

Источником возбудителя эперитрозооза являются свиноматки (состояние преунииции), у которых при стрессовых ситуациях заболевание проявляется в острой форме агалактией, метритом, маститом, повышением температуры тела, отсутствием аппетита.

Заражение поросят происходит при родах (заглатывание слизи и крови), передаче возбудителя трансмиссивно, оперативных вмешательствах при нарушении правил асептики и антисептики. Симптомы эперитрозооза у поросят проявляются в течение первой-второй недели после рождения внезапным значительным повышением температуры тела, слабостью, признаками анемии, желтушностью слизистых оболочек и кожи. Животные быстро худеют, появляется слабость тазовых конечностей.

Со временем температура тела снижается без медикаментозного влияния и процесс переходит в хроническую форму.

Под влиянием стрессовых ситуаций болезненный процесс обостряется, что особенно часто наблюдается у поросят после отъема. Они прогрессивно отстают в росте и развитии, интенсивно растёт щетина, проявляется гипокератоз в области ушей, брюха, тазовых конечностей, отмечаются некрозы кончиков ушей и хвоста.

Диагноз на эперитрозооз у свиней подтвержден гематологическими исследованиями. В мазках крови из периферических сосудов уха и окрашенных по Май Грюнвальду, выявляются возбудители чаще коковидной формы на поверхности эритроцитов и реже в плазме крови. При остром процессе поражение эритроцитов достигает 80-100%. Количество эритроцитов уменьшается (до $2,58 \pm 0,36 \text{ Т}$), глюкозы (до $1,64 \pm 0,21 \text{ Ммоль/л}$), увеличивается содержание билирубина (до $29,12 \pm 1,26 \text{ Ммоль/л}$), уменьшается содержание в эритроцитах гемоглобина (до $51,52 \pm 0,98 \text{ г/л}$).

Обнаруживаются нарушения белкового, водно-солевого и других обменов веществ. О снижении природной резистентности организма свидетельствует снижение показателей БАСК, ФА, УФ, лизоцимной активности.

У больных животных эперитрозоозом отмечается дисбактериоз, который в последующем усугубляется при наличии гельминтозов и протозоозов.

Таким образом, необходимо отметить, что *E. suis* играет ведущую роль в развитии паразитоценозов свиней.

Литература

1. Апатенко В. М. Ветеринарна імунологія та імунопатологія. – К., 1994. – 175 с.
2. Бритов В. А., Василин М. Г. Симбионты гельминтов и их роль в патогенезе гельминтозов. – Владивосток. 1986. - 41 с.
3. Дьяконов Л. П. Кровепаразитарные болезни животных, вызываемые прокариотами (анаплазмоз, эперитрозооз, гемобартонеллез). // Итоги науки и техники. Животноводство и ветеринария. – М., 1978. – Т. 10. – С. 1-58.
4. Урбан В. П., Найманов И. Л. Болезни молодняка в промышленном животноводстве. – М.: Колос, 1984. – 207 с.
5. Ятусевич А. И. Влияние технологии выращивания и откорма на формирование кишечных паразитоценозов свиней. // Тез. докл. научн. конф. "Гельминтология сегодня – проблемы и перспективы". – М., 1989. – Т. 2. – С. 207-208.
6. Bugnowski H. Untersuchungen über die Eperythrozoonose des Schweines. // Vet. – Med. Diss. B., Humboldt – Universität Berlin. - 1987. - №4 (56) – P. 317-318.
7. Smith A. R. Eperythrozoonosis // Diseases of swine. Ed. Leman A. D. et al. – 6th. – P. 683-687.

УДК 619:616.98:579.873.21

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОНЪЮГАТА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И ФЛУОРОХРОМА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИММУНОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА

Полоз А.И.

РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси»

Известные способы бактериологической и серологической диагностики туберкулеза человека и животных, включающие в себя посев биоматериала на плотные или жидкие питательные среды, идентификацию выросших культур по морфологическим, культуральным, биохимическим, антигенным, патогенным свойствам или по наличию специфических участков ДНК дороги, требуют значительных затрат времени (до 3 месяцев), их эффективность низка. Чрезвычайный поли-

морфизм L-форм, их многочисленных вариантов и ревертантов, редкость полного восстановления исходных признаков родительских форм бактерий затрудняют индикацию и идентификацию агентов с дефектной клеточной стенкой [1, 2]. Для снижения затрат времени и повышения точности диагностики туберкулеза, мы предлагаем непрямой метод иммунолюминесцентной микроскопии [3], при котором материал (выделенные культуры, материал из объектов внешней среды и т.д.) исследуют с использованием аффинно очищенных иммуноглобулинов (ОИ) к видоспецифическим антигенам возбудителя туберкулеза и соответствующей антисывороткой, конъюгированной с ФИТЦ в люминесцентной микроскопии.

