

Министерство образования и науки Кыргызской Республики

**Кыргызский национальный аграрный университет
имени К.И. Скрябина**

Диссертационный совет Д.06.14.489

На правах рукописи
УДК 619:614.47+636.1.189

Кошеметов Жумагали Каукарбаевич

**ЧУМА МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ: МОНИТОРИНГ И РАЗРАБОТКА
СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ**

06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат
диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Бишкек – 2016

Диссертационная работа выполнена в РГП «Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности» КН МОН Республики Казахстан и Кыргызском научно-исследовательском институте ветеринарии имени А.Дуйшеева.

Научный консультант: доктор ветеринарных наук, член-корреспондент
НАН КР, профессор
Нургазиев Рысбек Зарылдыкович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Доолоткелдиева Тинатин Доолоткелдиевна

доктор биологических наук, профессор РАЕ
Мусаева Асия Кыблашевна

доктор биологических наук
Сейдахметова Роза Джаровна

Ведущая организация: Институт ветеринарии Таджикской
академии сельскохозяйственных наук, 734005,
Республика Таджикистан,
г. Душанбе, ул. Каххорова 43

Защита диссертации состоится «29» апреля 2016 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д.06.14.489 при Кыргызском национальном аграрном университете имени К.И. Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. Медерова, 68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского национального аграрного университета (720005, г. Бишкек, ул. Медерова, 68).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук**

Крутская Е.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Чума мелких жвачных животных (ЧМЖЖ) – высококонтагиозное, остро или подостро протекающее вирусное инфекционное заболевание мелкого рогатого скота (МРС), характеризующееся лихорадкой, язвенными поражениями слизистой оболочки ротовой полости, геморрагическим гастроэнтеритом, поражением лимфоидной системы и пневмонией. Инфицированные животные проявляют клинические признаки, сходные с чумой крупного рогатого скота (ЧКРС) у коз и овец, однако при заражении КРС клинических проявлений нет. Вирус ЧМЖЖ передается воздушно-капельным путем при тесном контакте. Благодаря своему сходству с ЧКРС, чумой плотоядных и корью его относят к роду морбилливирусов семейства парамиксовирусов.

Экономический ущерб, причиняемый ЧМЖЖ овцеводству и козоводству, значительный, поскольку заболеваемость в первичных очагах инфекции может достигать 100% при высоком уровне летальности. Кроме того, при заболевании ЧМЖЖ часто возникает смешанная инфекция, что усугубляет ситуацию. Следовательно, есть необходимость в разработке методов диагностики, способных быстро и точно поставить диагноз.

При постановке диагноза на ЧМЖЖ используются комплексные диагностические тест-системы РДП, РСК, РН, ИФА, ПЦР, постановка биопробы, электронная микроскопирования и выделение возбудителя в чувствительных системах, что дает возможность получить объективный результат. Они нашли широкое применение в ветеринарной практике благодаря простоты постановки, высокой чувствительности, специфичности и воспроизводимости для получения результатов.

В Республике Казахстан такие комплексные тест-системы для РДП, РСК, РН, ИФА и ПЦР не разработаны, в связи, с чем перед нами стояла задача разработать тест-системы для мониторинга ЧМЖЖ с целью выявления её очагов на территории Республики Казахстан, Таджикистан и Кыргызской Республики.

Связь темы диссертации с крупными научными программами, основными научно-исследовательскими работами, проводимыми научными учреждениями.

Диссертационная работа выполнена в рамках научно-технических программ следующих проектов РГП НИИ проблем биологических безопасности» КН МОН РК:

Диссертационная работа входила в тематический план НИР РГП НИИ проблем биобезопасности КН МОН по теме: «Разработка и внедрение метода суспензионного культивирования и на микроносителях вирусов чумы мелких жвачных животных и катаральной лихорадки овец», 2006-2008 гг.; «Разработка полимеразной цепной реакции для идентификации возбудителей особо опасных вирусных инфекций», 2004-2006 гг.; «Разработка научно-обоснованной системы мониторинга особо опасных заболеваний сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей на территории Республики Казахстан», 2004-2006 гг.; «Разработка средств и методов диагностики возбудителя чумы мелких жвачных животных», 2006-2008 гг.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы явилась разработка диагностических тест-систем (РДП, РСК, РН, ИФА и ОТ-ПЦР) для выявления антигена вируса ЧМЖЖ, самого возбудителя и антител к нему, а также проведение эпизоотического мониторинга по данной инфекции на территории Республики Казахстан, Таджикистан и Кыргызской Республики.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

- исследовать эпизоотическую ситуацию в мире и в Республике Казахстан по ЧМЖЖ;
- выделить из очагов эпизоотии штамм вируса ЧМЖЖ в чувствительных системах и изучить культуральные свойства выделенного штамма;
- оптимизировать условия выделения, очистки и концентрирования РНК вируса ЧМЖЖ из очищенных препаратов вируса, инфицированных культур клеток и органо-тканевых материалов;

- подобрать наиболее оптимальные условия приготовления комплексных диагностических препаратов (специфические антигены, сыворотки, иммуноглобулины, вирусспецифические и антивидовые конъюгаты), пригодных для постановки РДП, РСК, РН, ИФА;
- провести анализ нуклеотидных последовательностей генов штаммов и изолятов вируса ЧМЖЖ;
- подобрать и синтезировать специфические праймеры для обратнo-транскриптазной ПЦР (ОТ-ПЦР) при обнаружении вируса ЧМЖЖ;
- разработать оптимальные условия постановки РДП, РСК, РН, ИФА и ОТ-ПЦР для диагностики ЧМЖЖ;
- с применением разработанных тест-систем РДП, РСК, РН, ИФА и ОТ-ПЦР провести мониторинг по ЧМЖЖ на территории Республики Казахстан, Таджикистан и Кыргызской Республики.

Научная новизна полученных результатов:

- испытана эпизоотическая ситуация по ЧМЖЖ в мире и на территории Республики Казахстан;
- из очагов эпизоотии выделен штамм «Кентау-7» вируса ЧМЖЖ и изучены его культуральные свойства;
- впервые в Республике Казахстан отработана методика приготовления комплексного культурального специфического антигена на основе штамма «Кентау-7», пригодных для постановки РДП, РСК, ИФА и иммунизации животных против ЧМЖЖ;
- отработана схема получения комплексных вирусспецифических сывороток, пригодной для постановки РДП, РСК, РН, ИФА и выделения иммуноглобулинов;
- отработана схема получения высокоактивной антивидовой сыворотки, пригодная для выделения антивидовых антител;
- подобраны специфические праймеры для постановки ПЦР при диагностике ЧМЖЖ;
- отработаны оптимальные условия постановки РДП, РСК для диагностики ЧМЖЖ;
- отработаны оптимальные условия постановки РН с использованием штамма «Кентау-7» вируса ЧМЖЖ на культурах клеток ПЯ;
- отработаны оптимальные условия постановки прямого варианта ИФА для обнаружения антигена вируса ЧМЖЖ методом одного разведения;
- отработаны оптимальные условия постановки непрямого варианта ИФА для выявления вирусспецифических антител против ЧМЖЖ методом одного разведения;
- отработаны оптимальные условия постановки ПЦР для диагностики ЧМЖЖ;
- с использованием разработанных тест-систем проведен мониторинг по ЧМЖЖ на территории Республики Казахстан, Таджикистан и Кыргызской Республики.

Практическая значимость полученных результатов. Предложен способ изготовления культурального антигена на основе штамма «Кентау-7» вируса ЧМЖЖ для постановки РДП, РСК, ИФА и иммунизации животных.

Рекомендована схема получения специфической сыворотки против вируса ЧМЖЖ с использованием культурального антигена и антивидовой кроличьей сыворотки, а также методы выделения и очистки вирусспецифических иммуноглобулинов.

На основании проведенных исследований разработаны и рекомендованы ветеринарной практике комплексные тест-системы РДП, РСК, РН, ИФА и ПЦР, предназначенные для выявления возбудителя ЧМЖЖ, специфических антигенов вируса ЧМЖЖ в органах и тканях больных и павших животных, а также антител против вируса ЧМЖЖ в сыворотках крови вакцинированных, переболевших и гипериммунизированных животных.

Разработана нормативно-техническая документация:

- набор препаратов для лабораторной диагностики чумы жвачных животных и идентификации возбудителя болезни (Технические условия ТУ 31 00 РК-389343366-РГКП-

37-2003, Временная инструкция по изготовлению и контролю и Временное наставление по применению), 2003 г.;

- тест-система для лабораторной диагностики чумы мелких жвачных животных методом полимеразной цепной реакции (Стандарт организаций СТ ДГП 3893436-001-2006, Временная инструкция по изготовлению и контролю и временную наставлению по применению), 2006 г.;

- тест-система [набор] для выявления антител к вирусу чумы мелких жвачных животных методом иммуноферментного анализа (себя, Стандарт организаций СТ 405-1919-04ГП-088-2015, Временная инструкция по изготовлению и контролю и временное наставление по применению), 2015 г.;

- тест-система (набор препаратов) для лабораторной диагностики чумы мелких жвачных животных и индикации антигена возбудителя болезни методом иммуноферментного анализа (Стандарт организаций СТ ДГП 38934366-017-2009, Временная инструкция по изготовлению и контролю и временную наставлению по применению), 2009 г.;

- тест-система [набор] для лабораторной диагностики чумы мелких жвачных животных методом иммуноферментного анализа (Стандарт организаций СТ 405-1919-04ГП-089-2015, Временная инструкция по изготовлению и контролю и временное наставление по применению), 2015 г.;

- Рекомендация по проведению противозооотических и профилактических мероприятий при чуме мелких жвачных животных, утверждена главным государственным ветеринарным инспектором Республики Казахстан, Директором Департамента ветеринарного надзора МСХ Республики Казахстан, 2006 г.

Экономическая значимость полученных результатов.

Применение диагностических тест-систем на основе РДП, РСК, РН, ИФА, ПЦР позволит с высокой точностью выявлять очаги эпизоотий ЧМЖЖ на территории Республики Казахстан, а также сопредельных стран с Республикой Казахстан и принимать целенаправленные меры борьбы.

Разработанные тест-системы обеспечивают эффективное проведение мониторинговых исследований по ЧМЖЖ на территории Республики Казахстан.

Тест-системы не будут уступают зарубежным аналогам и дешевле, чем зарубежные тест-системы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- изучение эпизоотической ситуации в мире и на территории Республики Казахстан по ЧМЖЖ;

- разработка РДП, РСК, РН, ИФА и ПЦР для диагностики ЧМЖЖ;

- разработка тест-системы для мониторинговых исследований по ЧМЖЖ на территории Республики Казахстан, Таджикистан и Кыргызской Республики;

- разработка тест-системы для определения поствакцинального иммунитета вируса ЧМЖЖ.

Личный вклад соискателя.

Все разделы научной работы выполнены при личном участии автора.

Апробация результатов исследований. Основные положения диссертации доложены на Международной научно-практической конференции «Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития», посвящённой 50-летию НИИ биологической безопасности НЦБ МОН РК» Алматы, 2008 г.; на Международном ветеринарном конгрессе «Ветеринария на пути инновационного развития агропромышленного комплекса». Алматы. 6 ноябрь 2015 г.; на Международной конференции «New Technologies in medicine and experimental Biology». Hochiminh-PhanTiet (Vietnam). 24 February – 8 March, 2010 г., на Международном научно-практическом семинаре, посвящённом 90-летию академика Мустакимова Р.Г. «Обеспечение национальной системы биологической безопасности» 30-31 октября 2014 г.; на Международной научно-

практической конференции посвященной 80-летию заслуженного ученого, профессора В.Л. Зайцева «Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности», 2015 г., на Международной научно-практической конференции «Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел», посвященной 110-летию юбилею Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко г. Москва, 2008 г.; на Международной конференции «Состояние и перспективы развития производства ветеринарных биопрепаратов», Алматы-2006 г..

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях.

По материалам диссертационной работы опубликовано 46 научных трудов, в том числе 31 статьи, 12 тезисов и 3 инновационных патента.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 359 страницах компьютерного текста (Microsoft Word) и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, списка литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 47 рисунками, 70 таблицами. Библиографический указатель включает 489 источников литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении представлены общие сведения, отражающие состояние заболеваемости чумой жвачных животных и обоснована актуальность разработки тест-систем для диагностики ЧМЖЖ.

В главе 1 «Обзор литературы». По литературным источникам дана характеристика существующих мировых технологий производства тест-систем для диагностики РДП, РСК, РН, ИФА и ПЦР для диагностики ЧМЖЖ и проведения мониторинговых исследований.

В главе 2 «Материалы и методы исследований» дана характеристика объектов исследований и методических подходов к выполнению исследовательской работы.

В опытах использован следующий биологический материал: вирус болезни ЧМЖЖ, штаммы «Кентау-7» (выделен из биологического материала козлят на территории Республики Казахстан в 2005 г.) и «G-45МК», выращен стационарным способом в культуре клеток ПЯ с титром инфекционности не менее $4,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. В опытах использованы овцы и козы местной казахской породы в возрасте от 1 до 3 лет массой от 30 до 50 кг; кролики массой от 2 до 3 кг, перевиваемые линии культур клеток почки овцы (ПО) и почки зеленой мартышки (Vero), почки коровы (MDBK), почки свиней (ПС), а также первичные культуры клеток почек ягнят (ПЯ), телят (ПТ), тестикулы ягнят (ТЯ) и почки кролика (ПК).

Методы исследований.

Эпизоотическую ситуацию по ЧМЖЖ исследовали методом анализа статистических данных и отчетности Департамента ветеринарии МСХ РК, а также по данным МЭБ и ФАО.

Выделение изолята вируса ЧМЖЖ проводили на чувствительных системах из биоматериала, взятого от павшего козленка в с. Буратышкан Кентауского округа Южно-Казахстанской области.

Для заражения первично-трипсинизированных и перевиваемых линий культур клеток вирусом ЧМЖЖ культуру в пробирках со сформировавшимся монослоем заражали культуральной вирусосодержащей суспензией с 200 ед/мл пенициллина и стрептомицина в объеме $0,2 \text{ см}^3$ на каждую пробирку. Контакт вирусосодержащего материала с монослоем осуществляли в течение 1 часа при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, после чего материал сливали и заливали по 1-1,5 см^3 питательной среды ПСП. Смену среды проводили питательной средой с 2-5% нормальной сыворотки крупного рогатого скота через каждые 2-3 сут.

Для приготовления органо-тканевых антигенов навеску органа измельчали с помощью ножниц и растирали в ступке со стерильным кварцевым песком. Готовили 10-20 % суспензию органов на стерильном физиологическом растворе. Полученную суспензию однократно замораживали при минус 40°C в течение 3 ч, оттаивали при комнатной температуре и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин. Надосадок использовали в качестве испытуемого антигена.

Для выделения РНК вируса ЧМЖЖ использовали методики, применяемые для выделения РНК из РНК-содержащих вирусов.

При отработке оптимальных условий выделения нативных РНК в опытах использовали очищенные препараты вируса чумы МЖЖ. Выделение РНК вируса проводили модифицированными методами фенольной депротеинизации.

Сбор данных нуклеотидной последовательности отдельных генов вируса ЧМЖЖ проводили с использованием данных Интернет на сайте National Centre for Biotechnology Information, объединяющий в себе все нуклеотидные последовательности баз данных Ген банка (USA), Европейской лаборатории Молекулярной биологии и Японской ДНК базы данных. Отбирали отдельные гены или их фрагменты с целью дальнейшего их анализа.

Анализ нуклеотидных последовательностей генов или их отдельных фрагментов проводили с помощью различных пакетов компьютерных программ (Vector NTI Suite 9, DNASIS MAX 1.0, BioEdit). С этой целью отбирали необходимые файлы с последовательностями и проводили выравнивание ДНК с последующим выявлением гомологичных участков.

Конструирование специфических праймеров проводили с использованием компьютерных программ GeneFisher, Primer 3, Oligo Software, Oligo6 и других.

Синтез конструированных праймеров проводили на синтезаторе олигонуклеотидов Expedite 8909, фирмы Applied Biosystems. Нарботку олигонуклеотидов осуществляли на специальных колонках с твердофазным носителем емкостью 0,05 мМ. Полноту синтеза наблюдали по тритил-выходу.

Вирусспецифические сыворотки, иммуноглобулины, иммунопероксидазные конъюгаты, специфические культуральные и нормальные (контрольные) антигены лиофилизировали в объеме 0,5-1,0 см³. Перед высушиванием к антигенам добавляли стабилизирующую среду, содержащую по 4% пептона и сахаразы, или раствор желатина до содержания его в препарате 0,5%. В иммунопероксидазные конъюгаты добавляли стабилизатор, предложенный О.Г. Башкировым в соотношении 1:1 (7,5 % сахарозы, 1,5 % желатина, 0,2 % агара, 90,8 % дистиллированной воды). Сушку проводили в вакуум-сушильном аппарате "Юзифруа" х.

Сыворотки, предназначенные для хранения в жидком виде консервировали фенолом в концентрации 0,5%. Пероксидазные конъюгаты для хранения в жидком виде смешивали 1:1 с насыщенным раствором сульфата аммония. Для комплектации тест-систем конъюгаты смешивали до 100-кратного концентрата рабочего титра с жидкими стабилизирующими растворами производства различных фирм.

Сенсибилизированные планшеты после блокировки и высушивания запаивали под вакуумом в фольгированные полиэтиленовые пакеты.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В главе 3 «Результаты исследований и их обсуждение» дана характеристика эпизоотической ситуации по ЧМЖЖ в Республике Казахстан и в мире.

