

Кузеубаева Анар Сабырбаевна – PhD доктор, «С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті» КЕАҚ, Қазақстан Республикасы, 010000, Астана қ., Жеңіс даңғ 62 тел.: 87028529254, e-mail: a.kuzeubaeva@kazatu.edu.kz.

Аканова Жаннара Жульдасовна – кандидат ветеринарных наук, ассоциированный профессор, НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина», Республика Казахстан, 010000, г. Косшы, дом 4, тел.: 87014212103, e-mail: azhzh80@mail.ru.

Есенеева Салтанат Советовна* – кандидат ветеринарных наук, НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина», Республика Казахстан, 010000, г. Астана, ул. Е882 дом 5, кв. 35, тел.: 87788406387, e-mail: s.eseneeva@kazatu.edu.kz.

Бегенова Айнагуль Байбулсыновна – кандидат ветеринарных наук, НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина», Республика Казахстан, 010000, г. Астана, пр. Победы 62, тел.: 87751611747, e-mail: a.begenova@kazatu.edu.kz.

Кузеубаева Анар Сабырбаевна – PhD, НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина», Республика Казахстан, 010000, г. Астана, пр. Победы 62, тел.: 87028529254, e-mail: a.kuzeubaeva@kazatu.edu.kz.

Akanova Zhannara Zhuldassovna – Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, S. Seifullin Kazakh Agro Technical Research University NCJSC, Republic of Kazakhstan, 010000, Astana, Kosshy, bld. 4, tel.: 87014212103, e-mail: azhzh80@mail.ru.

Yesseneyeva Saltanat Sovetovna* – Candidate of Veterinary Sciences, S. Seifullin Kazakh Agro Technical Research University NCJSC, Republic of Kazakhstan, 010000, Astana, E882 Str., bld. 5, apt. 35, tel.: 87788406387, e-mail: s.eseneeva@kazatu.edu.kz.

Begenova Ainagul Baibulsynovna – Candidate of Veterinary Sciences, S. Seifullin Kazakh Agro Technical Research University NCJSC, Republic of Kazakhstan. 010000, Astana, 62 Pobeda Ave., tel.: 87751611747, e-mail: a.begenova@kazatu.edu.kz.

Kuzeubayeva Anar Sabyrbayevna – PhD, S. Seifullin Kazakh Agro Technical Research University NCJSC, Republic of Kazakhstan, 010000, Astana, 62 Pobeda Ave., tel.: 87028529254, e-mail: a.kuzeubaeva@kazatu.edu.kz.

МРНТИ 68.41.53; 34.27.29

УДК 636.09; 578.2:57.08

<https://doi.org/10.52269/SEPT2631017>

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕНОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РИНОПНЕВМОНИИ ЛОШАДЕЙ

Алексеевкова С.В.* – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Москва, Российская Федерация.

Куттымуратова К.Б. – магистр ветеринарии, Казахский национальный аграрный исследовательский университет, г. Алматы, Республика Казахстан.

Сансызбай А.Р. – доктор ветеринарных наук, профессор кафедры биологической безопасности, Казахский национальный аграрный исследовательский университет, г. Алматы, Республика Казахстан.

Нусупова С.Т. – кандидат ветеринарных наук, ассоциированный профессор кафедры фармакологии и патологии животных, Казахский национальный аграрный исследовательский университет, г. Алматы, Республика Казахстан.

Исследованы способы получения антигенов для диагностики ринопневмонии – вирусного аборта лошадей методом иммуноферментного анализа, основанные на ступенчатом центрифугировании и осаждении полиэтиленгликолем. В качестве материала использовали вакцинный штамм СВ/69 вируса герпеса лошадей 1-го типа, культивированный в культуре клеток СПЭВ. Инфекционный титр вируса составил $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Установлено, что наиболее очищенный антиген получают из свободных вирионов методом ступенчатого центрифугирования с последующей очисткой в градиенте сахарозы. Однако данный способ требует значительных временных и материальных затрат, использования специализированного оборудования и характеризуется низким выходом: из 105 мл исходной вирусосодержащей суспензии получено 400 мкл антигена. Антиген, выделенный из клеточно-связанной фракции вируса, имел более высокий выход – 650 мкл, но содержал больше клеточных примесей. Метод осаждения полиэтиленгликолем технологически проще и обеспечивает больший выход антигена – 1,5 мл из 125 мл суспензии, однако полученный препарат оказался непригодным для ИФА, несмотря на эффективность в реакции торможения гемагглютинации. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости выбора метода

получения антигена с учетом предполагаемого диагностического применения и могут быть использованы при разработке методических рекомендаций по получению антигенов ВГЛ-1 для диагностики ринопневмонии лошадей.

Ключевые слова: ринопневмония, герпесвирус лошадей, ВГЛ-1, антигены, серологические реакции, ИФА, центрифугирование.