Для осуществления способа получали антисыворотку к ОИ, полученными нами ранее, используя их в качестве антигена при иммунизации кроликов. Иммунизацию животных и выделение антисыворотки проводили по общепринятым методикам [4]. Полученные антитела к ОИ конъюгировали с флуоресцеинизогиоцианатом (ФИТЦ). Иммуноглобулины диализировали против бикарбонатного буферного раствора, содержащего хлорид натрия. Конъюгировали иммуноглобулины с флуорохромами их диализом против растворов флуорохромоов, затем против ЗФР [4]. Очистку конъюгата проводили при помощи гельфильтрации с использованием геля АсА 200. Конъюгат выходил в первой фракции. Образец концентрировали до объема 2 мл и исследовали на чувствительность и специфичность. Для этого в качестве положительного контроля использовали взвесь вакцинного штамма VCG, отрицательного - *M. avium* 1603, в которые внесли по 100 мкл полученного конъюгата и инкубировали при температуре 37⁰С в течение 1 часа. Затем смесь центрифугировали при 5000g, 15 мин, супернатант удаляли, в пробирки вносили раствор альбумина бычьего, меченного родамином С в объеме 50 мкл и повторяли инкубацию и центрифугирование. Смесь 2-3 раза отмывали стерильным физиологическим раствором и исследовали на люминесцентном микроскопе (МЛ-2) в падающем свете с помощью иммерсионной системы (иммерсионный объектив ахромат 90x1,25 и окуляр 10) в сине-фиолетовых лучах видимого спектра. Использовали сочетания первичных светофильтров возбуждения ФС-1-2, С-С-15-2, Б-С-82 и запирающего светофильтра Т-2,1. В качестве иммерсионного масла применяли диметилфталат. Интенсивность специфической флуоресценции оценивали по следующей системе обозначений: ++++ - очень яркая изумрудно-зеленая люминесценция периферии клетки, внутриклеточных включений; +++ - яркое периферическое и диффузное свечение; ++ - слабое свечение; + - люминесценция отсутствует. Результат реакции считали положительным при интенсивности свечения мазков из положительного контроля ++ и более и отсутствии свечения мазков отрицательного контроля. После получения положительного результата проводили дальнейшую очистку конъюгатов, применяя колоночную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе. Для этого, образец диализировали против фосфатного буферного раствора, преципитаты удаляли центрифугированием. ДЭАЭ-целлюлозу уравнивали фосфатным буферным раствором и элюировали конъюгат ступенчатым градиентом концентрации хлорида натрия в фосфатном буфере. Полученные фракции концентрировали сульфатом аммония при 50% насыщении, растворяли в небольшом объеме дистиллированной воды, диализировали против ЗФР и определяли отношение ФИТЦ: белок (Ф:Б) и специфичность конъюгата. Для этого спектрофотометрически измеряли A_{280} и A_{555} и рассчитывали концентрацию Ф:Б, мг/мл (оптимальным при работе с суспензиями клеток является отношение 5-6:1). Затем конъюгат испытывали на чувствительность и специфичность окрашивания. Для этого готовили различные разведения препарата и анализировали их с гомологичными и гетерологичными клетками-мишенями (см. выше). Выбирали разведения, обеспечивающие максимальную специфичность и чувствительность с гомологичными антигенами при минимальном фоновом окрашивании гетерологичных антигенов.

Предлагаемый способ с использованием аффинно очищенных иммуноглобулинов к видоспецифическим антигенам возбудителя туберкулеза и конъюгата антисыворотки к ним с ФИТЦ позволяет ускорить индикацию и дифференциацию возбудителя туберкулеза в различных объемах, повысить достоверность диагностирования.

Литература

1. Обнаружение типичных и измененных микобактерий туберкулеза непрямим методом иммунофлуоресценции: Методические рекомендации // РАСХН Дальневост. отд-ние ДальЗНИВИ. - Новосибирск, 1992. - 12 с.
2. Земскова З.С., Дорожкова И.Р. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция // М.: Медицина, 1984.
3. Макаров Ю. А. Диагностика туберкулеза методом иммунофлуоресценции // Сб.науч.тр. ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние. ИЭВСиДВ. - Новосибирск, 1991. - С. 36-38.
4. Иммунологические методы/Под ред. Г.Фримеля, Пер. с нем А.П. Тарасова.- М.: Медицина, 1987.- 472 с.