения чистых специфических антител против вируса ЧМЖЖ [3, 4].

Целью настоящей работы являлось выделение очищенных препаратов вируса ЧМЖЖ и получение ИАЖ к данному вирусу для методов РДП, РСК и ИФА.

Материалы и методы исследований. В работе использовали вирус ЧМЖЖ, штамм «Кентау-7» в виде вирусосодержащей культуральной суспензий с биологической активностью 5,0 Ig ТЦД₅₀/см³.

- белые беспородные мыши;
- РДП, РСК и ИФА ставили по отработанным методикам в условиях РГП НИИПББ КН МОН РК.

Результаты исследований и их обсуждение. Для получения активных и специфичных антительных препаратов к вирусу ЧМЖЖ нам необходимо было отработать методы очистки и концентрирования вируса из вирусосодержащей суспензий и выделить чистый препарат вируса. В связи с этим нами подобраны нижеследующие методики очистки и концентрации вируса ЧМЖЖ. В результате проведённых исследований была отработана следующая оптимальная схема выделения вируса. Вирусосодержащую суспензий осветляли центрифугированием, обрабатывали антибиотиками в дозе 2000 ед/см³ затем ультрацентрифугировали при 30000 об/мин и очищали в градиенте плотности сахарозы (20, 40 и 60%). Очищенный вирус ресуспендировали в 100-кратном объёме стерильного 0,05М фосфатно-буферного раствора (ФБР) с рН 7,2-7,4. Активность очищенного по данному способу препарата вируса составила в ИФА 1:40960- 1:81920 и содержание белка в препарате составило 700-800 мкг/см³. В электронном микроскопе JEM 100 В очищенный вирус представлял собой гомогенный препарат. Затем вирус обрабатывали ферментом - бромелайном в течение 24 ч при 37°C при соотношении вируса и фермента 9:1, фермент использовали в концентрации 13мг/см³ [4]. Обработанный ферментом вирус осаждали при 30000 об/мин в течение 90 мин и ресуспендировали в исходном объёме 0,05 М ФБР. Препарат выделяли обработкой вируса 10%-ным тритоном X-100 и ультрацентрифугированием по методу Холла и Мартина. Для этого очищенный вирус (700-800) мкг белка смешивали с 1 М раствором хлористого калия, содержащим 10% тритона X-100, в соотношении 1:4 по объёму. Затем смесь периодически встряхивали в течение 1 ч и центрифугировали при 27000 об/мин в течение 45 мин. Надосадочную жидкость собирали и диализовали против 0,01М ФБР, с рН 7,2 в течение ночи при 4°C на магнитной мешалке. После диализа жидкость центрифугировали при 8000 об/мин в течение 25 мин. Образовавшийся осадок (МБ) ресуспендировали в 0,05 М ФБР до необходимой концентрации и использовали для гипериммунизации животных.

Таблица 1 – Результаты исследования в ИФА, РДП и РСК, при использовании ИАЖ к препарату ЧМЖЖ

| № п/п | Наименование проб | Исследовано проб | Активность | | |
|-------|---|------------------|---------------|---------|-----------|
| | | | в ИФА | в РДП | в РСК |
| 1 | АнС ЧМЖЖ, серия №1 | 3 | 1:320-1:640 | 1:2-1:4 | 1:16-1:24 |
| 2 | АнС ЧМЖЖ, серия №2 | 3 | 1:320-1:640 | 1:2-1:4 | 1:16-1:24 |
| 3 | Культуральная суспензия вируса ЧМЖЖ | 3 | 1:8-1:16 | - | - |
| 4 | АнС ЧМЖЖ, серия №3 | 3 | 1:1280-1:2560 | 1:4-1:8 | 1:24-1:32 |
| 5 | 20% суспензия лёгкого павшей от вируса ЧМЖЖ | 3 | 1:1280-1:5120 | 1:4-1:8 | 1:24-1:32 |
| 6 | 20% суспензия селезенки павшей от вируса ЧМЖЖ | 3 | 1:1280-1:2560 | 1:4-1:8 | 1:24-1:32 |
| 7 | 20% суспензия лёгкого здоровой овцы | 3 | 1:1280-1:2560 | 1:4-1:8 | 1:24-1:32 |
| 8 | 20% суспензия селезенки здоровой овцы | 3 | - | - | - |
| 9 | АнС оспы овец, серия №1 | 3 | - | - | - |
| 12 | АнС катаральной лихорадки овец, серия №1 | 3 | - | - | - |
| 13 | АнС контагиозной эктимы овец, серия №1 | 3 | - | - | - |
| 17 | АнН культуральный | 3 | - | - | - |

Примечания: 1. «АнС» - антиген специфический.
2 «АнН» - антиген нормальный.

