

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО, ВОДНОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПЕРЕРАБАТЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

**КЫРГЫЗСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ЖИВОТНОВОДСТВА, ВЕТЕРИНАРИИ И ПАСТБИЩ  
ИМЕНИ АРСТАНБЕКА ДУЙШЕЕВА**

**На правах рукописи  
УДК 619:616.98:578.835.1Я-07-084**

**ИСКЕМБАЕВА ГУЛМАЙРАМ АСАНОВНА**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ  
ПРЕЦИПИТИРУЮЩИХ АНТИГЕНОВ И СЫВОРОТОК ДЛЯ  
ДИАГНОСТИКИ ЯЩУРА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

**16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология**

**А в т о р е ф е р а т**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук**

**Бишкек - 2005**

Работа выполнена в отделе вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ, в хозяйствах Ошской, Таласской, Чуйской, Иссыккульской областей Кыргызской Республики.

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук Белеков Т.Б.

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор  
Иманалиев М.И.  
кандидат ветеринарных наук, доцент  
Буларкиев К.У.

Ведущая организация: Казахский научно-исследовательский  
ветеринарный институт, г.Алматы

Защита состоится **20 января 2005 года в 10<sup>00</sup> часов** на заседании межведомственного диссертационного совета Д 16.04.246 (соучредители Кыргызский научно-исследовательский институт животноводства, ветеринарии и пастбищ им.Арстанбека Дуйшеева и Кыргызский аграрный университет им.К.И.Скрябина) по адресу: 722160, Кыргызская Республика, Аламудунский р-н, с.Лебединовка, пр.Ленина, 354 «А».

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ имени Арстанбека Дуйшеева.

Автореферат разослан «18» декабря 2004 г.

Ученый секретарь межведомственного  
диссертационного совета,  
кандидат ветеринарных наук,  
старший научный сотрудник



Акылбекова К.Т.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Успех проводимых мероприятий по ликвидации инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных зависит от своевременной и достоверной диагностики.

Диагностика ящура до 1960 года осуществлялась с помощью клинических, эпизоотологических данных, а также биопробы. В последние годы по данным зарубежных исследователей, так и стран содружеств для лабораторной диагностики ящура можно применять РСК (реакция связывания комплемента), РДП (реакция диффузионной преципитации), МФА (метод флуоресцирующих антител), РРИД (реакция радиальной иммунодиффузии), ИФА (иммуноферментный анализ), РН (реакция нейтрализации), РУСК (реакция угнетения связывания комплемента). Многие из этих методов диагностики довольно сложны в постановке, требуются специальные условия, дорогостоящее оборудование и диагностикумы.

По мнению некоторых исследователей РДП и РРИД в агаровом геле являются простым, легко доступными методами по сравнению с другими реакциями и могут быть использованы в любой диагностической лаборатории и в полевых условиях. Однако, в доступной литературе не имелось достаточных сведений об оптимальных условиях постановки этих реакций. Отсутствовал метод по изготовлению компонентов для постановки РДП, РРИД и не были изучены основные свойства антигенов и сывороток (активность, специфичность, стабильность при хранении и др.).

В связи с вышеизложенным необходимо было отработать оптимальные условия постановки РДП и РРИД; совершенствовать методы изготовления преципитирующих антигенов и сывороток; изучить свойства полученных диагностических препаратов и выяснить возможность применения РДП и РРИД для лабораторной диагностики ящура.

**Связь темы диссертации.** Исследования проводились согласно тематического плана НИР в отделе вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ им.А.Дуйшеева (КыргызНИИЖВиП) по теме: «Разработать и внедрить эффективные средства диагностики и специфической профилактики ящура сельскохозяйственных животных», регистрационный № 0001378.

**Цель и задачи исследования.** Целью наших исследований явились получение преципитирующих антигенов и сывороток вируса ящура, типов А и О. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: изучить эпизоотическую ситуацию ящура в хозяйствах Республики; отработать оптимальные условия постановки РДП и РРИД при ящуре; совершенствовать методы изготовления преципитирующего антигена и сыворотки для РДП и РРИД при ящуре; изучить возможность использования РДП и РРИД для обнаружения специфических антител и антигена при ящуре.

**Научная новизна.** Впервые в Кыргызской Республике получены преципитирующие антигены и сыворотки, обладающие высокой активностью,

специфичностью, пригодные для использования в РДП и РРИД. Отработаны оптимальные условия постановки РДП и РРИД для диагностики ящура. Отработан ранний метод диагностики ящура (до появления афтозных поражений). Установлены оптимальные условия хранения антигенов и сывороток.

**Практическая значимость.** На основании проведенных исследований разработаны и внедрены: Рекомендация, методическое руководство, Брошюры, Инструкция и Наставление по диагностике, профилактике и организации мероприятий по борьбе с ящуром, которые используются в практической ветеринарии, в учебном процессе, а также для проведения семинаров с ветеринарными специалистами лабораторий по диагностике ящура. Получен патент на изобретение штамма вируса ящура типа О «Белек-2001», Кыргызпатент от 30 августа 2004 года, № 688.

**Экономическая значимость полученных результатов.** Полученные преципитирующие антигены и сыворотки позволяют в течении 6-ти часов при микрометоде, 14-ти часов при макрометоде выявить преципитирующие антигены у больных, антитела у вакцинированных и переболевших животных, а также антиген в плазме крови у больных животных до проявления клинического признака. Стоимость преципитирующего антигена и сыворотки в 3-4 раза дешевле, чем коммерческие.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:** условия постановки РДП и РРИД; преципитирующие антигены для выявления антител в сыворотках крови у вакцинированных и переболевших животных; преципитирующие сыворотки для выявления антигена у больных ящуром животных.

**Личный вклад соискателя.** Диссертационная работа выполнена соискателем лично согласно утвержденного тематического и индивидуального плана. Ею изучено распространение ящура у различных видов животных, усовершенствованы методы изготовления преципитирующего антигена и сывороток, изучены его свойства и методы постановки РДП и РРИД.