ЖЫЛҚЫ РИНОПНЕВМОНИЯСЫН ДИАГНОСТИКАЛАУҒА АРНАЛҒАН АНТИГЕНДЕРДІ АЛУ ӘДІСТЕРІН САЛЫСТЫРМАЛЫ ТАЛДАУ

Алексеевкова С.В.* – биология ғылымдарының кандидаты, РҒА ФМБФМ ФГО ВИЭВ жетекші ғылыми қызметкері, Мәскеу қ., Ресей Федерациясы.

Құттымұратова К.Б. – ветеринария магистрі, «Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті», Алматы қ., Қазақстан Республикасы.

Сансызбай А.Р. – ветеринария ғылымдарының докторы, биологиялық қауіпсіздік кафедрасының профессоры, «Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті», Алматы қ., Қазақстан Республикасы.

Нусупова С.Т. – ветеринария ғылымдарының кандидаты, жануарлар фармакологиясы және патологиясы кафедрасының қауымдастырылған профессоры, «Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті», Алматы қ., Қазақстан Республикасы.

Иммуноферменттік талдау әдісі арқылы жылқы ринопневмониясын, яғни жылқылардың вирустық іш тастауын диагностикалауға арналған антигендерді алу тәсілдері зерттелді. Зерттеу сатылы центрифугалау және полиэтиленгликольмен тұндыру әдістеріне негізделді. Материал ретінде СПЭВ жасуша дақылында өсірілген 1-типті жылқы герпесвирусының СВ/69 вакциналық штаммы пайдаланылды. Вирустың инфекциялық титрі $6,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ құрады. Ең жоғары тазартылған антиген бос вириондардан сатылы центрифугалау және сахароза тығыздық градиентінде қосымша тазарту арқылы алынатыны анықталды. Алайда бұл әдіс көп уақытты, материалдық шығындарды және арнайы жабдықты қажет етеді, сондай-ақ шығымы төмен: 105 мл бастапқы вирусқұрамды суспензиядан 400 мкл антиген алынды. Вирустың жасушамен байланысқан фракциясынан алынған антигеннің шығымы жоғары болды – 650 мкл, бірақ оның құрамында жасушалық қоспалар көбірек кездесті. Полиэтиленгликольмен тұндыру әдісі технологиялық тұрғыдан қарапайым және антигеннің жоғары шығымын қамтамасыз етті – 125 мл суспензиядан 1,5 мл. Дегенмен алынған препарат ИФА үшін жарамсыз болып шықты, бірақ гемагглютинацияны тежеу реакциясында тиімділік көрсетті. Алынған нәтижелер ВГЛ-1 антигенін алу әдісін оның диагностикалық қолданылу мақсатына сәйкес таңдау қажеттігін көрсетеді және жылқы ринопневмониясын диагностикалау үшін ВГЛ-1 антигендерін алу жөніндегі әдістемелік ұсынымдарды әзірлеуде пайдаланылуы мүмкін.

Түйінді сөздер: ринопневмония, жылқы герпесвирусы, ВГЛ-1, антигендер, серологиялық реакциялар, ИФА, центрифугалау.

COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS FOR OBTAINING ANTIGENS FOR THE DIAGNOSIS OF EQUINE RHINOPNEUMONITIS

Alekseyenkova S.V.* – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Federal Scientific Center – All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation.

Kuttymuratova K.B. – Master of Veterinary Medicine, Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Republic of Kazakhstan.

Sansyzbay A.R. – Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Department of biological safety, Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Republic of Kazakhstan.

Nussupova S.T. – Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, Department of pharmacology and animal pathology, Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Republic of Kazakhstan.

Methods for obtaining antigens for the diagnosis of equine rhinopneumonitis, also known as viral abortion of horses, using enzyme-linked immunosorbent assay were studied. The methods were based on stepwise centrifugation and precipitation with polyethylene glycol. The vaccine strain CB/69 of equine herpesvirus type 1, cultivated in SPEV cell culture, was used as the source material.

The infectious titer of the virus was $6.5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. It was found that the most purified antigen was obtained from free virions by stepwise centrifugation followed by purification in a sucrose density gradient.

However, this method requires considerable time, material resources, and specialized equipment, and is characterized by a low yield: 400 μl of antigen was obtained from 105 ml of the initial virus-containing suspension. The antigen isolated from the cell-associated viral fraction had a higher yield of 650 μl but contained more cellular impurities. Polyethylene glycol precipitation was technologically simpler and provided a higher antigen yield of 1.5 ml from 125 ml of suspension; however, the resulting preparation was unsuitable

for ELISA, despite being effective in the hemagglutination inhibition test. The results indicate that the method for obtaining EHV-1 antigen should be selected depending on the intended diagnostic application. These findings may be used in the development of methodological recommendations for obtaining EHV-1 antigens for the diagnosis of equine rhinopneumonitis.

Key words: rhinopneumonitis, equine herpesvirus, EHV-1, antigens, serological reactions, ELISA, centrifugation.

