

ISSN 2224-526X

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

АГРАРЛЫҚ ҒЫЛЫМДАР СЕРИЯСЫ



СЕРИЯ АГРАРНЫХ НАУК



SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

1 (31)

ҚАҢТАР – АҚПАҢ 2016 ж.
ЯНВАРЬ – ФЕВРАЛЬ 2016 г.
JANUARY – FEBRUARY 2016

2011 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 2011 ГОДА
PUBLISHED SINCE JANUARY 2011

ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ
ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД
PUBLISHED 6 TIMES A YEAR

АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА
АЛМАТЫ, НАН РК
ALMATY, NAS RK

Б а с р е д а к т о р

Есполов Т.И.,

э.ғ.д, профессор,

ҚР ҰҒА академигі және вице-президенті

Р е д а к ц и я а л қ а с ы:

Байзақов С.Б., э.ғ.д, проф., ҚР ҰҒА академигі (бас редактордың орынбасары); **Тиреуов К.М.**, э.ғ.д, проф., ҚР ҰҒА корр-мүшесі (бас редактордың орынбасары); **Елешев Р.Е.**, т.ғ.д, проф., ҚР ҰҒА академигі; **Рау А.Г.**, т.ғ.д, проф., ҚР ҰҒА академигі; **Иванов Н.П.**, в.ғ.д, проф., ҚР ҰҒА академигі; **Кешуов С.А.**, т.ғ.д, проф., ҚР ҰҒА корр-мүшесі; **Мелдебеков А.**, а.ш.ғ.д., проф., ҚР ҰҒА академигі; **Чоманов У.Ч.**, т.ғ.д, проф., ҚР ҰҒА академигі; **Елюбаев С.З.**, а.ш.ғ.д., проф., ҚР ҰҒА корр-мүшесі; **Садықұлов Т.**, а.ш.ғ.д., проф., ҚР ҰҒА корр-мүшесі; **Сансызбай А.Р.**, а.ш.ғ.д., проф., ҚР ҰҒА корр-мүшесі; **Умбетаев И.**, а.ш.ғ.д., проф., ҚР ҰҒА корр-мүшесі; **Оспанов С.Р.**, а.ш.ғ.д., проф., ҚР ҰҒА құрметті мүшесі; **Олейченко С.И.**, а.ш.ғ.д., проф.; **Кененбаев С.Б.**, а.ш.ғ.д., проф., ҚР АШҒА академигі; **Омбаев А.М.**, а.ш.ғ.д., проф.; **Молдашев А.Б.**, э.ғ.д, проф., ҚР ҰҒА құрметті мүшесі; **Сагитов А.О.**, б.ғ.д., ҚР ҰҒА академигі; **Сапаров А.С.**, а.ш.ғ.д., проф., ҚР АШҒА академигі; **Балгабаев Н.Н.**, а.ш.ғ.д., проф.; **Умирзаков С.И.**, т.ғ.д, проф.; **Султанов А.А.**, в.ғ.д., проф., ҚР АШҒА академигі; **Жамбакин К.Ж.**, б.ғ.д., проф., ҚР ҰҒА корр-мүшесі; **Алимқұлов Ж.С.**, т.ғ.д., проф., ҚР АШҒА академигі; **Саданов А.К.**, б.ғ.д., проф.; **Сарсембаева Н.Б.**, в.ғ.д., проф.

Р е д а к ц и я к ең е с і:

Fasler-Kan Elizaveta, Dr., University of asel Switzeland; **Koolmees Petrus Adrianus**, Prof. Dr., Utrecht University, The Netherlands; **Babadoost-Kondri Mohammad**, Prof., University of Illinois, USA; **Yus Aniza Binti Yusof**, Dr., University Putra, Malaysia; **Hesseln Hayley Fawn**, As. Prof., University of Saskatchewan, Canada; **Alex Morgounov**, Pr., International Maize and Wheat Improvement Center Turkey; **Андреш С.**, Молдова Республикасы ҰҒА академигі; **Гаврилюк Н.Н.**, Украина ҰҒА академигі; **Герасимович Л.С.**, Беларусь Республикасының ҰҒА академигі; **Мамедов Г.**, Азербайджан Республикасының ҰҒА академигі; **Шейко И.П.**, Беларусь Республикасының ҰҒА академигі; **Жалнин Э.В.**, т.ғ.д., проф., Ресей; **Боинчан Б.**, а.ш.ғ., проф., Молдова Республикасы.