**Апробация результатов исследования.** Основные материалы диссертации доложены на заседаниях ученого Совета Кыргызского НИИЖВиП им.А.Дуйшеева в 1996-2004 гг., на региональных и международных научно-производственных конференциях Кыргызской аграрной академии (г.Бишкек, 1996, 1998, 1999), пгт.Гвардейский – Каз.НИСХИ (1998), г.Жалалабат (1999), Кыргызский аграрный университет, Центр аграрной науки и консультационных служб (г.Бишкек, 2002, 2003, 2004), ведущих, периодических и специализированных научных журналах и изданиях Кыргызской Республики и Республики Казахстан (2004 г.).

**Публикация результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, в которых изложены основные положения и выводы диссертационной работы.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 108 страницах компьютерного текста и включает введение, обзор литературы,

собственные исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список использованных источников литературы и приложения.

Работа иллюстрирована 17 таблицами и 9 рисунками.

Библиографический список включает 160 источника, в том числе 30 иностранных.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Материалы и методы

Сбор данных и анализ эпизоотического процесса по ящуре проводился методом ВНИЯИ (Методика по идентификации типов и вариантов вируса ящура и изучение краевой эпизоотологии. Владимир, 1970) и ВНИИВВиМ (Рекомендации по методике эпизоотологического исследования. Москва, 1982).

Для изготовления специфического антигена для РДП и РРИД использовали 1-2-х дневных крольчат в период агонии, зараженных лапнизированным вирусом ящура типа А и О (90 голов). Крольчат заражали подкожно по 1 мл 10%-ной суспензией 5-го пассажа лапнизированного вируса. Тушки павших крольчат измельчали в размельчителе РТ-1 с фосфатным буферным раствором в соотношении 1:10.

Очистку вирусосодержащей суспензии проводили хлороформом (5%) и комбинированным методом в сочетании ПЭПА (полиэтиленполиамин) 0,05 – 0,1% + хлороформ – 5%. Вирус, очищенный комбинированным методом инактивировали 0,15% ДЭИ-ном (димерэтиленимин) при температуре 58°C в течение 1-го часа и формальдегидом 0,04%-ной концентрации в течении 48-ми часов.

Авирулентность антигена определяли на мышцах-сосудах (100 голов), которых заражали в дозе 0,1 мл подкожно в область спины. Учет результатов проводили ежедневно в течение 7-ми суток. После очистки, инактивации вирусосодержащую суспензию концентрировали ПЭГ-лем (полиэтиленгликоль) м.м.6000 в концентрации – 5, 7, 10%.

Специфическую преципитирующую сыворотку получали от различных видов сельскохозяйственных животных: крупного рогатого скота (10 голов), овец (10 голов), свиней (10 голов), яков (30 голов), привитых традиционной и универсальной моновалентной вакциной типа А и О. Животных иммунизировали подкожно по 2 мл и через 20, 30, 60 дней получали пробы сывороток крови и проверяли в РДП и РРИД.

Нормальным антигеном служили не зараженные 1-2-х дневные крольчата, приготовленные таким же способом, как специфический антиген. Нормальную сыворотку брали от здоровых невакцинированных ящуром животных. Для диагностики и типизации вируса ящура использовали афты и плазму крови от больных, а также сыворотку от переболевших ящуром животных. Цитрированную кровь для ранней диагностики ящура брали от

больных ящуром крупного рогатого скота в объеме 100-150 мл (температура тела 41-41,5°C). Плазму концентрировали 7%-ным ПЭГ-лем в 10, 20 раз. Осадок ресуспендировали на физиологическом растворе.

Активность и специфичность преципитирующих антигенов и сывороток определяли в РДП и РРИД в 2-х модификациях: макрометод в чашках Петри и микрометод на предметных стеклах. При постановке реакции агар «Дифко» использовали в концентрации от 0,5-3,0%, pH среды 7,0-8,8, хлористого натрия 0,6-1,6% и температурного режима +4 - +37°C. Учет результатов проводили при микрометоде через 6-24 часа, макрометодом через 14-48 часов.

Сохраняемость антигена и сывороток определяли при температуре +4, +6, +20, +25, -10, -12°C в течение года.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Анализ эпизоотической ситуации ящура у различных видов сельскохозяйственных животных

За последние 9 лет (1996-2004 гг.) ящур в республике регистрировался ежегодно, за исключением 2002 г. Наибольшее количество неблагополучных пунктов регистрировалось в 2001, 2003-2004 гг.

В 1996-1997 гг. выявлено 52 неблагополучных пункта в Ошской и Жалалабатской областях, где заболело 427 голов крупного рогатого скота.

Чуйская область более 20-ти лет была благополучной по ящуру. Но, в 1998 году в апреле месяце ящур возник в Сокулукском, Аламудунском, Московском районах, а также в с.Токтогул Жалалабатской области, где выделено 30 очагов, заболело 50 голов крупного рогатого скота. По Чуйской и Жалалабатской областям выявлен 31 очаг, заболело 876 голов крупного рогатого скота, 67 голов овец, 14 голов свиней. Пало 6 голов крупного рогатого скота и 6 голов свиней.

Нами установлено, что причиной и источником возникновения ящура в Чуйской долине послужили бычок и телка, купленные в начале апреля на скотском рынке с.Сокулук.

В июле 1999 года ящур возник в Таласской области, где зарегистрировано 4 очага (с.Кок-Сай, Шекер, Грозный, Кайнар) заболело 279 голов крупного рогатого скота, 298 голов овец.

В 2000 году ящур регистрировался в хозяйствах Манасского, Таласского, Сузакского районов Жалалабатской области, Кеминского района Чуйской области, где соответственно возникло 9, 1 и 4 неблагополучных пунктов. Заболело 448 голов крупного рогатого скота. Заболевание возникло там, где весенняя профилактическая вакцинация не проводилась.