Введение. Коневодство является важным направлением аграрного сектора, имеющим экономическое, социальное и селекционное значение. В последние годы сохраняется интерес к развитию племенного коневодства, спортивного направления, конного туризма, иппотерапии и производства кумыса [1, с. 26]. В связи с этим особую значимость приобретает ветеринарное обеспечение отрасли, включая своевременную диагностику инфекционных болезней лошадей.

Одной из наиболее распространенных вирусных инфекций лошадей является ринопневмония, или вирусный аборт кобыл, вызываемая вирусом герпеса лошадей 1-го типа (ВГЛ-1). Заболевание регистрируется во многих странах мира, включая США, Великобританию, Францию, Германию, Японию, Австралию, Российскую Федерацию и страны Центральной Азии. По данным опубликованных исследований, серопозитивность лошадей к ВГЛ-1 в отдельных регионах может варьировать от 20 до 80% в зависимости от возраста животных, условий содержания, плотности поголовья и уровня профилактических мероприятий [2, с. 14; 3, с. 5]. Наиболее высокий риск распространения инфекции отмечается в хозяйствах с интенсивным перемещением животных, на конноспортивных мероприятиях, племенных фермах и в местах группового содержания лошадей.

В Российской Федерации герпесвирусные инфекции лошадей также сохраняют актуальность. По данным отечественных исследователей, на территории страны выявляются как классические, так и гипервирулентные варианты ВГЛ-1, в том числе штаммы генотипа A2254, ассоциированные с тяжелыми клиническими проявлениями и абортами у кобыл [2, с. 15; 3, с. 4]. При этом эпизоотическая ситуация может различаться по регионам, что требует регулярного лабораторного мониторинга и совершенствования диагностических методов.

Источником инфекции являются больные животные, вирусоносители, а также латентно инфицированные лошади, у которых вирус может длительно сохраняться в организме и реактивироваться при стрессовых воздействиях, транспортировке, изменении условий содержания, иммуносупрессии или жеребости. Основными путями передачи ВГЛ-1 являются аэрогенный путь, прямой контакт с инфицированными животными, а также передача через выделения из дыхательных путей, абортированные плоды, плодные оболочки, загрязненные предметы ухода, инвентарь и транспорт. Заболевание может проявляться респираторной формой, абортами, рождением нежизнеспособного молодняка и, в отдельных случаях, неврологическими расстройствами.

Профилактика ринопневмонии лошадей включает карантинирование вновь поступающих животных, изоляцию больных и подозрительных по заболеванию лошадей, дезинфекцию помещений и инвентаря, контроль перемещения животных, вакцинацию, а также регулярный лабораторный мониторинг. Однако эффективность противозoonотических мероприятий во многом зависит от своевременного выявления инфицированных животных и наличия надежных диагностических препаратов.

Быстрая и точная лабораторная диагностика является необходимым условием для организации мер профилактики и борьбы с ринопневмонией лошадей. Среди методов лабораторной диагностики широко применяется непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющий выявлять специфические антитела и оценивать иммунологический статус животных [4, с. 91]. Для постановки ИФА необходимо использовать качественные антигены возбудителя, обладающие достаточной специфичностью, антигенной активностью и минимальным содержанием посторонних примесей.

Для получения диагностических антигенов ВГЛ-1 могут быть использованы различные методы: разрушение вирусосодержащих клеток путем замораживания-оттаивания, обработка ультразвуком, концентрирование вируса с применением полиэтиленгликоля (ПЭГ), а также ступенчатое центрифугирование и ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы [5, с. 15; 6, р. 52; 7, с. 130]. Антиген можно выделять как из клеточно-связанной фракции вируса, так и из свободных вирионов. При этом выбор метода получения антигена должен определяться его дальнейшим использованием в конкретной серологической реакции.

Цель исследования – провести сравнительный анализ методов получения антигенов ВГЛ-1 и определить оптимальный способ их получения для диагностики ринопневмонии лошадей методом ИФА.

Задачи. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести культивирование вакцинного штамма СВ/69 ВГЛ-1 в культуре клеток СПЭВ.
2. Определить инфекционный титр вируса в культуре клеток.
3. Получить антигены ВГЛ-1 методами ступенчатого центрифугирования и осаждения полиэтиленгликолем.
4. Оценить выход полученных антигенных препаратов.
5. Изучить активность антигенов в ИФА, реакции гемагглютинации (РГА) и реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

6. Сравнить эффективность исследованных методов с учетом дальнейшего диагностического применения антигенов.

Материалы и методы. Исследования проводились в лабораторных условиях ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН в период 2023-2024 гг. Основной этап культивирования вируса, получения и оценки антигенов был выполнен в осенне-зимний период, что обеспечивало стабильные условия хранения биологического материала и проведения лабораторных процедур.

В работе использовали производственный вакцинный штамм СВ/69 вируса ринопневмонии лошадей – вируса герпеса лошадей 1-го типа (ВГЛ-1), а также культуру клеток СПЭВ – перевиваемую культуру клеток почки эмбриона свиньи. Штамм вируса и культура клеток были предоставлены лабораторией клеточной биотехнологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Клеточную культуру выращивали в среде Игла МЕМ с солями Хенкса с добавлением 2 мМ глутамин, 5% сыворотки крови крупного рогатого скота, пенициллина в концентрации 100 ЕД/мл и стрептомицина в концентрации 100 мкг/мл. Для заражения использовали молодые клетки в первый день формирования полного монослоя.

