

молодняк. Из ассоциативных болезней наиболее опасен паразитоценоз метастронгилюсов и эймерий.

УДК 619:616.98 683.4.082

### Диагностика лептоспироза у свиней с помощью иммуноферментного анализа

В.А.Кирпиченок, Витебская государственная академия ветеринарной  
медицины

Одной из основных задач ветеринарного надзора является раннее выявление инфицированных животных с целью их изоляции от здоровой популяции.

В настоящее время лабораторная диагностика лептоспироза основана на бактериологическом и серологическом методах исследования.

По мнению ряда ученых, при первичном обследовании сывороток крови, полученных от подозрительных по заболеванию лептоспирозом животных, нет необходимости проведения анализа с помощью реакции микроагглютинации (РМА). Некоторые авторы считают, что на первом этапе исследования достаточно использовать скрининговые методы. По результатам скрининговых тестов может быть осуществлен отбор сывороток крови животных на наличие лептоспирозных антител. В последующем положительные сыворотки крови в условиях лаборатории могут быть типизированы в РМА.

С целью совершенствования методов диагностики нами разработан способ микроточечного иммуноферментного анализа (дот-блоттинг) для определения лептоспирозных антител в сыворотке крови свиней. Впервые сконструирован лептоспирозный диагностикум для скринингового экспресс-анализа, и в 1996 году получен патент РФ на изобретение "Способ диагностики лептоспироза свиней" (соавторы М.С. Жаков, В.М. Жаков, Ю.О. Сергеев, С.Ю. Пчелинцев, С.В. Юров).

При изготовлении диагностикума (антигена) на питательных средах выращивали лептоспирры серогруппы Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Hebdomadis и Sejroe, смесь культур центрифугировали при 45000 g в течение 15 мин, надосадочную жидкость удаляли, полученный осадок подвергали дезинтеграции при частоте 20 кГц, мощности 100 Вт в течение 2 минут, экстракцию антигена проводили 50%-ым этиловым спиртом в течение 24 часов при температуре минус 20<sup>0</sup> С и 90%-ым этиловым спиртом при температуре минус 20<sup>0</sup> С в течение 6 суток, отделение антигена осуществляли центрифугированием при 80000 g в течение 30 минут, надосадочную жидкость удаляли и доводили концентрацию белка до 20 мкг/см<sup>3</sup> Набор для проведения иммуноферментного анализа для выявления

лептоспирозных антител в сыворотке крови свиней включает в себя: комплект нитроцеллюлозных мембран (НЦМ), сенсibilизированных лептоспирозными антигенами серогрупп: *Pomona*, *Canicola*, *Tarassovi*, *Icterohaemorrhagiae*, *Hebdomadis*, *Sejroe*, конъюгат белка А с пероксидазой хрена, концентрат буфера, бычий сывороточный альбумин, хромоген, растворитель для хромогена, гидроперит.

Принцип иммуноферментной тест-системы (дот-блоттинг) для определения лептоспирозных антител в сыворотке крови заключается в том, что образцы сывороток крови свиней инкубируют совместно с нитроцеллюлозной мембраной, сенсibilизированной лептоспирозным антигеном. Антитела, присутствующие в сыворотке крови, связываются с антигеном. Несвязавшийся материал удаляют отмыыванием и наносят конъюгат белка А с пероксидазой хрена. Инкубируют в термостате при 37°C. Образовавшийся иммунный комплекс выявляют добавлением субстрат-хромогенной смеси. При наличии в исследуемом образце лептоспирозных антител на нитроцеллюлозной мембране появляется окрашенная в синий цвет точка. Ферментативную реакцию останавливают промыванием мембраны в дистиллированной воде. Интенсивность окраски пропорциональна титру лептоспирозных антител в образце.

В качестве испытуемых были взяты иммунная и неиммунная сыворотки свиней, которые были протитрованы 2-кратным шагом с 1:50 до 1:102400. НЦМ в виде блоков были сенсibilизированы антигенами, полученными из отдельных серогрупп лептоспир, а также общим антигеном, представляющим собой смесь из антигенов, выделенных из отдельных серогрупп.