В 2001 году ящур регистрировался во всех областях республики: 27 очагов по Чуйской, 14 – Жалалабатской, 8 – Иссыккульской, 12 – Нарынской, 11 – Ошской, 2 – Таласской, где заболело 3742 голов животных, из них 2213 голов крупного рогатого скота, 1469 голов овец, 60 голов свиней, пало 4 головы крупного рогатого скота и 13 голов свиней.

В 2003 году ящур зарегистрирован в 6-ти областях Республики: Баткенской, Ошской, Жалалабатской, Таласской, Иссыккульской и Чуйской, где установлено 44 неблагополучных пунктов, заболело 6699 голов крупного рогатого скота. Наибольшее количество заболевших животных отмечено в Чуйской и Иссыккульской областях 6301 и 229 голов, соответственно.

В 2004 году заболевание животных ящуром установлено также в 6-ти областях: Баткенской, Жалалабатской, Таласской, Иссыккульской, Нарынской и Чуйской, где отмечено 17 неблагополучных пунктов, заболело 1504 голов крупного рогатого скота, из них 118 голов в Таласской, 1264 голов Нарынской областях. При серологическом исследовании установлено тип О и Азия-1, но в основном превалировал тип Азия-1. Подъем эпизоотии наблюдался в апреле-июне-декабре месяце. Нами выявлено, что основной причиной возникновения ящура явилось бесконтрольное передвижение (купля-продажа) животных, невыполнение карантинно-ограничительных мероприятий, несоблюдение схемы вакцинации, перевозки и хранения препаратов из-за недостаточного финансирования противоэпизоотических мероприятий.

Результаты наших исследований показали, что заболевание отмечалось в основном среди крупного рогатого скота, реже овец, свиней. Животные болели в тяжелой генерализованной форме, с характерными клиническими признаками.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИЗГОТОВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК И АНТИГЕНОВ ДЛЯ РДП И РРИД

### Изготовление специфической преципитирующей сыворотки

Животных (крупный рогатый скот, овцы, свиньи, яки) иммунизировали двукратно моновалентной традиционной противоящурной вакциной в объеме 2,0 мл. Затем через 20, 30, 60 дней получали пробы сывороток и исследовали в РДП и РРИД.

Результаты исследований показывают, что преципитирующие антитела в сыворотках крови крупного рогатого скота и овец обнаруживаются в титрах от 1,0 до 3,0, у яков от 2,0 до 5,0, а у свиней титр антител обнаруживался в титрах 1,0  $\log_2$ .

Следовательно, у яков антитела в 3-4 раза было выше, чем у других животных. Поэтому в дальнейших опытах нами использованы яки.

Животных иммунизировали моновалентной универсальной противоящурной вакциной типа А и О в дозе 2,0 мл подкожно и гипериммунизировали через 7 дней после первичной иммунизации, в той же дозе, что и в первый раз (рис.1).



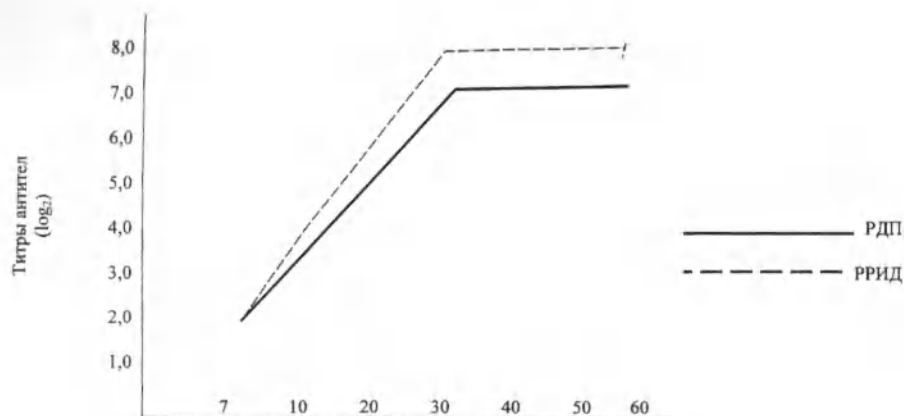


Рис. 1. Титр преципитирующих антител в сыворотках яков, привитых универсальной противоящурной вакциной после двукратной иммунизации

Данные исследования показали, что сыворотки яков иммунизированные универсальной противоящурной вакциной типа А, так и типа О были высокоактивными на 60-й день в РДП до 7,0, в РРИД до 8,0 log<sub>2</sub>.

#### Изготовление специфического преципитирующего антигена

Для выделения штаммов вируса ящура использовали 1-2-х дневных крольчат, весом не менее 60 грамм, клинически здоровых, хорошо насосавшихся молоком матери. Заражение крольчат проводили афтозным вирусом ящура типа А и О. Тушки крольчат измельчали в размельчителе РТ-1 с фосфатным буферным раствором в соотношении 1:10 с рН 7,2-7,4. Замораживали при температуре - 40°C, затем размораживали и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 30 минут. Надосадок использовали для дальнейшей работы.

Очистку вирусосодержащей суспензии проводили с использованием 5%-го хлороформа и комбинированным методом: 0,05%-ный полиэтиленполиамин + 5%-ный хлороформ. В результате было установлено, что очистка вирусосодержащей суспензии 5%-ным хлороформом, приготовленная на фосфатном буферном растворе без добавления ПЭПА показала активность в РДП и РРИД от 2,0 до 3,0 log<sub>2</sub>, а при использовании комбинированного метода (5% хлороформ + 0,05% ПЭПА) активность была несколько выше, т.е. в РДП - 3,0, РРИД - 4,0 log<sub>2</sub>.

Таким образом оптимальным для очистки преципитирующего антигена типов А и О является комбинированный метод: 5%-ный хлороформ + 0,05%-

ный ПЭПА. Далее преципитирующие антигены инактивировали формальдегидом от 0,02 до 0,1%, ДЭИ от 0,1 до 0,4%-ой концентрации при 58°C в течение 1-го часа. Остаточную вирулентность антигена проверяли на мышатах-сосунах 3-4-х дневного возраста (90 голов). При этом опытные животные оставались живыми в течение срока наблюдения (7 суток).