Главный редактор

Есполов Т.И.,

доктор эконом. наук, проф.,
вице-президент и академик НАН РК

Редакционная коллегия:

Байзаков С.Б., доктор эконом. наук, проф., академик НАН РК (заместитель главного редактора); **Тиреуов К.М.**, доктор эконом. наук, проф., член-корр. НАН РК (заместитель главного редактора); **Елешев Р.Е.**, доктор техн. наук, проф., академик НАН РК; **Рау А.Г.**, доктор техн. наук, проф., академик НАН РК; **Иванов Н.П.**, доктор ветеринар. наук, проф., академик НАН РК; **Кешуов С.А.**, доктор техн. наук, проф., член-корр. НАН РК; **Мелдебеков А.**, доктор сельхоз. наук, проф., академик НАН РК; **Чоманов У.Ч.**, доктор техн. наук, проф., академик НАН РК; **Елюбаев С.З.**, доктор сельхоз. наук, проф., член-корр. НАН РК; **Садыкулов Т.**, доктор сельхоз. наук, проф., член-корр. НАН РК; **Сансызбай А.Р.**, доктор сельхоз. наук, проф., член-корр. НАН РК; **Умбетаев И.**, доктор сельхоз. наук, проф., член-корр. НАН РК; **Оспанов С.Р.**, доктор сельхоз. наук, проф., Почетный член НАН РК; **Олейченко С.И.**, доктор сельхоз. наук, проф.; **Кененбаев С.Б.**, доктор сельхоз. наук, проф., академик АСХН РК; **Омбаев А.М.**, доктор сельхоз. наук, проф.; **Молдашев А.Б.**, доктор эконом. наук, проф., Почетный член НАН РК; **Сагитов А.О.**, доктор биол. наук, академик НАН РК; **Сапаров А.С.**, доктор сельхоз. наук, проф., академик АСХН РК; **Балгабаев Н.Н.**, доктор сельхоз. наук, проф.; **Умирзаков С.И.**, доктор техн. наук, проф.; **Султанов А.А.**, доктор ветеринар. наук, проф., академик АСХН РК; **Жамбакин К.Ж.**, доктор биол. наук, проф., член-корр. НАН РК; **Алимкулов Ж.С.**, доктор техн. наук, проф., академик АСХН РК; **Саданов А.К.**, доктор биол. наук, проф.; **Сарсембаева Н.Б.**, доктор ветеринар. наук, проф.

Редакционный совет:

Fasler-Kan Elizaveta, Dr., University of asel Switzeland; **Koolmees Petrus Adrianus**, Prof. Dr., Utrecht University, The Netherlands; **Babadoost-Kondri Mohammad**, Prof., University of Illinois, USA; **Yus Aniza Binti Yusof**, Dr., University Putra, Malaysia; **Hesseln Hayley Fawn**, As.Prof., University of Saskatchewan, Canada; **Alex Morgounov**, Pr., International Maize and Wheat Improvement Center Turkey; **Андреш С.**, академик НАН Республики Молдова; **Гаврилюк Н.Н.**, академик НАН Украины; **Герасимович Л.С.**, академик НАН Республики Беларусь; **Мамедов Г.**, академик НАН Республики Азербайджан; **Шейко И.П.**, академик НАН Республики Беларусь; **Жалнин Э.В.**, доктор техн. наук, проф., Россия; **Боинчан Б.**, доктор сельхоз. наук, проф., Республика Молдова.

Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия аграрных наук.

ISSN 2224-526X

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан № 10895-Ж, выданное 30.04.2010 г.

Периодичность 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219-220, тел. 272-13-19, 272-13-18

<http://nauka-nanrk.kz/agricultural.kz>

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2016

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Chief Editor

Espolov T.I.,

Dr. economy. Sciences, prof.,
Vice President and member of the NAS RK

Editorial Board:

Baizakov S.B., Dr. of economy sciences, prof., academician of NAS RK (deputy editor); **Tireuov K.M.**, Doctor of Economy Sciences., prof., corresponding member of NAS RK (deputy editor); **Eleshev R.E.**, Dr. Of agricultural sciences, prof., academician of the National Academy of Sciences of Kazakhstan; **Rau A.G.**, Dr. sciences, prof., academician of the National Academy of Sciences of Kazakhstan; **Ivanov N.P.**, Dr. of veterinary sciences, prof., academician of the National Academy of Sciences of Kazakhstan; **Kesha S.A.**, Dr. sciences, prof., corresponding member. NAS RK; **Meldebekov A.**, doctor of agricultural sciences, prof., academician of the National Academy of Sciences of Kazakhstan; **Chomanov U.Ch.**, Dr. sciences, prof., academician of the National Academy of Sciences of Kazakhstan; **Yelyubayev S.Z.**, Dr. of agricultural sciences, prof., corresponding member. NAS RK; **Sadykulov T.**, Dr. Farm. Sciences, prof., corresponding member. NAS RK; **Sansyzbai A.R.**, doctor of agricultural sciences, prof., corresponding member. NAS RK; **Umbetaev I.**, Dr. Farm. Sciences, prof., corresponding member. NAS RK; **Ospanov S.R.**, Dr. agricultural sciences, prof., Honorary Member of the National Academy of Sciences of Kazakhstan; **Oleychenko S.N.**, Dr. Of agricultural sciences, prof.; **Kenenbayev S.B.**, Dr. Agricultural sciences, prof., academician of the Academy of Agricultural Sciences of Kazakhstan; **Ombayev A.M.**, Dr. Agricultural sciences, Prof.; **Moldashev A.B.**, Doctor of Economy sciences, prof., Honorary Member of the National Academy of Sciences of Kazakhstan; **Sagitov A.O.**, Dr. biol. sciences, Academician of the National Academy of Sciences of Kazakhstan; **Saparov A.S.**, Doctor of agricultural sciences, prof., academician of the Academy of Agricultural Sciences of Kazakhstan; **Balgabaev N.N.**, the doctor agricultural sciences, Prof.; **Umirzakov S.I.**, Dr. Sci. Sciences, Prof.; **Sultanov A.A.**, Dr. of veterinary sciences, prof., academician of the Academy of Agricultural Sciences of Kazakhstan; **Zhambakin K.J.**, Dr. of biological Sciences, prof., corresponding member of. NAS RK; **Alimkulov J.C.**, Dr. of biological sciences, prof., academician of the Academy of Agricultural sciences of Kazakhstan; **Sadanov A.K.**, Dr. of biological Sciences, Prof.; **Sarsembayeva N.B.**, Dr. veterinary sciences, prof.

