

УДК 619:616.98:578.828.11П:636.22/28

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОАГГУЛИНИРУЮЩЕГО ДИАГНОСТИКУМА
ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ВЛКРС

Лынченко И.Ю.

Одним из способов повышения специфичности иммуноглобулиновых диагностикумов является использование клеток золотистого стафилококка, несущих протеин А. Протеин А обладает способностью вступать в соединение с IgG человека, кроликов, морских свинок, крыс, мышей, коз и крупного рогатого скота за счет связывания белком А Fc-фрагмента. Коаггулинирующий диагностикум со специфическими IgG способен специфически соединяться с антигенами, не только находящимися в растворе, но и фиксированными на клеточной поверхности. При этом Fab₂-фрагменты антител ориентированы наружу, это значительно повышает специфичность такого диагностикума и устраняет неспецифическую связь с клетками. Коаггулинирующий диагностикум широко применяют для выявления вирусных и бактериальных инфекций. Однако данных о применении его для диагностики лейкоза крупного рогатого скота нет.

Для изготовления коаггулинирующего диагностикума брали следующие компоненты: стафилококковый реагент, содержащий протеин А; физиологический раствор; IgG к ВЛКРС; 0,1 М фосфатный буфер, рН 8,0; фенол; дистиллированную воду.

Стафилококковый реагент производства НИИ им. Л. Пастера (г. Санкт-Петербург), содержащий протеин А, лиофилизирован в объеме 2 мл в наполнителе следующего состава: пептон-3%, сахароза-1%, БСА-0,5%. Флакон, содержащий стафилококковый реагент, растворяли в 2 мл дистиллированной воды и оставляли на 2 часа до полной регидратации. После этого производили трехкратное отмывание золотистого стафилококка 0,1 М фосфатным буфером, рН 8,0 на центрифуге. После последнего центрифугирования осадок стафилококка применяли для изготовления диагностикума.

Коаггулинирующий диагностикум готовили следующим образом:

- осадок стафилококка разводили физиологическим раствором до 10 мл;
- добавляли 0,2 мл IgG к ВЛКРС (концентрация по белку 2 мг/мл);
- оставляли на один час при комнатной температуре, постоянно перемешивая на магнитной мешалке;
- центрифугировали, осадок трижды промывали физраствором и взвешивали его в 10 мл раствора следующего состава: физраствор + 0,3 фенола;

-диагностикум хранили при 4⁰С в течение 4 месяцев.

Из исследуемой крови, обработанной трилоном-Б, готовили мазки. Мазки приготавливали немедленно после взятия крови по общепринятым методикам.

Фиксацию мазков для индикации инфицированных ВЛКРС лимфоцитов с помощью коаггулинирующего диагностикума проводили ацетоном, охлажденным в морозильнике, в течение 10 минут.

На фиксированный мазок наносили 2-3 капли коаггулинирующего диагностикума, накрывали покровным стеклом, затем помещали в условия влажной камеры (чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой) и инкубировали в термостате при 37⁰С в течение 30 мин. После этого мазки тщательно промывали физраствором, высушивали и окрашивали по Романовскому-Гимзе в течение 1 часа. Полученные препараты промывали, высушивали и просматривали под обычным световым микроскопом (x900).

Контроль специфичности коаггулинирующего диагностикума осуществляли в следующих системах: а) стафилококковый диагностикум + вирусный антиген из "Набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота" производства государственной Курской биофабрики, б) стафилококковый диагностикум + физиологический раствор.

Учет реакции проводили, начиная с контрольных проб. Наличие агглютинации в смеси диагностикума и вирусного антигена из "Набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота" производства государственной Курской биофабрики и отсутствие ее в смеси диагностикума и физиологического раствора - показатель специфичности диагностического препарата.

При обнаружении лимфоцита, инфицированного ВЛКРС, отмечали адсорбцию коаггулинирующего диагностикума на поверхности лимфоцитов в виде "шариков", покрывающих ту или иную поверхность площади лимфоцита.

При отрицательной реакции адсорбции клеток золотистого стафилококка не отмечали.

Диагноз считали установленным: при обнаружении адсорбированных клеток стафилококкового диагностикума на поверхности лимфоцитов периферической крови.

УДК 619:616.9-07-084

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ
БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Медведев А.П., Вербицкий А.А., Жаков В.М.

УО "Витебская государственная академия ветеринарной медицины", Республика Беларусь

Важным направлением развития современной ветеринарной науки является разработка высокочувствительных, высокоспецифичных и ускорен-

ных методов диагностики и выделения возбудителей инфекционных болезней, а также создание эффективных специфических биопрепаратов.

