

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
МОСКОВСКАЯ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ ВЕТЕРИНАР-  
НАЯ АКАДЕМИЯ имени К.И. СКРЯБИНА

---

На правах рукописи

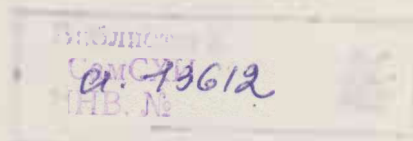
ТАРИГ ЭЛЬ МАХАДИ ЭЛЬ АВАД

РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ  
АНТИГЕНОВ И АНТИТЕЛ ПАСТЕРЕЛЛА МУЛЬТОЦИДА

16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология, иммунология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук



Москва - 1992

Работа выполнена в Московской ордена Трудового Красного  
Знамени ветеринарной академии имени К.И. Скрябина

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук,  
профессор Бурлаков В.А.

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук,  
профессор Сидоров М.А.  
кандидат ветеринарных наук,  
доцент Масимов Н.А.

Ведущая организация: Всесоюзный ордена Ленина научно-  
исследовательский институт экспери-  
ментальной ветеринарии им.Я.Р.Коваленко

Защита диссертации состоится " 15 - января 1993г.  
в 14<sup>00</sup> часов на заседании специализированного Совета К 120.36.05  
по защите диссертации на соискание ученой степени кандидата наук  
в Московской ордена Трудового Красного Знамени ветеринарной ака-  
демии имени К.И. Скрябина по адресу: 109472 Москва, ул. Академике  
Скрябина, 23, тел. 377-93-83.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке академии.

Автореферат разослан " 25 " декабря 1992г.

## I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Микроорганизмы рода *Pasteurella* широко распространены в природе и вызывают заболевания у многих видов животных, нанося большой экономический ущерб. *P. multocida* — является причиной пастереллеза крупного рогатого скота, овец, свиней, буйволов, птиц и других животных. Заболевание наблюдается почти во всех странах мира.

Трудность диагностики и специфической профилактики обусловлена тем, что среди пастерелл встречается несколько типов, которые отличаются своими иммунобиологическими свойствами (типы А, В, Д, Е и неидентифицированные штаммы). Однако, широта распространения серологических типов *P. multocida* у разных видов животных при остром и хроническом течении болезни изучены недостаточно (П. Субрашто, 1974; Б. Гунто и С. Куимор, 1979; Н. А. Чистов, 1969; Г. Ф. Бовкун, 1976 и др.).

Важнейшей задачей в борьбе с пастереллезом является разработка эффективных методов лабораторной диагностики, доступных для применения в практических лабораториях.

В настоящее время с этой целью многие авторы (А. Н. Борисенкова, И. А. Болотников, 1966; Г. Ф. Бовкун, 1976, 1977; В. В. Кольчак, 1979; М. А. Сидоров, Э. М. Агаева, 1982; М. Я. Ярцев и др., 1989; G. Carter, 1955, 1972; I. Brogden, 1979) считают целесообразным применение серологических методов в сочетании с бактериологическими исследованиями патматериала. Для серологической диагностики и типирования штаммов возбудителя пастереллеза были предложены реакции агглютинации, непрямого гемагглютинации и преципитации. Из указанных методов на практике лишь в отдельных случаях применяются реакции диффузионной преципитации, а также непрямого гемагглютинации. Эти основные серологические методы имеют ряд недостатков. Реакция преципитации в силу своей низкой чувствительности уже мало приемлема для серотипизации, а реакция непрямого гемагглютинации, хотя считается основным серологическим тестом, довольно капризна относительно сансбилизации эритроцитов, и компонентов для ее постановки биопромышленность не выпускает. То же самое следует отметить и относительно реакции латексагглютинации.

Исходя из этого необходимо изучить возможность более простых, доступных и чувствительных методов диагностики заболевания и типирования возбудителя. Кроме того необходимо изыскать серологические методы контроля вакцины. Таким требованиям в большей мере отвечает реакция иммунофлуоресценции (РИФ). РИФ, как метод диагностики, широко применяется для диагностики многих бактериальных и вирусных заболеваний. Многие авторы находят, что РИФ вполне заслуживает внедрения в практику как надежный и самый быстрый метод индикации бактерий в патологическом материале, по эффективности, как минимум, не уступающий выделению чистых культур на питательных средах. Но он еще не отработан при пастереллезе, хотя имеются отдельные сообщения о положительных результатах при выявлении антигенов из культур.

#### Цель и задачи исследований.

Целью исследований являлась отработка методики постановки прямого и непрямого вариантов реакции иммунофлуоресценции (РИФ) и определить ее перспективы для выявления антител и антигенов при пастерелла мультацида.

В задачи исследований входило:

- приготовить цельномикробные и капсульные антигены, получить соответствующие антисыворотки и меченые конъюгаты из них на серотипы А, В и Д пастерелл;
- отработать оптимальные режимы постановки прямого и непрямого вариантов РИФ;
- изучить чувствительность и специфичность РИФ при выявлении антител и антигенов пастерелла мультацида.

Научная новизна. Отработаны методики постановки прямого и непрямого вариантов реакции иммунофлуоресценции (РИФ) при пастереллезе с использованием полученных капсульных и цельномикробных антигенов и соответствующих кроличьих антисывороток.

