

Оразымбетова Н.К., Матвеева В.М., Матраимов М.Б., Кошеметов Ж.К.

ПОДБОР СПОСОБОВ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА ДЛЯ ТЕСТ-СИСТЕМ ПРИ ГРИППЕ ЛОШАДЕЙ

Оразымбетова Н.К., Матвеева В.М., Матраимов М.Б., Кошеметов Ж.К.

ЖЫЛКЫЛАРДЫН САСЫК ТУМООСУНДА ТЕСТ-СИСТЕМА ҮЧҮН АТАЙЫН АНТИГЕНДИ ДАЯРДООНУН ЫКМАЛАРЫН ТАНДОО

N.K. Orazymbetova, V.M. Matveeva, M.B. Matraimov, Zh.K. Koshemetov

SELECTION OF METHODS FOR PREPARING OF SPECIFIC ANTIGEN FOR TEST-SYSTEMS FOR EQUINE INFLUENZA

УДК: 619:616-07/619.3

В данной статье приведены результаты исследований по получению комплексных специфических антигенов вируса гриппа лошадей (ВГЛ) для лабораторных тест-систем. Для получения специфических антигенов ВГЛ использованы 4 способа для штамма А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и 3 способа для штамма А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8). Наиболее активные антигены из монослоя культуры клеток MDCK получены по второму способу, где активность гемагглютинина и антигена составила в РГА 1:512-1:1024, РДП 1:8-1:32 и в ИФА 1:5120-1:20480. Также активные специфические антигены получены в 10-11 сутокных РКЭ, где их активность составила в РГА 1:20480-1:40960, РДП 1:4-1:8 и в ИФА 1:10240-1:20480

Ключевые слова: вирус гриппа лошадей, иммуноферментный анализ, вируссодержащая суспензия, хорио-аллантоисная оболочка, развивающиеся куриные эмбрионы, аллантоисная жидкость.

Макалада лабораториялык тест-система үчүн жылкылардын сасык тумоосунун вирусунун комплекстүү атайын антигенин алуу боюнча жүргүзүлгөн изилдөөлөрдүн жыйынтыгы келтирилди. ЖСТВнун атайын антигенин алуу үчүн А/жылкы 1/Киргизия/74 (H7N7) штаммынын 4 ыкмасы жана А/жылкы/Отар/764/07 (H3N8) штаммынын 3 ыкмасы колдонулду. Гемагглютининдин жана антигендин көрсөткүчү РГА да 1:512-1:1024, РДП да 1:8-1:32 жана ИФА да 1:5120-1:20480 түзгөн MDCK клеткаларынын культурасынын монокатмарынын жогорку активдүү антигени экинчи ыкма менен алынды. Ошондой эле 10-11 күндүк РКЭ де активдүүлүгү РГА да 1:20480-1:40960, РДП да 1:4-1:8 жана ИФА да 1:10240-1:20480 түзгөн активдүү атайын антигендер алынды.

Негизги сөздөр: жылкылардын сасык тумоосунун вирусу, иммуноферменттик анализ, вирус алып жүрүүчү суспензия, хориоаллантоиддик кабык, өнүгүп жаткан тоок эмбриондору, аллантоисдик суюктук.

Results of researches for obtaining complex specific antigens of equine influenza virus (EIV) for the laboratory test-systems is presented in this article. Four methods for A/equine1/Kirghizia/74 (H7N7) strain and three methods for A/equine/Otar/764/07 (H3N8) strain are used for obtaining specific antigens of equine influenza virus. The most active antigens from monolayer of cell culture MDCK is obtained by the second method, where hemagglutinin and antigen activity was 1:512-1:1024 in RHA, 1:8-1:32 - in RDP and 1:5120-1:20480 - in ELISA. The active specific antigens is obtained on 10-11 days old developing chicken embryos, where their activity was 1:20480-1:40960 in RHA, 1:4-1:8 - in RDP and 1:10240-1:20480 - in ELISA.