В результате установлено, что оптимальной концентрацией при изготовлении антигена для РДП и РРИД является как формальдегид (0,04%), так и ДЭИ (0,15% концентрации).

Очищенный, инактивированный антиген концентрировали ПЭГ м.м. 115, 6000 в 5, 7, 10%-ной концентрации.

Результаты исследований показали, что концентрирование преципитирующего антигена ПЭГ-лем в 10 раз титр антигена повышается в 2 раза, при концентрировании в 50 и 100 раз в 4, 16 раз, соответственно по сравнению с исходным материалом. Концентрация антигена ПЭГ-лем в 5, 7, 10%-ной концентрации существенных различий на активность преципитирующего антигена не оказывали.

Таким образом, оптимальным для очистки преципитирующего антигена является комбинированный метод: 5%-ный хлороформ + 0,05%-ный ПЭПА, для концентрирования ПЭГ м.м. 6000 в концентрации 7%, для инактивации 0,15%-ный ДЭИ или формальдегид 0,04%-ной концентрации.

#### Отработка условий постановки РДП и РРИД

В качестве специфического антигена для РДП и РРИД использовали афты от больных ящуром животных и 1-2-х дневных крольчат в период агонии, зараженных лапинизированным вирусом ящура. Нормальным антигеном служили здоровые крольчата, приготовленные таким же способом, как специфический антиген (Раздел материалы и методы). Специфическими антителами служили сыворотка, полученная от яков, привитых универсальной моновалентной вакциной типов А и О. Нормальную сыворотку получали от невакцинированных яков. Контрольными антигенами и сыворотками служили стандартные диагностикумы, изготовленные ВНИИИ (Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт).

Для определения оптимальных условий постановки РДП и РРИД нами было изучено концентрация хлористого натрия, агарового геля, рН агаровой среды и температурного режима на образование линий преципитации.

Для определения оптимальной концентрации хлористого натрия в РДП и РРИД был взят 1%-ный агаровый гель с концентрацией соли 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6. Реакция ставилась при температуре +4, +6, +14, +20 - +25°, +37°C, рН 7,0 до 8,8 (табл.1). Результаты исследований показали, что содержание хлористого натрия в агаровой среде в пределах от 0,6 до 1,2% практически не влияет на результативность РДП и РРИД, но наиболее выраженные линии преципитации образуются в среде состоящей из 1%-го хлористого натрия.

Таблица 1  
Влияние различных концентраций компонентов на результаты  
РДП и РРИД

Компоненты реакций	Концентрация компонентов реакции в %	Разведение сыворотки ( $\log_2$ )					
		1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
Антиген специфический + сыворотка специфическая	NaCl						
	0,6	+	+	+	+	+	-
	0,8	+	+	+	+	+	-
	1,0	+	+	+	+	+	-
	1,2	+	+	+	+	+	-
	1,4	+	+	+	+	-	-
	1,6	+	+	+	-	-	-
Антиген специфический + сыворотка специфическая	агара						
	0,5	+	+	+	+	+	-
	1,0	+	+	+	+	+	-
	1,5	+	+	+	+	+	-
	2,0	+	+	+	+	-	-
	2,5	+	+	+	-	-	-
	3,0	+	+	-	-	-	-
Антиген специфический + сыворотка специфическая	pH агаровой среды						
	7,0	+	+	+	-	-	-
	7,2	+	+	+	-	-	-
	7,4	+	+	+	+	-	-
	7,6	+	+	+	+	+	-
	7,8	+	+	+	+	+	-
	8,0	+	+	+	+	+	-
	8,2	+	+	+	+	+	-
	8,4	+	+	+	+	+	-
8,6	+	+	+	+	+	-	
	8,8	+	+	+	+	-	-
Антиген специфический + сыворотка специфическая	T° внешней среды						
	+4 - +6	+	+	+	+	-	-
	+12 - +14	+	+	+	+	-	-
	+20 - +25	+	+	+	+	+	-
	+37	+	+	+	+	+	-
Нормальный антиген		-	-	-	-	-	-

Примечание: + - результат положительный  
- - результат отрицательный

Для определения оптимальной концентрации агарового геля, последний готовили на физиологическом растворе с концентрацией 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0%. Концентрация NaCl равнялась от 0,6 - 1,6; pH среды от 7,0-8,8. Реакцию ставили при температуре +4, +6, +12, +14, +20, +25, +37°C. Учет результатов проводили в течение 24-48 часов.

Как видно из результатов, представленных в таблице 1, РДП и РРИД при ящуре идет в широком диапазоне концентраций агарового геля. Однако, оптимальной концентрацией агара в геле является 0,5-1,5%. Учитывая полученные результаты в дальнейших исследованиях использовали гель с 1%-ной концентрацией агара.

Определение оптимального значения pH агаровой среды проводили с 1%-ной концентрацией агарового геля, содержащей 1% хлористого натрия, с pH от 7,0 до 8,8 (табл.1). Из данных таблицы видно, что реакция идет со всеми значениями pH среды. Однако, оптимальным показателем pH агаровой среды оказалось 7,4-7,8. Следует отметить, что при значении равным pH 7,6 линии преципитата с максимальными разведениями сывороток были выражены более отчетливо.

Температура внешней среды при постановке РДП и РРИД изучали при значениях +4 - +6°C; +12 - +14°C; +20 - +25°C и при + 37°C. При этом концентрация агара и хлористого натрия были равны 1%, а pH среды 7,6 (табл.1). Из данных таблицы видно, что линии преципитата в РДП и РРИД образуются во всех испытанных температурных условиях. Однако, при температуре +4, +6, +12, +14°C линии преципитата проявлялись с задержкой и слабее, чем при температуре +20 - +37°C. Однако, более быстро и выражено образуются линии преципитата в среде, состоящей из 1% агара, 1%-ного хлористого натрия, pH-среды 7,6 и температуры внешней среды +20 - +37°C.