Изучение и анализ эпизоотологических данных по ЧМЖЖ показал, что данное заболевание в конце 70-х годов 20 века регистрировали только на западе африканского континента в 1-2 странах. В начале 80-х годов болезнь уже регистрировали на востоке Африки, а в середине 80-х годов она перекинулась на азиатский континент, захватывая все новые страны. В настоящее время ЧМЖЖ регистрируется практически во всех странах центральной, средней и южной Азии, в странах ближнего востока и Африканского континента.

Современный нозоареал ЧМЖЖ (период 2001 – 2011 гг.) охватывает страны Африки и Евразии. Она получила распространение в 56 странах – 35 странах Африки и 21 стран Азии. Болезнь имеет тенденцию к территориальному распространению. По данным МЭБ за период 2001-2011 гг. зарегистрировано 24258 вспышек. В Африке было выявлено 6627

вспышек. На евразийском континенте в неблагополучных странах Азии диагностировано 17631 вспышек. Болезнь регистрируется в Турции, Китае, установлена в Таджикистане и Казахстане.

Уровень летальности в Азии у овец колебался от 7,5 до 66%, у коз от 16,6 до 74 %, в Африке же патогенность вируса для овец составляла от 21,6 до 72%, для коз от 5,6 до 90,1%.

Впервые ЧМЖЖ на территории Республики Казахстан диагностирована в 2003 г на территории Южно-Казахстанской и Жамбылской областей.

Особо сложна эпизоотическая ситуация по ЧМЖЖ сложилась в Республике Таджикистан, где с 1995 года зарегистрирована данная инфекция.

По результатам экспедиционных выездов в регионы Кыргызской Республики и анализ проведенных лабораторных исследований определена география распространения заболевания на данной территории.

Такая же эпизоотологическая ситуация по ЧМЖЖ отмечается и Республике Узбекистан. Однако ветеринарные службы соседнего государства умалчивают факты заболевания животных.

Таким образом, ЧМЖЖ в настоящее время представляет большую угрозу для экономики государств и должна оставаться постоянным объектом внимания для ветеринарных специалистов.

Выделение штамма «Кентау-7» вируса ЧМЖЖ для приготовления диагностических препаратов

Сотрудниками НИИПББ КН МОН Республики Казахстан в 2004 г. проведены исследования по установлению причин заболевания и гибели молодняка и взросло поголовье овец и коз в с. Буратышкан Кентауского округа Южно-Казахстанской области.

Клиническими обследованиями животных в хозяйстве установлено, что болеет, в основном, молодняк овец и коз, в то же время заболевание и падеж от ЧМЖЖ встречается и среди взрослого поголовья, с проявлением следующих клинических признаков: общее угнетение, повышение температуры тела, истечения из глаз и носа, кашель, диарея и истощение. Заболевания животных ЧМЖЖ выявлены в 3 отарах общей численностью 1200 гол, падеж среди молодняка коз, молодняка овец и взрослого поголовья, соответственно, составил 100, 50 и 2 %. В угрожаемой зоне оказались животные близлежащих сельских округов общей численностью 60 тыс. гол.

Проведено патологоанатомическое вскрытие павшего козленка от ЧМЖЖ.

Для лабораторного исследования взяты пробы органов (легкие, лимфатические узлы, селезенка, кишечник) и приготовлены суспензии для вирусологического и серологического исследования. Для выделения возбудителя болезни полученными пробами заражали первично-трипсинизированные культуры клеток ПЯ и ТЯ. В монослое культуры клеток проведены по три последовательных пассажа. На третьем пассажном уровне в монослое культуры клеток ПЯ проявлен ЦПД, характерны для вируса ЧМЖЖ. С помощью электронного микропирования, ИФА и биопробы было подтверждено наличие антигена вируса ЧМЖЖ и самого возбудителя.

Микроскопическое исследование штамма "Кентау-7" вируса чумы МЖЖ, показало, вирусные частицы имеют характерную икосаэдрическую форму, содержат капсид (белковую оболочку), который состоит из отдельных идентичных пептидных структурных субъединиц, или капсомеров, содержат наружную суперкапсидную оболочку. Вирионы без суперкапсида имели размеры около 130-150 нм. Полученный эпизоотический штамм, названный нами «Кентау-7», депонирован в коллекции штаммов микроорганизмов НИИПББ КН МОН РК (ПК - 4-05/Д от 17 ноября 2005 г.).

Выделенный от козленка эпизоотический штамм вируса ЧМЖЖ размножается на 1-2 суточной культуре клеток ПЯ при температуре от плюс 37...до плюс 38°C в течение 7-9 сут;

- биологическая активность штамма при оптимальной температуре инкубации от плюс 37...до плюс 38°C достигает $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и выше;

- антигенная активность вируссодержащей суспензии в ИФА составляет 1:16.

В настоящее время штамм успешно используется для контроля иммуногенности вирусвакцины и приготовления диагностических препаратов для диагностики ЧМЖЖ.

Подбор оптимальной системы культивирования вируса ЧМЖЖ для наработки вирусосодержащего материала и приготовления специфического антигена

Активность специфического антигена зависит от условий культивирования клеток. Для этого нами проведен ряд опытов с использованием первичных (ПЯ, ТЯ, ПТ, ПК) и перевиваемых (ПО, Vero, МДВК, ПС) культур клеток. С целью адаптации вируса к каждой культуре проведено по 3 последовательных пассажа в пробирках. После 3 пассажа полученный вирусосодержащий материал исследован на биологическую активность путем титрования и использован для заражения матрасов соответствующей культурой. Зараженные матрасы помещены при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ для инкубирования. Ежедневно вели наблюдение за изменениями в монослое через световой микроскоп. Учитывали сроки наступления ЦПД. После поражения монослоя на 80-100% матрасы были использованы для приготовления специфического антигена. Полученные препараты исследовали в РДП на активность и специфичность со специфической и нормальной сыворотками при ЧМЖЖ. Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Подбор оптимальной среды культивирования вируса ЧМЖЖ

Параметры	Культура клеток							
	ПЯ	ПО	Vero	МДВК	ТЯ	ПС	ПТ	ПК
Сроки наступления ЦПД, сут	4-5	4-5	4-5	4-5	7-8	7-8	6-8	8-14
Биологическая активность, $\lg\text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	$5,43 \pm 0,26$	$5,17 \pm 0,14$	$4,75 \pm 0,25$	$5,71 \pm 0,22$	$4,25 \pm 0,25$	$5,50 \pm 0,25$	$4,00 \pm 0,25$	$5,75 \pm 0,25$
Активность специфического антигена в РДП с SS _{ЧМЖЖ}	$4,71 \pm 0,49$	$3,33 \pm 0,58$	$2,33 \pm 0,67$	$4,33 \pm 0,52$	$1,67 \pm 0,58$	$4,67 \pm 0,58$	$1,33 \pm 0,58$	$4,33 \pm 0,58$
Активность специфического антигена в РДП с SN _{ЧМЖЖ}	-	-	-	-	-	-	-	-
Активность нормального антигена в РДП	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечания: 1. SS_{ЧМЖЖ} – сыворотка специфическая при ЧМЖЖ. 2. SN_{ЧМЖЖ} – сыворотка нормальная при ЧМЖЖ. 3. «-» - отрицательный результат.

Из данных таблицы 1 следует, что вирус размножался на всех указанных культурах клеток. При этом наибольшее накопление вируса и антигена происходило на ПЯ, МДВК, ПС и ПК – титры вируса составили $5,43-5,75 \lg\text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, титр антигена в РДП составил $4,33-4,71 \log_2$. В культурах клеток ПО, Vero, ТЯ и ПТ отмечены низкие показатели – биологическая активность $4,00-5,17 \lg\text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и титр антигена $1,33-3,33 \log_2$. Препараты, приготовленные из незараженных культур клеток, показали отрицательный результат с обеими сыворотками.

В дальнейших опытах по наработке вирусосодержащего материала и приготовлению специфического антигена ЧМЖЖ были использованы культуры клеток ПЯ и МДВК. Поскольку ПС и ПК показали более поздние сроки наступления ЦПД, их не использовали.

С целью получения наиболее активного препарата необходимо было оптимизировать сроки сбора вирусосодержащего материала ЧМЖЖ для приготовления специфического антигена. Для этого сбор материала проводили в разные сроки и исследовали на биологическую активность вируса титрованием и в РДП на активность специфического антигена.

В процессе культивирования на культуре клеток ПЯ рост активности вируса наблюдался со 1-3 сут и достигал максимума на 6-7 сут. Дальнейшее культивирование не приводило к повышению титра вируса и приводило к дегенерации монослоя и отслоению его от стекла.

Динамика накопления антигена вируса ЧМЖЖ при культивировании на культуре клеток ПЯ показывало, что антиген обнаруживается на 3-4 сут культивирования, содержание его повышается до 6-7 сут, что совпадает с максимумом титра вируса. В дальнейшем наблюдали снижение титра антигена.

Таким образом, установлено, что наибольшее накопление антигена вируса ЧМЖЖ в культуре клеток ПЯ происходит на 6-7 сут культивирования, визуально это сопровождается появлением «окон» в пораженном монослое.

Отработка условий приготовления специфического антигена ЧМЖЖ

Для отработки условий приготовления специфического антигена при ЧМЖЖ использовали клеточную суспензию зараженной культуры клеток ПЯ. С этой целью пораженный монослой снимали стерильным резиновым шпателем, полученную суспензию с разных матрасов объединяли и делили на пять равных частей для оптимизации условий приготовления антигена по 5-ти методикам.

К суспензии добавляли ПЭГ-6000 до концентрации 7%, оставляли на 16-18 ч при $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$ для формирования осадка и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 мин. Надосадок сливали, осадок ресуспендировали в дистиллированной воде в объеме, в 100 раз меньшем первоначального объема суспензии. Полученный препарат подвергали термолизису, однократно замораживая при минус 40°C и оттаивая при комнатной температуре. Центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин и диализировали против физиологического раствора в течение суток.

Суспензию концентрировали в 100 раз, подвергали однократному термолизису, замораживая при минус 40°C и оттаивая при комнатной температуре, и освещению при 4000 об/мин в течение 30 мин.

Суспензию концентрировали в 100 раз, подвергали однократному термолизису, замораживая при минус 40°C и оттаивая при комнатной температуре, и освещению при 10000 об/мин в течение 30 мин.

Суспензию концентрировали в 100 раз, подвергали трехкратному термолизису, замораживая при минус 40°C и оттаивая при комнатной температуре, для более полного освобождения вируса из клеток и освещению при 4000 об/мин в течение 30 мин.

К суспензии добавляли серноокислый аммоний до концентрации 20%, оставляли на 16-18 ч при $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$ для формирования осадка, концентрировали в 100 раз, подвергали однократному термолизису, замораживая при минус 40°C и оттаивая при комнатной температуре, и освещали при 4000 об/мин в течение 30 мин. Препарат диализировали против физиологического раствора в течение суток.

Полученные препараты были исследованы в РДП на активность со специфическими сыворотками при ЧМЖЖ и на специфичность с нормальными сыворотками козы и овцы. Результаты исследований приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Активность антигенов в РДП при разных методах приготовления

Активность антигена в РДП с	Методика приготовления антигена									
	1		2		3		4		5	
	AgS	AgN	AgS	AgN	AgS	AgN	AgS	AgN	AgS	AgN
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SS _{ЧМЖЖ} козья	3,66± 0,58	-	5,00± 0,00	-	4,33± 0,58	-	4,00± 0,00	-	3,33± 0,58	-
SS _{ЧМЖЖ} овечья	3,66± 0,58	-	5,00± 0,00	-	4,33± 0,58	-	4,00± 0,00	■	3,33± 0,58	-
Продолжение таблицы 2										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SN козья	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

SN овечья	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Примечания: 1. AgS – антиген специфический. 2. AgN – антиген нормальный; 3. SS_{ЧМЖЖ} – сыворотка специфическая при ЧМЖЖ. 4. SN – сыворотка нормальная. 5. «-» – отрицательный результат.

Наиболее активные антигены получены при использовании методики 2. Антигены, приготовленные по другим методикам, показали низкую активность. Нормальные антигены, приготовленные по этим же методикам, показали отрицательный результат со всеми сыворотками.

Получение вирусспецифических сывороток

Для получения вирусспецифических сывороток использовали вируссодержащую суспензию активностью 5,0 IgТЦД₅₀/см³, осветленную при 2000 об/мин в течение 30 мин, и специфический культуральный антиген с активностью в РДП – 4,0-5,0 log₂. Вируссодержащую суспензию использовали для предварительной вакцинации животных и получения первичного иммунного ответа. Концентрированный антиген использовали в процессе гипериммунизации. Сыворотки получали на кроликах, козах и овцах.

В опытах по гипериммунизации использовали 4 кролика, 1 козу и 1 овцу. На кроликах сыворотки получали по четырем схемам, представленным в таблице 3.

Таблица 3 - Схема гипериммунизации кроликов

№ животного	Порядок введения	Вируссодержащая суспензия	Специфический антиген	Интервал, сут
1	1	1 см ³ в/в, 3 см ³ п/к	-	2
	2	1 см ³ в/в, 4 см ³ п/к	-	1
	3	1 см ³ в/в, 4 см ³ п/к	-	7
	4	2 см ³ в/в, 4 см ³ п/к	-	7
	5	3 см ³ в/в, 4 см ³ п/к	-	
2	1	2 см ³ в/в, 3 см ³ п/к	-	7
	2	2 см ³ в/в, 4 см ³ п/к	-	7
	3	3 см ³ в/в, 5 см ³ п/к	-	
3	1	3 см ³ в/в, 4 см ³ п/к	-	7
	2	2 см ³ в/в	0,5 см ³ п/к	7
	3	2 см ³ в/в, 5 см ³ п/к	-	
4	1	-	0,05 см ³ с НАФ	7
	2	-	0,5 см ³ с НАФ	7
	3	-	0,5 см ³ с НАФ	7
		-	1,0 см ³ с НАФ	

Примечания: 1. в/в – внутривенно. 2. п/к – подкожно. 3. НАФ – неполный адьювант Фрейнда.

Материал вводили внутривенно через ушную вену и подкожно в область подколенных лимфатических узлов. По окончании гипериммунизации спустя 7 суток у животных отбирали кровь для исследования в РДП. Результаты исследований приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Активность специфических сывороток против вируса ЧМЖЖ

№ животного	Активность сывороток в РДП с	
	AgS _{ЧМЖЖ}	AgN

1	4,5±0,71	4,5±0,71
2	3,0±0,00	2,0±0,00
3	5,0±0,00	5,0±0,00
4	5,5±0,71	4,5±0,71

Примечания: 1. AgS – антиген специфический. 2. AgN – антиген нормальный.

Сыворотки, полученные на кроликах по схемам 1, 3 и 4, оказались высокоактивными, но при этом показали равнозначный уровень не специфичности в реакции с нормальным антигеном. Сыворотка, полученная по схеме 2, была менее активной, неспецифический фон оказался ниже на одно разведение.

Для получения специфической сыворотки против вируса ЧМЖЖ на козах и овцах использован специфический антиген, очищенный на сахарозной подушке.

С использованием очищенного антигена в последующих опытах получали специфическую сыворотку по следующим схемам (табл. 5).

Таблица 5 - Схема гипериммунизации козы и овец с использованием очищенного на сахарозной подушке специфического антигена ЧМЖЖ

Животное	№ введения	AgS очищенный	Интервал, сут
Коза	1	1,5 см ³ в/в, 0,5 см ³ п/к	7
	2	1,5 см ³ в/в, 2 см ³ п/к	7
	3	5 см ³ в/в	10
	4	5 см ³ в/в, 3 см ³ п/к с сапонином	7
	5	5 см ³ в/в, 5 см ³ п/к с сапонином	
Овца 1	1	2 см ³ в/в, 2 см ³ п/к с сапонином	10
	2	4 см ³ в/в, 4 см ³ п/к с сапонином	10
	3	5 см ³ в/в, 5 см ³ п/к с сапонином	
Овца 2	1	3 см ³ в/в и 3 см ³ п/к	7
	2	6 см ³ в/в и 6 см ³ п/к с сапонином	7
	3	9 см ³ в/в и 9 см ³ п/к	7
	4	12 см ³ в/в и 12 см ³ п/к	

Примечания: 1. AgS – антиген специфический. 2. в/в – внутривенно. 3. п/к – подкожно.

Антиген вводили внутривенно через яремную вену и подкожно в область подколенных лимфатических узлов. В процессе гипериммунизации уровень содержания специфических антител накапливался у козы до 5,0 log₂ при пятикратном введении антигена без неспецифической реакции. Другая картина наблюдалась при гипериммунизации овец. В их крови антитела накапливались до уровня 3,0 log₂ при трехкратном введении антигена. При дальнейшем введении препарата рост уровня антител не происходил, и появлялась не специфичность в реакции с нормальным антигеном.

Таким образом, специфические сыворотки против вируса ЧМЖЖ целесообразнее получать на козах путем пятикратной гипериммунизации с интервалом между введениями 7 сут с использованием специфического антигена, очищенного на сахарозной подушке, с добавлением сапона в качестве адъюванта.

Полученную на козе сыворотку лиофилизировали и использовали для выделения вирусспецифических иммуноглобулинов.

Отработка оптимальных параметров постановки РДП при ЧМЖЖ для обнаружения антигена и антител к нему

Отработку оптимальных параметров постановки РДП проводили с использованием агара Дифко, при этом были испытаны разные концентрации агара (от 0,8 до 1,5 %),

различные буферные растворы (0,01МФБС, 0,01М Трис-НСl, 0,15М NaCl, 8% NaCl) и дистиллированная вода для приготовления геля агара, а также различные температурно-временные условия постановки реакции. Пригодность испытуемых параметров оценивали по активности и специфичности исследованных антигенов или антител при ЧМЖЖ.