Key words: equine influenza virus, enzyme-linked immunosorbent assay, virus containing suspension, chorio-allantoic membrane, developing chicken embryos, allantoic fluid.

Введение

Грипп лошадей (ГЛ) - остро протекающая высококонтагиозная болезнь, характеризующаяся кратковременной непостоянной лихорадкой, катаральным воспалением слизистых оболочек верхних дыхательных путей, сухим и болезненным кашлем и вызывается вирусом гриппа лошадей [1, 2, 3].

В общем комплексе мероприятий по предупреждению заноса и ликвидации особо опасных вирусных болезней сельскохозяйственных животных существенная роль принадлежит лабораторной диагностике и идентификации возбудителей заболевания [4].

В лабораторной диагностике ВГЛ важное место занимают методы, основанные на обнаружении специфического антигена и антител к нему в биоматериалах, отобранных от больных и переболевших животных [4]. В настоящее время в лабораторной диагностике ГЛ в странах дальнего зарубежья используются как классические, так и новые методы, такие как: выделение вируса на куриных эмбрионах, реакция торможения гемагглютинации (РТГА), иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР) и др. [5, 6].

В свою очередь вышеуказанные качества методов диагностики ГЛ зависят от качества диагностических препаратов (праймер, антиген, сыворотка, конъюгат) входящих в набор. Среди этих диагностических препаратов при постановке ИФА, РТГА, РДП для диагностики ГЛ особую роль играет специфический антиген.

Цель нашего исследования – получение комплексного специфического антигена для лабораторных тест-систем для диагностики гриппа лошадей.

Материалы и методы

В экспериментальной работе использовали следующие штаммы ВГЛ: «А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7)» и «А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8)».

Для культивирования штаммов ВГЛ и получения вируссодержащих суспензий были использованы: развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) 10-

11 - суточного возраста и перевиваемая линия культуры клеток почки собаки (MDCK), выращенная в 1,5 литровых матрасах и пробирках.

Культивирование штаммов ВГЛ. Для получения вирусосодержащего материала использовали 10-11-сут РКЭ и перевиваемые культуры клеток MDCK, которые инфицировали вирулентными штаммами А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ.

Культуру клеток MDCK инфицировали вирусом, наработанным в РКЭ в разведениях с 1:10 до 1:100. Инкубацию проводили в течение 72 ч при 35-37 °С.

Определение гемагглютинирующей и антигенной активности ВГЛ. Гемагглютинирующую и антигенную активность ВГЛ определяли в РГА, РДП и ИФА по общепринятой методике.

Результаты исследования

В ходе проведения исследований по получению очищенных и концентрированных антигенов из штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ использовали несколько способов приведенных в таблице. Специфический антиген из штамма А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) получали 4 способами, а из штамма А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ 3 – способами.

Приготовленные разными способами антигены были оценены на антигенную активность в РГА, ИФА и РДП, результаты представлены в таблице.

Как видно из данных таблицы все испытанные нами способы приготовления специфических антигенов ВГЛ пригодны для постановки ИФА. Но более активные антигены для обоих штаммов ВГЛ получены с использованием способа осаждения клеточной фракции центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 мин, концентрирование в 100 раз от первоначального объема с последующим 3-кратным термолизисом и центрифугированием при 4000-4500 об/мин в течение 20-30 мин, где активность препаратов после обработки была наиболее высокая. Также надо отметить, что активность антигенов находилась в прямой зависимости от заражающей дозы эмбрионального вируса при инфицировании им клеток MDCK, т.е. более активные антигены в РДП (1:8-1:32) были приготовлены при заражении клеток MDCK эмбриональным вирусом в разведениях 1:10-1:25.