Editorial Board:

Fasler-Kan Elizaveta, Dr., University of Basel Switzzeland; **Koolmees Petrus Adrianus**, Prof. Dr., Utrecht University, The Netherlands; **Babadoost-Kondri Mohammad**, Prof., University of Illinois, USA; **Yus Aniza Binti Yusof**, Dr., University Putra, Malaysia; **Hesseln Hayley Fawn**, As. Prof., University of Saskatchewan, Canada; **Alex Morgounov**, candidate of agricultural sciences, International Maize and Wheat Improvement Center Turkey; **Andresh S.**, academician of NAS of Moldova; **Gavriluk N.N.**, academician of NAS of Ukraine; **Gerasimovich L.S.**, academician of NAS of Belorassia; **Mamadov G.**, academician of NAS of Azerbaijan; **Sheiko I.P.**, academician of NAS of Belorassia; **Zhalnin E.V.**, Dr. of technical sciences, professor, Russia, **Boinchan B.**, doctor of agricultural sciences, prof., Moldova.

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of Agrarian Sciences.

ISSN 2224-526X

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of Information and Archives of the Ministry of Culture and Information of the Republic of Kazakhstan N 10895-Ж, issued 30.04.2010

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of.219-220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,
<http://nauka-nanrk.kz/> agricultural.kz

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2016

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 1, Number 31 (2016), 5 – 11

PREPARATION OF ANTIGEN PLAGUE OF PESTE DES PETITUS RUMINANTS BASED ON STRAINS OF "KENTAУ-7"

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

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

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

³Kyrgyz National Agrarian university named after K. I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyzstan.

E-mail: koshemetov2008@mail.ru; abeuov_khairulla@mail.ru; knau-info@mail.ru; Sansyzbai-ar@mail.ru

Keywords: plague of shallow ruminant animals, stamm, antigen, cultivation, culture of cages, termolizis, technology of preparation of cultural antigen.

Abstract. It has been conducted by selection of the optimum system of cultivation strain "Kentau-7" virus plague of peste des petitus ruminants. To do this, it was used the primary (KL, LT, KC, KC) and transplanted (SK, Vero, MDBK, PK) cell cultures. Empirically it was found that the strain of "Kentau-7" of the virus plague peste des petitus ruminants breeds in all these cell cultures. However, the more active the virus accumulates in the cell culture monolayers KL, MDBK, PK and KC - virus titers reached 5,43-5,75 lgTCE_{50/cen}³.

In the experiment for the preparation of antigen plague of peste des petitus ruminants there was used 5 ways. It was established experimentally that the most active antigen obtained using the procedure 2 providing a 100-fold concentration of the cell suspension precipitating at 2000 rev / min, and a single termolizis clarification at 4000 rev/min for 30 min.

УДК 619:578.831.2:57.083.138

ПРИГОТОВЛЕНИЕ АНТИГЕНА ВИРУСА ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ОСНОВЕ ШТАММА «КЕНТАУ-7»

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

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

Жамбылская область, Кордайский район, пгт Гвардейский, Казахстан,

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

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

Ключевые слова: чума мелких жвачных животных, штамм, антиген, культивирование, культура клеток, термоллизис, технология приготовления культурального антигена.

Аннотация. Проведены по подбору оптимальную систему культивирования штамма «Кентау» вируса чумы мелких жвачных животных. Для этого использованы первичные (ПЯ, ТЯ, ПТ, ПК) и перевиваемые (ПО, Vero, МДБК, ПС) культур клеток.