Положительные результаты в РДП получены с применением всех испытанных буферных растворов, но лучшие результаты по активности и специфичности антигенов получены при использовании 1,5 % агара Дифко в 0,01М ФБС. Активность антигена из штамма «Кентау-7» составила 1:16-1:32, а антигена из штамма «G-45МК» 1:8-1:16.

Для определения активности антигенов при ЧМЖЖ в РДП, в зависимости от температурно-временных условий постановки реакции в опыте испытаны 24⁰С, 35⁰С и 37⁰С.

В результате РДП проходит нормально при всех испытанных температурных режимах постановки реакции, но оптимальной температурой является 37⁰С в течение 24 часов, при этом режиме достигнута наивысшая чувствительность реакции.

Аналогичные исследования проведены по отработке оптимальных параметров постановки РДП для тестирования антисывороток к вирусу ЧМЖЖ и подтверждены те же оптимальные условия.

Таким образом, установлены следующие оптимальные параметры постановки РДП в агаровом геле: применение 1,5 % агара Дифко в 0,01М ФБС и учет результатов реакции через 24 ч инкубирования при 37⁰С.

Отработанный оптимальный метод постановки РДП применен нами для обнаружения типоспецифического антигена ЧМЖЖ и антител к нему в различных вируссодержащих материалах и сыворотках. Результаты исследований представлены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6 - Результаты исследования в РДП гомологичных к ЧМЖЖ и гетерологичных антигенов при идентификации антигена или антител

Наименование проб	К-во повторностей опытов	Активность в РДП с сыворотками		
		негатив	позитив к штамму «Кентау-7», серия №1	позитив к штамму «G-45МК», серия №1
Антиген позитив из штамма «Кентау-7», серия №1, 2, 3	3-7	-	1:8-1:32	1:8-1:32
Антиген позитив из штамма «G-45МК», серия №1, 2, 3	3-5	-	1:4-1:32	1:4-1:16
Антиген негатив	5	-	-	-
Антиген позитив вирусов оспа овец, контагиозной эктимы овец, катаральной лихорадки овец	5	-	-	-

Примечание - «-» - отрицательный результат.

Все исследованные антигены ЧМЖЖ из штаммов «Кентау-7» и «G-45МК» в РДП дали положительные результаты с активностью 1:8-1:32 и 1:4-1:16 соответственно. Предлагаемый метод РДП пригоден для обнаружения антигена ЧМЖЖ в вируссодержащем материале.

Таблица 7- Результаты исследования в РДП сывороток к ЧМЖЖ от гипериммунизированных и переболевших животных

Наименование сывороток	Кол-во	Активность в РДП с
------------------------	--------	--------------------

	повтор- ностей опыта	антиген негатив, серия №1	антиген позитив из штамма «Кентау-7», серия №1	антиген позитив из штамма «G- 45МК», серия №1
Сыворотка позитив к штамму «Кентау-7»	5	-	1:4-1:8	1:2-1:4
Сыворотка позитив к штамму «G-45МК»	5	-	1:2-1:4	1:2-1:4
Сыворотка от переболевшей овцы и коз, Республики Таджикистан и Казахстан	3	-	1:2-1:16	1:2-1:8
Сыворотка негатив, козья и овечья	3	-	-	-
Сыворотка позитив к вирусам оспа овец, контагиозной эктимы овец, катаральной лихорадки овец	3	-	-	-

Примечание - «-» - отрицательный результат.

Результаты, представленные в таблице 7, показывают, что активность исследованных сывороток от гипериммунных и переболевших ЧМЖЖ животных в РДП составила 1:2-1:16. Предлагаемый метод РДП пригоден для выявления антител к вирусу ЧМЖЖ в сыворотках от переболевших и гипериммунизированных животных.

Таким образом предложены следующие оптимальные параметры постановки РДП в агаровом геле при ЧМЖЖ: применение 1,5 % агара Дифко в 0,01М ФБС и учет результатов реакции через 24 ч инкубирования при 37⁰С.

Разработка РСК для диагностики ЧМЖЖ

Для получения гемолизина иммунизировали кроликов весом 2-2,5 кг, свежеприготовленными эритроцитами барана. При этом кроликам пятикратно внутривенно вводили по 1 см³ свежеприготовленных эритроцитов барана с интервалом между введениями 7 суток. Через 7 сут после последней инъекции у кроликов брали пробу крови из яремной вены и определяли активность. При активности гемолизина 1:2000 кроликов тотально обескровливали. Полученные сыворотки использовали для оптимизации условий постановки РДСК в качестве гемолизина.

Для определения титра гемолизина готовили серию его разведений на физиологическом растворе и затем испытывали в этих разведениях. Для приготовления первого разведения - 1:100, брали 0,1 мл гемолизина и 9,9 мл физиологического раствора. Затем строили геометрический ряд разведений на физиологическом растворе по 0,5 мл с каждого разведения. После чего вносили по 0,5 мл 2,5%-ных эритроцитов барана, 0,5 мл комплемента в соотношении 1:10. Инкубировали на водяной бане в течение 10 мин при 37⁰С, после чего производили учет реакции.

Рабочим разведением гемолизина считается четырехкратная концентрация от его предельного титра (предельный титр гемолизина 1:2000), рабочее разведение составляет 1:500. Для дальнейшей работы гемолизин в рабочем разведении смешивали с равным количеством 2,5% взвеси эритроцитов барана. Полученная смесь называется гемолитической системой (гемсистемой).

Для постановки РДСК использовали коммерческий комплемент производства ФГУП «НПО Микроген» Россия, ТУ 9389-029-14237183-2007.

Титрование комплемента проводили по методу Смородинцева. Реакцию ставили на физиологическом растворе.

Рабочим разведением комплемента считается двукратная концентрация от его предельного титра. По результатам опыта установлено, что предельный титр комплемента составил 1:35,8.

Для оптимизации условий постановки РДСК использованы следующие компоненты: антиген специфический и нормальный, сыворотка специфическая и нормальная, комплемент, гемолизин и эритроциты барана. Отработку оптимальных параметров постановки РДСК проводили в фазе связывания 18 ч при 4°C и фазе выявления 30 мин при 37°C. При этом испытаны разные концентрации антигена, сывороток, комплемента, гемолизина и эритроцитов барана, различные буферные растворы (0,01 МФБС и 0,15 М NaCl), а также различные температурно-временные условия постановки реакции.

Комплементсвязывающую активность и специфичность сывороток проверяли в РДСК со стандартными (специфический и нормальный) антигенами в рабочем разведении на физиологическом растворе.

Испытуемые нормальные и специфические сыворотки исследовали в разведениях 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 и 1:64. Каждая сыворотка испытывалась с нормальными и специфическими антигенами, которые брали в рабочем разведении. Использовали 2 гемолитические единицы комплемента для козьих сывороток и 1,5 – для овечьих, которые определяли в предварительном титровании комплемента. В нашем случае комплемент 1:35,8, то для овечьих сывороток рабочее разведение комплемента будет 1:23,9, а для козьих сывороток 1:17,9. Все разведения антигенов и сывороток готовили на физиологическом растворе.

Гемолизин использовали в учетверенном титре в разведении 1:500, в смеси с равным объемом 2,5%-ой взвеси эритроцитов барана (гемсистема). Все компоненты реакции использовали в объеме 0,1 см³. Общий объем смеси реакции составляет 0,5 см³.

Сыворотку предварительно разводили и прогревали в водяной бане при различных температурах (56; 58; 60; 61,5 и 63,5)°C. Фазу связывания комплемента проводили в холодильнике при (4±1)°C в течение 18 ч, фазу выявления результатов РДСК - в термостате при (37±1)°C в течение 30 мин.

Установлено, оптимальной температурой для инактивации сывороток является 58 или 60°C.

Для постановки реакции брали в полуторном, удвоенном и учетверенном титрах, то есть если предельная активность комплемента была 1:35,8, то его рабочее разведение составляло 1:23,9; 1:17,9 и 1:8,95 соответственно. Исследуемые сыворотки крови овец и коз до постановки главного опыта предварительно инактивировали (59±1)°C в течение 30 мин.

Установлено, оптимальной концентрацией комплемента при постановке РДСК для овечьих сывороток является его полуторный титр, то есть 1:23,9, а для козьих сывороток предварительная инактивация повлияла негативно. А оптимальной концентрацией комплемента при постановке РДСК для козьих сывороток является его удвоенный титр, то есть 1:17,9.

Для изучения влияния солевых растворов на результаты РДСК в опыте испытаны 0,01М ФБС с pH 7,2 и 0,15М NaCl с pH 6,8.

Положительные результаты в РДСК получены с применением всех испытанных буферных растворов, но лучшие результаты получены при использовании 0,15М NaCl с pH 6,8. Активность сыворотки составила 1:32.

Были испытаны различные температурно-временные режимы связывания компонентов реакции между собой при оптимизации условий постановки РДСК. Установлено, что для фазы связывания (антиген + антитело + комплемент) достаточно 18 ч при 4°C, а для выявления (антиген + антитело + комплемент + гемсистема) 30 мин при 37°C.

Таким образом, установлены следующие оптимальные параметры постановки РДСК: РДСК ставить на физиологическом растворе; испытуемые нормальную и специфическую сыворотки исследовать в разведениях 1:4, 1:8, 1:16, 1:32; до постановки главного опыта

сыворотки от овец предварительно прогревают в водяной бане при температуре $(59 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин; сыворотки от коз используют без прогрева; в реакции использовать двукратный сниженный титр комплемента для козьих сывороток, а для овечьих сывороток полуторный титр; гемолизин использовать в учетверенном титре; фазу связывания комплемента проводить в холодильнике при $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18 ч, а фазу гемолиза - в термостате при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин.

Результаты реакции начинают учитывать с контролей, при этом в пробирках, содержащих нормальную контрольную сыворотку с нормальным и специфическим антигенами и без них должен наступить полный гемолиз эритроцитов. В пробирках, содержащих специфическую сыворотку со специфическими антигенами, должна наблюдаться задержка гемолиза эритроцитов, положительный результат оценивается в четырех и трех крестах ("++++, +++-" - положительный результат).

Специфичность РДСК исследовать, используя сыворотки, специфические к данному вирусу, гетерологичные (оспы и контагиозной эктимы овец, катаральной лихорадки овец) и нормальные (контрольные) сыворотки крови овец. Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Специфичность РДСК при ЧМЖЖ

Сыворотка	Рабочее разведение антигена	Разведения сыворотки				
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
СС ЧМЖЖ из штамма «Кентау – 7»	АгС	++++	++++	++++	++++	+++-
	АгН	----	----	----	----	----
	ФР	----	----	----	----	----
СС ЧМЖЖ из штамма «G-45» МК	АгС	++++	++++	++++	++++	----
	АгН	----	----	----	----	----
	ФР	----	----	----	----	----
СС оспы овец, КЛО, КЭО	АгС	----	----	----	----	----
	АгН	----	----	----	----	----
	ФР	----	----	----	----	----
Сыворотка нормальная	АгС	----	----	----	----	----
	АгН	----	----	----	----	----
	ФР	----	----	----	----	----

Примечания: 1 «++++, +++-» - положительный результат. 2 «-» - отрицательный результат. 3 «АгС/АгН» - специфический/нормальный антиген. 4 «ФР» - физиологический раствор.

Как видно из данных таблицы 8, активность специфической сыворотки к штаммам составила в РДСК 1:16-1:64 при отрицательной реакции с гетерогенными и нормальными (контрольными) сыворотками. Таким образом, разработанная нами тест-система при ЧМЖЖ специфична.

Разработка условий постановки РН при ЧМЖЖ

Для оптимизации условий постановки РН в опыте использованы штаммы «Кентау-7» и «G-45» вируса ЧМЖЖ и гомологичную к нему иммунную сыворотку животных.

Для определения зависимости между дозами вируса, используемыми в реакции и выявляемостью вируснейтрализующих антител в экспериментах использовали вирус в дозах от 10 до 100000 ТЦД₅₀, которые испытывали с сывороткой в разведении от 1:4 до 1:64.

Установлено, что иммунная сыворотка подавляла цитопатогенное действие различных доз вируса. Так, при применении 10 ТЦД₅₀ вируса титр антител иммунной сыворотки был равен 1:64 в течение 14 дней. Большие дозы вируса (от 100 до 100000 ТЦД₅₀) также нейтрализовались иммунной сывороткой, но в меньших разведениях. Следовательно, выявляемость антител в сыворотках увеличивается при использовании меньших доз вируса и

снижается при их увеличении. Из таблицы видно, что доза 1000 ТЦД₅₀ вируса подавлялась разведением сыворотки 1:4 во все дни наблюдения.

Эта доза будет достаточна для качественной характеристики любой вируснейтрализующей сыворотки. Для выяснения оптимальной температуры постановки РН и длительности контакта смеси вирус-сыворотка ставили реакцию при температурах 4°, 26° и 37°, соответственно, выдерживая смесь вирус-сыворотку в течение 1 и 24 часов при температуре 4°, 1 и 2 ч при 26° и 30, 60, 90, 120 мин при 37°.

Максимальное выявление нейтрализующих антител в испытуемой сыворотке проходило при температурах 26° и 37°. При этой температуре разведение сыворотки 1:128 подавляло цитопатогенное действие вируса во все сроки контактирования смеси. В то же время в реакции, проходящей при 4°, активность сыворотки была лишь в разведении 1:64. Следовательно, оптимальным временем контактирования вируса с сывороткой при температуре 26° и 37° является 1 час. Более длительное контактирование смеси при 26° и 37° не приводит к увеличению титра сыворотки, а уменьшение срока контактирования при 37° до 30 минут обуславливает снижение её титра до 1:64, что может привести к неправильной оценке активности сыворотки.

Были изучены различные разбавители компонентов РН.

Их разводили физраствором, раствором Хенкса, 0,5% раствором гидролизата лактальбумина на растворе Хенкса, 0,5% раствором гидролизата лактальбумина на растворе Хенкса с 2%, 5% и 10% сыворотки крови крупного рогатого скота. Реакцию ставили с 1000 ТЦД₅₀ вируса при температуре 37°, при контакте смеси вирус-сыворотка в течение 1 часа.

В результате установлено, что использование различных растворов и питательных сред в качестве разбавителей компонентов не выявило преимуществ какого-либо одного из них. В дальнейших опытах для разбавления сывороток использовали раствор Хенкса.

Далее нами была испытана применимость условий постановки в других клеточных системах с этими штаммами вируса ЧМЖЖ. Для этого применили первично-трипсинизированные культуры клеток из ПЯ и ТЯ. Реакцию ставили при температуре 37° с 1000 ТЦД₅₀ вируса. Время контакта вируса с сывороткой 1 час. Результаты опытов показаны в таблице 9.

Иммунная сыворотка овец оказалась активной и подавляла цитопатогенное действие вируса в разведении 1:128, как в культуре клеток ПЯ, так и в ТЯ. Одновременно в контрольных пробирках с нормальной сывороткой, разведенной 1:4, было четко выражено цитопатогенное действие. Отработанные условия постановки РН со штаммами вируса ЧМЖЖ в культурах клеток ПЯ и ТЯ оказались применимыми и для других штаммов вируса ЧМЖЖ.

Таблица 9 – Титр антител в иммунной овечьей сыворотке на штаммы вируса ЧМЖЖ при постановке РН в культурах клеток ПЯ и ТЯ

Культуры клеток	Разведения иммунной сыворотки					
	4	8	16	32	64	128
штамм «Кентау-7»						
ПЯ	-	-	-	-	-	+
ТЯ	-	-	-	-	-	+
штамм «G-45»						
ПЯ	-	-	-	-	-	+
ТЯ	-	-	-	-	-	+

Примечания: 1. + - наличие цитопатогенного действия. 2. - - отсутствие цитопатогенного действия.

Таким образом, для постановки РН при ЧМЖЖ приемлемыми являются следующие схемы. Все сыворотки для постановки РН используют после предварительной инактивации

при $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Готовят последовательные двукратные разведения сывороток от 1:4 до 1:128 и смешивают с 1000 ТЦД50/мл вируса ЧМЖЖ в равных объемах. Полученные смеси инкубируют 1 ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и инфицируют по 4 пробирки с культурой клеток в объеме 1 см^3 на каждую пробирку. В качестве контроля служат 4 пробирки с культурой, инфицированной смесью вируса с нормальной сывороткой в разведении 1:10. Смену питательной среды проводят каждые 3 дня.

Учет результатов РН проводят путем ежедневного просмотра пробирок с культурой под световым микроскопом.

За титр антител принимают наивысшее разведение сыворотки, подавляющее развитие ЦПД вируса в 50% пробирок с инфицированной культурой клеток.

Выделение вирусспецифических иммуноглобулинов из сывороток крови гипериммунизированных животных

Результаты постановки ИФА напрямую зависят от качества приготовленных конъюгатов, которое зависит от качества используемых для их приготовления иммуноглобулинов. В связи с этим необходимо было отработать метод выделения и очистки глобулинов из специфических сывороток. Нами использованы две специфические сыворотки: козью, с активностью в РДП $5,0\text{ log}_2$ – серия 1 и овечью, с активностью в РДП $3,0\text{ log}_2$ – серия 2.

Для выделения иммуноглобулиновой фракции из вирусспецифических сывороток использовали четыре методики:

- ступенчатым трехкратным осаждением белков сыворотки крови различными концентрациями этилового спирта по методу Кона;
- трехкратным осаждением глобулиновой фракции из сыворотки крови сульфатом аммония;
- осаждение глобулиновой фракции из сыворотки крови спиртово-хлороформным методом;
- осаждение глобулиновой фракции из сыворотки крови хлористым натрием.

Полученные препараты иммуноглобулинов использовали для приготовления конъюгатов периодатным методом.