После заражения культуральные флаконы ежедневно исследовали под микроскопом IM-3 Series, Optica, Италия, на наличие цитопатического действия, сравнивая инфицированные культуры клеток с контрольными. Для визуализации цитопатического эффекта готовили окрашенные препараты культуры клеток СПЭВ, зараженной ВГЛ-1. Покровные стекла с культурой клеток фиксировали смесью 96% этилового спирта и хлороформа в соотношении 1:1 и окрашивали азу-эозином по стандартному протоколу.

Титр инфекционной активности вируса определяли по ТЦД₅₀/мл на культуре клеток СПЭВ в 96-луночных микропланшетах. Результаты оценивали по 50% цитопатическому действию через 4 суток методом Рида и Менча [8, р. 493].

Накопленный в культуре клеток вирус общим объемом 230 мл разделили на две части: 105 мл использовали для получения антигена методом ступенчатого центрифугирования, 125 мл – для получения антигена методом осаждения полиэтиленгликолем.

Ступенчатое центрифугирование выполняли в следующей последовательности: осаждение клеточно-связанной фракции вируса центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 15 минут при 5 °С на центрифуге Thermo Scientific Sorvall Evolution RC; обработка клеточного осадка ультразвуком с использованием гомогенизатора Sonics Ultra-cell для разрушения многоядерных клеток; контроль разрушения клеток путем приготовления цитологического мазка из суспензии с последующей фиксацией, окрашиванием и микроскопией; центрифугирование обработанной ультразвуком суспензии при 8 000 об/мин в течение 2 минут на настольной центрифуге CM-50, ELMi; концентрирование свободной фракции вируса из надосадочной жидкости центрифугированием при 25 000 об/мин в течение 50 минут; очистка антигена ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы 30% и 65% на ультрацентрифуге Beckman L7.

В результате были получены два образца антигена: Ag1 – антиген из клеточно-связанной фракции вируса; Ag2 – антиген из свободных вирионов.

Осаждение полиэтиленгликолем проводили следующим образом: в вирусосодержащую суспензию объемом 125 мл вносили кристаллический ПЭГ-6000 из расчета 5 г на 100 мл и сульфат аммония из расчета 345 г на 1000 мл. Раствор выдерживали в холодильнике при 4 °С в течение 16 часов. После разделения суспензии на три слоя отбирали средний слой, содержащий белок, и подвергали трехкратному центрифугированию при 4 000 об/мин по 20 минут с последовательным удалением надосадочной жидкости. К очищенному осадку добавляли 2% раствор Triton X-100 и инкубировали при 37 °С в течение 1 часа.

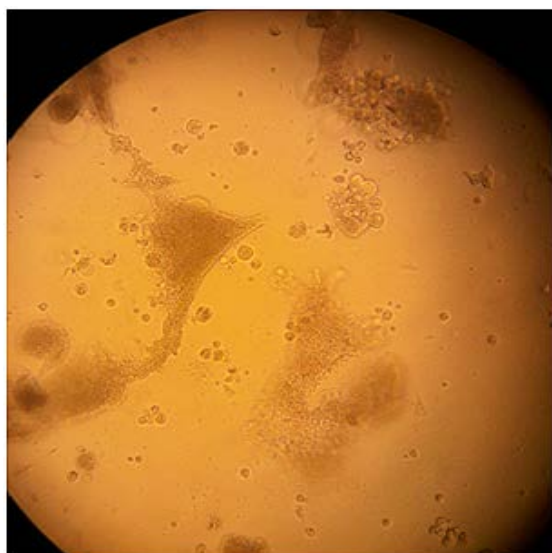
Полученные антигены тестировали в реакции гемагглютинации (РГА) с 1% суспензией эритроцитов лошади и методом ИФА.

Для определения рабочего разведения антигена использовали непрямой вариант твердофазного ИФА с шахматным титрованием антигенов и положительной сыворотки, полученной от абортировавшей кобылы. Антигены в начальном разведении 1:100 вносили в 96-луночные полистироловые планшеты и инкубировали в течение 24 часов при 4 °С. После блокирования неспецифического связывания и отмывки вносили сыворотки в начальном разведении 1:200 и инкубировали 1,5 часа при 37 °С. Затем добавляли иммунопероксидазный конъюгат, специфичный к IgG лошади. После инкубации и отмывки вносили субстрат – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Через 30 минут реакцию останавливали 70% серной кислотой.

Результаты учитывали на спектрофотометре с вертикальным лучом StatFax 4300 ChroMate при длине волны 450 нм. Также проводили РТГА с полученными антигенами и стандартными сыворотками по общепринятой методике.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программ Microsoft Office и Matlab.