Опытным путем установлено, что штамм «Кентау-7» вируса чумы мелких жвачных животных размножается на всех указанных культурах клеток. Однако более активные вирусы накапливаются в монослоях культур клеток ПЯ, МДВК, ПС и ПК – титры вируса составили 5,43-5,75 lgТЦД₅₀/см³.

В опыте для приготовления антигена вируса чумы мелких жвачных животных использованы 5 способов. Опытным путем установлено, что наиболее активные антигены получены при использовании методики 2, предусматривающей 100-кратное концентрирование клеточной суспензии осаждением при 2000 об/мин, однократный термоллизис и осветление при 4000 об/мин в течение 30 мин.

Введение. Вирусные антигены в процессе производства иммуноферментных тест-систем играют неоднозначную роль. Помимо непосредственного их применения при постановке серологической реакции для выявления антител в качестве иммуносорбента или контрольного компонента при выявлении антигена, они используются также в качестве иммуногена в процессе получения диагностических сывороток.

Антигены, используемые для приготовления иммуносорбента или иммунизации животных, во многом определяют чувствительность и специфичность иммуноферментной тест-системы. В процессе приготовления вирусные антигены, независимо от способа культивирования, оказываются контаминированы множеством балластных веществ из органов или культур тканей, что в свою очередь сказывается на специфичности препарата и соответственно самого метода. В связи с этим возникает необходимость дальнейшей очистки. Среди наиболее широко используемых методов очистки вирусов и их субъединиц считаются высокоскоростное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы или хлористого цезия [1, 2], хроматография [2–5] и другие методы, в том числе и в комбинации друг с другом [6]. Но самым эффективным способом очистки является аффинная хроматография с использованием моноклональных антител. Данный метод ввиду своей высокой специфичности позволяет получить наиболее очищенный антиген [7, 8].

Для диагностики ЧМЖЖ ранее антиген при исследовании в реакции иммунодиффузии в геле готовили из тканей и органов больных животных. Для этого ткань измельчают в ступке со стерильным песком или стеклом пестиком до образования гомогенной массы. Затем добавляют буферный солевой раствор и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость используют в качестве антигена [9, 10]. Затем было предложено готовить антиген из зараженной культуры клеток Vero. Для этого пораженный монослой трехкратно замораживали и оттаивали, осветляли низкоскоростным центрифугированием, и далее осаждали вирус высокоскоростным центрифугированием. Полученный препарат использовали для постановки дот-ИФА [11].

Позже, с развитием метода иммуноферментного анализа, требования к чистоте антигена возросли. Для большей степени очистки стали использовать двухстадийное градиентное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы и тартрата калия [12].

С развитием химических и генетических технологий появилась возможность создавать синтетические и рекомбинантные антигены. Синтетические и рекомбинантные антигены включают в себя детерминанты (эпитопы) природных антигенов и содержат компонент, определяющий специфичность строго определенного возбудителя. Использование рекомбинантов и синтетических пептидов имеет то преимущество, что работать с ними намного безопаснее, поскольку человек не контактирует с возбудителем, и кроме того упрощается ход очистки и повышается чистота антигена [13, 14].

В связи с этим в данной работе отражены исследовательские работы по подбору системы культивирования штамма «Кентау-7» вируса чумы мелких жвачных животных, и на основе приготовления антигена к данному возбудителю пригодных для постановки лабораторных тест-систем.

Материалы и методы исследований. Вирусы. Штамм вируса ЧМЖЖ «Кентау-7». Имеет биологическую активность в первично-трипсинизированной культуре клеток ПЯ 5,0 lgТЦД₅₀/см³.

Культуры клеток. Для выделения, культивирования, титрования вируса ЧМЖЖ и использовали первично-трипсинизированные культуры клеток ПЯ, ТЯ, ПТ, ПК и перевиваемые линии культуры клеток ПО, Vero, МДВК, ПС выращенные в лаборатории «Культивирования клеток и тканей» НИИПББ.

Аппараты и лабораторное оборудование

- низкотемпературный холодильник «Sanuo» (режим хранения биоматериалов минус 30-40°С);

- бытовые холодильники «Зил», «Stinol» для хранения образцов вирусодержащего материала, диагностических препаратов;

- Торсионные весы марки «ВТ»;

- Планшетный спектрофотометр марки «Multiscan Plus» фирмы «Flow Laboratories»;

Инфицирование культур клеток и получение вирусодержащего культурального материала

Заражение первично-трипсинизированных и перевиваемых линий культур клеток вирусом ЧМЖЖ осуществляли следующим способом. Культуру клеток в пробирках со сформировавшимся монослоем заражали культуральной вирусодержащей суспензией с 200 ед/мл пенициллина и стрептомицина в объеме 0,2 см³ на каждую пробирку. Контакт вирусодержащего материала с монослоем осуществляли в течение 1 час при (37±1)°С, после чего материал сливали и заливали по 1-1,5 см³ питательной среды ПСП. В ходе культивирования смену среды проводили питательной средой с 2-5% нормальной сыворотки крупного рогатого скота через каждые 2-3 сут.