Препараты иммуноглобулинов были исследованы в РДП и конъюгатов в ИФА на активность и специфичность.

Установлено, что все способы выделения вирусспецифических иммуноглобулинов из сывороток крови позволяют получить достаточно активные препараты. При этом наибольшее содержание глобулина получено при выделении сульфатом аммония и спиртово-хлороформным методами. Конъюгаты, приготовленные на основе этих глобулинов, были исследованы в ИФА. При этом наилучшие результаты были получены с использованием ВИГ, полученного трехкратным спиртовым осаждением. Остальные конъюгаты показали низкую активность и неспецифический фон. Активность иммуноглобулина составила $6,0\text{ log}_2$, а приготовленного конъюгата $11,64\text{ log}_2$.

Получение антивидовых сывороток и приготовление антивидовых иммунопероксидазных конъюгатов

Для выявления в ИФА вирусспецифических антител в сыворотках крови вакцинированных и переболевших животных необходим качественный специфичный антивидовой конъюгат. Качество конъюгата зависит от качества полученной антивидовой сыворотки.

Антивидовые сыворотки получали на кроликах путем гипериммунизации нормальным иммуноглобулином сыворотки крови овец. Нормальные иммуноглобулины получали из нормальных сывороток трехкратным спиртовым осаждением методом Кона.

Результаты проведенных опытов показали, что наиболее активные сыворотки против антител овцы были получены на кроликах по третьей схеме. Сыворотки, полученные по первым двум схемам, показали меньшую активность.

Была изучена эффективность различных адъювантов для получения высокоактивной антивидовой антиовечьей сыворотки

В качестве адъювантов использовали полный и неполный адъюванты Фрейнда, Монтаниды ISA50, ISA206, IMS1313 («Seppic») и адъювант на основе минерального масла «Маркол».

В опытах использовали кроликов средней массой 2,5-3 кг в количестве 18 голов. Полученные сыворотки исследовали в РДП, они имели достаточно высокие титры антител против иммуноглобулинов овцы. Активность сывороток, полученных с использованием неполного адъюванта Фрейнда (НАФ), составляла $5,66 \pm 0,58$. Сыворотки, полученные с использованием полного адъюванта Фрейнда (ПАФ) имела активностью $6,00 \pm 0,00$. Монтанид ISA50 показал несколько большую эффективность по сравнению с ПАФ: $6,33 \pm 0,58$. Сыворотка, полученная с использованием монтанида ISA206, имела активность, сравнимую с ПАФ – $6,00 \pm 0,00$.

Эмульсии, полученные с вышеперечисленными адъювантами, имеют стабильно вязкую консистенцию, приобретенную в результате длительного эмульгирования с раствором белка. В отличие от них эмульсия, получаемая с монтанидом IMS1313, оставалась жидкой. Данный адъювант показал самую низкую эффективность – средний титр сывороток составил $4,67 \pm 0,58$.

Самую высокую эффективность показал адъювант на основе минерального масла «Маркол». Активность сывороток составила $7,00 \pm 0,00$. Эмульсия, образованная этим адъювантом, имела стабильную вязкую консистенцию. При вскрытии животных отмечено сильное увеличение лимфатических узлов, у одного кролика на коже на внутренней стороне бедер отмечены язвенные поражения, что указывает на высокую реактогенность адъюванта.

Следовательно, наиболее активные антивидовые сыворотки против иммуноглобулинов овцы при иммунизации кроликов могут быть получены с использованием адъюванта на основе минерального масла Маркол путем четырехкратной иммунизации возрастающих доз белка 3, 4, 5, 6 мг на одно животное.

Нами были изучены различные способы приготовления конъюгата. Были исследованы четыре методики приготовления конъюгата: усовершенствованный периодатный метод Wilson M.B. и Nakane P.K.; периодатный метод Nakane P.K. и Kawaoi A.A.; двухстадийный глутаральдегидный метод и модифицированный двухстадийный глутаральдегидный метод.

Конъюгаты исследовали путем титрования со специфическими сыворотками. Результаты учитывали на фотометре BioRad model 680 при длине волны 405 нм. В результате, конъюгаты показали различную активность. Так, самую низкую активность показали конъюгаты, приготовленные глутаральдегидным методом (3) – титр конъюгата составил $10,32 \log_2 (1:1280)$ и периодатным методом (2) Nakane P.K. и Kawaoi A.A. – титр конъюгата составил $11,32 \log_2 (1:2560)$. Более высокую активность показал конъюгат, приготовленный модифицированным глутаральдегидным методом (4) – его титр составил $12,32 \log_2 (1:5120)$. Лучшие результаты показал конъюгат, приготовленный по периодатному модифицированному методу Wilson M.B. и Nakane P.K. (1), его титр составил $13,32 \log_2 (1:10240)$.

Следовательно наиболее эффективным методом приготовления антивидового кроличьего конъюгата против иммуноглобулинов овцы является модифицированный периодатный метод Wilson M.B. и Nakane P.K.

Стабилизация диагностических препаратов при ЧМЖЖ и определение их сохранности в течение срока годности

Известно, что диагностические препараты в монофильном состоянии сохраняют свою активность значительно дольше, чем в нативном. Однако для комплектации тест-систем, в основном, применяются препараты в жидком виде, а планшеты уже сенсibilизированы. При хранении в жидком виде биокomпонентов существует опасность бактериального пророста и деградация специфических компонентов под действием протеаз. В связи с этим представляет интерес изучить различные способы хранения диагностических препаратов.

Сыворотки разливали по ампулам в объеме 1 см³, антигены и конъюгаты – по 0,5 см³. После лиофилизации ампулы запаивали под вакуумом.

Для хранения в жидком виде сыворотки консервировали фенолом в концентрации 0,5%, антигены консервировали тимеросалом в концентрации 0,01%. После термолиза в процессе приготовления антигена в среду входит множество ферментов, в том числе протеолитических, разрушающих белки, в том числе и антигены. Для блокирования их разрушающего действия добавляли к антигенам и сывороткам ингибитор протеаз. Конъюгаты консервировали насыщенным сульфатом аммония для хранения в концентрированном виде и стабилизирующим буфером для пероксидазных конъюгатов фирмы «Sigma» и 50% глицерином – для хранения в виде 100-кратного концентрата. Кроме того, были подготовлены иммуносорбенты с антителами и антигенами. Планшеты сорбировали компонентами в рабочем разведении, блокировали 1% БСА и запаивали под вакуумом в фольгированных полиэтиленовых пакетах.

В процессе хранения препараты исследовали в ИФА в рабочем разведении, установленном перед закладкой на хранение, для определения сохранности в течение срока годности иммуноферментных тест-систем (12 месяцев). Результаты учитывали по оптической плотности препаратов.

Установлено, конъюгат без консервирования в процессе хранения снижает активность на 97%, лиофилизированный сохраняет свою активность практически без изменений. Также не меняется активность конъюгата, растворенного в специальном стабилизирующем буфере («Sigma»), добавление насыщенного раствора сульфата аммония сохраняет активность концентрированного конъюгата на 95% в течение 12 месяцев, стабилизация в 50% глицерине сохраняет активность на 71%.

Антиген в процессе хранения сохраняет свою активность практически в первоначальном значении при лиофилизации и добавлении консерванта с ингибиторами протеаз. Добавление одного консерванта сохраняет активность препарата в течение 12 месяцев на 64%. Это говорит о том, что в препарате антигена сохраняется протеазная активность, что вызывает снижение его активности в процессе хранения.

Вирусспецифическая сыворотка аналогично антигену сохраняет свою активность в течение всего срока хранения в неизменном виде при лиофилизации и добавлении консерванта с ингибиторами протеаз. При добавлении одного только консерванта активность сохраняется на 75%.

Изучение способов стабилизации иммунопероксидазных конъюгатов в процессе постановки ИФА.

Были проведены опыты по сохранению стабильности конъюгата в процессе постановки ИФА. Для этого исследовали ряд дополнительных реагентов, добавляемых в среду, в которой проходит контакт конъюгата с иммунокомплексом на твердой фазе (раствор для разведения конъюгата). С этой целью были исследованы следующие реагенты, добавляемые в раствор для промывания, содержащий 1% БСА: ионы Са и Mg по 0,01М, 0,4 г/л гексацианоферрата калия, 4-аминоантипирин, 3% ПЭГ-6000. Пробы конъюгатов были исследованы в прямом ИФА в 16 повторностях, продолжительность контакта составила 60 мин при температуре (37±1)°С. Результаты учитывали по оптической плотности с использованием в качестве субстрата ТМБ на фотометре BioRad Model 680.

Результаты, показали, что наиболее эффективным стабилизирующим действием в процессе контакта пероксидазного конъюгата с иммунокомплексом на твердой фазе обладает ПЭГ в концентрации 3%.

Оптимизация условий постановки ИФА для диагностики ЧМЖЖ

Данный этап работы включал оптимизацию условий постановки «сэндвич»-варианта ИФА, подбор температурно-временных режимов сенсibilизации планшет, контакта реагентов с иммобилизованной твердой фазой.

Определение оптимальной концентрации вирусспецифических иммуноглобулинов (ВИГ) осуществляли шахматным титрованием 2-х серий белка со специфическим

культуральным антигеном в «сэндвич»-варианте ИФА. Для этого готовили разведения иммуноглобулинов на 0,01М КББ от $8,96 \log_2 (1:500)$ до $17,96 \log_2 (1:256000)$, специфический антиген титровали в разведениях от $6,64 \log_2 (1:100)$ до $13,64 \log_2 (1:12800)$, нормальный антиген разводили до $5,64 \log_2 (1:50)$ и $6,64 \log_2 (1:100)$.

Таким образом, испытанные концентрации 2-х серий вирусспецифического иммуноглобулина, имеющих активность в РДП $3,0$ и $5,0 \log_2$, дают положительную реакцию в ИФА со специфическим антигеном, при отрицательной реакции с нормальным антигеном.

Оптимальная концентрация белка, которая позволяет выявить специфический культуральный антиген в его предельном титре, составляет для 1-ой серии – $14,96 \log_2 (1:32000)$, для 2-ой – $11,96 \log_2 (1:4000)$. В дальнейших исследованиях для сенсibilизации лунок планшетов использовали стократный предельный титр иммуноглобулина – $8,32 \log_2 (1:320)$ и $5,32 \log_2 (1:40)$.

Определение рабочего разведения вирусспецифического иммунопероксидазного конъюгата (ВИПК) проводили шахматным титрованием с специфическим антигеном вируса ЧМЖЖ. Предельным титром конъюгата считали максимальное его разведение, которое способно выявить специфический антиген при отрицательном результате с нормальным антигеном. За оптимальное рабочее разведение конъюгата принимали его восьмикратный предельный титр.

В результате предельный титр конъюгата серии 1 составил $11,64 \log_2 (1:3200)$, серии 2 – $8,64 \log_2 (1:400)$. Отсюда рабочее разведение конъюгата составило: серия 1 – $8,64 \log_2 (1:400)$, серия 2 – $5,64 \log_2 (1:50)$.

В опыте для отработки температурно-временных условий сенсibilизации полистироловых плоскодонных плашек ВИГ испытаны три температурных режимов: $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и комнатная температура $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 6 ч и $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 18 ч. Вирусспецифический иммуноглобулин ЧМЖЖ брали в рабочем разведении на 0,01М КББ. Контакт антигена с сенсibilизированной твердой фазой составлял 3 ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, контакт с конъюгатом – 1 ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. О степени сорбции иммуноглобулина судили по показателям оптической плотности (ОП) лунок планшета. Учет результатов реакции проводили на фотометре Multiscan Plus при длине волны 405 нм (для АБТС). Установлено, степень сорбции ВИГ возрастает при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ до ОП 1,7 в течение 4 ч; при комнатной температуре в течение 5 ч, дальнейший контакт не приводит к увеличению ОП. При $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ средний показатель ОП составил 1,8. Следовательно, оптимальным режимом сорбции ВИГ на планшетах является 4 ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, 5 ч при комнатной температуре и 18 ч при $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Для подбора раствора для сенсibilизации плоскодонных полистироловых плашек готовили следующие растворы: 0,1 М фосфатный буферный раствор (ФБР) pH 7,2-7,4, 0,01М ФБР, 0,1М фосфатно-буферный солевой раствор (ФБС) pH 7,2-7,4, 0,01М ФБС, 0,1М карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ) pH 9,6, 0,01М КББ, 0,1М боратный буфер (ББ) pH 8,0-8,2, 0,01М боратный буфер, 0,1М ТрисHCl-буфер (ТБ) pH 8,0-8,2, 0,01М ТрисHCl-буфер, 0,15М физиологический раствор (ФР) pH 6,5 и кипяченая водопроводная вода pH 7,5.

Вирусспецифический иммуноглобулин разводили вышеуказанными растворителями до рабочего разведения и сенсibilизировали планшеты. Условия инкубации – 18 ч при $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$. Наилучшие результаты показали растворы: 0,01М ФБС (ОП – 1,67); 0,01М КББ (ОП – 1,71); 0,01М Трис-HCl-буфер (ОП – 1,70) и кипяченая водопроводная вода (ОП – 1,68).

Отработку температурно-временного режима проводили при: $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и комнатной температуре $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 6 ч и $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 18 ч.

Результаты опыта показали, связывание антигена с иммуносorbентом при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ продолжается в течении 4 ч до значения ОП 1,65, дальнейшая инкубация не приводит к повышению уровня ОП. Реакция при комнатной температуре в течение 6 ч не обеспечивает необходимого уровня ОП. Инкубация при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 18 ч показала ОП равную 1,72.

Разработка ИФА для выявления антигена вируса ЧМЖЖ методом одного разведения

С целью оптимизации постановки «сэндвич»-варианта ИФА был определен температурно-временной режим инкубации препаратов, взятый за основу: контакт с пробами патологического материала и контролями – 60 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, контакт с вирусспецифическим конъюгатом – 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. В качестве субстрата использовали однокомпонентный раствор ТМБ, результаты анализов считывали на фотометре BioRad Model 680.

Определение оптимального разведения проб патологического материала проводили с использованием специфических антигенов с различным содержанием антигена вируса ЧМЖЖ и нормальных антигенов, полученных из органов здоровых животных и незараженных культур клеток. Антигены исследовали в трех разведениях: 1/10, 1/20 и 1/50. Оптимальное разведение определяли по максимальной разнице ОП между позитивными и негативными пробами. При этом были получены следующие результаты: Разведение 1/10 – 0,649, Разведение 1/20 – 0,547 и Разведение 1/50 – 0,331.

Таким образом, наиболее оптимальным разведением является 1/10.

Важным моментом при разработке иммуноферментной тест-системы является снятие неспецифического фона в процессе постановки. Состоит он из двух этапов: блокирование свободных участков твердой фазы после сенсibilизации иммуноглобулином и блокирование неспецифического прикрепления посторонних примесей, находящихся в испытуемой или контрольной пробе, в процессе инкубации иммуносorbента с антигеном.

Подбор блокирующего реагента проводили с использованием 1% раствора БСА, 5% раствора обезжиренного молока, 1% раствора желатина, 1% раствора гидролизата казеина. Результат показал, что наиболее оптимальным блокирующим компонентом твердой фазы и для снятия неспецифичности в процессе инкубации с исследуемыми пробами является БСА. Использование БСА позволяет получить самый низкий показатель ОП отрицательных проб – не более 0,06. При этом сохраняет достаточно высокий показатель ОП положительных проб – не ниже 1,0.

Важным условием при постановке анализа в одном разведении является оптимальное содержание искомого агента в исследуемом образце. Для решения этой задачи определяются параметры уравнения линейной регрессии и строится калибровочный график зависимости количественного содержания искомого компонента в пробе от показателя оптической плотности. Для определения параметров уравнения и построения калибровочного графика исследовали в ИФА органо-тканевые и культуральные пробы вируса ЧМЖЖ с различным содержанием антигена. Для каждой пробы определяли показатель S/P по ОП в разведении 1/10 и титр. При помощи программы Statistica 6.0 рассчитали параметры уравнения линейной регрессии и построили калибровочный график.

Для разграничения положительной и отрицательной реакции при анализе органо-тканевых проб в «сэндвич»-варианте ИФА и определения пороговых значений ОП необходимо было определить позитивно-негативный порог (ПНП). ПНП определяли путем расчета граничного значения ОП отрицательных сывороток и стандартного отклонения.

По результатам исследования органо-тканевых проб следует считать отрицательным, если их титр ниже $5,88 \log_2$, или положительным, если их титр выше $6,0 \log_2$. Пробы антигенов считались сомнительными, если значения титров попадали в промежуточный интервал $5,88 < \text{титр} < 6,0$.

Для установления диапазона допустимых значений определяли средние значения ОП контрольных 5 положительных и 5 отрицательных антигенов в 6 повторностях. Предельные значения ОП контролей определялись суммой среднего значения и удвоенного стандартного отклонения. Было показано, что допустимыми значениями оптической плотности контрольных антигенов являются значения, лежащие в диапазонах для отрицательного контроля – до 0,085, для положительного контроля – от 0,523 и выше.

Если значения ОП контрольных антигенов выходят за рамки допустимых значений, результаты реакции считают некорректными и пробы должны быть исследованы заново.

Эффективность разработанных нами методов оценивали по чувствительности и специфичности тест-системы.

Пробы антигенов исследовали в разведениях и сравнивали их предельные титры в разных методах. При исследовании в ИФА методом одного разведения титр определяли по уравнению линейной регрессии, рассчитанному нами ранее.

Установлено, что разработанный нами метод ИФА превосходит по чувствительности РДП в 200 раз и РСК – в 20 раз. При этом разработанный нами «сэндвич»-вариант ИФА для выявления антигена методом одного разведения показал результаты, схожие с классическим ИФА при титровании антигена.

