

*Сейсенбаева М.С., Матвеева В.М., Матраимов М.Б., Кошеметов Ж.К.,  
Бержанова Р.Ж., Аширбек А.Т.*

**ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОГО МЕТОДА ОЧИСТКИ АНТИГЕНА ВОЗБУДИТЕЛЯ  
ПАСТЕРЕЛЛЕЗА ДЛЯ ИМУННОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (ИФА)**

*Сейсенбаева М.С., Матвеева В.М., Матраимов М.Б., Кошеметов Ж.К.,  
Бержанова Р.Ж., Аширбек А.Т.*

**ИМУННОФЕРМЕНТТИК АНАЛИЗ (ИФА) ҮЧҮН ПАСТЕРЕЛЛЕЗ КОЗГОГУЧУНУН  
АНТИГЕНИН ТАЗАЛОО МЕТОДУНУН ОПТИМАЛДЫК ЫКМАСЫН АНЫКТОО**

*M.S. Seisenbaeva, V.M. Matveeva, M.B. Matraimov, Zh.K. Koshemetov,  
R.Zh. Berzhanova, A.T. Ashirbek*

**THE METHODS CLEANING PATHOGEN ANTIGENS  
PASTEURELLOSIS FOR ELISE**

УДК: 597.82.:591.524.1(04)

*Приготовлен очищенный и концентрированный специфический антиген из штамма «Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ» возбудителя пастереллеза, активность которого составила в реакции диффузионной преципитации (РДП) 1:32. С использованием данного антигена, получены активные и специфичные антисыворотки.*

**Ключевые слова:** пастереллез, антиген, антисыворотка.

*Активдүүлүгү диффуздук преципитация реакциясында (ДПП) 1:32 түзгөн пастереллез козгогучунун «Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ» штаммынан тазаланган жана концентрацияланган атайын антигени даярдалды. Бул антигенди колдонуу менен активдүү жана атайын сары суу алынды.*

**Негизги сөздөр:** пастереллез, антиген, антисыворотка.

*The purified and concentrated specific antigen from «Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ» strain is prepared, activity in the reaction of diffusion precipitation (RDP) was 1:32. Active and specific antisera are obtained with using of this anti-gen.*

**Key words:** pasteurellosis, antigen, antiserum.

**Введение**

Пастереллез – острое заболевание, характеризующееся быстрым течением и высокой смертностью животных. Пастереллезная инфекция регистрируется повсеместно и известна как гетерогенный бактериальный агент, вызывающий тяжелые заболевания среди многих животных, в том числе геморрагическую септицемию у сайгаков [1].

Экономический ущерб от пастереллеза складывается из потерь от падежа, вынужденного убоя больных животных и затрат на проведение профилактических и оздоровительных мероприятий.

В цепи мероприятий по борьбе с пастереллезом важным звеном является постановка своевременного и точного диагноза заболевания. В настоящее время для диагностики и дифференциации пастереллеза используются микробиологические методы и лабораторные тест-системы.

Из лабораторных тест-систем в мировой практике для диагностики возбудителя пастереллеза применяются реакция пассивной гемагглютинации

(РПГА), реакция диффузионной преципитации (РДП), иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР) и другие методы [2].

Результативность и эффективность диагностики инфекционных болезней сельскохозяйственных животных зависит от качества применяемых диагностических препаратов, используемых при постановке вышеуказанных лабораторных тест-систем.

В связи с вышеизложенным, в данной работе мы привели результаты получения активных и специфичных антигенов, пригодных для применения в иммунологических тест-системах с целью своевременной диагностики возбудителя пастереллеза.

**Материалы и методы исследования**

**Возбудитель.** В работе использовали штамм «Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ».

**Освежение.** Для освежения штамма «Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ» возбудителя пастереллеза сделали посев на питательный агар с 20% сывороткой крови КРС (СН) и проводили инкубацию в течение 24-48 ч при 37°C.

**Наработка биомассы.** Для наработки биомассы из штамма «Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ» делали посев на 10 чашек Петри с питательным агаром и проводили инкубацию в течение 24-48 ч при 37°C по общепринятому методу. Приготовление суспензии (бактериальной массы) на физиологическом растворе, объем 50 см<sup>3</sup> на одну чашку Петри.