Результаты исследований и их обсуждение

Активность специфического антигена зависит от оптимальной системы культивирования, в качестве которой используется культура клеток. Для этого мы провели ряд опытов с использованием первичных (ПЯ, ТЯ, ПТ, ПК) и перевиваемых (ПО, Vero, МДВК, ПС) культур клеток. С целью адаптации вируса к каждой из указанных культур было проведено по 3 последовательных пассажа на пробирках. После 3 пассажа полученный вирусодержащий материал был исследован на биологическую активность путем титрования и использован для заражения матрасов с соответствующей культурой. Зараженные матрасы были помещены при температуре (37±1)°С 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 – Результаты исследований по подбору 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, lgТЦД ₅₀ /см ³	5,43± 0,26	5,17± 0,14	4,75± 0,25	5,71± 0,22	4,25± 0,25	5,50± 0,25	4,00± 0,25	5,75± 0,25
Активность специфического антигена в РДП с SS	4,71± 0,49	3,33± 0,58	2,33± 0,67	4,33± 0,52	1,67± 0,58	4,67± 0,58	1,33± 0,58	4,33± 0,58
Активность специфического антигена в РДП с SN	–	–	–	–	–	–	–	–
Активность нормального антигена в РДП	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечания: 1. SS – сыворотка специфическая при ЧМЖЖ. 2. SN – сыворотка нормальная при ЧМЖЖ. 3. «–» – отрицательный результат.

Из данных, приведенных в таблице 1, видно, что вирус размножается на всех указанных культурах клеток. При этом по полученным результатам титрования и исследования специфического антигена в РДП наибольшее накопление вируса и антигена происходит на ПЯ, МДВК, ПС и ПК – титры вируса составили 5,43-5,75 lgТЦД₅₀/см³, титр антигена в РДП составил 4,33-4,71 log₂. В культурах клеток ПО, Vero, ТЯ и ПТ при титровании вируса на биологическую активность и при титровании антигена отмечены более низкие показатели – биологическая активность 4,00-5,17 lgТЦД₅₀/см³ и титр антигена 1,33-3,33 log₂. Препараты, приготовленные из незараженных культур клеток, показали отрицательный результат с обеими сыворотками.

В дальнейших опытах по наработке вирусодержащего материала и приготовлению специфического антигена ЧМЖЖ были использованы культуры клеток ПЯ и МДВК, поскольку ПС и ПК показали более поздние сроки наступления ЦПД.

С целью получения наиболее активного препарата необходимо было изучить 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 на активность специфического антигена в РДП. Результаты проведенных исследований отражены в рисунках 1 и 2.

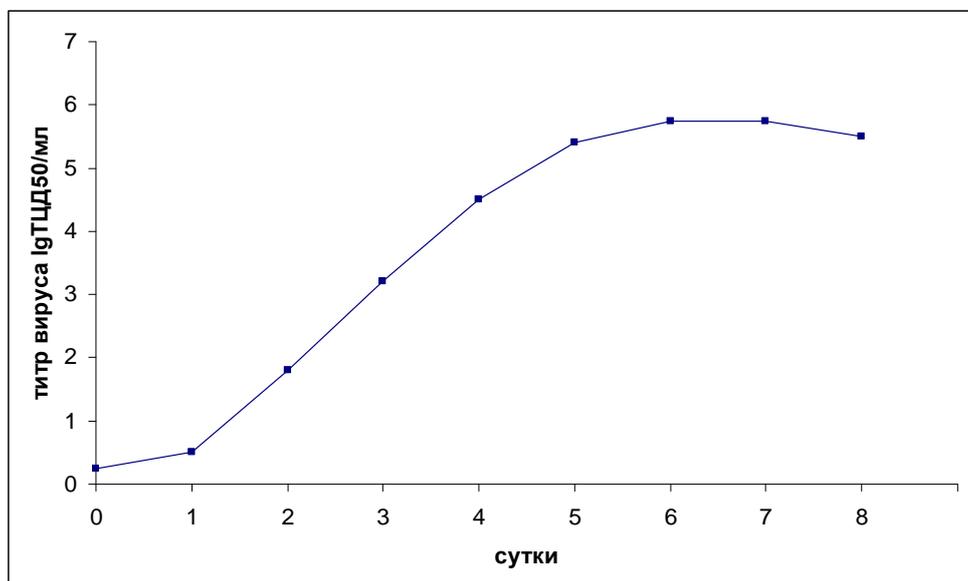


Рисунок 1 – Динамика изменения титра вируса ЧМЖЖ в процессе культивирования на культуре клеток ПЯ

На рисунке 1 показана динамика изменения титра вируса в процессе культивирования на культуре клеток ПЯ. Как видно из рисунка, рост активности наблюдается с 1-3 суток и достигает максимума на 6-7 суток. Дальнейшее культивирование не приводит к повышению титра вируса и приводит к дегенерации монослоя и отслоению его от стекла.

