

ОИ-19 с помощью лупы начиная с контроля. Если с нормальной сывороткой не отмечалась агглютинация, проводили учёт всей реакции. Положительной считали реакцию с образованием крупно- или мелкозернистого агглютината с просветлением жидкости не менее, чем на "++". Отрицательной считали реакцию, если суспензия оставалась гомогенной. Интенсивность агглютинации оценивали в плюсах: "++++" - образование крупно- или мелкозернистого агглютината с полным просветлением жидкости; "+++ " - образование заметного крупно- или мелкозернистого агглютината с почти полным просветлением жидкости; "++" - образование заметного крупно- или мелкозернистого агглютината, но просветление жидкости выражено слабо; "+" - образование едва заметного крупно- или мелкозернистого агглютината, жидкость мутная; "-" - нет образования агглютината, жидкость равномерно мутная;

Результаты исследований и их обсуждение. Нами получены следующие результаты:

1) из лимфатических узлов убитых животных и из крови животных и человека при помощи питательной среды ВКГ и созданного нами диагностического набора антисывороток были выделены протопласты и L-формы микобактерий, которые были идентифицированы как *M. tuberculosis*.

2) В результате культивирования полученных культур на среде Гельберга с малахитовым зелёным в течение 30-40 дней был получен характерный рост колоний для *M. tuberculosis* и *M. bovis*. При окраске препаратов-мазков по Цилю-Нильсену были выявлены рубиново-красные утолщённые по центру палочки, что является свидетельством способности трансформированных форм реверсировать в кислото-спирто-устойчивую форму.

При обработке исследуемого материала на питательной среде ВКГ выделяются протопласты (от лат. *protos* – первый, *plato* – лепить) и L-формы микобактерий. Многие исследователи считают протопласты одной из стадий L-трансформации бактерий //1.

Вывод. Проведенные исследования показали, что питательная среда ВКГ и диагностический набор сывороток, являются универсальным способом, при помощи которого можно в течение 3 - 7 дней выделить трансформированные (без клеточной стенки) и L-формы микобактерии и достоверно установить их принадлежность к микобактериям вида *M. bovis* или *M. tuberculosis*.

**Литература.** 1. Власенко В.В. Микробиология туберкулеза в фокусе проблем современности. Винница, «Гипанис», 1999 – 224 с; 2. Гарданов М.С. Туберкулёз: второе пришествие: История болезни, её профилактика и лечение. – Мн.: Парадокс, 2000. – 160с; 3. Джавец Э., Мельник Дж. Л., Эйфельберг Э.А. Руководство по медицинской микробиологии. – Москва, 1982, т. 1. – 368 с; 4. Лысенко А.П. и др. Стимулятор роста и среда ВКГ для ускоренного выделения микобактерий, культуральные, патогенные и антигенные свойства изолируемых культур// Ветеринарная медицина Беларуси. - Мн.- № 1.-2003.- С.- 10-13; 5. Лысенко А.П., Высоцкий А.Э., Агеева Т.Н. Разработка и внедрение новых методов диагностики и профилактики туберкулеза в Республике Беларусь; Ветеринарная патология, современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных. Мн., 1-2 (9), 2004 г., с. 41-43; 6. Мельник В.М., Турченко Л.В., Фещенко Ю.И. Клиническая оценка эффективности выявления микобактерий туберкулеза на среде ВКГ; Ветеринарная патология, современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных. Мн., 1-2 (9), 2004 г., с.110-113; 7. Яковенко К.Н., Тронцкий Н.А. Протопласты микроорганизмов. – Мн.: Наука и техника, 1985. – 160 с.

УДК 619:616.98:578.828.11Л:636.22/28

#### СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ ЛЕЙКОЗЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Лынченко И.Ю.

УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», Республика Беларусь

Fab<sub>2</sub>флуоресцирующий диагностикум предназначен для индикации лимфоцитов периферической крови инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС).

Препарат представляет собой взвесь Fab<sub>2</sub>-фрагментов иммуноглобулинов класса G к ВЛКРС, обработанных флуоресцеинаизотиоцианатом (ФИТЦ).

Для изготовления Fab<sub>2</sub>флуоресцирующего диагностикума использовали следующие компоненты: Fab<sub>2</sub>-фрагменты IgG к ВЛКРС; ФИТЦ; 0.1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,05 М раствор карбоната натрия; 0.01 М фосфатно-солевой буфер, рН 7,5; дистиллированная вода; физраствор.

Для получения Fab<sub>2</sub>-фрагментов IgG к ВЛКРС брали следующие компоненты: IgG к

ВЛКРС; 0,1 М ацетатный буфер рН 4,3; кристаллический пепсин; 1 М раствор уксусной кислоты; 1 М раствор NaOH; стафилококковый реагент производства НИИ им Л.Пастера( г.Санкт-Петербург); 0,1 М фосфатный буфер рН 8,0; азид натрия.