#### Скорость образования линий преципитата при макро-и микрометоде

С этой целью по отработанным условиям с заведомо известными специфическими и нормальными антигенами и сыворотками реакцию ставили макрометод в чашках Петри и микрометод на предметных стеклах. Учет результатов реакции проводили в течение 24-х часов (через каждые 2 часа).

Полученные результаты, как при макрометоде, так и при микрометоде совпадают. Однако при микрометоде предварительный учет первых результатов можно производить уже через 6 часов, тогда как при макрометоде через 14 часов.

#### Изучение свойств преципитирующих антигенов и сывороток при ящуре

Известно, что диагностикумы, применяемые для серологических реакций должны быть активными, специфичными и длительное время оставаться при соответствующих условиях хранения.

**Антигены.** Активность неинфекционных антигенов проверяли в РДП и РРИД. С этой целью антигены испытывали в разведениях от 1,0 до 6,0  $\log_2$  с сыворотками в удвоенном титре. Реакцию ставили в чашках Петри и на предметных стеклах. За титр принимали наибольшее его разведение, образующий линию преципитата с заведомо положительной преципитирующей сывороткой, взятой в рабочем титре (табл.2).

Таблица 2

#### Активность преципитирующих антигенов

Серии антигенов	Титры антигенов ( $\log_2$ )	
	РДП	РРИД
1	3,0	3,0
2	4,0	5,0
3	4,0	4,0
Нормальный антиген	-	-

Из приведенных в таблице 2 данных видно, что активность приготовленных преципитирующих антигенов как типа А, так и типа О равнялись от 3,0 до 5,0  $\log_2$ .

**Специфичность.** Специфические свойства преципитирующих антигенов проверяли с нормальными, заведомо положительными, и гетерологичными сыворотками других инфекций (оспа овец). Кроме того, в опытах использовали диагностические сыворотки других типов вируса ящура и вирусных инфекций: АЗИЯ-1, С, SAT-1, SAT-2, SAT-3.

В результате выявлено, что преципитирующие антигены реагируют в РДП и РРИД только с гомологичными сыворотками, полученные на соответствующие типы вируса ящура. Результаты реакций с гетерологичными сыворотками были отрицательными.

**Сохраняемость.** После определения преципитирующей активности антиген разливали в ампулы по 2 мл и запаивали. Активность антигенов изучали при различных температурах и сроках хранения: +4, +6, +20, +25, -10, -12°C в течение 10, 30, 60, 90, 180, 270 и 360 дней.

В результате установлено, что антигены сохраняют преципитирующую активность при температуре -10, -12°C в течение 360 дней (срок наблюдения). При температуре +4 - +6°C активность сохраняется в течение 180, а при температуре +20 - +25°C полностью теряет активность через 60 дней после хранения.

#### Сыворотки

**Активность** преципитирующих сывороток полученных от яков испытывали в РДП и РРИД как в цельном, так и в разведениях от 1,0 до 9,0  $\log_2$ . Антигены в реакцию брали в удвоенном (рабочем) титре. Реакцию ставили в чашках Петри и на предметных стеклах. За титр антитела принимали

наибольшее разведение сыворотки, дающие четкие линии преципитата с заведомо положительным антигеном, взятым в реакцию (табл.3).

Таблица 3

#### Преципитирующая активность специфических сывороток

№№ сывороток	Титры сывороток в РДП и РРИД ( $\log_2$ )			
	Нативные		После обработки теплом	
	РДП	РРИД	РДП	РРИД
25	6,0	7,0	6,0	7,0
47	7,0	8,0	7,0	8,0
60	7,0	8,0	7,0	8,0
71	5,0	6,0	5,0	6,0

Данные таблицы показывают, что сыворотки как нативные, так и обработанные теплом (58°C) в РДП и РРИД не снижали специфическую преципитирующую активность.

**Специфичность** преципитирующих сывороток проверяли в РДП и РРИД специфичными и нормальными преципитирующими антигенами вируса ящура типов А, О, С, Азия-1 и антигенами оспы овец. В результате установлено, что сыворотки оказались, специфичными с гомологичными антигенами, а с гетерологичными реакциями была отрицательной.

Таким образом, подводя итоги результатов опыта по изучению свойств преципитирующих антигенов и сывороток следует отметить, что приготовленные диагностикумы являются активными, специфичными, стабильными при хранении, и могут быть использованы для диагностики ящура.

**Сохраняемость** полученных преципитирующих сывороток изучали при различных температурных условиях в течение 12-ти месяцев хранения +4 - +6; +20 - +25; -10 -12°C. В результате установлено, что сыворотки исходную преципитирующую активность сохраняют в течение 12-ти месяцев при температуре -10, -12°C (срок наблюдения), в то время как при температуре +4 - +6°C к 300 дню титры антител снижаются до 4,0  $\log_2$ , а при температуре +20 - +25°C к 120-150 дню полностью утрачивают преципитирующую активность.

#### Выявление преципитирующего и комплементсвязывающего антигена у больных ящуром животных

Для изучения этого вопроса от больных и павшего от ящуром крупного рогатого скота отбирали пробы из различных органов (афты, легкие, печень, селезенка, средостенные лимфатические узлы, сердечная мышца, межкопытное поражение). Из полученных материалов готовили 33%-ную суспензию и исследовали в РДП, РРИД и РСК. В качестве специфической сыворотки

использовали сыворотки, полученные от яков. Результаты опытов показали, что специфический антиген вируса ящура обнаруживается в афтозных материалах, межкопытных поражениях и в средостенных лимфатических узлах, а в пробах тканей и органов павших животных (легкие, печень, селезенка, сердечная мышца) преципитирующих и комплементсвязывающих антиген обнаружить не удалось.