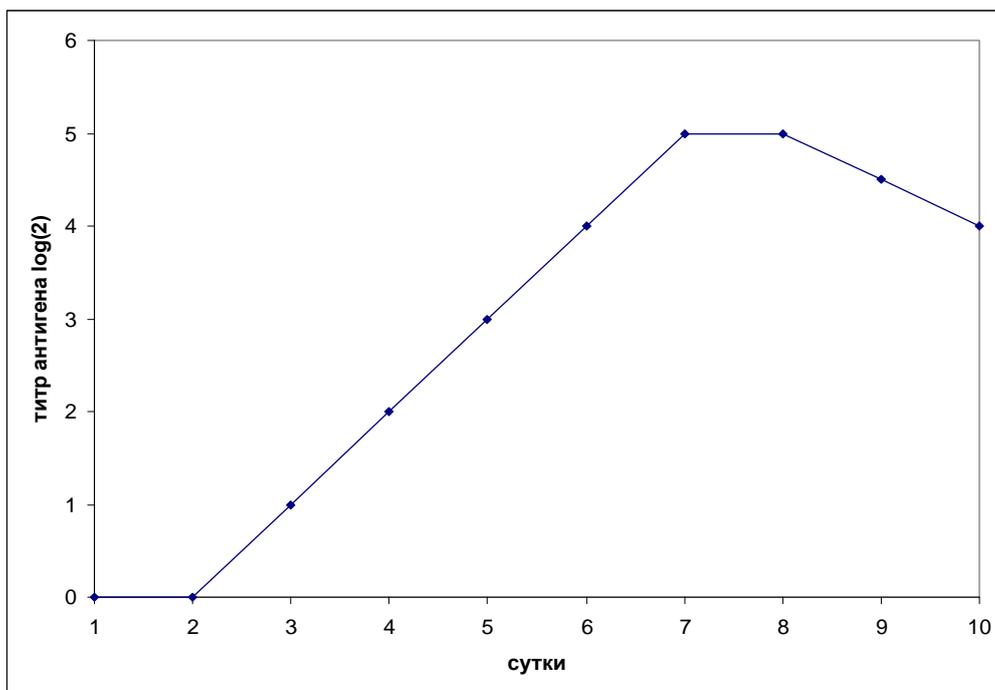


Рисунок 2 – Динамика накопления антигена вируса ЧМЖЖ при культивировании на культуре клеток ПЯ

На рисунке 2 показана динамика накопления антигена вируса ЧМЖЖ по результатам постановки РДП. Как видно из представленной кривой, антиген обнаруживается на 3-4 сут культивирования, и содержание его повышается до 6-7 сут, что совпадает с максимумом титра вируса. В дальнейшем наблюдается снижение титра антигена.

Для облегчения задачи своевременного сбора вирусосодержащего материала необходимо было изучить визуальные признаки изменения в монослое культуры клеток, соответствующие максимальному уровню содержания антигена ЧМЖЖ. При визуальном изучении поражения монослоя через микроскоп было отмечено, что максимальный выход специфического антигена совпадает с появлением «окон» в монослое.

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

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

- К клеточной 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 (концентрирование в 100 раз). Полученный препарат подвергали термолизису, однократно замораживая при минус 40°C и оттаивая при комнатной температуре. После этого центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин для удаления клеточной фракции и диализировали против физиологического раствора в течение суток.

- Клеточную суспензию концентрировали в 100 раз, подвергали однократному термолизису, замораживая при минус 40°C и оттаивая при комнатной температуре, и осветлению при 4000 об/мин в течение 30 мин для удаления клеточной фракции.

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

- Клеточную 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 осветлению при 4000 об/мин в течение 30 мин для удаления клеточной фракции.

- К клеточной суспензии добавляли сернокислый 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 осветляли при 4000 об/мин в течение 30 мин для удаления клеточной фракции. Полученный препарат диализировали против физиологического раствора в течение суток.

Как видно, в опыте были использованы разные способы концентрирования клеточной суспензии, разные режимы термолизиса и осветления готового препарата. В предварительных опытах по осветлению антигена было установлено, что центрифугирование ниже 4000 об/мин не позволяет полностью освободиться от клеточной фракции, поэтому в дальнейшем в процессе приготовления антигена мы использовали только этот режим.