Таблица - Сравнительная активность, приготовленных различными способами, антигенов ВГЛ в лабораторных тест-системах

№	Способы приготовления антигена	Сравнительная активность антигена в		
		РГА	РДП	ИФА
из штамма А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ				
1	Осаждение клеточной (MDCK) фракции центрифугированием, концентрирование в 100 раз от первоначального объема, 1-кратный термолизис	1:256-1:512	1:2-1:4	1:2560-1:5120

2	Осаждение клеточной (MDCK) фракции центрифугированием, концентрирование в 100 раз от первоначального объема с последующим 3-кратным термолизисом и центрифугированием	1:512-1:1024	1:8-1:16	1:5120-1:20480
3	Осаждение вируса из культуральной (MDCK) вирусосодержащей жидкости с помощью ПЭГ-6000 в 7 %-ной конечной концентрации с добавлением 3 % NaCl, последующее осаждение антигена центрифугированием, концентрирование в 100 раз от первоначального объема, 2-3-кратный термолизис	1:128-1:256	ц-1:2	1:1280-1:5120
4	Осаждение вируса из вирусосодержащей АЖ с помощью ПЭГ-6000 в 7 %-ной конечной концентрации при pH-8,5, последующее осаждение антигена центрифугированием, концентрирование в 100 раз от первоначального объема, 2-3-кратный термолизис	1:10240-1:20480	1:2-1:4	1:10240-1:20480
из штамма А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ				
1	Гомогенизация инфицированных ХАО, приготовление 20 % суспензии, трехкратный термолизис, осветление центрифугированием	1:64-1:128	1:4-1:8	н.и
2	Осаждение клеточной (MDCK) фракции центрифугированием, концентрирование в 100 раз от первоначального объема с последующим 3-кратным термолизисом и центрифугированием	1:1024-1:2048	1:16-1:32	1:10240-1:20480
3	Осаждение вируса из вирусосодержащей АЖ с помощью ПЭГ-6000 в 7 %-ной конечной концентрации при pH-8,5, последующее осаждение антигена центрифугированием, концентрирование в 100 раз от первоначального объема, 2-3-кратный термолизис и осветление	1:20480-1:40960	1:4-1:8	1:10240-1:20480
Примечания: 1 «ц» - в цельном виде; 2 Активность антигена выражена в обратных величинах.				

Кроме того активные антигены из данных штаммов ВГЛ получены из вирусосодержащей аллантоисной жидкости (АЖ) РКЭ с использованием ПЭГ-6000 в 7 %-ной конечной концентрации при pH-8,5.

Заключение

В результате проведенных опытов установлено, что все полученные нами антигены отличаются высокой активностью в РГА, РДП и ИФА по отношению к положительным сывороткам. Наиболее активные антигены к штаммам А/лошадь1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ из монослоя культуры клеток MDCK получены по второму способу (таблица), активность полученных антигенов составила в РДП 1:8-1:32, в ИФА 1:5120-1:20480, а гемагглютинирующая активность в РГА 1:512-1:2048. Активные антигены к штаммам

А/лошадь1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ также получены из аллантоисной жидкости, активность данных антигенов в РДП составила 1:2-1:8, в ИФА 1:10240-1:20480, а гемагглютинирующая активность в РГА 1:10240-1:40960.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности использования полученных специфических антигенов в РДП, ИФА для обнаружения специфических антител против ВГЛ.

Литература:

1. Иванова Г.А. Грипп лошадей // Ветеринария. - 1970. - №8. - 41 с.
2. Равилов А. З. Грипп сельскохозяйственных животных // - Москва. - 1989. - С. 19-21.
3. Юров К.П. Грипп лошадей//Ветеринария.- 2009.- С.56-58.
4. Бессарабов Б.Ф. Инфекционные болезни животных // - М.: Колос. - 2007. - 671 с.
5. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г. и др. Изоляция штаммов вируса гриппа А/Н5N1 от домашних и диких птиц в период эпизоотии в западной Сибири (июль 2005) и их депонирование в Государственную коллекцию вирусов (06 августа 2005 г.) // Вопросы вирусологии - 2006. - №1. - С.11-14.
6. Методические рекомендации «Быстрая диагностика гриппа и других ОРВИ иммунофлуоресцентным методом», М., 2006.

Рецензент: к.биол.н., профессор Ахматов М.К.