**Инактивация суспензий возбудителя пастереллеза.** Полученную бактериальную массу штамма «Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ» инактивировали формалином в конечной концентрации 0,3% в течение 24 часов при 37°C при постоянном перемешивании.

**Очистка антигена штамма «Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ» возбудителя пастереллеза.** С целью освобождения суспензий от клеточных балластов их отмывали трехкратно физиологическим раствором, путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 15 мин, затем сконцентрировали пробы 10-кратно. Далее антиген готовили 5 способами.

1 способ – осаждение суспензии при 15000 об/мин в течение 15 мин, обработка осадка *Bug Buster Mix* из расчета 5 см<sup>3</sup> на 1 г.

2 способ – обработка суспензии УЗИ по 5 сек 3 раза (21 кГц, 20-30 миллиампер).

3 способ – отмывка трехкратно путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 10 мин.

4 способ – обработка УЗИ по 5 сек 3 раза (21 кГц, 20-30 миллиампер), надосадов обрабатывали твин-эфиром.

5 способ – по методу Grosset [3].

Содержание белка в препаратах определяли с помощью аппарата *Nano Drop* – 2000.

Животные. Донорами специфических антител служили козы и овцы местной породы в возрасте до одного года.

### Результаты и обсуждение

В ходе работы нами было использованы 5 способов очистки и концентрирования антигена штамма «*Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ*» возбудителя пастереллеза по вышеуказанным методам. После чего определяли концентрацию белка в препаратах, таблица 1.

Из результатов, приведенных в таблице 2 видно, что наиболее активный антиген возбудителя пастереллеза получен по 5 способу, включающему осаждение микробных клеток и трехкратную отмывку физиологическим раствором, разбавление осадка микробных клеток дистиллированной водой, разрушение микробных клеток путем замораживания и оттаивания с последующим центрифугированием. Активность антигена приготовленного по 5 способу в РДП составила 1:32. Остальные антигены в РДП показали низкую активность, в цельном виде или 1:2.

Таблица 1 - Концентрация белка в антигенах штамма «*Pasteurella/Saigas/2011/ ZKO/KZ*» возбудителя пастереллеза

Номер способа приготовления антигена	Наименование штамма	Концентрация белка, мг/см <sup>3</sup>
1	« <i>Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ</i> »	46,4
2		23,3
3		20,0
4		25,7
5		48,4

Антигенную активность полученных препаратов проверяли в РДП, результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Активность приготовленных антигенов в РДП

Исследуемые антигены	Наименование штамма	Активность в РДП	
		СС	СН
AgC 1 способ	« <i>Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ</i> »	ц	-
AgC 2 способ		1:2	-
AgC 3 способ		1:2	-
AgC 4 способ		1:2	-
AgC 5 способ		1:32	-

**Примечания:** 1 «ц» - в цельном виде; 2 «-» - отрицательный результат; 3 «СС» - сыворотка специфическая к возбудителю пастереллеза; 4 «СН» - сыворотка нормальная; 5 «AgC» - антиген специфический.

В ходе проведенного исследования удалось сконцентрировать, очистить и проверить антигенные свойства штамма «*Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ*» возбудителя пастереллеза.

В дальнейшем были проведены опыты по получению антисывороток к штамму «*Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ*» возбудителя пастереллеза на разных видах животных с применением антигена приготовленного по методу Grosset [3]. Так как в организме кроликов активный иммунный ответ получен после введения данного антигена.

При получении антисывороток к возбудителю пастереллеза, использовали коз и овец местной породы в возрасте 8-12 мес. Животных до проведения экспериментов выдерживали на карантине в течение 2-х недель с проведением термометрии, клинического осмотра и исследованием сывороток крови на наличие вируснейтрализующих антител. Содержание животных проводили в соответствии с "Инструкцией по содержанию подопытных животных и ветеринарно-санитарным правилам в экспериментально-биологических изоляторах "НИИПББ инв. №1069 [4].

Схемы получения антисывороток к возбудителю пастереллеза представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Схемы получения антисывороток к возбудителю пастереллеза

№ схемы	Вид животного	Наименование вводимого материала	Способ введения	Концентрация белка, мкг/см <sup>3</sup>	Интервал между введениями, сут
1	Овца	антиген №5 штамма « <i>Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ</i> »	В область предлопаточных лимфатических узлов	80	18
				150+ 0,05% ГОА	9
				250+2,5% Montanid ISA-71	7
2	Коза	« <i>Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ</i> »	В область предлопаточных лимфатических узлов	80	18
				150+ 0,05% ГОА	9
				250+2,5% Montanid ISA-71	7
Примечание – «ГОА» – гидроксид алюминия.					