Таким образом, исследования показали, что в случае подозрения на ящур антиген следует обнаруживать в афтозных материалах, межкопытных поражениях и средостенных лимфатических узлах.

#### Обнаружение преципитирующих и комплементсвязывающих антител у крупного рогатого скота, привитых бивалентной противоящурной вакциной типов А и О

С целью обнаружения и установления сроков появления специфических антител в сыворотках крови крупного рогатого скота от привитых животных получали сыворотки до прививки и через 7, 30, 120 и 180 дней и исследовали в РДП, РРИД и РСК (табл.4).

Анализы исследований показали, что преципитирующие антитела удается обнаружить через 7 дней с момента вакцинации, причем процент выявления зависит от вида реакций. Наибольший процент антител обнаруживается через 30-120 дней после прививки. В РСК от 53,3-90%, РДП от 30,0-76,6%, РРИД от 63,3-93,3%,

Таблица 4

#### Обнаружение преципитирующих и комплементсвязывающих антител у крупного рогатого скота, привитых противоящурной вакциной

Наименование вакцины	Реакция	Тип вируса	Антитела до вакцинации	Сроки исследования сывороток							
				7	%	30	%	120	%	180	%
Бивалентная противоящурная вакцина	РСК	А	0	10/30	33,3	27/30	90,0	20/30	66,6	6/30	20,0
		О	0	6/30	20,0	25/30	83,3	16/30	53,3	2/30	6,6
	РДП	А	0	4/30	13,3	23/30	76,6	12/30	40,0	0/30	0
		О	0	2/30	6,6	22/30	73,3	9/30	30,0	0/30	0
	РРИД	А	0	8/30	26,6	28/30	93,3	19/30	63,3	5/30	16,6
		О	0	7/30	23,3	25/30	83,3	20/30	66,6	5/30	16,6

Примечание: 0 – антитела отсутствовали;  
числитель – количество положительных животных;  
знаменатель – количество исследованных животных.

а на 180-день в РДП антитела выявить не удалось. В РСК и РРИД обнаруживались антитела от 6,0-20,0%.

#### Оценка чувствительности и специфичности РДП и РРИД при диагностике ящура сельскохозяйственных животных

Для выяснения диагностической ценности РДП и РРИД испытуемые материалы получали от больного ящуром крупного рогатого скота и свиней, принадлежащих неблагополучным хозяйствам и фермерам Чуйской, Иссык-кульской, Нарынской, Таласской, Жалалабатской и Ошской областей. При этом в качестве контроля использовали в РДП, РРИД и РСК стандартные сыворотки ВНИИЗЖ и сыворотки яков. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 5.

Проведенные исследования показали, что применение специфических сывороток, полученных от яков позволяют выявить антиген вируса ящура гомологичного типа в полевых пробах не снижая чувствительности реакций. Полученные данные свидетельствуют о том, что антигены выявляемые в РДП и РРИД полностью согласуются с результатами традиционной реакции РСК.

Таблица 5

#### Результаты исследований пробы материалов от больных ящуром животных, доставленных из различных зон республики (1996-2004 гг.)

№	Наименование областей	Количество исследованных проб	Количество положительных реакций					
			РДП		РРИД		РСК	
			Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
1.	Чуйская	21	20	95,2	20	95,2	19	90,5
2.	Иссыккульская	9	8	88,8	8	88,8	8	88,8
3.	Нарынская	5	5	100	5	100	5	100
4.	Жалалабатская	8	6	70,0	6	70,0	7	62,5
5.	Таласская	16	14	87,5	14	87,5	13	81,2
6.	Ошская	13	9	69,2	10	76,9	9	69,2
7.	Стандартные антигены	Тип О	+	+	+	+	+	+
		А	-	-	-	-	-	-
		С	-	-	-	-	-	-
		Азия-1	+	+	+	+	+	+

Примечание: + - результат положительный;  
- - результат отрицательный

Таким образом, исследованиями установлено, что РДП и РРИД по чувствительности и специфичности пригодны для обнаружения антигена вируса ящура и ее типизации.



### Использование сыворотки крови больных животных для ранней диагностики ящура

После изучения возможности обнаружения преципитирующего антигена в афтозных материалах и тканях, полученных от больных животных, необходимо было разработать раннюю диагностику ящура. Известно, что прижизненная диагностика с успехом применяется для обнаружения преципитирующего антигена в крови больных животных при различных вирусных инфекциях. С этой целью мы брали кровь от больных животных, зараженных в экспериментальных условиях и от больных животных непосредственно в очагах инфекций. Пробы цитрированной крови получали из яремной вены до заражения, а затем ежедневно до проявления типичных клинических признаков заболевания в количестве 100-150 мл. Плазму крови концентрировали полиэтиленгликолем (ПЭГ) м.м. 6000 в 10-20 раз от исходного объема и осадок использовали в качестве антигена. Плазму крови от здоровых животных обрабатывали таким же путем. Приведенные данные свидетельствуют о том, что метод концентрирования антигена с использованием ПЭГ позволяет выявить антиген вируса в плазмах крови больных животных. Причем в первые сутки после начала температурной лихорадки результативность исследований в РДП и РРИД не превышает 10%, в то время как на 2 и 3 сутки выявляемость была равна 95% случаев.

Таким образом, результаты опытов показали, что в первые дни после проявления лихорадки количество преципитирующего антигена в крови бывает незначительным, а на 2-3 сутки антиген вируса накапливается в достаточном количестве, которое способно давать линии преципитации со специфическими сыворотками. Следовательно, для ранней диагностики ящура методом РДП и РРИД (выявление антигена) плазму крови от больных животных следует брать не раньше, чем через 2-е суток после повышения температуры тела с последующей 10-20-ти кратной концентрацией ПЭГ.

### ВЫВОДЫ

1. Выявлены некоторые особенности проявления эпизоотического процесса ящура в условиях рыночной экономики, которые выражаются усилением риска распространения ящура. За 1996-2004 г.г. выявлено 2436 неблагополучных пунктов по ящуру и заболело 12,4 тыс. голов крупного и 1,8 тыс. голов мелкого рогатого скота.