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

Результаты, представленные в таблице 3, показывают, что наиболее активные антигены получены при использовании методики 2, предусматривающей 100-кратное концентрирование клеточной суспензии осаждением при 2000 об/мин, однократный термолизис и осветление при 4000 об/мин в течение 30 мин. Антигены, приготовленные по другим методикам показали более низкую активность. Нормальные антигены, приготовленные по этим же методикам, показали отрицательный результат со всеми сыворотками.

Таблица 2 – Результаты исследований в РДП антигенов вируса ЧМЖЖ, приготовленных разными способами

Активность антигена в РДП с	Методика приготовления антигена									
	1		2		3		4		5	
	AgS	AgN	AgS	AgN	AgS	AgN	AgS	AgN	AgS	AgN
SS козья	3,66±0,58	–	5,00±0,00	–	4,33±0,58	–	4,00±0,00	–	3,33±0,58	–
SS овечья	3,66±0,58	–	5,00±0,00	–	4,33±0,58	–	4,00±0,00	–	3,33±0,58	–
SN козья	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
SN овечья	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

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

Выводы. Разработана технология приготовления культурального антигена вируса ЧМЖЖ из штамма «Кентау-7», включающая культивирование штамма на культуре клеток ПЯ и МДВК, концентрирование в 100 раз осаждением клеточной суспензии и очистки от клеточного детрита центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 мин с последующей очисткой на 30% сахарозной подушке при 25000 об/мин в течение 60 мин.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Вирусология. Методы: Пер. с англ./Под ред. Б.Мейхи.- М.: Мир, 1988.- 344 с.
- [2] Frommhagen L.H. Level and specificity of antibodies evoked by crude and purified antigens of poliovirus I and echovirus 7. //Appl. Microbiol. 1965 Nov;13(6):895-8.
- [3] Wigand R., Wunn W., Schmidt W.A., Gelderblom H. Procedure for the separation of adenovirus antigens. // Arch. Gesamte Virusforsch. 1966;19(3):319-33.
- [4] Seto J.T., Becht H., Rott R. Isolation and purification of surface antigens from disrupted paramyxoviruses. // Med. Microbiol. Immunol. 1973 Sep 26;159(1):1-12.
- [5] Gumm I.D., Newman J.F. The preparation of purified bluetongue virus group antigen for use as a diagnostic reagent. //Arch Virol. 1982;72(1-2):83-93.
- [6] Сарбасов А.С., Старов С.К., Евсеев А.М. и др. Очистка белков нуклеокапсида вируса чумы плотоядных для использования их в качестве антигенов при получении диагностических сывороток // Пробл.инфекц.патологии с.-х. животных. - Владимир, 1997. - С.175.
- [7] Sugiura T., Nakajima H. Purification of equine infectious anemia virus antigen by affinity chromatography. // J Clin Microbiol. 1977 Jun;5(6):635-9.
- [8] Харитоненков И.Г. Использование метода аффинной хроматографии в вирусологии. // Вопр. вирусол., 1977, (1), с. 97-104
- [9] Peste des petits ruminants. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. (2004). Terrestrial Manual 5th Edition, Chapter 2.1.5.
- [10] Durojaiye O.A. Precipitating antibody in sera of goats naturally affected with peste des petits ruminants // Trop. Anim. Health Prod., 1982, 14, 98-100.
- [11] Obi T.U., Ojeh C.K. Dot enzyme immunoassay for visual detection of peste-des-petits-ruminants virus antigen from infected caprine tissues. //J. Clin Microbiol. 1989, Sep.;27(9):2096-9.
- [12] Saliki J.T. et al. Monoclonal antibody-based blocking enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection and titration of peste des petits ruminants virus antibody in caprine and ovine sera// J. Clin. Microbiol., 1993, 31(5), 1075-1082.
- [13] Nishihara T., Nozaki C., Nakatake H., Hoshiko K., Esumi M., Hayashi N., Hino K., Hamada F., Mizuno K., Shikata T. Secretion and purification of hepatitis C virus NS1 glycoprotein produced by recombinant baculovirus-infected insect cells. //Gene. 1993, Jul. 30;129(2):207-14.[14] Qin A., Cui Z. Purification of recombinant 38-kDa phosphorylated protein of Marek's disease virus from insect cells through an affinity column. //Chin J Biotechnol. 1994;10(3):195-201.

REFERENCES

- [1] Virology. Methods: Per. from English. / Ed. B.Meyhi.- M.: Mir, 1988.- 344 p.
- [2] Frommhagen L.H. Level and specificity of antibodies evoked by crude and purified antigens of poliovirus I and echovirus 7. //Appl. Microbiol. 1965 Nov;13(6):895-8.
- [3] Wigand R., Wunn W., Schmidt W.A., Gelderblom H. Procedure for the separation of adenovirus antigens. // Arch. Gesamte Virusforsch. 1966;19(3):319-33.
- [4] Seto J.T., Becht H., Rott R. Isolation and purification of surface antigens from disrupted paramyxoviruses. // Med. Microbiol. Immunol. 1973 Sep 26;159(1):1-12.
- [5] Gumm I.D., Newman J.F. The preparation of purified bluetongue virus group antigen for use as a diagnostic reagent. //Arch Virol. 1982;72(1-2):83-93.