С использованием препаратов из вируса ЧМЖЖ были проведены опыты по получению ИАЖ на мышах. Для этого мышам вводили препараты вируса ЧМЖЖ внутрибрюшинно по 200 мкл в комплексе с равным объемом полный адьювант Фрейнда (ПАФ). Схема гипериммунизации состояла из пяти введений белка с интервалом между введениями в 4-5 суток. Через пять суток после последнего введения препарата мышам вводили клетки асцитной саркомы 180/ТС в дозе 2-4 млн саркомных клеток на одну мышь внутрибрюшинно. На 10-15 суток у мышей образовалась опухоль, количество накапливающейся асцитной жидкости достигало 10-15 см³. Иммунную асцитную жидкость извлекали из брюшной полости и осветляли центрифугированием затем её замораживали при минус (20-40)⁰С. После оттаивания в ИАЖ образуются хлопья фибрина, которые удаляли центрифугированием. Полученные ИАЖ исследовали в прямом варианте ИФА на активность и специфичность. Для этого ИАЖ вносили в лунки плашек, вместо иммуноглобулина, в оптимальном разведении и исследовали пробы антигенов вируса ЧМЖЖ. Результаты проведенных опытов представлены в таблице 1.

Из результатов таблицы видно, что во всех исследованных нами пробах вируса ЧМЖЖ с помощью полученных ИАЖ выявлен специфический антиген ЧМЖЖ в титрах с 1:320 до 1:2560 в ИФА, 1:2-1:4 в РДП и 1:24-1:32 в РСК. В то же время все нормальные и гетерологичные антигены показали отрицательный результат в тест-системах.

Закключение. Таким образом, полученные ИАЖ к очищенному препарату вируса ЧМЖЖ оказались пригодны для применения в прямом варианте ИФА для обнаружения специфического антигена вируса ЧМЖЖ в различных испытуемых материалах. Следует отметить то преимущество применения ИАЖ в РДП, РСК и ИФА, что без дополнительной очистки из ИАЖ антител они показывают специфичные и активные результаты в РДП, РСК и ИФА, сравнимые с результатами, полученными при использовании иммуноглобулинов к препарату.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Forsyth M.A., Barrett T. Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Research*, 1995, 19, -P. 151-163.
- [2] Луговцев В.Ю. (2000). Разработка средств и методов лабораторной диагностики пограничной болезни овец. // Дис... канд. вет. наук. – Покров. -148 с.
- [3] Петров Р.В., Хайтов Р.М. Получение гипериммунных сывороток к белку М вируса гриппа. *Вопросы вирусологии.*-1984.-№3.- 271 с.
- [4] Иванова В.Т., Кордюкова Л.В., Манькин А.Н. Использование бромелайна для получения субвирусных частиц вируса гриппа А и В // *Вопр. вирусол.* 2003. №5. С.14-18.

REFERENCES

- [1] Forsyth M.A., Barrett T. Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Research*, 1995, 19, -P. 151-163.
- [2] Lugovtsov V.Y. (2000). Development of the means and methods of laboratory diagnostics border disease of sheep. // *Dis ... Cand. vet. Sciences. - Cover. -148 With.*
- [3] Petrov R.V., RM K Haitov The hyperimmune serum M-protein of influenza virus. *Zh.Voprosy virusologii.*-1984.-№3.- 271.
- [4] Ivanov V.T., Kordyukova L.V., Manykin A.N. The use of bromelain for subviral particles of influenza virus A and B // *Issues. virusol.* 2003. №5. S.14-18.

ҰСАҚ КҮЙІС ҚАЙЫРАТЫН МАЛДАР ОБАСЫНЫҢ ВИРУСЫНА ҚАРСЫ ИММУНДЫ АСЦИТТІК СҮЙЫҚТЫҒЫН АЛУ

Ж.К. Қошметов, Б.М. Хайруллин, А.Р. Сансызбай, Х.Б. Абеуов

РМК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ҒК БҒМ ҚР, Гвардейск қалашығы, Қазақ ұлттық Аграрлық университеті, Алматы қ.

Түйін сөздер: ұсақ күйіс қайыратын малдар обасы, иммунды асциттік сұйық, иммунды ферменттік талдау, араласқан преципитациялық реакция, комплементті байланыстыру реакциясы.

Аннотация. Жұмыста ұсақ күйіс қайыратын малдар обасының вирусына жалпы ақзатына қарсы ДПР, КБР және ИФӨ әдістеріне жарамды тышқанда белсенді иммунды сұйықтығын алу бойынша жұмыстар көрсетілген.

Поступила 15.07.2016 г.