

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТВЕРДОФАЗНОЙ РКОА В ДИАГНОСТИКЕ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

И.Ю.БОГАТОВА

Витебская государственная академия ветеринарной медицины

В настоящей работе представлен новый твердофазный метод обнаружения антигенов ВЛКРС в сыворотке крови крупного рогатого скота, больного лейкозом и названный нами твердофазной реакцией коаглютинации (ТРКОА).

Исследуемые сыворотки предварительно необходимо проверить на наличие антител к стафилококку. На предметном стекле смешивали 25 мкл 10% суспензии стафилококка и 25 мкл анализируемой сыворотки, разведенной 1:10 фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Сыворотку считали пригодной для исследования, если через 3-5 минут не отмечали агглютинации, что свидетельствовало об отсутствии антител к стафилококку.

В качестве твердой фазы для прикрепления антител к ВЛКРС использовали клетки золотистого стафилококка штамма Cowan-1 производства НИИ им. Л.Пастера (г.Санкт-Петербург), который обладает свойством присоединять к своей поверхности IgG своим Fc-фрагментом. При этом антигенсвязывающие паратопы ориентированы наружу, что значительно повышает чувствительность этого диагностикума. Стафилококковый реагент перед использованием регидратировали в дистиллированной воде, отмывали от наполнителей ФСБ, содержащим 0,05% твина-20 и доводили до 10%-ной суспензии.

Процедура отмывания. К 10% суспензии стафилококка добавляли 1:1 ФСБ с твином, тщательно перемешивали и центрифугировали (3000 об/мин 15 мин.), а осадок стафилококка ресуспензировали ФСБ до 10%-ной концентрации. Суспензию стафилококка окрашивали метиленовым синим. Для этого к 1 мл 10%-ной суспензии стафилококка добавляли 0,1 мл красителя, разведенного ФСБ 1:200. Затем проводили однократное отмывание ФСБ и суспензию стафилококка использовали для приготовления диагностикума.

Стафилококковый диагностикум готовили непосредственно перед употреблением. Для этого использовали 0,5 мл 10%-ной взвеси стафилококка, к которой добавляли 0,1-0,2 мл IgG к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в разведении 1:100. IgG предварительно получали из сыворотки к ВЛКРС методом аффинной иммуносорбции. Все это тщательно

перемешивали, оставляли при комнатной температуре на 15-30 мин, однократно отмывали на центрифуге и ресуспендировали в ФСБ до 10%-ной концентрации. Для контроля специфичности стафилококкового диагностикума сенсибилизировали реагент нормальной сывороткой морской свинки в таких же разведениях.

Антигены в исследуемых сыворотках определяли качественно и количественно. В случае качественного определения на предметное стекло (положенное на лист черной бумаги) наносили каплю диагностикума и каплю физраствора (для контроля). В каплю диагностикума вносили каплю испытуемой сыворотки, а в каплю физраствора - диагностикум. Тщательно перемешивали и, покачивая стекло, учитывали реакцию в течение 3-4 минут. Положительная реакция - агглютинация стафилококков (полное просветление жидкости и хлопья агглютинированных стафилококков). Отрицательная реакция - отсутствие агглютинации (жидкость мутная, агглютинатов не видно).

Для количественного определения использовали панели микротитратора Такачи с U-образными лунками. Для сенсибилизации панелей в лунки вносили по 75 мкл раствора IgG против ВЛКРС, разведенного на 0,01 М карбонатно-бикарбонатном буфере pH-9,6. Разведение IgG подбирали экспериментально в пределах 1:1000-1:10000. Панели с сыворотками оставляли на 2-3 часа при 37° С. Несвязавшиеся с твердой фазой антитела удаляли трехкратным отмыванием ФСБ с твином. После этого в лунки вносили по 50 мкл исследуемых, а также заведомо положительных и отрицательных проб (по две лунки для каждой пробы). Все это оставляли на 2 часа при 37° С для образования комплексов антиген-антитело. Несвязавшиеся антитела и сопутствующие примеси удаляли трехкратным отмыванием ФСБ с твином. Затем в одну лунку добавляли по 50 мкл 0,5% стафилококкового диагностикума, в другую (контрольную) - столько же взвеси стафилококка, сенсибилизированного нормальной сывороткой. Панель с компонентами инкубировали в течение 18-24 часов при 40° С.

Результаты реакции оценивали визуально:

- ++++ - резко положительная реакция. Агглютинированные бактерии образуют перевернутый "зонтик", края которого опадают;
- +++ - положительная реакция. Агглютинированные бактерии образуют "зонтик" с ровными краями;
- ++ - слабоположительная реакция. На дне лунки наряду с "зонтиком" намечается образование диска из неагглютинированных бактерий;

- + сомнительная реакция. По периферии образовавшегося диска из неагломентированных бактерий незначительная зона из агломентированных бактерий;
- отрицательная реакция. Бактерии полностью оседают на дно лунки в виде диска.

В результате проведенных исследований установлено, что все РИД-позитивные сыворотки (50 проб) показали положительный результат на стекле. Количественное определение доказало наличие антигена в титрах 1:512 - 1:4096. В РИД - отрицательных сыворотках (50 проб) были обнаружены 5 сывороток, давшие положительную реакцию на стекле и в планшетах (титр 1:512).

Таким образом, предлагаемая нами реакция позволяет определить наличие антигенов ВЛКРС в исследуемых сыворотках. При этом коаггулирующий диагностикум показал полное совпадение результатов с РИД, что говорит о высокой специфичности. Кроме того, предлагаемая нами реакция оказалась и более чувствительной: пять РИД-отрицательных сыворотки по наличию антигена определены как положительные.

УДК 626.826:631.2:691.4

ФИЛЬТРАЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕСЧАНО-САПРОПЕЛЕВЫХ СОСТАВОВ

А.А. БОРОВИКОВ

Белорусская сельскохозяйственная академия

Целью работы являлось исследование фильтрационных свойств песчано-сапропелевых составов, которые могут быть использованы для строительства противофильтрационных завес способом "стена в грунте".

В качестве исходных материалов были использованы песок и сапропель. Песок, согласно классификации [1] - крупный с коэффициентом неоднородности 4,23. Сапропель - высокозольный с зольностью 80,5% и начальной влажностью 110%.

Исследуемые песок и сапропель с плотностью твердых частиц 2,62 г/см³ и 2,55 г/см³ соответственно характеризуются коэффициентом пористости 0,52 и 3,4, и плотностью в воздушно-сухом состоянии, равной 1,68 г/см³ и