Результаты. При культивировании ВГЛ-1, штамм СВ/69, в культуре клеток СПЭВ через 48 часов наблюдали выраженный цитопатический эффект, достигавший 90% поражения монослоя. Цитопатическое действие характеризовалось образованием многоядерных гигантских клеток и деструкцией клеточного монослоя.



а)



б)

Рисунок 1 – Культура клеток СПЭВ. Увеличение $\times 250$ а) через 48 часов после заражения ВГЛ-1; б) контрольная культура

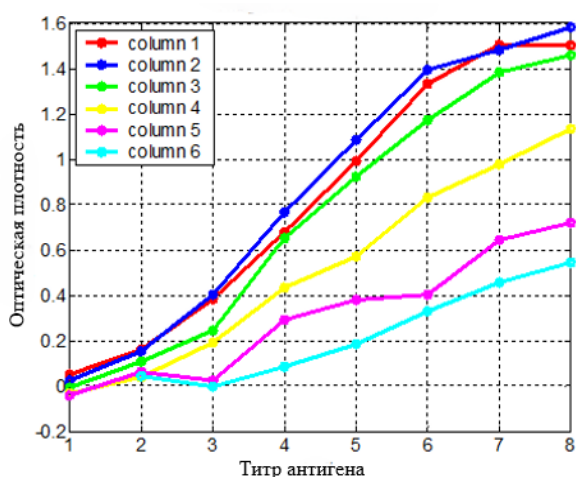
Инфекционный титр вируса составил $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, что соответствует данным других исследователей для данного штамма [9, с. 6].

При использовании метода ступенчатого центрифугирования из 105 мл вируссодержащей суспензии было получено около 650 мкл антигена из клеточно-связанной фракции – Ag1, и 400 мкл антигена из свободных вирионов – Ag2. Методом осаждения полиэтиленгликолем из 125 мл вируссодержащей суспензии получено 1,5 мл антигена.

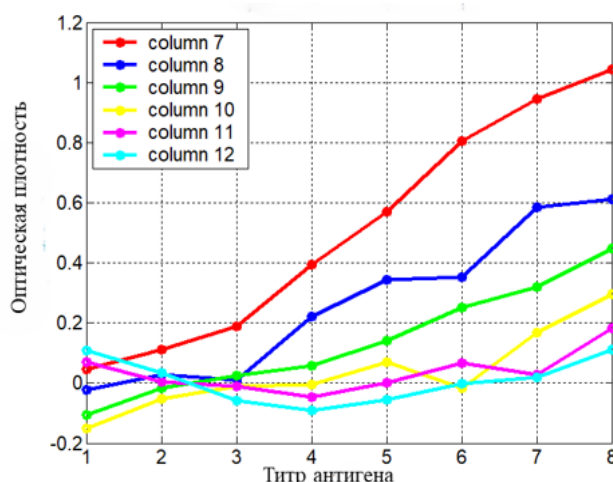
Визуально антигены, полученные разными методами, отличались. Ag1 имел бежевый оттенок, Ag2 был прозрачным с легкой опалесценцией, а антиген, полученный методом осаждения полиэтиленгликолем, имел желтоватый цвет.

В РГА антиген, полученный методом осаждения полиэтиленгликолем, показал титр 1:96, что свидетельствует о его выраженной гемагглютинирующей активности.

При проведении ИФА была выявлена четкая зависимость оптической плотности от разведения антигенов Ag1 и Ag2, полученных методом ступенчатого центрифугирования.



а)



б)

Рисунок 2 – Зависимость оптической плотности в ИФА от разведения антигенов, полученных методом ступенчатого центрифугирования

а) Ag1 – антиген из клеточно-связанной фракции; б) Ag2 – антиген из свободных вирионов

Экспериментально установленное рабочее разведение антигена составило 1:800 для Ag1 и 1:200 для Ag2, что отражает различия в их антигенной активности. Более высокое рабочее разведение Ag1 может быть обусловлено большим содержанием антигенных детерминант вследствие разрушения инфицированных клеток и выхода клеточно-связанных вирусных компонентов.

Антиген, полученный методом осаждения полиэтиленгликолем, не демонстрировал градиента оптической плотности в ИФА, что указывает на его непригодность для данной реакции.