Специфичность метода оценивали по реакции с отрицательными органо-тканевыми суспензиями органов коз и овец и антигенами других инфекций мелкого рогатого скота: КЭО, ОО, ящур. Активность антигенов оценивали в обоих отработанных нами методах ИФА. Показатель ОП гетерологичных антигенов в ИФА методом одного разведения (КЭО, ОО, ящур) сравним с ОП отрицательных сывороток при отрицательных показателях в классическом ИФА, а титр специфических антигенов в классическом ИФА сравним с титром, вычисленным по ОП. Следовательно тест-систему можно считать специфичной.

Оценка эффективности разработанных методов ИФА для выявления антигена вируса ЧМЖЖ при исследовании проб патологического материала от больных ЧМЖЖ животных

Для получения объективных результатов оценки пригодности иммуноферментной тест-системы в ветеринарной практике необходимо было провести исследования проб органов и тканей на наличие возбудителя инфекции. Для этого исследовали пробы органо-тканевых суспензий от павших и вынужденно убитых животных, доставленных из очага инфекции. Кроме того, была поставлена биопроба на 3-х ягнятах и 1 козленке. От одного ягненка взяли кровь для исследований в период проявления клинических признаков заболевания. Полученные пробы исследовали в РДП, РСК и разработанных нами классическом ИФА и ИФА методом одного разведения. Результаты исследований представлены в таблице 10.

Из исследованных 14 органо-тканевых проб патологического материала положительный результат показали 11 проб, отрицательный результат – нет, сомнительный результат показали 3 пробы.

Таблица 10 - Результаты исследования патологического материала на обнаружение антигена вируса ЧМЖЖ

Испытуемые пробы	РДП	Титры			
		РСК	ИФА		
			Кл.	ОП	О.р.
1	2	3	4	5	6
Легкое павшего ягненка инв. №234	-	4,32	8,32	0,423	8,42
Печень павшего ягненка инв. №234	-	-	-	0,132	6,29
Селезенка павшего ягненка инв. №234	-	4,32	7,32	0,285	7,41
Легкое павшего ягненка инв. №235	+	5,32	9,32	0,524	9,16
Печень павшего ягненка инв. №235	-	-	6,32	0,157	6,47
6. Селезенка павшего ягненка инв. №235	+	5,32	9,32	0,551	9,35
Легкое вынужденно убитого ягненка инв. №1	+	5,32	9,32	0,589	9,63
Печень вынужденно убитого ягненка инв. №1	-	-	6,32	0,174	6,60
Селезенка вынужденно убитого ягненка инв. №1	+	5,32	8,32	0,415	8,36

Продолжение таблицы 10					
1	2	3	4	5	6

Средостенный лимфатический узел вынужденно убитого ягненка инв. №1	+	6,32	10,32	0,624	9,89
Брыжеечный лимфатический узел вынужденно убитого ягненка инв. №1	-	5,32	9,32	0,577	9,55
Почка вынужденно убитого ягненка инв. №1	-	-	-	0,132	6,29
Сердце вынужденно убитого ягненка инв. №1	-	-	-	0,129	6,27
Кровь больного ягненка, поставленного на биопробу, инв. № 2	-	н.и.	8,32	0,399	8,24
Культура клеток, зараженная кровью больного ягненка	н.и.	н.и.	4,0	н.и.	н.и.
AgS _{ЧМЖЖ} серия 1	+	6,32	10,32	0,734	10,69
AgS _{ЧМЖЖ} серия 2	+	7,32	11,32	0,905	11,94
AgN _{органно-тканевой}	-	-	-	0,064	-
AgN _{культуральный}	-	-	-	0,012	-

Примечание: 1. Кл. – классический ИФА. 2. О.р. – ИФА в одном разведении. 3. титры антигенов указаны в log₂. 4. «-» - отрицательный результат. 5. «+» - положительный результат. 6. AgS – антиген специфический. 7. AgN – антиген нормальный.

Классический ИФА и ИФА в одном разведении показали близкие результаты. При этом количество положительных проб в РСК составило 8, в РДП – 5. Наличие вируса ЧМЖЖ подтверждается также положительной реакцией в титре 4,0 log₂, при исследовании культуры клеток, зараженной пробой крови от больного ягненка.

Оптимизация схемы подготовки проб для специфической индикации

Первоначальным этапом исследований был подбор оптимальных фильтров и элюирующих сред для концентрирования проб из объектов внешней среды (вода, сено, зерно и воздух).

Для концентрирования проб инфицированной воды были испытаны фильтры «Миллипор», «Владипор» и капроновые размером пор 0,22 мкм, а для отбора проб аэрозоля воздуха – фильтры из ткани Петрянова ФПП- 15-1,5, НЭЛ-3 и ВП-20.

В качестве элюирующих жидкостей испытывали среды, содержащие нормальную сыворотку крови телят, мясопептонный бульон (МПБ), бычий сывороточный альбумин (БСА), твин-80, твин-20, тритон, додецилсульфат натрия, хлористый натрий, роданистый калий в различных концентрациях.

Эффективность различных фильтров и элюирующих сред оценивали исследованием этих проб в ИФА. В первой серии опытов определяли эффективность использования различных сред для элюции вируса ЧМЖЖ, сконцентрированных из инфицированных проб воды на фильтр «Миллипор». Для этого воду в объеме 500мл контаминировали вирусами в дозах 100 и 1000 ТЦД_{50/см}³, выдерживали 10 минут при комнатной температуре и концентрировали на фильтр с помощью перистальтического насоса. Затем элюировали вирус с фильтра с помощью различных сред. В результате установлено, что эффективность индикации вируса ЧМЖЖ овец зависит от заражающей дозы вируса и состава элюирующей среды. Лучшие результаты получены при исследовании проб воды, зараженных 100 и 1000 ТЦД_{50/см}³ в случае применения для элюирования данных вирусов с фильтра «Миллипор» 1% раствора хлористого натрия в 0,05М ФБС с разными концентрациями твина-80 и твина-20 и 5% раствора МПБ в 0,05М ФБС с 0,5% твина-80. Однако при автоматическом учете результатов ИФА более высокая оптическая плотность испытуемых образцов отмечена при использовании для элюции антигена с фильтра 1% раствора хлористого натрия в ФБС с 0,5% твина-80. Поэтому во всех последующих исследованиях для концентрирования жидких проб и оценки эффективности применения других видов фильтров применяли указанные среды.

В следующей серии опытов была изучена эффективность использования жидких проб фильтров «Миллипор», «Владипор 2» и капроновых микропористых мембран диаметром пор

0,22 мкм с применением элюирующей среды, содержащей 1% раствор хлористого натрия в ФБС с 0,5% твина-80.

Результаты исследований показали, что испытанные фильтры по эффективности концентрирования жидких проб оказались примерно одинаковыми. Но при автоматическом учете результатов ИФА отмечено, что оптическая плотность в испытуемых пробах была выше при применении капронового фильтра и фильтра «Миллипор». Поэтому в дальнейших экспериментах использовали фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,22 мкм и среду для элюирования, содержащую натрий хлористый и твин-80.

С целью подбора эффективных сред для элюции проб аэрозоля воздуха, инфицированных вирусом ЧМЖЖ, были испытаны среды, содержащие нормальную сыворотку телят, МПБ и среду ГЛА, а также различные методы элюции вируса фильтром ФПП-15-1,5.

Установлено, что испытанные нами методы элюции вируса ЧМЖЖ фильтром ФПП-15-1,5 по эффективности примерно одинаковы. Однако при исследовании элюатов в ИФА пробы, содержащие 5% сыворотки КРС, вызвали неспецифическое фоновое окрашивание в отрицательных контрольных рядах, а среда, содержащая МПБ, показала меньшую оптическую плотность в инфицированных пробах. Таким образом, более эффективной средой для элюции вируса ЧМЖЖ с фильтра ФПП-15-1,5 является среда, состоящая из 0,05М ФБС с 0,5% твина 80. При подборе фильтров и элюирующих сред для заражения воды использовали штамм «Кентау-7» вируса ЧМЖЖ.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что для концентрирования жидких проб с различных тест-объектов наиболее пригодны фильтры «Миллипор» с диаметром пор 0,22 мкм, а для отбора проб аэрозоля фильтр ФПП-15-1,5. Наиболее эффективной средой для элюции вирусов с фильтра является среда, состоящая из 0,05М ФБС с 0,5% твина 80.

Нами проведены исследования по индикации вируса ЧМЖЖ в различных объектах внешней среды и ветнадзора. Пробы после их концентрирования и элюции исследовали в ИФА без предварительного подрачивания возбудителя болезни в чувствительной культуре клеток. В качестве объектов ветеринарного надзора использовали кровь, смывы из носовой, ротовой полости и ануса, вируссодержащие культуральные суспензии, а также воду, сено, зерно и воздух. Была экспериментально заражена овца эпизоотическим вирусом чумы МЖЖ. Ежедневно от овцы отбирали пробы гепаринизированной крови и смывы из носовой, ротовой полости и ануса. Отобранные пробы были исследованы на наличие антигена вируса чумы МЖЖ в прямом варианте ИФА и РДП. Гепаринизированная кровь и смывы исследовали после замораживания-оттаивания.

Из проведенного опыта установлено, что антиген вируса ЧМЖЖ был выявлен методом ИФА на третьи сутки после заражения овцы в смывах из ротовой полости и ануса.

Проведены также опыты по эффективности применения метода ИФА для индикации вируса ЧМЖЖ в объектах ветнадзора после их концентрирования на фильтры. С этой целью пробы воды (500 мл), сена и зерна (по 50-100 грамм) контаминировали вирусом в дозах 100, 500 и 1000 ТЦД₅₀/мл/г, а воздух 10 и 20 ТЦД₅₀/л

В результате проведенных опытов установлено, что метод ИФА позволяет обнаруживать вирус ЧМЖЖ в дозе 10 ТЦД₅₀/л и более в пробах аэрозоля воздуха и 100-500 ТЦД₅₀/мл/г в пробах воды, сена и зерна.

Отработка методов постановки непрямого метода ИФА для определения антител против вируса ЧМЖЖ в сыворотках крови овец

Предстояло провести оптимизацию условий постановки непрямого варианта ИФА, подбор температурно-временного режима подготовки иммуносорбента, подбор условий контакта реагентов с сенсibilизированными планшетами.

Оптимальную концентрацию антигена вируса ЧМЖЖ определяли шахматным титрованием 2-х серий препарата со специфической гипериммунной сывороткой в «сэндвич»-варианте ИФА. Для этого готовили последовательные двукратные разведения

антигена на 0,01М КББ от 5,64 log₂ (1:50) до 14,64 log₂ (1:25600), специфическую сыворотку титровали в разведениях от 6,64 log₂ (1:100) до 13,64 log₂ (1:12800), нормальную сыворотку разводили до 5,64 log₂ (1:50) и 6,64 log₂ (1:100).

Проведенный опыт показал, что испытанные концентрации 2-х серий специфического антигена ЧМЖЖ, имеющего активность в РДП 3,0 и 4,0 log₂, дают положительную реакцию в ИФА со специфической сывороткой, при отрицательной реакции с нормальной сывороткой.

Оптимальная концентрация антигена позволяет выявить специфические антитела против вируса ЧМЖЖ в сыворотках крови животных в его предельном титре и составляет для 1-ой серии – 10,64 log₂ (1:1600), для 2-ой – 8,64 log₂ (1:400). В дальнейших исследованиях для сенсibilизации лунок планшетов использовали двукратный предельный титр антигена – 9,64 log₂ (1:800) и 7,64 log₂ (1:200).

Рабочее разведение антивидового иммунопероксидазного конъюгата (АИПК) определяли шахматным титрованием со специфической гипериммунной сывороткой против вируса ЧМЖЖ. Предельным титром конъюгата считали максимальное его разведение, которое способно выявить специфические антитела при отрицательном результате с нормальной сывороткой. За оптимальное рабочее разведение конъюгата принимали его восьмикратный предельный титр. В результате установлено, что предельный титр конъюгата 1-серии составил 12,64 log₂ (1:6400), 2-серии – 10,64 log₂ (1:1600). Рабочее разведение конъюгата составило: серии 1 – 9,64 log₂ (1:800), серии 2 – 7,64 log₂ (1:200).

Опыт по отработке температурно-временных условий сенсibilизации полистироловых плоскодонных планшетов антигеном вируса ЧМЖЖ проводили при двух температурных режимах: (37±1)°С в течение 5 ч и (4±2)°С в течение 18 ч. Специфический антиген вируса ЧМЖЖ брали в рабочем разведении на 0,01М КББ. Контакт сывороток с сенсibilизированной твердой фазой составлял 3 ч при (37±1)°С, контакт с антивидовым конъюгатом – 1 ч при (37±1)°С. О степени сорбции антигена судили по оптической плотности (ОП) лунок планшета. Учет результатов реакции проводили на фотометре Multiscan Plus при длине волны 405 нм (для АБТС). Установлено, степень сорбции антигена возрастает при (37±1)°С до ОП 1,420 в течение 3 ч, дальнейший контакт не приводил к увеличению ОП. При (4±2)°С средний показатель ОП составил 1,54. Следовательно, оптимальным режимом сорбции антигена вируса ЧМЖЖ на планшетах является 4 ч при (37±1)°С и 18 ч при (4±2)°С.

Для подбора раствора для сенсibilизации плоскодонных полистироловых плашек готовили следующие растворы: 0,01 М карбонатный буферный раствор (КББ) pH 9,6, 0,02М КББ pH 9,6, 0,05М КББ pH 9,6, 0,1М КББ pH 9,6, 0,01М фосфатно-буферный солевой раствор (ФБС) pH 7,4, 0,01М ТрисHCl-буфер (ТБ) pH 8,2. Антиген вируса ЧМЖЖ разводили вышеуказанными растворителями до рабочего разведения и сенсibilизировали планшеты. Условия инкубации – 18 ч при (4±2)°С. Результаты оценивали методом ИФА по оптической плотности на фотометре Multiscan Plus при длине волны 405 нм.

Наилучшие результаты проявил раствор: 0,02М КББ (показатель ОП – 1,254) и 0,01М Трис-HCl-буфер (показатель ОП – 1,208). В дальнейших опытах использовали 0,02М КББ pH 9,6.

Отработку температурно-временных условий контакта сывороток с сенсibilизированной антигеном ЧМЖЖ твердой фазой проводили при (37±1)°С в течение 5 ч и (4±2)°С в течение 18 ч. Результаты учитывали по оптической плотности на спектрофотометре Multiscan Plus при длине волны 405 нм. Наибольшее связывание антител с антигеном происходило в течение 2 ч, достигая ОП 1,210, дальнейшая инкубация не приводила к повышению уровня ОП. Инкубация при температуре (4±2)°С в течение 18 ч показала ОП равную 1,254.

Оптимизация условий постановки непрямого варианта ИФА выявления антител против вируса ЧМЖЖ в сыворотках крови мелкого рогатого скота методом одного разведения.

Для разработки непрямого варианта ИФА выявления антител против вируса ЧМЖЖ в качестве основного рабочего режима взят контакт с исследуемыми и контрольными сыворотками – 60 мин при температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$, контакт с антивидовым конъюгатом – 30 мин при температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$. В качестве субстрата использовали однокомпонентный раствор ТМБ.

В опыте использовали специфические сыворотки с разным содержанием антител против вируса ЧМЖЖ и нормальные сыворотки от здоровых животных. Образцы исследовали в трех разведениях: 1/10, 1/20 и 1/50. Оптимальное разведение определяли по максимальной разнице ОП между позитивными и негативными пробами. При этом были получены следующие результаты: разведение 1/10 – 1,235, разведение 1/20 – 0,767 и разведение 1/50 – 0,601.

Таким образом, наиболее оптимальным разведением является 1/10. Рабочий титр конъюгата составил 1/1600.

Подбор блокирующего реагента проводили с использованием 1% раствора БСА, 5% раствора обезжиренного молока, 1% раствора желатина, 1% раствора гидролизата казеина. Оптимальными блокирующими компонентами являются желатин и гидролизат казеина, для снятия неспецифичности в процессе инкубации с исследуемыми пробами – гидролизат казеина. Использование гидролизата казеина позволяет получить самое низкое значение ОП отрицательных проб – не более 0,11, при этом сохраняется достаточно высокий показатель ОП положительных проб – 0,8-1,0.

При разработке современной иммуноферментной тест-системы определяют параметры уравнения и строят калибровочный график, по которому можно определить титр сыворотки по показателю ОП. Для определения параметров уравнения и построения калибровочного графика исследовали в ИФА пробы сывороток против вируса ЧМЖЖ с различным содержанием антител. Для каждой пробы определяли S/P в разведении 1/10 и титр сыворотки. При помощи программы Statistica 6.0 рассчитали параметры уравнения линейной регрессии и построили калибровочный график.

При разработке непрямого варианта ИФА и интерпретации его результатов важно обоснование пороговых значений S/P и титра, разграничивающих неспецифическую (отрицательную) и специфическую (положительную) реакции. ПНП определяли расчетом граничного значения ОП отрицательных сывороток и стандартного отклонения.

Среднее значение ОП, суммированное с утроенным значением стандартного отклонения, определяло граничное значение (cut off). Сыворотки считались положительными, если их ОП превышает граничное значение на 10% и отрицательными, если их ОП был ниже граничного значения на 10%. Сыворотки, показавшие ОП в диапазоне $\pm 10\%$ от граничного значения (серая зона), считали сомнительными.