2. Усовершенствована схема изготовления преципитирующего антигена комбинированным методом и изучены его свойства.

3. Впервые получена в Кыргызстане высокоактивная, специфическая преципитирующая сыворотка на яках и изучены ее диагностические свойства.

4. При ящуре сельскохозяйственных животных впервые разработаны оригинальные методы ранней диагностики заболевания (до проявления клинических признаков).

5. Экспериментально доказано, что преципитирующие антигены у больных ящуром животных выявляется от 87,5% до 100% случаев в афтозных материалах на языке, межкопытной щели и средостенных лимфатических узлах, а антитела обнаруживались на 14-21 дни после прививки. Максимальный титр достигал к 30-60 дню, а у переболевших животных через 10-14 дней после выздоровления.

6. Отработаны оптимальные условия постановки РДП и РРИД: 1,0% агаровый гель, с содержанием 1,0% хлористого натрия (рН 7,6) и температуры окружающей среды  $t^0 +20, +25$  и  $+37^0$ .

7. Применение РДП и РРИД позволяет обнаруживать преципитирующие антигены у больных и антитела у вакцинированных животных в течение 6 и 14 часов, соответственно.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практической ветеринарии предлагается нормативно-техническая документация: Инструкция «О мероприятиях по предупреждению и ликвидации заболевания животных в Кыргызской Республике», утвержденной Минюстом Кыргызской Республики от 25 ноября 1999 года, регистрационный номер 113 от 27 декабря 1999 года; Рекомендации «По диагностике, специфической профилактике и организации мероприятий по борьбе с ящуром сельскохозяйственных животных», утвержденная Департаментом госветеринарии при МСВХ Кыргызской Республики, 1998 г.; Методическое руководство для студентов факультета ветеринарной медицины и практических ветеринарных врачей «Ящур сельскохозяйственных животных». Одобрено и рекомендовано к изданию кафедрой инфекционных и инвазионных болезней животных (протокол № 4 от 5 апреля 2001 г.) и методической комиссии факультета ветеринарной медицины КАУ (протокол № 5 от 13 апреля 2001 г.); Наставление по лабораторной диагностике ящура методом РДП и РРИД в агаровом геле, рассмотрено и одобрено Ученым Советом КНИИЖВиП им.А.Дуйшеева, протокол № 5 от 19 октября 2004 г. и утверждено Департаментом Госветеринарии Кыргызской Республики 15 декабря 2004 г.; Для проведения семинаров с ветспециалистами, ветсервисов, фермерско-крестьянскими хозяйствами предложена брошюра «Предохраняйте скот от ящура», выпущенное совместно с проектом овцеводства при МСВХ Кыргызской Республики, 2000 г.; Материалы по проекту «Организация и обучение ветеринарных специалистов, работников айыл өкмөтү и фермеров», КНИИЖВиП им.А.Дуйшеева, 2004 г.

### СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сравнительная оценка противоящурных сывороток, полученных на различных видах животных. //Сб. научн. трудов. – Жалалабат, 1997. – Ч.1, С.98-100. (соавт. Белеков Т., Шакиров А.Э., Мамбеталиева Ж.).

2. Некоторые биологические свойства вируса ящура, выделенного от крупного рогатого скота в Ошской области. //Сб.научн.труд. – Жалалабат, 1997. – Ч.1, С.113-115. (соавт. Эсенов Б., Белеков Т.).
3. Эпизоотологическая ситуация по ящуру и его этиологическая структура в районах Ошской области. //Сб.научн.труд. – Жалалабат, 1997. – Ч.1, С.115-117. (соавт. Эсенов Б., Белеков Т.).
4. Рекомендации по диагностике, специфической профилактике и организации по борьбе с ящуром сельскохозяйственных животных.//Кырг.аграрная академия, КыргызГНИКИВ. – Бишкек, 1998. (соавт. Белеков Т., Эсенов Б., Мамбеталиева Ж.).
5. Приготовление концентрированного антигена для серологических реакций при диагностике ящура.//Междун.конф.Казахстан, 1998. - № 1-2, С.114-115. (соавт. Белеков Т., Эсенов Б.).
6. Экономический ущерб, нанесенный ящуром в Чуйской области.//Сб.научн.трудов КАА. – Бишкек, 1999. – С.21-22. (соавт. Белеков Т.).
7. Эпизоотология и особенности течения ящура в Чуйской области.//Сб.научн.трудов КАА. – Бишкек, 1999. – С.23-24. (соавт. Белеков Т.).
8. Инструкция о мероприятиях по предупреждению и ликвидации заболевания ящуром в Кыргызской Республике.//Кыргызская аграрная академия, КыргызГНИКИВ. – Бишкек, 1999. (соавт. Белеков Т., Дуйшеев А., Эсенов Б., Алиев Б.).
9. Предохраняйте скот от ящура.// МСХ и ПП проект «Развития овцеводства в Кыргызской Республике» компонент «Ветеринария». – Бишкек, 2000. (соавт. Аныварбеков К., Белеков Т., Борбиев Б., Жунушов А.).
10. Ящур сельскохозяйственных животных. Методическое руководство для студентов ветеринарной медицины и практических ветеринарных врачей.//Мин.образ. и культ. КР., КАА, - Бишкек, 2001. (соавт. Белеков Т., Раимбеков Д.).
11. Ящур в Кыргызской Республике и сопредельных с ним странах. //Мат.междун.конф., посвященной 75-летию проф. Ибрагимова Э.К. – Бишкек, 2002, КАУ. – С.57-59. (соавт. Белеков Т., Султаналиев Н., Искеев Т.).
12. Возможность использования крови больных животных для ранней диагностики ящура.//Мат. междун. научно-практ.конф., посвященной 2200-летию Кыргызской Государственности.//Сб.н.тр. Вып.1. – Бишкек, 2003. - С.213-214. (соавт. Белеков Т., Султаналиев Н.).
13. Ящур – мировая проблема.//Респ.сельхозиздание «Агропресс» № 1. – Бишкек, 2004. – С.23-25. (соавт. Белеков Т.).
14. Ящур сельскохозяйственных животных.//Мат. по проекту «Организация и обучение вет.специалистов, работников айыл өкмөтү и фермеров». – КНИИЖВиП, с.Лебединовка, 2004, – 8 с. (соавт. Нургазиев Р.З., Белеков Т., Иманов Э.Д.).
15. Получение специфических антигенов при ящуре сельскохозяйственных животных.//Вестник с/х науки Казахстана. Изд-во Бастау. – А-Ата, № 10, 2004, - С.39-40. (соавт. Белеков Т.).