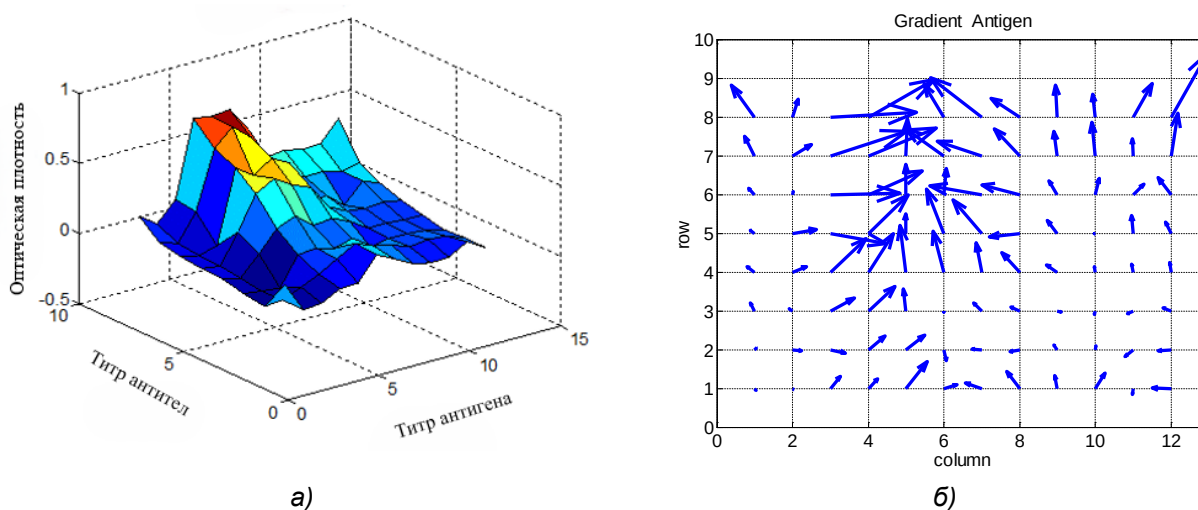


Рисунок 3 – Трехмерное изображение оптической плотности результатов ИФА с антигеном, полученным методом осаждения полиэтиленгликолем

Обсуждение. Вероятной причиной непригодности ПЭГ-антигена для ИФА является наличие остаточных количеств полиэтиленгликоля, влияющих на адсорбцию антигена к твердой фазе планшета. Кроме того, возможное присутствие сопутствующих белковых и клеточных компонентов может повышать фоновые значения и снижать специфичность реакции.

В то же время антиген, полученный с использованием полиэтиленгликоля, показал хорошие результаты в РТГА. Титр антител в положительных сыворотках достигал 1:128, что подтверждает сохранение антигенных свойств препарата и возможность его применения в данной реакции.

Анализ результатов показал, что антиген Ag2, полученный из свободных вирионов методом ступенчатого центрифугирования с последующей очисткой в градиенте сахарозы, характеризуется наибольшей чистотой. Это подтверждается более плавным изменением оптической плотности в ИФА и меньшими фоновыми значениями. Однако выход такого антигена был относительно невелик – 400 мкл из 105 мл исходной суспензии. Кроме того, процедура его получения технически сложна и требует дорогостоящего оборудования.

Антиген Ag1, полученный из клеточно-связанной фракции вируса, имел более высокий выход – 650 мкл, но содержал больше клеточных примесей, что потенциально может снижать специфичность реакции. Тем не менее рабочее разведение данного антигена в ИФА составило 1:800, что выше, чем у Ag2, для которого рабочее разведение составило 1:200.

Метод осаждения полиэтиленгликолем оказался технологически более простым, не требовал ультрацентрифугирования и обеспечивал наибольший выход антигена – 1,5 мл из 125 мл исходной суспензии. Однако полученный препарат не подходил для использования в ИФА. При этом его эффективность в РТГА позволяет рассматривать данный метод как перспективный для получения антигена, предназначенного для гемагглютинационных серологических реакций.

Полученные результаты согласуются с данными других исследователей [10, с. 214; 11, с. 14], отмечающих, что эффективность методов получения вирусных антигенов зависит от природы вирусного материала, способа очистки и дальнейшего диагностического применения препарата.

Закключение. Проведенные исследования показали, что выбор метода получения антигена ВГЛ-1 должен определяться целью его дальнейшего использования.

Для постановки ИФА в исследовательских и диагностических целях наиболее предпочтительным является антиген, полученный из свободных вирионов методом ступенчатого центрифугирования с последующей очисткой в градиенте сахарозы. Данный способ обеспечивает получение наиболее очищенного препарата с низкими фоновыми значениями, однако требует специализированного оборудования, значительных временных и материальных затрат и характеризуется относительно низким выходом.

Антиген, полученный из клеточно-связанной фракции вируса, имеет более высокий выход и демонстрирует выраженную антигенную активность в ИФА, однако наличие клеточных примесей может снижать специфичность реакции.