Для установления ПНП в непрямом варианте ИФА определяли значение оптической плотности 24 образцов сывороток крови коз и овец, не имеющих антител к вирусу ЧМЖЖ. Для этого вычисляли S/P и по уравнению линейной регрессии находили значение титров антител. Сыворотки следует считать отрицательными, если их титр ниже $4,41 \log_2$, или положительными, если их титр выше $4,58 \log_2$, сомнительными, если полученные значения титров попадали в промежуточный интервал $4,41 < \text{титр} < 4,58$.

Следует учитывать, входят ли ОП контрольных сывороток в диапазон допустимых значений. Для установления данного диапазона определяли средние значения ОП 4 положительных и 8 отрицательных сывороток в 6 повторах в установленном ранее рабочем разведении 1/10. Полученные результаты позволили рассчитать соответствующие средние величины и стандартные отклонения оптической плотности контролей. Было показано, что оптимальными значениями оптической плотности контрольных сывороток крови коз и овец являются значения, лежащие в диапазонах: для положительного контроля – от 0,560 и выше, для отрицательного контроля – до 0,130. Если ОП контрольных сывороток выходят за рамки допустимых значений, результаты реакции считают некорректными и пробы должны быть исследованы заново.

Для оценки чувствительности проводили сравнительную оценку разработанного метода с РДП и РСК. Сыворотки исследовали в разведениях и сравнивали их предельные титры. При исследовании в ИФА методом одного разведения титр определяли по уравнению линейной регрессии, рассчитанному нами ранее. Установлено, что разработанный метод ИФА превосходит по чувствительности РДП в 136-200 раз и РСК – в 68-100 раз.

Специфичность метода оценивали по реакции с отрицательными сыворотками и сыворотками к другим инфекциям мелкого рогатого скота: КЭО, ОО. Установлено, что ОП гетерологичных сывороток КЭО, ОО сравнима с ОП отрицательных сывороток, титр, определенный по уравнению линейной регрессии, сравним с титром, полученным при исследовании в классическом ИФА. Следовательно тест-систему можно считать специфичной.

Разработка ПЦР для диагностики ЧМЖЖ.

Специфичность и чувствительность ПЦР находятся в большой зависимости от концентрации $MgCl_2$ и KCl , pH буфера. Изменения в буфере для ПЦР вызывают качественное или количественное изменение выхода амплификата. $MgCl_2$ необходим для поддержания активности Taq-полимеразы. Концентрация $MgCl_2$ также влияет на отжиг праймеров и денатурацию образца. Избыток может вызывать неспецифичность продукта.

Были апробированы 10 буферных систем, которые различались концентрацией хлористого магния и калия, а также величиной pH. Состав буферных систем: 100 мМ Трис HCl, pH 8,3, 15 мМ $MgCl_2$, 250 мМ KCl, 100 мМ Трис HCl, pH 8,3, 15 мМ $MgCl_2$, 750 мМ KCl, 100 мМ Трис HCl, pH 8,3, 35 мМ $MgCl_2$, 250 мМ KCl, 100 мМ Трис HCl, pH 8,3, 35 мМ $MgCl_2$, 750 мМ KCl, 100 мМ Трис HCl, pH 8,8, 15 мМ $MgCl_2$, 250 мМ KCl, 100 мМ Трис HCl, pH 8,8, 15 мМ $MgCl_2$, 750 мМ KCl, 100 мМ Трис HCl, pH 8,8, 35 мМ $MgCl_2$, 250 мМ KCl, 100 мМ Трис HCl, pH 8,8, 35 мМ $MgCl_2$, 750 мМ KCl, 100 мМ Трис HCl, pH 9,2, 15 мМ $MgCl_2$, 250 мМ KCl, 100 мМ Трис HCl, pH 9,2, 15 мМ $MgCl_2$, 750 мМ KCl.

Амплификацию специфического ПЦР продукта проводили в реакционной смеси, состоящей из:

10x ПЦР буфер	- 2,0 мкл
дНТФ	- 0,5 мкл
праймер PCR_PPRV_f3	- 1,0 мкл
праймер PCR_PPRV_r3	- 1,0 мкл
Taq ДНК полимеразы	- 0,5 мкл
кДНК вируса ЧМЖЖ	- 1 мкл
вода до 20 мкл	

Амплификацию специфического участка проводили на термоциклере "GeneAmp PCR 9700", фирмы "Applied Biosystems" при следующих режимах:

95 °С – 2 мин - денатурация кДНК

94 °С – 30 сек

55 °С – 30 сек

72 °С – 60 сек

72 °С – 10 мин

} 40 циклов

По завершению наработки кДНК полученные пробы детектировали электрофорезом в 2 % агарозном геле, приготовленном на ТБЕ буфере в присутствии бромистого этидия.

Отмечено, что при использовании буферных систем № 6, 7 и 10 не происходит амплификации фрагмента. При использовании остальных буферных систем (№ 1, 2, 3, 4, 5, 8 и 9) нарабатывается ПЦР-продукт размером 274 п.о., представленный на рисунке яркими и четкими полосами. Существенных различий при использовании буферных систем не наблюдается. По-видимому, в буферных системах № 6, 7 и 10 сочетание более высокой pH и использование данных концентраций $MgCl_2$ и KCl приводит к ингибированию реакции.

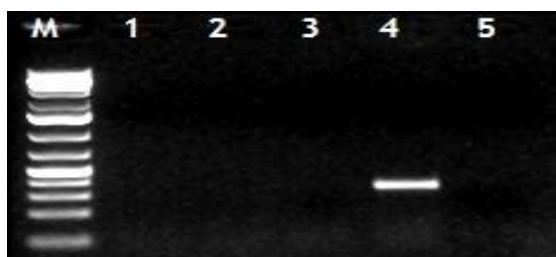
Как было упомянуто, основная роль в ПЦР отведена ферменту Taq-полимеразе. Концентрация фермента в реакции подбирается в зависимости от индивидуальной мишени (кДНК) или праймеров. При подборе оптимальной концентрации брали активность фермента

в реакционной смеси от 0,5 ед до 3,0 ед/50 мкл, и проверяли результаты амплификации геле-электрофорезом в 2 % агарозе.

Концентрация Taq ДНК-полимеразы влияет на выход конечного продукта; замечено, что с повышением концентрации фермента в реакционной смеси происходит увеличение интенсивности полос, следовательно, и концентрации ДНК. Однако при активности фермента всего 0,5 ед нарабатывается ПЦР-продукт, который достаточно легко визуализировать в 2 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия под УФ-светом. Нужно отметить, что в разрабатываемой тест-системе полимеразы является самым дорогим компонентом. Поэтому в наших экспериментах мы выбрали экономичный расход фермента – 0,5 ед.

Ионы Mg^{2+} являются необходимым кофактором для ДНК-полимеразы в ПЦР. Многие компоненты реакционной смеси связывают эти ионы, в том числе ДНК-матрица, праймеры, ампликоны и дНТФ. Избыток концентрации ионов магния может приводить к неспецифичности продукта реакции. Нами изучено влияние разных концентраций хлорида магния, начиная с 1 мМ и постепенно повышая до предельного значения 2,5 мМ. Опыт показывает, что изменение концентрации соли в пределах 1-2,5 мМ существенно не влияло на процесс амплификации. Выход специфического ПЦР-продукта был приблизительно одинаков. И при максимальной концентрации $MgCl_2$ (2,5 мМ) нарабатывалось достаточное количество специфического продукта. В дальнейших экспериментах при проведении ПЦР для приготовления реакционных смесей использовали концентрацию соли 1,5 мМ.

В дальнейших опытах изучалась специфичность отработанного метода ПЦР при идентификации вируса ЧМЖЖ. В качестве исследуемых проб использовали РНК вирусов ЧМЖЖ, ЧКРС, ЧП и БН. Полученные результаты исследований представлены на рисунке 1.

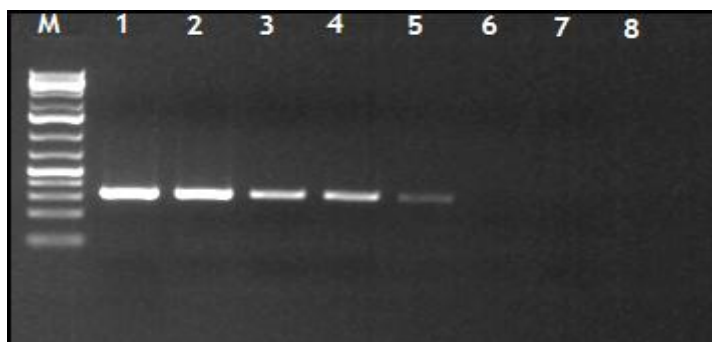


М – маркер ДНК, 1 – кДНК вируса чумы плотоядных, 2 – кДНК вируса ЧКРС штамм "К₃₇₋₇₀", 3 – кДНК вируса болезни Ньюкасла штамм "Ла-Сота", 4 – кДНК ЧМЖЖ штамм "Кентау-7", 5 – негатив контроль.

Рис. 1 Определение специфичности ПЦР при идентификации вируса ЧМЖЖ

Как следует из рисунка 1, при использовании пар праймеров PCR_PPRV_f1 и PCR_PPRV_r1 и подобранных условий постановки ПЦР образовался ПЦР-продукт размером 274 п.н. только в пробе с вирусом ЧМЖЖ, в остальных пробах кДНК не обнаружено.

Чувствительность разработанного метода ПЦР определяли десятикратным разведением кДНК. Полученные результаты при идентификации вируса ЧМЖЖ представлены на рисунке 2.



1 – 1 нг; 2 – 0,1 нг; 3 – 10 пг; 4 – 1 пг; 5 – 0,1 пг; 6 – 10 фг; 7 – 1 фг; 8 – негатив контроль.
М – маркер ДНК “BioLabs 50 bp DNA Ladder, "50 – 1350 bp".

Рис. 2 Чувствительность ПЦР при идентификации вируса ЧМЖЖ

Установлено, что чувствительность разработанного метода ПЦР при выявлении кДНК вируса ЧМЖЖ составляет 0,1 пг.

При постановке ОТ-ПЦР для идентификации вируса ЧМЖЖ оптимальными оказались специфические праймеры PCR_PPRV_f1 и PCR_PPRV_r1, позволяющие нарабатывать ПЦР продукт размером 274 п.н., характерный только для вирусов ЧМЖЖ.

Применение разработанных тест-систем для мониторинга по ЧМЖЖ на территории Республики Казахстан и сопредельных стран Средний Азии

С целью изучения эпизоотической ситуации в Республике Казахстан по ЧМЖЖ в течение июня-июля 2004 г. проведены экспедиционные выезды двух групп в южный и восточный регион Республики Казахстан. В течение 15 сут экспедиционные группы НИИПББ провели обследование Жамбылской, Южно-Казахстанской, Кызыл-Ординской, Восточно-Казахстанской и Алматинской областей на инфекционные болезни с.х. животных.

В процессе обследования хозяйств Южно-Казахстанской области был выявлен очаг заболевания животных с неизвестной этиологией. В результате бездействия ветеринарных специалистов округа и несвоевременно проведенных ветеринарных мероприятий болезнь распространилась на 3 отары общей численностью 1200 гол, падеж среди молодняка коз, овец и взрослого поголовья, соответственно, составил 100, 50 и 2 %. В условиях НИИПББ взятый патологический материал исследован на наличие кДНК и антигена вируса ЧМЖЖ с помощью разработанной нами тест-системы (РДП, РСК, ИФА и ПЦР).

Установлено, что заболевание МРС в с. Буратышкан Кентауского округа Южно-Казахстанской области вызвано вирусом ЧМЖЖ. Во всех пробах в РСК и ИФА был выявлен антиген вируса ЧМЖЖ. В ПЦР РНК вируса ЧМЖЖ, выделен на монослое культуры клеток ПЯ.

4 августа 2004 года сотрудники НИИПББ в Талгарском районе Алматинской области диагностировали заболевание МРС невыясненной этиологии.

В результате клинического осмотра патологоанатомического вскрытия, электронно-микроскопических исследований, биопроба с вирусовыделением и лабораторные исследования в тест-системах РДП, РСК, ИФА и ПЦР установлено, что в доставленных пробах патологического материала от больных животных выявлен РНК и антиген вируса ЧМЖЖ.

В крестьянском хозяйстве "Асел" Кордайского района Жамбылской области в доставленных пробах патологического материала методами РДП, РСК, ИФА и ПЦР диагностирован ЧМЖЖ.

Эпизоотологические обследования проводились в хозяйствах ПК "Сарём" Сайрамского района Южно-Казахстанской области и ПК "Пионер" Жамбылского района Жамбылской области. Данные регионы были выбраны как неблагополучные по ЧМЖЖ. Было подтверждено, что на территории обследованных регионов циркулирует вирус ЧМЖЖ,

в сыворотках крови восприимчивых животных циркулируют антитела против вируса ЧМЖЖ, уровень которых был недостаточным для предохранения животных от заражения.

Проведено эпизоотологическое обследование частных хозяйств Мырзатайского сельского округа Байзакского района Жамбылской области. Установлено, что в патологическом материале (легкие) от павшего козла в ИФА выявлен антиген ЧМЖЖ, а в двух пробах с помощью ПЦР выделен РНК вируса. Наличие антител в сыворотке крови коровы в ИФА и РН свидетельствует о циркуляции вируса ЧМЖЖ.

В частных хозяйствах "Молдагулова" и "Мыктыбаева" села Сулу-Тор Кордайского района Жамбылской области гибель овец вызвана возбудителем ЧМЖЖ. Из исследованных 15 проб в ИФА в 10 пробах, в РСК – 3, в РДП в 2 пробах выявлен антиген вируса ЧМЖЖ, а также с помощью ПЦР в 12 пробах обнаружены РНК данного возбудителя.

По сообщению Департамента ветеринарии Республики Таджикистан в период с 1995 по 2005 гг. животноводы этой республики понесли большие потери в связи с высокой смертностью среди молодняка и взрослых животных от вируса ЧМЖЖ, составляющей от 20% до 50%. Циркуляция вируса среди животных в некоторых стадах составляла около 80%.

В феврале 2005 г. сотрудники НИИПББ провели эпизоотологический мониторинг и выяснение причины заболевания овец и коз в Республике Таджикистан. В условиях САЯИ ТАСХН РК произведено патологоанатомическое вскрытие павших козлят и отбор проб, исследование сывороток и материалов, отобранных в АО «Чарвадор». Материалы были исследованы в РДП, РСК, ИФА и ПЦР с наборами препаратов производства НИИПББ. В сыворотках крови овец и коз из АО «Чарвадор» в ИФА выявлены антитела к вирусу ЧМЖЖ.

В результате исследований в пробах патологического материала от овец из колхоза «Бахор» и крестьянского хозяйства «ПМК-11» выявлен РНК возбудителя ЧМЖЖ и антиген.

В период с 10 по 17 июля 2006 года сотрудниками института совместно со специалистами Департамента ветеринарии МСХ Республики Таджикистан и Среднеазиатского ящурного института Республики Таджикистан проведен сбор биоматериалов от больных и павших животных Шахринавского, Гиссарского, Турсунзадинского, Джиликульского, Вахдатского, Файзабадского и Рудакинского районов Республики Таджикистан.

Во всех пробах биоматериала с помощью ИФА и ПЦР были выявлены РНК вируса ЧМЖЖ и антиген данного возбудителя.

Также во всех пробах сывороток крови овец, коз и КРС выявлены антитела против вируса ЧМЖЖ с титрами в ИФА 1:1600-1:6400, в РСК 1:24-1:32, в РДП 1:2-1:4, а в РН 1:8-1:32.

В 2007 г. были исследованы пробы сывороток крови коз и овец на территории Республики Таджикистан на наличие антител к вирусу ЧМЖЖ в ИФА, РН, РСК и РДП.

В организме животных установлен высокий уровень накопления антител, что свидетельствует о переболевании животных ЧМЖЖ. В 2013-2014 гг. исследовано 13 проб патологического материала от павших овец и коз и 2000 проб сывороток крови.

С применением лабораторных тест-систем установлена циркуляция вируса ЧМЖЖ в 2013-2014 годах среди животных.

Были проведены широкомасштабные серологические исследования с наименованием ИФА. Целью исследований было изучение степени распространения инфекции и разработка научно обоснованных рекомендаций по профилактике и борьбе с болезнью.

В результате исследования сывороток крови овец и коз из 70 районов и городов во всех регионах выявлена циркуляция вируса ЧМЖЖ.

В период с 19-29 сентября 2006 г. сотрудниками института совместно с заведующим лабораторией НАН Кыргызской Республики Белековым Т. организован экспедиционный выезд в Нарынскую область Кыргызской Республики, проведено эпизоотологическое обследование животноводческих хозяйств. Для проведения лабораторных исследований отобран патологический материал.

В селе Каражигач Аксыйского района отобрано 14 проб сывороток крови. В Алайском районе в селе Жош-олы из-за труднодоступности и невозможности проезда (сход снежных лавин) клинически обследовано всего 27 гол КРС, взяты пробы сывороток крови от 5 гол КРС. Проведён клинический осмотр КРС на выпасах и в частных подворьях Карасуйского района в селе Жоош в количестве 156 гол КРС и отобрано 30 проб сывороток крови. В двух районах Ошской области отобрано 35 проб сывороток крови КРС. Клинически обследовано 143 гол КРС и 56 гол МРС в сёлах Учкорган, Карадобе и Марказ.

Пробы сывороток крови сельскохозяйственных животных, доставленные из разных хозяйств Кыргызской Республики, были исследованы в НИИПББ на наличие вируса ЧМЖЖ.

С 09 июня по 10 июня 2014 года по приглашению директора Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии имени А.Дуйшеева Абдыкеримова К.А., д.в.н. зав. лабораторией РГП НИИПББ КН МОН РК Кошембетов Ж. К. был командирован в Кыргызскую Республику. Цель поездки было проведение совместного мониторинга по особо опасным болезням на территории Кыргызской Республики среди животных. Сотрудник НИИПББ в течение двух дней непосредственно принял участие в постановке диагноза на инфекционные заболевания животных – ЧМЖЖ, оспа овец, пастереллез и клостридиоз с помощью ИФА и РДП.