Для прямого обнаружения возбудителей и их антигенов широко применяют метод флюоресцирующих антител (МФА), реакцию связывания комплекса (РСК), реакцию гемагглютинации (РГА) и ее различные модификации (РНГА, РЗГА).

Сравнительно недавно были разработаны радиоиммунный (РИА) и иммуноферментный (ИФА) анализы, которые явились прогрессивным шагом вперед в лабораторной диагностике инфекционных болезней не только животных, но и человека. Известно, что РИА выявляет больных бруцеллезом животных на 1,5-2 месяца раньше по сравнению с традиционными методами исследований (РБП, РА, РСК, РДСК).

Возможности РИА и ИФА значительно возрастают при применении для их постановки моноклональных антител (МКА), синтетических пептидов и антител к последним. Использование МКА имеет важное значение при изучении структуры антигенов, их выделении и очистке, изучении механизма взаимодействия возбудителей с клетками макроорганизма.

Самыми современными методами идентификации возбудителей инфекционных болезней и, следовательно, диагностики их, являются методы, основанные на обнаружении нуклеиновых кислот. На основании анализа нуклеиновых кислот можно определить индивидуальность любого организма. Известно, что эти методы являются трудоемкими и требуют высокой квалификации исследователей, но они очень информативны, обладают высокой чувствительностью и точностью. К этим методам относят метод ретракционного анализа, позволяющий идентифицировать микроорганизм даже по штаммовой принадлежности, метод мононуклеарной гибридизации, который основан на комплементарности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах.

Однако, самым чувствительным и перспективным оказался метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). С помощью этой реакции можно выявить в исследуемом объекте даже единичные молекулы нуклеиновой кислоты.

Перспективным является метод, так называемой геномной дактилоскопии, который позволяет идентифицировать организм на родовом, видовом и на индивидуальном уровне. Этот метод дает возможность, например, дифференцировать возбудителей бруцеллеза, сибирской язвы и туберкулеза

даже по штаммовой принадлежности, что весьма важно при идентификации вакцинных и полевых штаммов, оценке эпизоотической ситуации.

На современном этапе развития ветеринарной вакцинологии многие вакцинные препараты готовят из ослабленных живых культур и выпускают в лиофилизированном виде. Лиофилизация удлиняет срок хранения препаратов, создает удобство при транспортировке и использовании. Однако массовое производство и применение живых вакцин в ветеринарии, наряду с достоинствами их выявило следующие недостатки: реверсия, длительная персистенция вакцинного штамма в организме, аллергия, реактогенность, выделение живых микроорганизмов в окружающую среду, что может иметь отрицательные последствия для людей и животных.

Отрицательным моментом при применении живых вакцин является проблема дифференциации вакцинированных животных от больных, вакцинных штаммов от эпизоотических.

В развитых странах, с учетом достижений молекулярной биологии, приступили к созданию вакцинных препаратов на основе антигенов, полученных методом химического синтеза, генетической и клеточной инженерии.

Современная наука в создании вакцинных препаратов выделяет следующие перспективные направления.

В настоящее время ведутся работы по получению специфических и иммуногенных белков из самих микроорганизмов, созданию рекомбинантных организмов, содержащих определенные гены, которые обеспечивают репродукцию поверхностных белков инфекционных агентов.

Перспективной является разработка химического синтеза пептидов, содержащих антигенные детерминанты инфекционных агентов, обеспечивающие выработку специфических антител. Не исключена возможность получения вакцин на основе фрагментов ДНК, встроенных в геном макроорганизма, создание специфических препаратов с помощью генетической инженерии мутантов микроорганизмов, утративших патогенность.

Реализация этих направлений позволит обеспечить животноводство страны высокоиммуногенными специфическими биопрепаратами нового поколения.

УДК 619:579.842.14

ИНАКТИВАЦИЯ САЛЬМОНЕЛЛ ДИМЕРОМ ЭТИЛЕНИМИНА

Медведев А.П., Иванова Т.П., Даровских С.В.

УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», Республика Беларусь

Специфическую профилактику многих болезней бактериальной и вирусной природы осуществляют инактивированными вакцинами. В качестве инактиватора традиционно используют формалин. Это вещество применяют и для инактивации культур сальмонелл при получении противосальмонел-

лезных вакцин и поливалентного антигена предназначенного для гипериммунизации продуцентов лечебно-профилактической сыворотки. Для инактивации допускается формалин, содержащий не менее 36% формальдегида. К культуре сальмонелл добавляют 0,3-0,4% формалина процесс инактивации