Для массовых серологических исследований с использованием РТГА может быть рекомендован метод осаждения полиэтиленгликолем. Он является более технологичным и экономичным, обеспечивает высокий выход антигена и позволяет получить препарат, пригодный для реакции торможения гемагглютинации.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке методических рекомендаций по получению антигенов вируса герпеса лошадей 1-го типа для диагностики ринопневмонии лошадей в ветеринарных лабораториях.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Юров, К.П. Диагностика и контроль массовых острых и хронических вирусных инфекций лошадей [Текст] / К.П. Юров // Российский ветеринарный журнал. – 2017. – № 7. – С. 26–32.
2. Алексеенкова, С.В., Юров, К.П. Герпетическая инфекция лошадей: особенности патогенеза и диагностики [Текст] / С.В. Алексеенкова, К.П. Юров // Российский ветеринарный журнал. – 2020. – № 2(6). – С. 13–17. – <https://doi.org/10.32416/2500-4379-2020-2-13-17>.
3. Алексеенкова, С.В. Гипервирулентные штаммы вируса ринопневмонии лошадей генотипа A2254, распространенные на территории РФ [Текст] / С.В. Алексеенкова // Ветеринария. – 2022. – № 11. – С. 3–9.
4. Жебентяев, А.И., Каткова, Е.Н. Иммуноферментный метод анализа [Текст] / А.И. Жебентяев, Е.Н. Каткова // Вестник фармации. – 2013. – № 2(60). – С. 90–97.
5. Чернявцева, А.П. Сравнительная характеристика основных биологических свойств различных штаммов герпесвируса лошадей 1 [Текст]: автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.П. Чернявцева. – Москва, 2006. – 28 с.
6. Hierholzer, J.C., Killington, R.A., Stokes, A. Preparation of antigens [Text] / J.C. Hierholzer, R.A. Killington, A. Stokes // Virology Methods Manual. – 1996. – P. 47–70. – <https://doi.org/10.1016/B978-012465330-6/50004-X>.
7. Рябинникова, А.И., Матраимов, М.Б., Шалгынбаев, Э.К., Рыстаева, Р.А., Орынбаев, М.Б. Очистка и концентрирование вируса ринопневмонии лошадей [Текст] / А.И. Рябинникова, М.Б. Матраимов, Э.К. Шалгынбаев, Р.А. Рыстаева, М.Б. Орынбаев // Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. – 2015. – № 4. – С. 129–131.
8. Reed, L.J., Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints [Text] / L.J. Reed, H. Muench // American Journal of Epidemiology. – 1938. – Vol. 27(3). – P. 493–497. – <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>.
9. Тайлакова, Э.Т. Червякова, О.В., Садикалиева, С.О., Султанкулова, К.Т., Зайцев, В.Л., Турганбаева, А.С., Сансызбай, А.Р. Оптимизация условий очистки и концентрирования вируса гриппа лошадей [Текст] / Э.Т. Тайлакова, О.В. Червякова, С.О. Садикалиева, К.Т. Султанкулова, В.Л. Зайцев, А.С. Турганбаева, А.Р. Сансызбай // Вестник науки КазАТУ им. С. Сейфуллина. – 2011. – № 4(71). – 12 с.
10. Сюрин, В.Н., Самуйленко, А.Я., Соловьев, Б.В., Фомина, Н.В. Вирусные болезни животных [Текст] / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. – М.: ВНИТИБП, 1998. – 928 с.
11. Яковлева, А.С., Каньшина, А.В., Щербаков, А.В. Непрямой вариант ИФА для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови свиней [Текст] / А.С. Яковлева, А.В. Каньшина, А.В. Щербаков // Ветеринария сегодня. – 2018. – № 3(26). – С. 13–16.

REFERENCES:

1. Yurov K.P. Diagnostika i kontrol' massovy'h ostry'h i hronicheskikh virusnyh infekcij loshadej [Diagnosis and control of mass acute and chronic viral infections of horses]. *Rossijskij veterinarnyj zhurnal*, 2017, no. 7, pp. 26–32. (In Russian)
2. Alekseenkova S.V. Gerpeticheskaya infekciya loshadej: osobennosti patogeneza i diagnostiki [Equine herpetic infection: features of pathogenesis and diagnosis]. *Rossijskij veterinarnyj zhurnal*, 2020, no. 2(6), pp. 13–17. <https://doi.org/10.32416/2500-4379-2020-2-13-17>. (In Russian)
3. Alekseenkova S.V. Gipervirulentny'e shtammy' virusa rinopnevmonii loshadej genotipa A2254, rasprostranenny'e na territorii RF [Hypervirulent strains of equine rhinopneumonia virus genotype A2254 circulating in the Russian Federation]. *Veterinariya*, 2022, no. 11, pp. 3–9. (In Russian)
4. Zhebentyaev A.I., Katkova E.N. Immunofermentny'j metod analiza [Enzyme immunoassay method]. *Vestnik farmacii*, 2013, no. 2(60), pp. 90–97. (In Russian)
5. Chernyavtseva A.P. Sravnitel'naya harakteristika osnovny'h biologicheskikh svoystv razlichny'h shtammov herpesvirusa loshadej 1 [Comparative characteristics of the main biological properties of various strains of equine herpesvirus 1]. Abstract of PhD thesis (Biol.), Moscow, 2006, 28 p. (In Russian)
6. Hierholzer J.C., Killington R.A., Stokes A. Preparation of antigens. *Virology Methods Manual*, 1996, pp. 47–70. <https://doi.org/10.1016/B978-012465330-6/50004-X>.
7. Ryabinnikova A.I., Matraimov M.B., Shalgynbaev E.K. et al. Ochistka i koncentrirovaniye virusa rinopnevmonii loshadej [Purification and concentration of equine rhinopneumonia virus]. *Nauka, novy'e tehnologii i innovacii Kyrgyzstana*, 2015, no. 4, pp. 129–131. (In Russian)
8. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 1938, vol. 27, no. 3, pp. 493–497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>.