Оценку активности и специфичности полученных антисывороток проводили в РДП. Результаты проведенного опыта по получению антисывороток к возбудителю пастереллеза и оценка их активности представлены в таблице 5.

**Таблица 5- Оценка активности антисывороток к возбудителю пастереллеза в РДП**

Наименование антисыворотки	Активность			в ИФА
	в РДП			
	AgC бруцелле за	Ag H	AgC	
Овечья	-	-	1/32	1:3200
Козья	-	-	1/4	1:800
<p><b>Примечания:</b> 1 «-» – отрицательный результат;                  2 «AgH» – антиген нормальный;                  3 «AgC» – антиген специфический.</p>				

Из результатов таблицы 5 видно, что активность овечьей антисыворотки к возбудителю пастереллеза составила в РДП 1:32, в ИФА 1:3200, козья антисыворотка показала активность в РДП - 1:4, в ИФА 1:100-1:800. Неспецифические реакции с гетерогенными антигенами не наблюдались, что свидетельствует о специфичности полученных нами антител.

Приготовленные диагностические препараты были эффективно использованы при диагностике возбудителя пастереллеза.

При определении оптимальных условий очистки и концентрирования антигена возбудителя пастереллеза до настоящего времени зарубежными учеными проведены определенные исследования. Так, например Рубан Е.А. соавторами [5] и Самуйленко А.Я. соавторами [6] для получения биомассы возбудителя пастереллеза в работе использовали производственные штаммы возбудителя *Pasteurella multocida* А-1231, В-681 и Д-Т-80. Питательные среды для выращивания вакцинных штаммов готовили по действующим инструкциям на монопрепараты, а их выращивание осуществляли в лабораторных ферментерах АНКУМ-2М, оснащенных системами автоматического контроля и регулирования основных параметров культивирования (температура, рН, и CO<sub>2</sub>).

Концентрация культур производственных штаммов по окончании процесса выращивания (10-

12 час) была 22 ± 2 млрд.м.т./мл. Культуры пастерелл инактивировали формалином в конечной концентрации 0,3% при температуре 37°С в течение 24 часов и концентрировали методом центрифугирования.

#### Выводы

В результате проведенных исследований был отработан оптимальный метод очистки и концентрирования антигена из штамма «*Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ*» возбудителя пастереллеза, активность которого в РДП составила 1:32. С использованием данного антигена, получены активные и специфичные антисыворотки на разных видах животных. Наиболее активные и специфичные сыворотки к штамму «*Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ*» возбудителя пастереллеза получены на овцах, активность данной сыворотки в РДП составила 1:32, в ИФА 1:3200. Приготовленные диагностические препараты были эффективно использованы при диагностике возбудителя пастереллеза.

#### Литература:

1. Емельяненко П.А. Учение об инфекции и иммунитете. Ветеринарная микробиология. М.: Колос.- 1982. С.82 – 137.
2. Хралович Т.М. Получение специфического сенситина для ИФА из штаммов *Pasteurella multocida* серотипов А1, А3, А4. Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. Минск. 2006. № 3. С.57-62.
3. Grosset E. - C.R. Soc. Biol., 1935, v. 118, 765 p.
2. Сансызбай А.Р. "Инструкция по содержанию подопытных животных и ветеринарно-санитарным правилам в экспериментально-биологических изоляторах" инв. №1069. Утвержденный генеральным директором НИИПББ Республики Казахстан.
3. Рубан Е.А., Соловьев Б.В., Самуйленко С.А., Самуйленко А.Я., Клюкина В.И. Некоторые проблемы глубинного культивирования клеток животных в биореакторах. Биологическая научно-практическая конференция ВГНКИ. Москва. 2003. С.290-293.
4. Самуйленко А.Я., Рубан Е.А., Гунин М.А., Самуйленко С.А. Исследование гибели клеток в процессе аэрации при глубинном культивировании в биореакторе. Международная научно-практическая конференция «Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных» во Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии. Покров. 2000. С.199-203.

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