В результате исследований 25 проб в 13 пробах был выявлен антиген вируса ЧМЖЖ.

Органо-тканевые материалы в количестве 5 проб были исследованы в РГП НИИПББ на наличие возбудителя и антигенов чумы МЖЖЖ с помощью ПЦР, ИФА, РДП, РСК.

Установлено, что причина заболевания и падежа животных (овец и коз) в Нарынской области является вирус ЧМЖЖ. Это было подтверждено кыргызскими учеными совместно с учеными Кыргызско-Турецкого университета «Манас».

Изучение поствакцинального иммунитета у животных привитых вакциной против ЧМЖЖ.

Одним из эффективных мер борьбы с ЧМЖЖ является вакцинация и контроль напряженности иммунитета у вакцинированных животных.

В 2004 г. в хозяйствах Восточно-Казахстанской, Алматинской, Южно-Казахстанской, Жамбылской и Кызыл-Ординской областей были выборочно отобраны сыворотки крови вакцинированных животных на напряженность поствакцинального иммунитета. В условиях НИИПББ сыворотки крови животных были исследованы на наличие антител к вирусу ЧМЖЖ в РН, ИФА, РДП и РСК. Пробы из приграничных районов Восточно-Казахстанской и Алматинской областей были исследованы в РН и ИФА на наличие специфических антител к вирусу ЧМЖЖ. По данным ветеринарной отчетности иммунизация животных против ЧМЖЖ проводилась в сентябре 2005 г. Всего исследовано 115 проб сывороток крови овец.

Лабораторно установлено, что во всех обследованных районах процент иммунных животных составил более 80%. Что свидетельствует о наличии напряженного иммунитета вакцинированных животных против вируса ЧМЖЖ.

В августе-сентябре 2003 года в хозяйствах Южно-Казахстанской и Жамбылской областей среди овец и коз было зарегистрировано заболевание ЧМЖЖ. Это было подтверждено и лабораторными диагностическими исследованиями.

По данным ветеринарной отчетности против ЧМЖЖ прививались в Южно-Казахстанской области в октябре – ноябре 2003 года только ягнята и козлята. Отобранные сыворотки были проверены в реакции нейтрализации. Всего исследованы 249 проб сывороток крови овец.

Высокие титры антител к вирусу ЧМЖЖ у овец, и наличие их в сыворотках крови КРС свидетельствовали о перебеливании животных в Шардаринском и Сарыагашском районах Южно-Казахстанской области указанной болезнью.

В феврале 2005 г сотрудники НИИПББ выезжали в крестьянское хозяйство Асель Кордайского района Жамбылской области. В результате проведенных исследований установлено, что в сыворотках всех вакцинированных животных имелись антитела к вирусу ЧМЖЖ в титрах, обеспечивающих невосприимчивость животных к заболеванию.

Сотрудниками НИИПББ в период с 05.06.2005 г. по 10.06.2005 г. по результатам экспедиционных выездов в Южно-Казахстанскую и Жамбылскую области проведены исследования по определению уровня антител к вирусу ЧМЖЖ. До вакцинации в сыворотках крови овец и коз было отмечено незначительное содержание антител к вирусу ЧМЖЖ. Профилактическая вакцинация обеспечила резкий рост уровня антител, что обеспечило специфическую невосприимчивость животных к инфицированию возбудителем ЧМЖЖ.

Аналогичные обследования проведены в Восточно-Казахстанской и Алматинской областях.

В районах, где проводится вакцинация животных против ЧМЖЖ, недостаточно напряженный поствакцинальный иммунитет против данной инфекции.

12-13 июля 2005 г. проведен экспедиционный выезд в частные хозяйства Мырзатайского сельского округа Байзакского района Жамбылской области по определению иммунного фона овец и коз к ЧМЖЖ.

В сыворотках крови МРС полностью отсутствовали антитела к вирусу ЧМЖЖ, что свидетельствует о неполном охвате вакцинацией восприимчивого поголовья животных.

С целью определения эпизоотической ситуации в приграничных государствах, в период с 20.08.2005 г. – 31.08.2005г. сотрудниками НИИПББ проведены лабораторные исследования уровня антител в сыворотках крови сельскохозяйственных животных, доставленных из различных хозяйств Республики Таджикистан.

В ИФА было исследовано 165 проб сыворотки крови овец и коз. Установлено, что в хозяйствах Республики Таджикистан среди овец и коз активно циркулирует возбудитель вируса ЧМЖЖ. Активность антител в ИФА, в основном, составила 1:800-1:6400 и не обеспечивает надежную защиту животных от заражения вирусом ЧМЖЖ. Также существует вероятность повторного проявления инфекции среди МРС, особенно среди коз, так как уровень антител в сыворотках крови овец и коз, взятых из хозяйств Файзабадского р-на д/х Дошманди, Пянджского р-на АХД Дзержинский, Таджикибадского р-на к-к Калаи лаби об, Раштского р-на к-к Зарангак, Балджуонского р-на к-к Сарои-малик, Ховалингского р-на к-к Санговак, Ховалингского р-на Сафедшахрак, Джиргитальского р-на к-к Ярош находится на недостаточно высоком уровне или они полностью отсутствуют.

ВЫВОДЫ

1. По материалам МЭБ и ФАО и собственных экспедиционных исследований установлено на достаточно широкое распространение ЧМЖЖ среди овец и коз в мире и в сопредельных с Республикой Казахстан странах. Первые очаги эпизоотии на территориях Республики Казахстан, Таджикистан регистрировались с 2004 г. и в Кыргызской Республике с 2005 г.

2. Из очага эпизоотии выделен штамм «Кентау-7» вируса ЧМЖЖ, депонированный в лаборатории «Коллекция микроорганизмов» НИИПББ КН МОН РК; изучены его культуральные свойства на чувствительных системах.

3. Оптимизированы условия выделения, очистки и концентрирования РНК вируса штамма «Кентау-7» через ДЭАЭ-целлюлозы, что позволяет сконцентрировать вирус ЧМЖЖ из объема 500 см³ в 100 раз с концентрацией вирусных белков 5,26±0,44 мг/см³.

4. Разработана технология приготовления культурального антигена вируса ЧМЖЖ из штамма «Кентау-7», схема получения вирусспецифической сыворотки на козах и изготовлены сыворотки с активностью в РДП не ниже 4 log₂; разработана схема получения высокоактивной антивидовой сыворотки против иммуноглобулинов овцы на кроликах с активностью в РДП не ниже 7 log₂, пригодной для постановки РДП, РСК, РН, ИФА. Показано, что наиболее эффективным методом выделения иммуноглобулинов из вирусспецифических сывороток против вируса ЧМЖЖ является спиртовое осаждение по Кону; для приготовления конъюгатов наиболее эффективным оказался периодатный метод в модификации Wilson M.B. и Nakane P.K.

5. Проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов штаммов и изолятов вируса ЧМЖЖ;

6. Впервые сконструированы и синтезированы специфические праймеры на ген тимидинкиназы для амплификации участка геномной кДНК вируса ЧМЖЖ, имеющие нуклеотидный состав:

- PCR_PPRV_f1;

- PCR_PPRV_r1.

7. Оптимизированы условия постановки диагностических реакций РДП, РДСК, РН, ИФА и ОТ-ПЦР для обнаружения специфического антигена и вируса в различных органах и тканях больных животных ЧМЖЖ и антител к нему. Модифицированные методики не уступают по своей специфичности и чувствительности другим зарубежным модификациям, что позволяет рекомендовать их для широкого применения при диагностике ЧМЖЖ;

8. Разработаны тест-системы РДП, РСК, РН, ИФА и ОТ-ПЦР, которые апробированы при проведении мониторинга ЧМЖЖ на территориях Республики Казахстан, Таджикистан и Кыргызской Республики.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

По завершенным исследованиям разработана и оформлена научно-техническая документация.

Рекомендация по проведению противозпизоотических и профилактических мероприятий при чуме мелких жвачных животных. Утверждена главным государственным ветеринарным инспектором Республики Казахстан Директором Департамента ветеринарного надзора МСХ Республики Казахстан в октябре 2006 г.

Тест-система набор препаратов для лабораторной диагностики чумы мелких жвачных животных и индикации антигена возбудителя болезни методом иммуноферментного анализа, Временная инструкция по изготовлению и контролю и Временное наставление по применению тест-системы, 2009 г.

Набор препаратов для лабораторной диагностики чумы жвачных животных и идентификации возбудителя болезни методами реакции диффузионной преципитации, реакции связывания комплемента, реакции нейтрализации и иммуноферментного анализа. Технические условия ТУ 31 00 РК-389343366-РГКП-37-2003, Временная инструкция по изготовлению и контролю и Временное наставление по применению, 2003 г.

Тест-система для лабораторной диагностики чумы мелких жвачных животных методом полимеразной цепной реакцией. Временная инструкция по изготовлению и контролю и Временное наставление по применению, 2006 г.

Тест-система [набор] для лабораторной диагностики чумы мелких жвачных животных методом иммуноферментного анализа. Временная инструкция по изготовлению и контролю и Временное наставление по применению, 2015 г.

Тест-система [набор] для выявления антител к вирусу чумы мелких жвачных животных методом иммуноферментного анализа. Временная инструкция по изготовлению и контролю и Временное наставление по применению, 2015 г.

Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. Кошематов, Ж.К. Дифференциальная диагностика заболеваний среди мелкого жвачного животного на территории Кыргызской Республики [Текст] /Ж.К.Кошематов, Р.З.Нургазиев, К.А.Абдикеримов, Н.Т.Джапаралиев, Е.Д.Крутская, М.Ахмеджанов // Известия вузов Кыргызстана, 2015. - №7. - С.52-54.

2. Кошематов, Ж.К. Получение чистых препаратов вируса чумы мелких жвачных животных [Текст] / Р.З.Нургазиев, Ж.К.Кошематов, Е.Д.Крутская //Наука новые технологии и инновации Кыргызстана, 2015. - №5. - С.90-93.

3. Кошеметов, Ж.К. Оптимальные условия проведения иммуноферментного анализа для выявления антител против чумы мелких жвачных животных [Текст] /Ж.К.Кошеметов, Ш.Н.Джумаев, Г.Ю. Бобоев, М.А.Аноятбеков, М.Б.Орынбаев, Д.А. Девришов // Ветеринарная медицина, 2011. - №1. - С. 72-74.
4. Кошеметов, Ж.К. Мониторинг особо опасных вирусных заболеваний животных и птиц на территории республик Центральной Азии [Текст] /Ж.К.Кошеметов, С. М.Мамадалиев, В. М. Матвеева, Б. М. Хайруллин, М. Б.Орынбаев, Н. Т. Сандыбаев, Ж. К. Кыдырбаев, В. Л.Зайцев, Е. С.Жилин, С. Ш. Нурабаев М. И.Корягина //Журнал «Актуальные вопросы ветеринарной биологии», 2010. - № 2 (6). - С.3-10.
5. Кошеметов, Ж.К. Мониторинг по вирусным инфекциям животных на территории Республики Таджикистан и Кыргызской Республики в 2014 году [Текст] /Ж.К.Кошеметов, Е.О. Абдураимов, М.И.Богданова, Г.Д.Сугирбаева, В.М.Матвеева, С.Ш.Нурабаев, А.Р. Сансызбай // Вестник КрасГАУ, 2016. №3.– С.171-179.
6. Кошеметов, Ж.К. Получение вируса чумы мелких жвачных в культуре клеток MDBK на микроносителях [Текст] /Ж.К.Кошеметов, Е.О. Абдураимов, З.Д. Ершебулов, Д.С.Таранов, К.Д.Жугунисов, Е.А.Булатов // Вестник ветеринарии, 1/2016. – С.43-46.
7. Кошеметов, Ж.К. Особо опасные инфекционные заболеваний среди животных на территории Республики Таджикистан [Текст] /Р.З.Нургазиев, Ж.К.Кошеметов, Е.Д.Крутская, М.И.Богданова, Г.Д.Сугирбаева // Вестник алтайского государственного аграрного университета, 2016. – № 3(137), март.
8. Кошеметов, Ж.К. Эпизоотическая ситуация и меры борьбы по чуме мелких жвачных животных в мире и на территории Республики Таджикистан [Текст] /Ж.К.Кошеметов, А.Р. Сансызбай, И.Саттори, М.А.Амирбеков, Н.Я.Ярбаев, С.М.Мухитдинов, Г.Д.Сугирбаева, В.М.Матвеева, Ш.А.Турдиев, Ш.Н.Джумаев, Д.М.Шоназар // Доклады ТАСХН, 2014. - № 4. - С.30-38.
9. Кошеметов, Ж.К. Приготовление и контроль иммунопероксидазных конъюгатов для иммуноферментного анализа при чуме мелких жвачных животных [Текст] / Ж.К.Кошеметов, М.А.Аноятбеков, Ш.Н.Джумаев, Г.Ю.Бобоев, С.М.Мамадалиев, М.Б.Орынбаев // Доклады ТАСХН, 2007. - №3(13). - С.30-38.
10. Кошеметов, Ж.К. Подбор и синтез специфических праймеров для ПЦР при чуме мелких жвачных животных [Текст] / Ж.К.Кошеметов, М.А.Аноятбеков, Ш.А.Турдиев, Ш.Н.Джумаев, Г.Ю.Бобоев, А.Р. Мухиддинов // Доклады ТАСХН, 2014. - № 3(41). - С.44-50.
11. Кошеметов, Ж.К. Антивидовые сыворотки и на основе приготвление конъюгатов [Текст] / Ж.К.Кошеметов, И.Саттори, Н. Сатторов, Р.З.Нургазиев, А.В.Сухоруков, Е.О. Абдураимов// Доклады ТАСХН, №4(46). - 2015. - С.50-54.
12. Кошеметов, Ж.К. Диагностические сыворотки при чуме мелких жвачных животных [Текст] / Ж.К.Кошеметов, И.Саттори, Н. Сатторов, Р.З.Нургазиев, А.В.Сухоруков, Е.О. Абдураимов// Доклады ТАСХН, №4(46). - 2015. - С.55-59.
13. Кошеметов, Ж.К. Результаты исследований биологических проб с подозрением на чуму мелких жвачных и вакцинация животных в очаге инфекции [Текст] / Ж.К.Кошеметов, Е.О. Абдураимов, М.И.Богданова, Г.Д.Сугирбаева, Р.З.Нургазиев, Е.Д.Крутская // Вестник Кырг. гос. аграрн. Универс., 2016.
14. Кошеметов, Ж.К. Результаты исследований биологических проб с подозрением на чуму мелких жвачных и вакцинация животных в очаге инфекции [Текст] / Ж.К.Кошеметов, Е.О. Абдураимов, З.Д. Ершебулов, Д.С.Таранов, К.Д.Жугунисов, Е.А.Булатов // Вестник Кырг.гос. аграрн.универс. 2016.
15. Кошеметов, Ж.К. Приготовление антигена вируса чумы мелких жвачных животных на основе штамма «Кентау-7» [Текст] / Ж.К.Кошеметов, Х.Б. Абеуов, Р.З.Нургазиев, А.Р.Сансызбай, Сухоруков // Известия НАН РК, 2016.-№1.- С.5-11.
16. Кошеметов, Ж.К. Получение диагностических препаратов для лабораторных тест-систем при чуме мелких жвачных животных [Текст] / Ж.К.Кошеметов, Х.Б. Абеуов,

- Р.З.Нургазиев, А.Р.Сансызбай, А.В.Сухоруков, Б.М.Исмагамбетов // Известия НАН РК, 2016. - №1. С. 16-18.
17. Koshemetov, Zh.K. Seromonitoring of especially dangerous diseases in small ruminants in the Republic of Tajikistan [Text] / Zh.K.Koshemetov, V. M. Matveyeva, S. M.Mamadaliyev, S. Sh.Nurabayev, A. Zh.Azhibayev, M. B. Orynbayev // African Journal of Agricultural Research, Vol. 2 (4). - P. 187-190. - April 2007.
18. Кошеметов, Ж.К. Peste des petits ruminants: Monitoring, diagnostic and spread on the territory of the Central Asia [Текст] / Ж.К.Кошеметов, А.Р.Сансызбай, Н.Т.Сандыбаев, Б.М.Хайруллин, В.М.Матвеева, С.Ш.Нурабаев, М.И.Богданова // Life Science Journal 2014;11(7). PP.48-54.
19. Koshemetov, Zh.K. Epizootological analysis of PPR spread on African continent and in Asian countries [Text] / Zh.K. Koshemetov // African Journal of Agricultural Research, Vol. 4 (9). – P. 787-790.- September, 2009 .
20. Кошеметов, Ж.К. Эпизоотологический мониторинг чумы мелких жвачных животных и применение ПЦР для обнаружения кДНК возбудителя в биоматериале [Текст] / Ж.К.Кошеметов, М.Аноятбеков, М.А.Амирбеков, С.А.Мурватуллоев, А.Р.Сансызбай, В.М.Строчков // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ имени А. Дуйшеева. – Бишкек, 2012. - №6. - С.278-283.
21. Кошеметов, Ж.К. Разработка полимеразной цепной реакции для диагностики чумы мелких жвачных животных [Текст] / Ж.К.Кошеметов, В.М. Строчков, Н.Т.Сандыбаев, В.М. Матвеева // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ имени А. Дуйшеева. – Бишкек, 2012. - №7. - С. 241-245.
22. Кошеметов, Ж.К. Применение различных адъювантов для получения антивидовой антиовечьей сыворотки [Текст] /Ж.К.Кошеметов, А.Ж.Ажибаев, С.М.Мамадалиев, С.Ш.Нурабаев, А.А.Бурабаев, Е.О.Абдураимов // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ имени А. Дуйшеева. Бишкек, 2010. - №3. - С. 38-41.
23. Кошеметов, Ж.К. Сравнительная оценка антигенных свойств штаммов вируса чумы мелких жвачных животных [Текст] / Ж.К. Кошеметов //Биотехнология. Теория и практика, 2007. - №4. - С.79-85.
24. Кошеметов, Ж.К. Применение лабораторных тест-систем при постановке диагноза на вирусную инфекцию мелкого рогатого скота [Текст] / Ж.К. Кошеметов // Биотехнология. Теория и практика, 2007. - №2. - С.109-114.
25. Кошеметов, Ж.К. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител против вируса ЧМЖЖ в сыворотках крови мелкого рогатого скота методом одного разведения [Текст] / Ж.К.Кошеметов, А.В.Сухоруков, С.М.Мамадалиев //Биотехнология. Теория и практика, 2010. - №2. - С.72-78.
26. Кошеметов, Ж.К. Разработка иммуноферментного анализа для диагностики вируса чумы мелких жвачных животных [Текст] / Ж.К. Кошеметов // Научный журнал Исследования, результаты, 2014. - №01 (61). - С. 37-41.
27. Кошеметов, Ж.К. Очистка и концентрирование вируса чумы мелких жвачных животных [Текст] / Ж.К.Кошеметов, Г.Ю.Бобоев, Ш.Н.Джумаев, М.Аноятбеков, В.М.Строчков, Н.Т.Сандыбаев // Научно-практический журнал Ветеринария, 2012. - №7-9 (36). - С.17-21.
28. Кошеметов, Ж.К. Эпизоотический мониторинг по чуме мелких жвачных животных и применения ПЦР для обнаружения кДНК возбудителя в биоматериалах [Текст] / Ж.К.Кошеметов, М.А.Аноятбеков, М.А.Амирбеков, С.А.Мурватуллоев, Г.Ю.Бобоев, Ш.Н.Джумаев, А.Р.Сансызбай // Научно-практический журнал Ветеринария, 2012. - №10-12 (37).