9. Tailakova E.T., Chervyakova O.V., Sadikalieva S.O. et al. Optimizaciya uslovij ochistki i koncentrirovaniya virusa gripa loshadej [Optimization of purification and concentration conditions of the equine influenza virus]. *Vestnik nauki KazATU im. S. Seifullina*, 2011, no. 4(71), 12 p. (In Russian)

10. Syurin V.N., Samuilenko A.Ya., Solovyov B.V., Fomina N.V. Virusny'e bolezni zhivotny'h [Viral diseases of animals]. Moscow, VNITIBP, 1998, 928 p. (In Russian)

11. Yakovleva A.S., Kanshina A.V., Shherbakov A.V. Nepriamoj variant IFA dlya vy'yavleniya antitel k nestrukturny'm belkam virusa yashhura v sy'vorotkah krovi svinej [An indirect ELISA variant for detecting antibodies to non-structural proteins of the foot-and-mouth disease virus in pig serum]. *Veterinariya segodnya*, 2018, no. 3(26), pp. 13–16. (In Russian)

Дата поступления: 09 апреля 2026 г. **Принято:** 01 июля 2026 г.

Опубликовано: 30 сентября 2026 г.

Сведения об авторах:

Алексеевкова Светлана Валерьевна* – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук, Российская Федерация, 109428, г. Москва, Рязанский проспект, 24, корп., тел.: 8985 5179086, e-mail: alexeyenkova-viev@yandex.ru.

Куттымуратова Куралай Бисеновна – магистр ветеринарии, «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», Республика Казахстан, 050010, г. Алматы, проспект Абая, 26, тел.: 87078780466, e-mail: kaiashka_90@mail.ru.

Сансызбай Абылай Рысбайұлы – доктор ветеринарных наук, профессор кафедры биологической безопасности, «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», Республика Казахстан, 050010, г. Алматы, проспект Абая, 26, тел.: 87018802525, e-mail: abylay.sansyzbai@gmail.com.

Нусупова Салтанат Тлектесовна – кандидат ветеринарных наук, ассоциированный профессор кафедры фармакологии и патологии животных, «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», Республика Казахстан, 050010, г. Алматы, проспект Абая, 26, тел.: 87074142728, e-mail: saltanat.nussupova@kaznaru.edu.kz.

Алексеевкова Светлана Валерьевна* – биология ғылымдарының кандидаты, Федералдық ғылыми орталығының жетекші ғылыми қызметкері, РҒА К.И. Скрябин және Я.Р. Коваленко атындағы Бүкілресейлік эксперименттік ветеринария ғылыми-зерттеу институты, Ресей Федерациясы, 109428, Мәскеу қ., Рязанский даңғ., 24; тел.: 89855179086; e-mail: alexeyenkova-viev@yandex.ru.

Құттымұратова Құралай Бисенқызы – ветеринария магистрі, «Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті», Қазақстан Республикасы, 050010, Алматы қ., Абай даңғ., 26; тел.: 87078780466; e-mail: kaiashka_90@mail.ru.

Сансызбай Абылай Рысбайұлы – ветеринария ғылымдарының докторы, биологиялық қауіпсіздік кафедрасының профессоры, «Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті», Қазақстан Республикасы, 050010, Алматы қ., Абай даңғ., 26; тел.: 87018802525; e-mail: abylay.sansyzbai@gmail.com.

Нусупова Салтанат Тлектесқызы – ветеринария ғылымдарының кандидаты, жануарлар фармакологиясы және патологиясы кафедрасының қауымдастырылған профессоры, «Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті», Қазақстан Республикасы, 050010, Алматы қ., Абай даңғ., 26; тел.: 87074142728; e-mail: saltanat.nussupova@kaznaru.edu.kz.

Alekseyenkova Svetlana Valeriyevna* – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Federal Scientific Center – All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, Russian Federation, 109428, Moscow, 24 Ryazansky Ave., tel.: 89855179086; e-mail: alexeyenkova-viev@yandex.ru.

Kuttymuratova Kuralay Bissenovna – Master of Veterinary Medicine, Kazakh National Agrarian Research University, Republic of Kazakhstan, 050010, Almaty, 26 Abai Ave., tel.: 87078780466; e-mail: kaiashka_90@mail.ru.

Sansyzbay Abylay Rysbaiuly – Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Department of biological safety, Kazakh National Agrarian Research University, Republic of Kazakhstan, 050010, Almaty, 26 Abai Ave., tel.: 87018802525; e-mail: abylay.sansyzbai@gmail.com.

Nussupova Saltanat Tlektessovna – Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, Department of pharmacology and animal pathology, Kazakh National Agrarian Research University, Republic of Kazakhstan, 050010, Almaty, 26 Abai Ave., tel.: 87074142728; e-mail: saltanat.nussupova@kaznaru.edu.kz.