IgG к ВЛКРС диализовали против 0,1 М ацетатного буфера, рН 4,3; затем к нему добавляли кристаллический пепсин в соотношении глобулин:пепсин 50:1; при необходимости, доводили рН до 4,3 1М раствором уксусной кислоты; смесь оставляли на водяной бане при t +37°C на 8-14 часов; затем охлаждали во льду. Осадок, который образовывался во время реакции, удаляли центрифугированием и доводили рН до 8,0 с помощью 1М раствора NaOH (для инактивирования пепсина); к осадку стафилококка после последнего центрифуги-

гирования добавляли фрагментированные IgG в соотношении осадок : белок 8 : 1; взвесь тщательно встряхивали и оставляли при комнатной температуре на 2-3 часа; смесь центрифугировали в течение 10 минут при 5000 об/мин; осадок отбрасывали, надосадочную жидкость консервировали азидом натрия в соотношении 1 : 10 000.

Контроль чистоты Fab<sub>2</sub>-фрагментов IgG к ВЛКРС осуществляли с помощью реакции агглютинации со стафилококковым реагентом. Реакцию ставили капельным методом. Для этого на предметное стекло наносили каплю полученных Fab<sub>2</sub>-фрагментов IgG к ВЛКРС, затем добавляли стафилококковый реагент смесь тщательно перемешивали и оставляли на 2-3 минуты при комнатной температуре. Реакцию оценивали визуально, при наличии Fc-фрагментов IgG наблюдалось наличие агглютинации в виде хлопьевидного осадка.

Контроль активности Fab<sub>2</sub>-фрагментов IgG к ВЛКРС осуществляется с помощью микрометода РИД. Для определения активности Fab<sub>2</sub>-фрагментов необходимы следующие компоненты:

- антиген из «Набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота» производства Курской биофабрики;

- солевая смесь агара из «Набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота» производства Курской биофабрики;

- разбавитель из «Набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота» производства Курской биофабрики.

*Постановка РИД.*

Стеклопластиковые пластинки устанавливали на строго горизонтальной поверхности; расплавленный агар тщательно перемешивали пастеровской пипеткой и, не охлаждая, разливали на предметное стекло; в застывшем агаре металлическим пробойником делали две лунки; из лунок удаляли агаровые пробки, избегая повреждений краев лунки или отслоения агара от дна пластинки.

В первую лунку с помощью стерильной пастеровской пипетки вносили антиген из «Набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота» производства Курской биофабрики; во вторую лунку вносили Fab<sub>2</sub>-фрагменты IgG к ВЛКРС; предметное стекло ставили во влажную камеру и помещали в холодильник при t +4°C не менее чем на 24 часа.

*Оценка результатов РИД.*

Для учета реакции пластинки просматривали с помощью лупы на темном фоне. Положительная реакция характеризовалась наличием полосы преципитации серо-белого цвета между антигеном и Fab<sub>2</sub>-фрагментами, отрицательная - отсутствием полосы преципитации.

Метку Fab<sub>2</sub>-фрагментов IgG к ВЛКРС проводили флуоресцеинаизотиоцианатом (ФИТЦ). Для метки Fab<sub>2</sub>-фрагментов антител ФИТЦ использова-

ли следующие компоненты: Fab<sub>2</sub>-фрагменты IgG к ВЛКРС; ФИТЦ; 0.1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,05 М раствор карбоната натрия; 0.01 М фосфатно-солевой буфер, рН 7,5; дистиллированная вода; физраствор.

Необходимую навеску ФИТЦ готовили непосредственно перед меткой из расчета 10 мкл на 1 мг белка; ее растворяли в минимальном количестве 0,1 М раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; раствор белка предварительно охлаждают во льду; доводили рН до 9,0 с помощью 0,1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и добавляли к раствору ФИТЦ, осторожно перемешивая; реакция проходила на ледяной бане; в реакционной смеси поддерживали рН ближе к 9,0, добавляя в случае необходимости, 0,05 М раствор карбоната натрия; если рН смеси не изменялось в течение 15 минут, сосуд закрывали пробкой и оставляли во льду при легком помешивании на 18 часов в защищенном от света месте; после окончания реакции смесь центрифугировали, затем проводили диализ против физраствора.

Индикацию лимфоцитов периферической крови инфицированных ВЛКРС с помощью Fab<sub>2</sub>-флуоресцирующего диагностикума проводили следующим образом. Из исследуемой крови, обработанной трилоном-Б, готовили мазки. Мазки приготавливали немедленно после взятия крови по общепринятым методикам.

После высушивания мазки крови не позднее чем в первые двое суток после взятия фиксировали с целью закрепления клеток на стекле и сохранения их морфологии.

Фиксацию мазков для индикации инфицированных ВЛКРС лимфоцитов с помощью Fab<sub>2</sub>-флуоресцирующего диагностикума проводили ацетоном, охлажденным в морозильнике, в течение 10 минут.

Индикацию лимфоцитов, пораженных ВЛКРС проводили следующим образом:

- на фиксированный мазок наносили 2-3 капли Fab<sub>2</sub>-флуоресцирующего диагностикума и накрывали покровным стеклом;

- помещали в условия влажной камеры (чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой) и инкубировали в термостате при 37°C в течение 30 мин;

При обнаружении лимфоцита, инфицированного ВЛКРС, на его поверхности отчетливо определялись гранулы вирусного антигена, светящиеся зеленым цветом. Расположение их на поверхности лимфоцита было разным. Они определялись на всей поверхности, либо в одном каком-то месте.

При отрицательной реакции зеленого свечения на поверхности лимфоцитов не наблюдалось.

Диагноз считали установленным: при обнаружении на поверхности лимфоцитов периферической крови флуоресцирующих Fab<sub>2</sub>-фрагментов IgG.