29. Кошеметов, Ж.К. Изучение антигенных свойств вируса мелких жвачных животных в лабораторных тест-системах [Текст] / Ж.К.Кошеметов // Журнал Ветеринария, 2008. - №4. - С.26-31.
30. Кошеметов, Ж.К. Подбор стабилизирующий сред при лиофильной сушки диагностических препаратов при чуме мелких жвачных животных [Текст] / Ж.К.Кошеметов // Журнал Ветеринария, 2008. - №4. - С.32-35.
31. Пат. 19495 Казахстан, 2004/1677.1. Способ выявления специфических антител к вирусу чумы мелких жвачных животных [Текст] / Ж.К.Кошеметов, С.М.Мамадалиев, Б.М.Хайруллин, С.Ш.Нурабаев, М.Б.Орынбаев; Опубликовано: 19.11.2004.
32. Пат. 20450 Казахстан, 2004/1678.1. Способ выявления специфического антигена вируса чумы мелких жвачных животных [Текст] / Ж.К.Кошеметов, С.М.Мамадалиев, Е.Н.Троицкий, С.Ш.Нурабаев, М.Б.Орынбаев; Опубликовано: 19.11.2004.
33. Пат. 20025 Казахстан, 2007/0110.1. Штамм "Кентау-7" ПК-4-05Д вируса чумы мелких жвачных животных, пригодный для изготовления диагностических препаратов и контроля иммуногенности вакцинных штаммов [Текст] / Ж.К.Кошеметов, М.М.Касенов, С.Ш.Нурабаев, С.М.Мамадалиев, М.Б.Орынбаев, М.Мамбеталиев, Е.А.Булатов; Опубликовано: 29.01.2007.
34. Кошеметов, Ж.К. Специфическая индикация антигена вируса чумы мелких жвачных животных в объектах ветеринарного надзора с помощью иммуноферментного анализа [Текст] / Ж.К.Кошеметов, С.Ш.Нурабаев, С.М.Мамадалиев, М.И.Корягина // Новости науки Казахстан, 2009. - №1. – С. 133-137.
35. Кошеметов, Ж.К. Адаптация и культивирование вирусов чумы мелких жвачных животных и катаральной лихорадки овец в культурах клеток на микроносителях [Текст] / Ж.К.Кошеметов, З.Д.Ершебулов, Е.О.Абдураимов, Д.С.Таранов, В.Л.Зайцев // Материалы междунар. научно-практич. конф. «Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития», посвящённой 50-летию НИИ биологической безопасности НЦБ МОН РК. - Алматы, 2008. - С. 93-97.
36. Кошеметов, Ж.К. Анализ результатов эпизоотологического мониторинга особо опасных заболеваний на территории Республики Таджикистан и Кыргызской Республики [Текст] / Ж.К.Кошеметов, С.М.Мамадалиев, Е.Н.Троицкий, Б.М. Хайруллин, М.Б.Орынбаев, М.М.Касенов // Мат. межд. научно-практич. конф. «Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития», посвящённой 50-летию НИИББ НЦБ МОН РК. – Алматы, 2008. - С. 539-541.
37. Кошеметов, Ж.К. Чума мелких жвачных животных на территории республики Казахстан [Текст] / Ж.К.Кошеметов // Мат. III Межд. Вет. Конгресса. «Ветеринария на пути инновационного развития агропромышленного комплекса». – Алматы, 6 ноябрь 2015 г. - С.209-213.
38. Кошеметов, Ж.К. Освоение чумы мелких жвачных животных новые территории стран Африки и Азии [Текст] / Ж.К.Кошеметов // Мат. III Межд. Вет. Конгресса. «Ветеринария на пути инновационного развития агропромышленного комплекса». – Алматы, 6 ноябрь 2015 г. - С.205-209.
39. Кошеметов, Ж.К. Мониторинг по особо опасным болезням животных на территории Республики Таджикистан [Текст] / Ж.К.Кошеметов, А.Р.Сансызбай, Г.Д.Сугирбаева, В. М.Матвеева, М.И.Богданова, М.С.Сейсенбаева, С.Ш.Нурабаев, А. Н.Махмадшоев, К.Хамроев, Т.Т.Тиллоев // Сборник статей международного научно-практического семинара, посвящённого 90-летию академика Мустакимова Р.Г. «Обеспечение национальной системы биологической безопасности: практика, концепция, программы», 30-31 октября 2014 г. - С.19-23.
40. Кошеметов, Ж.К. Мониторинг особо опасных инфекционных заболеваний среди животных на территории Республики Таджикистан [Текст] / Ж.К.Кошеметов, Б.М.Исмагамбетов, А.Р.Сансызбай, Г.Д.Сугирбаева, В.М.Матвеева, М.И.Богданова, С.Ш.Нурабаев // В сборнике межд. научно-прак. конф., посвященной 80-летию заслуженного

ученого, профессора В.Л. Зайцева «Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности», 2015.- С.141-147.

41. Кошеметов, Ж.К. Мониторинг чумы мелких жвачных животных на территории Республик Казахстана и Средней Азии [Текст] / С.М.Мамадалиев, Ж.К.Кошеметов, С.Ш.Нурабаев, В.М.Матвеева, А.Ж.Ажибаев, Б.М.Хайруллин // Материалы международной конференции. – Ульяновск, 2006. - С.313-315.

42. Кошеметов, Ж.К. Отработка условий постановки реакции связывания комплемента для диагностики чумы мелких жвачных животных у коз [Текст] / Ж.К.Кошеметов, А.В.Сухоруков, Н.П.Иванов, А.К.Кусаинов // Третья Международная конференция. Состояние и перспективы развития производства ветеринарных биопрепаратов. – Алматы, 2006. - С. 324-326.

43. Кошеметов, Ж.К. Отработка условий постановки реакции связывания комплемента для диагностики чумы мелких жвачных животных с использованием сывороток, полученных от овец [Текст] / Ж.К.Кошеметов, А.В.Сухоруков, Н.П.Иванов, А.С.Сиденко // Третья Международная конференция. Состояние и перспективы развития производства ветеринарных биопрепаратов. – Алматы, 2006. - С. 327-329.

44. Кошеметов, Ж.К. Чума мелких жвачных животных в Республике Таджикистан [Текст] / Ж.К.Кошеметов, М.Б.Орынбаев, С.М.Мамадалиев, С.Ш.Нурабаев // Международная научно-практическая конференция. 19-20 мая 2005 г. -Павлодар. С.66-70.

45. Кошеметов, Ж.К. Чума мелких жвачных животных в Республике Таджикистан [Текст] / Ж.К.Кошеметов, М.Б.Орынбаев, С.М.Мамадалиев, Б.К.Бурабаев, М.А.Аноятбеков, Г.Бобоев, Ш.Джумаев // Третья Российская научная конференция с международным участием. Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера. Новосибирск. 2006. С.175-176.

46. Кошеметов, Ж.К. Серологический мониторинг эпизоотической ситуации по чуме мелких жвачных животных в странах Средней Азии [Текст] / Ж.К.Кошеметов, М.Б.Орынбаев, С.М.Мамадалиев, Б.М.Хайруллин, В.М.Матвеева, С.Ш.Нурабаев, А.Ж.Ажибаев, Б.С.Катубаева, Ы.Т.Мыктыбекова // Третья Российская научная конференция с международным участием. Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера. Новосибирск. 2006. С. 176-177.

Кошеметов Жумагали Каукарбаевичтин «Майда кепшөөчү жаныбарлардын кыргыны: мониторинг жана диагностикалык каражаттарын иштетүү» темасында биология илимдеринин доктору даражасын коргоочу диссертациясынын 06.02.02 – ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология жана иммунология адистиги боюнча

КОРУТУНДУСУ

Негизги сөздөр: майда кепшөөчү жаныбарлардын кыргыны, мониторинг, диффузиялуу преципитациялоо реакциясы, комплемент байланыштыруучу реакциясы, нейтралдаштыруу реакциясы, иммуноферменттик анализ, полимераздык чынжырлуу реакциясы.

Изилдөөнүн объектиси: Казакстан Республикасынын, Тажикистандын жана Кыргызстандын аймагында майда кепшөөчү жаныбарлардын кыргынын эпизоотиялык очоктору, диффузиялуу преципитациялоо реакциясы, комплемент байланыштыруучу реакциясы, нейтралдаштыруу реакциясы, иммуноферменттик анализ, полимераздык чынжырлуу реакцияларынын тест-системалары, майда кепшөөчү жаныбарлардын кыргынына каршы эмдөөдөн кийинки иммунитетти изилдөө жана мониторинг иштерин жүргүзүү үчүн тест-системдери.

Иштин максаты: майда кепшөөчү жаныбарлардын кыргынынын вирусунун антигенин табуу үчүн диффузиялуу преципитациялоо реакциясы, комплемент байланыштыруучу реакциясы, нейтралдаштыруу реакциясы, иммуноферменттик анализ, полимераздык чынжырлуу реакциялары иштелип чыккан жана майда кепшөөчү жаныбарлардын кыргынынын эпизоотологиялык жагдайы.

Изилдөөнүн ыкмалары: эпизоотологиялык мониторинг, вирусологиялык, серологиялык, иммунологиялык, молекулярдык, козунун бөйрөгүнүн клеткарынын өстүрмөсүндө вирусту өстүрүү.

Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы: дүйнө жүзүндө жана Казакстан Республикасында майда кепшөөчү жаныбарлардын кыргынынын эпизоотологиялык мониторингин жүргүзүү; эпизоотиялык очоктон майда кепшөөчү жаныбарлардын кыргынынын вирусунун «Кентау-7» штаммы бөлүнүп чыккан; Казакстан Республикасында биринчи жолу «Кентау-7» штаммынын негизинде комплекстүү өстүрмөлүү спецификалык антигенин даярдоо методикасы иштелип чыккан; диффузиялуу преципитациялоо реакциясы, комплемент байланыштыруучу реакциясы, нейтралдаштыруу реакциясы, иммуноферменттик анализдерин коюу үчүн жана иммуноглобулиндерди бөлүп алуу үчүн комплекстик вирусспецификалык сывороткаларды алуу схемасы иштелип чыккан; түрүнө каршы антителолорду бөлүп алуу үчүн жогоруактивдүү түрүнө каршы сывороткаларды алуу схемасы иштелип чыккан; майда кепшөөчү жаныбарлардын кыргынын полимераздык чынжырлуу реакциясы менен диагностикалоо үчүн спецификалык праймерлери тандалып алынган; майда кепшөөчү жаныбарлардын кыргыны менен ооруган жаныбарлардын органдарынан жана ткандарынан спецификалык антигендерди, вирустарды жана антителолорду табуу үчүн диффузиялуу преципитациялоо реакция, комплемент байланыштыруучу реакция, нейтралдаштыруу реакция, иммуноферменттик анализ жана полимераздык чынжырлуу реакция методдору иштелип чыккан; диффузиялуу преципитациялоо реакциясы, комплемент байланыштыруучу реакциясы, нейтралдаштыруу реакциясы, иммуноферменттик анализ, полимераздык чынжырлуу реакция диагностикалык методдору майда кепшөөчү жаныбарлардын кыргынына каршы эмдөөдөн кийинки иммунитетти изилдөө үчүн колдонулган.

Колдонуу чөйрөсү: практикалык ветеринария, эпизоотология, ветеринардык вирусология, биотехнология.

РЕЗЮМЕ

диссертации Кошеметова Жумагали Каукарбаевича на тему: «Чума мелких жвачных животных: Мониторинг и разработка средств диагностики» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Ключевые слова: чума мелких жвачных животных, мониторинг, реакция диффузионной преципитации, реакция связывания комплемента, реакция нейтрализации, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция.

Объект исследований: очаги эпизоотий по ЧМЖЖ на территории Республик Казахстан, Таджикистан и Кыргызстан, тест-системы РДП, РСК, РН, ИФА, ПЦР для проведения эпизоотологических исследований и изучения поствакцинального иммунитета против ЧМЖЖ.

Цель исследования: разработка диагностических методов РДП, РСК, РН, ИФА и ПЦР для выявления антигена вируса ЧМЖЖ, самого возбудителя и антител к нему, анализ эпизоотической ситуации по ЧМЖЖ.

Методы исследований: эпизоотологический мониторинг, вирусологические, серологические, иммунологические, молекулярные, культивирование вируса в культуре клеток ПЯ.

Полученные результаты и их новизна: проведен эпизоотический мониторинг по ЧМЖЖ в мире и Республике Казахстан; из очага эпизоотий выделен штамм «Кентау-7» вируса ЧМЖЖ; впервые в Республике Казахстан отработана методика приготовления комплексного культурального специфического антигена на основе штамма «Кентау-7»; отработана схема получения комплексных вирусспецифических сывороток для постановки РДП, РСК, РН, ИФА и выделения иммуноглобулинов; отработана схема получения высокоактивной антивидовой сыворотки для выделения антивидовых антител; подобраны специфические праймеры для постановки ПЦР диагностики ЧМЖЖ; разработаны диагностические методы РДП, РДСК, РН, ИФА и ОТ-ПЦР для обнаружения специфического антигена и вируса в различных органах и тканях больных животных ЧМЖЖ и антител к нему; диагностические методы РДП, РСК, РН, ИФА применены для определения поствакцинального иммунитета овец и коз, привитых против ЧМЖЖ.

Область применения: практическая ветеринария, эпизоотология, ветеринарная вирусология, биотехнология.

SUMMARY

dissertation Koshemetova Zhumagali Kaukarbaevicha on the theme: "The plague of small ruminants: monitoring and diagnostic tools " for the degree of Doctor of Biological Sciences in specialty 06.02.02 - veterinary microbiology, virology, epizootiology, mycology and immunology with mikotoksikologiy

Keywords: plague of small ruminants, monitoring, reaction of a diffusive precipitation, reaction of binding of a complement, neutralization reaction, immunofermental analysis, polimerazny chain reaction.

The object of research: the centers of an epizooty PPR on in the territory of the Republics Kazakhstan, Tajikistan and Kyrgyzstan, the RDP, RSK, RN, IFA, PC R test systems for carrying out the epizootologicheskikh of researches and studying of vaccine-challenged immunity against PPR.

Purpose of the study: development of the RDP, RSK, RN, IFA and PCR diagnostic methods for identification of an anti-gene of the PPR virus, the activator and antibodies to him, the analysis of an epizootic situation on PPR.

Research Methods: ehvizootologicheskij monitoring, virology, serology, immunology, molecular, culturing the virus in culture IK cells.

The results and their novelty: epizootic monitoring on PPR in the world and the Republic of Kazakhstan is carried out; from the center of an epizooty the strain of "Kantau-7" of the PPR virus is allocated; for the first time in the Republic of Kazakhstan the technique of preparation of a complex cultural specific anti-gene on the basis of a strain of "Kantau-7" is fulfilled; the scheme of receiving complex the virusspetsificheskikh of serums for statement of RDP, RSK, RN, IFA and release of immunoglobulins is fulfilled; the scheme of receiving highly active anti-specific serum for allocation of anti-specific antibodies is fulfilled; specific primers for statement of PCR of diagnostics of PPR are picked up; the RDP, RDSK, RN, IFA and OT-PTSR diagnostic methods are developed for detection of a specific anti-gene and a virus in various bodies and fabrics of sick animal PPR and antibodies to it; the RDP, RSK, RN, IFA diagnostic methods are applied to determination of vaccine-challenged immunity of the sheep and goats imparted against PPR.

Applications: Practical Veterinary, epizootiology, veterinary virology, biotechnology.