- [6] Sarbasov A.S., Starov S.A., Yeliseyev A.M., et al. Cleaning nucleocapsid protein of canine distemper virus to be used as antigens in the preparation of diagnostic sera // *Probl.infect.patology agri-cul. animal.-Vladimir*, 1997, p.175. (in Russ.).
- [7] Sugiura T., Nakajima H. Purification of equine infectious anemia virus antigen by affinity chromatography. // *J Clin Microbiol.* 1977 Jun;5(6):635-9.
- [8] Kharitonenko I.G. The use of affinity chromatography in virology. // *Problems. virusol.*, 1977, (1), p. 97-104. (in Russ.).
- [9] Peste des petits ruminants. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. (2004). Terrestrial Manual 5th Edition, Chapter 2.1.5.
- [10] Durojaiye O.A. Precipitating antibody in sera of goats naturally affected with peste des petits ruminants// *Trop. Anim. Health Prod.*, 1982, 14, 98-100.
- [11] Obi T.U., Ojeh C.K. Dot enzyme immunoassay for visual detection of peste-des-petits-ruminants virus antigen from infected caprine tissues. // *J. Clin Microbiol.* 1989, Sep.;27(9):2096-9.
- [12] Saliki J.T. et al. Monoclonal antibody-based blocking enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection and titration of peste des petits ruminants virus antibody in caprine and ovine sera// *J. Clin. Microbiol.*, 1993, 31(5), 1075-1082.
- [13] Nishihara T., Nozaki C., Nakatake H., Hoshiko K., Esumi M., Hayashi N., Hino K., Hamada F., Mizuno K., Shikata T. Secretion and purification of hepatitis C virus NS1 glycoprotein produced by recombinant baculovirus-infected insect cells. // *Gene.* 1993, Jul. 30;129(2):207-14.[14] Qin A., Cui Z. Purification of recombinant 38-kDa phosphorylated protein of Marek's disease virus from insect cells through an affinity column. // *Chin J Biotechnol.* 1994;10(3):195-201.

«КЕНТАУ-7» ШТАММЫНЫҢ НЕГІЗІНДЕ ҰСАҚ КҮЙІС ҚАЙЫРАТЫН МАЛДАР ОБАСЫ ВИРУСЫНЫҢ АНТИГЕНІН ӘЗІРЛЕУ

Ж. К. Көшембетов¹, А. В. Сухоруков¹, Х. Б. Әбеуов², Р. З. Нұрғазиев³, А. Р. Сансызбай¹

¹БҒМ ҒК «Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ҒЗИ» РМҚ,

²ҚР АШМ «Қазақ ұлттық аграрлық университеті» РМҚ,

³К. И. Скрябин атындағы Қырғыз ұлттық аграрлық университеті, Бішкек, Қырғызстан

Тірек сөздер: ұсақ күйіс қайыратын малдар обасы, штамм, антиген, өсіру, жасуша өсіндері, термолизис.

Аннотация. Ұсақ күйіс қайыратын малдар обасы вирусының «Кентау» штаммын өсіру үшін тиімді жүйе тандалып алынды. Осы мақсатта алғашқы өсетін (ҚБ, ҚТ, ББ, ЛБ) және дамылсыз өсетін (ҚойБ, Vero, МДВК, ШБ) жасуша өсіндері қолданылды.

Тәжірибе жүзінде ұсақ күйіс қайыратын малдар обасы вирусының «Кентау-7» штаммын жоғарыда келтірілген барлық жасуша өсіндерінде өсетіні анықталды. Алайда, солардың ішіндегі ҚБ, МДВК, ШБ және ЛБ жасуша өсіндерінің монокабатында вирус белсенді көбейіп, титрі 5,43-5,75 lgTCID₅₀/см³ құрады.

Ұсақ күйіс қайыратын малдар обасы вирусының антигенін әзірлеу тәжірибесінде 5 тәсілді қолдандық. Тәжірибе жүргізу жолымен минутына 2000 айналым жылдамдықпен отырғызу арқылы жүзеге асатын жасушалық суспензияны 100 есе концентрациялау, бір мәрте термолизистен өткізу және 30 минут бойы минутына 4000 айналыммен айналдырып мөлдіретуді көздейтін 2-ші әдістемені қолданғанда ең белсенді антигендерді алу мүмкін болды.

Поступила 19.01.2016г.

Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

[www:nauka-nanrk.kz](http://www.nauka-nanrk.kz)

<http://agricultural.kz/>

Редактор *М. С. Ахметова*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 27.01.2016.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
10,7 п.л. Тираж 300. Заказ 1.