

УДК 619:616.98.683.4.082.32

111

В.А.КИРПИЧЕНКО

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ НА ОСНОВЕ ДОТ-БЛОТТИНГА ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ЛЕПТОСПИРОЗА СВИНЕЙ

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 тест сывороток крови животных на наличие лептоспирозных антител. В следующем 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 диагностический набор для скринингового экспресс-анализа. Подучено положительное решение Роспатента от 26.10.1994 г. о выдаче патента на изобретение "Способ диагностики лептоспироза свиней" (соавторы М.С.Жаков, В.М.Жаков, П.О.Сергеев, С.Ю.Щелинцев, С.В.Кров).

Набор для проведения иммуноферментного анализа для выявления лептоспирозных антител в сыворотке крови свиней включает в себя: комплект нитроцеллюлозных фильтров (блоков), сенсibilизированных лептоспирозными антигенами серогрупп Помона, Каникола, Тарассови, Иктерогеморрагия, Гебдомадис, Сейро, конъюгат белка А с пероксидазой хрена, концентрат буфера, бычий сывороточный альбумин, хромоген, растворитель для хромогена, гидрокперит.

Принцип иммуноферментной тест-системы (дот-блоттинг) для определения лептоспирозных антител в сыворотке крови заключается в том, что образцы сывороток крови свиней инкубируют совместно с

нитроцеллюлозным блоком, sensibilizированным лептоспирозным антигеном. Антигены, присутствующие в сыворотке крови, связываются с антигеном. Несвязавшийся материал удаляют отмыванием 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 нитроцеллюлозном блоке появляется окрашенная в синий цвет точка. Ферментативную реакцию останавливают прерыванием блока 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. ИЦМ в виде блоков были sensibilizированы антигенами, полученными из отдельных серогрупп лептоспир, а также общим антигеном, представляющим собой смесь из антигенов, в целенных из отдельных серогрупп.

Исследованиями установлено, что в сыворотках крови иммунизированных поросят антитела к лептоспирам всех серологических групп, входящих в состав вакцины, в РМА сохранялись до двух месяцев, их титр составлял от $6,2 \pm 0,3$ до $7,4 \pm 0,5$ $\times 10^2$, через три месяца антитела сохранялись лишь к *L. feinen* и *L. interrogans* их титр снизился до $4,9 \pm 0,2$ - $5,0 \pm 0,4$ $\times 10^2$, а спустя 6 месяцев титр антител был предельно низким - $1,0 \pm 0,2$ $\times 10^2$, только к *L. interrogans*.

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, также и в РМА.

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

З а к л ю ч е н и е. Показана возможность использования дот-блоттинга для выявления лептоспирозных антител в сыворотках крови свиней.