16. Диагностика ящура. //Наука и новая технология № 9. – Бишкек, 2004. – С.95-98.

17. Влияние преципитирующих и комплементсвязывающих антител на образованные линии преципитации.//Вестник КАУ, № 1. – Бишкек, 2004. – С.61-62.

18. Наставление по диагностике ящура методом РДП, РРИД. – Бишкек, 2004. (соавт. Белеков Т., Нургазиев Р., Жапаралиев Т., Султаналиев Н.). – 4 с.

## РЕЗЮМЕ

**Искембаева Гулмайрам Асановна**

### **Усовершенствование методов получения преципитирующих антигенов и сывороток для диагностики ящура сельскохозяйственных животных.**

16.00.03. – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

**Ключевые слова:** эпизоотология, вирусология, серология, диагноз, реакция, проба, титр, активность, специфичность.

**Объект исследования:** патологический материал, сыворотка, плазма крови крупного и мелкого рогатого скота, свиней, яков.

**Цель работы:** разработка высокоактивных преципитирующих антигенов и сывороток для ранней диагностики ящура.

**Применяемые методы:** эпизоотологический, клинический, патологоанатомический, серологический.

**Аппаратура:** микроизмельчитель, центрифуга, водяная баня, холодильник.

Установлен ящур сельскохозяйственных животных во всех областях республики (1996-2004 г.г.). Выделен штамм вируса ящура типа О, который паспортизирован и получен патент на изобретение штамма «Белек-2001», Кыргызпатент № 688. Из полученного штамма впервые изготовлен преципитирующий антиген и сыворотка от яков, которые обладают высокой активностью, специфичностью и сохраняемостью в течение года.

**Полученные данные:** используются при диагностике и определения напряженности иммунитета в поствакцинальной и постинфекционный периоды ящура.

**Область применения:** ветеринарная практика.

## КЫСКАЧА МАЗМУНУ

**Искембаева Гулмайрам Асановна**

### **Айыл чарба малдарынан шарп ылаңына диагноз кою үчүн преципитациялоочу антигенди жана сары сууну алуу ыкмасы.**

16.00.03 – ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология микотоксикология жана иммунология.

**Негизги сөздөр:** эпизоотология, вирусология, серология, диагноз, реакция, сыноо, титр, активдүүлүк, специфика.

**Изилдөөнүн объектиси:** патологиялык материал, сары суу, плазма, бодо малдын, койдун, чочконун, топоздун каны.

**Изилдөөнүн максаты:** Шарп ылаңына эрте диагноз коюу үчүн жогорку активдүү преципитациялоочу антигенди жана сары сууну иштеп чыгуу.

**Колдонулуучу ыкмалар:** Эпизоотологиялык, клиникалык, серологиялык.

**Аппаратуралар:** Микроизмельчитель, центрифуга, суу мончосу, муздаткыч.

Шарп ылаңы республиканын баардык аймагында аныкталган (1999-2004 ж.ж.). Шарп вирусунун О тибиндеги штаммы бөлүнүн ага паспорт жана патент алынган, «Белек-2001», Кыргызпатент № 688. Алынган штаммдан биринчи жолу бир жылга чейин жогорку активдүүлүгүн жана спецификациялуулугун жоготпой турган преципитациялоочу антиген жана топоздун канынан сарысуусу даярдалган.

**Алынган көрсөткүчтөр:** Шарптын постинфекциялык, поствакциналык мезгилиндеги иммунитеттин күчүн аныктоодо жана диагноз коюуда колдонулат.

**Колдону аймагы:** Ветеринардык практика.

## RESUME

**Iskambaeva Gulmairam Asanovna**

**Improvement of the methods of getting precipitating antigens and serum to diagnose foot-and-mouth disease of livestock.**

16.00.03 – Veterinary Microbiology, Virology, Epizootology, Mycology with Mikotocsicology and Immunology.

**Key Words:** epizootology, virology, serology, diagnostics, reaction, test, titre, activity, specificity.

**Object of research:** pathological material, serum, plasma, blood of cattle, sheep, pigs, yaks.

**The purpose of the work:** development of high – active precipitating antigens and serum for early diagnostics of foot-and-mouth disease.

**Used methods:** epizootological, clinical, serological.

**Equipments:** micro-crumbler, centrifuge, water bath, fridge.

The epizootological situation of livestock's foot-and-mouth disease was studied in all oblate of the Republic (1996-2004 years).

Culture of foot-and-mouth disease virus, type O was discovered, which was passported and a patent for the culture "Belek 2001" was granted by Kyrgyzpatent № 688. For the first time from the received culture precipitating antigen and serum from yaks were prepared, which have high activity, specificity, infectiousness during the year (observation term).

**The obtained data** are used while diagnosing and determining immunity tensity during post-vaccination and post-infection periods of foot – and – mouth disease.

**Field application:** veterinary practice.

*Искембаева*

Формат 60x90/16. Объем 1, п.л. Заказ 23. Тираж 100 экз.  
Печать офсетная. Бумага офсетная.

720082, г. Бишкек, ул. Шабдан Баатыра, 4-Б  
Типография "XXI век"