Исследованиями установлено, что в сыворотках крови иммунизированных поросят антитела к лептоспирам всех серологических групп, входящих в состав вакцины, в РМА сохранились до двух месяцев, их титр составил от  $6,2 \pm 0,3$  до  $7,4 \pm 0,5 \log_2$ , через три месяца антитела сохранились лишь к *L. pomona* и *L. icterohaemorrhagiae*, их титр снизился до  $4,9 \pm 0,2$  -  $5,0 \pm 0,4 \log_2$ , а спустя 6 месяцев титр антител был предельно низким -  $1,0 \pm 0,2 \log_2$ , только к *L. icterohaemorrhagiae*.

При использовании в исследовании дот-блоттинга и ИФА на планшетах результаты были равнозначны. Чувствительность указанных тестов была в 4-5 раз выше, чем в РМА, при этом даже в более поздние сроки, через 6 месяцев после вакцинации, в сыворотке крови иммунизированных поросят обнаруживали в более низких титрах антитела ко всем вакцинным антигенам. У контрольных (невакцинированных) поросят в указанные сроки исследования антител к возбудителю лептоспироза в дот-блоттинге, ИФА на планшетах не обнаружили.

Установлено, что дот-блоттинг по своей чувствительности и специфичности не отличается от ИФА на планшетах со спектрофотометрическим детектированием результатов при определении лептоспирозных антител.

**Заключение.** Показана диагностическая возможность использования дот-блоттинга для выявления лептоспирозных антител в сыворотках крови свиней.

УДК 619: 619. 98: 578.835.579.842.11 -084

### **Антигенные свойства лабораторного образца вакцины против вирусных гастроэнтеритов и колибактериоза поросят**

**Н.А.Ковалев, Т.А.Савельева, А.А.Гутковский, А.С.Ястребов,  
Г.М.Кучинская. Бедорусский НИИЭВ м.С.Н Вышелесского**

Особое место в инфекционной патологии поросят-отъемышей занимают острые вирусные гастроэнтериты рота-, корона- и энтеровирусной этиологии. По данным Абеляна К.Е. (1995), Jahre В.Н. et al. (1988) и ряда других исследователей, около 15-20% поросят погибают вследствие заболеваний, вызываемых этими вирусами. По результатам наших исследований в 1994-1998г.г. выявлено широкое распространение гастроэнтеритов, обусловленных рота- и энтеровирусами, а также патогенными колибактериями. Так, при исследовании патматериала от поросят, больных острым гастроэнтеритом, из 15 свиноводческих хозяйств республики в 58,3% случаев зарегистрирована ротавирусная болезнь, в 29,2% энтеровирусная инфекция. В 22% случаев наблюдали смешанное заболевание, вызванное рота- и энтеровирусами. В связи с этим нами сконструирован и испытан на кроликах экспериментальный образец вакцины против вышеуказанных заболеваний.

В состав вакцины входят ротавирус, энтеровирусы 2, 6, 8-го серотипов (Дербишир, 1986г.), колибактерии с адгезинами К-88, К-99 и термолабильным энтеротоксином. Антигенные свойства поливалентной вакцины сравнивали со свойствами моноантигенов из ротакомпонента, энтеровирусного (2, 6, 8 серотипы) и колибактериального компонентов. В опыте находилось 25 кроликов, разделенных на пять групп. Кроликам первой группы вводили плацебо. Кроликов второй группы привили экспериментальным образцом вакцины, третьей - коликомпонентом, четвертой - рота и пятой - энтеровирусным компонентом. Дозы моноантигенов равны их количеству в поливалентном препарате. Через 0,5, 1 и 2 месяца после второго введения препаратов у кроликов брали пробы крови. В полученных сыворотках определяли титры антител к рота- и энтеровирусам. К-антител к адгезинам К-88 и К-99. В качестве К-антигенов использовали живые взвеси бактерий на физрастворе. Содержание агглютининов К-88 у кроликов, привитых плацебо, в указанные сроки наблюдения колебалось от 0 до  $1,8 \pm 1,6$  лог. У кроликов, привитых