В сравнительном аспекте реакции иммунофлуоресценции и диффузионной преципитации в агаре (РДП) изучено распределение антигенов пастерелл типов А, В и Д в органах экспериментально зараженных мышей и кроликов. Изучена динамика антителообразования (РИФ и РДП) при вакцинации кроликов стандартной гидроокисьалюминиевой формолвакциной и экспериментальной политиповой пастереллезными вакцинами. Выделены из патматериалов 15 культур пастерелл, изуч

ны культурально-биохимические свойства и на основе комплекса современных методик проведена их серотипизация. Получены данные о высокой чувствительности и специфичности отработанных методов постановки РИФ.

Практическая значимость. На основании проведенных исследований предложены методы постановки прямого и непрямого вариантов РИФ, простые, доступные для практической работы с целью выявления антигенов и антител типов А, В и Д пастерелла мультацида. В том числе показана возможность контроля вакцинных препаратов с использованием РИФ и РДП.

Выделены из патматериалов от больных животных 15 культур и типированы 11 этих изолятов.

Апробация работы и публикация. Материалы диссертации доложены и одобрены на отчетной научной конференции Московской ветеринарной академии в 1990 и 1991 гг.

По теме диссертации сданы в печать для публикации в трудах Московской ветеринарной академии им.К.И.Скрябина две статьи.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 110 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения и выводов. Список использованной литературы включает 154 публикации по тематике исследований, из них 55 русских и 99 зарубежных. Материалы иллюстрированы 19 таблицами и 7 фотографиями.

## 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы и методы

Работу проводили по плановой исследовательской тематике на кафедре вирусологии, микробиологии и биотехнологии ордена Трудового Красного Знамени Московской ветеринарной академии имени К.И.Скрябина в 1989-1992 гг.

В опытах для получения сывороток, выделения чистой культуры, определения патогенности выделенных штаммов пастерелл и изучения динамики выявления антигенов в тканях и накопления антител в сыворотках, были использованы 50 взрослых кроликов породы шиншилла массой 3-3,5 кг и 400 взрослых белых мышей.

Для проведения культуральных работ использовались следующие питательные среды: МПБ, МПА, перевар Хоттингера, гидролизат лактальбумина, кровяной агар и обогащенные среды Хоттингера.

В опытах были использованы штаммы пастерелл типов А, В и Д.

Для выделения и идентификации возбудителей пастереллеза применяли общепринятые методы.

Для выявления капсулы применяли метод Михина - фиксированный мазок или препарат-отпечаток из органов окрашивали метиленовой синькой с подогреванием до отхождения паров, выдерживали 7 мин, краски смывали, промывали водой, просушивали и микроскопировали в иммерсионной системе.

Изучение ферментативных свойств культуры проводили обычно с применением укороченного "пестрого" ряда, состоящего из некоторых наиболее используемых сахаров и спиртов.

Патогенность выделенных микроорганизмов испытывали на белых мышах.

В основу серотипизации штаммов пастерелл взяли предложенную Картером (1955) классификацию по капсульному антигену. Для получения типоспецифических сывороток использовали методику, предложенную М.А.Сидоровым (1979).

Селекционированные культуры каждого штамма пастерелл хранили в мясо-пептонном бульоне в запаянных ампулах при температуре -10-14°C до 3-х месяцев.

Серогрупповую принадлежность эталонных штаммов пастерелл, используемых в качестве антигенов, определяли по перекрестной РДП не реже двух раз в год с гомологичными антисыворотками. Для подтверждения результатов, полученных с помощью серологических методов, были использованы несерологические тесты: акрифлавиновый, триафлавиновый тесты и гиалуронидазная проба (Carter, Subranto, 1973; Carter, Rondle, 1975; Э.А.Шегидевич, В.В.Федотов, И.В.Чернушкина, 1985).

Реакцию диффузионной преципитации в агаровом геле ставили по Ouchterlony (1948) в чашках Петри. Для приготовления геля использовали 1% агар фирмы Difco в медиал-вероналовом буфере, консервированном азидом натрия.

Статистическую обработку результатов исследований проводили согласно методике Д.К.Гарна (1989).

## 2.2. Результаты исследований

### 2.2.1. Получение антигенов, антисывороток и постановки РИФ

Для приготовления антигенов штаммы А, В и Д серотипов пастерелл предварительно были проверены по морфологическим, культурально-биохимическим свойствам и патогенности.

Для получения растворимого антигена, используемого в реакции диффузионной преципитации, пастереллы осаждались центрифугированием при 6000 об. мин в течение 20-30 мин, затем дважды отмывали стерильным физиологическим раствором. Полученный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе из расчета 1/10 от исходного объема и к суспензии добавляли 0,3% формалина.

Для получения цельномикробного антигена для иммунизации кроликов с целью приготовления антисывороток пастереллы осаждали с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) с одновременной инактивацией их формалином (по методике Н.А.Смирновой).

Капсульный антиген получали по методике М.А.Сидорова и Э.М.Агаевой (1979).

Преципитирующая активность получаемых нами антигенов колебалась от 1:2 до 1:32.

Изготовление качественных иммунных сывороток является одним из основных условий успешного применения реакции иммунофлуоресценции.

Прежде чем проводить иммунизацию кроликов мы проверяли их сыворотки в РДП на отсутствие нормальных антител к пастерелла мультотида серотипов А, В и Д и выбраковывали пастереллоносителей.

Иммунизацию вели по следующей схеме: антиген вводили по 1,5 мл подкожно, далее дважды с интервалом 10 дней комплексно по 1,5 мл подкожно и по 2,0 мл внутримышечно.

В ходе опыта через каждые 7-10 дней после очередной иммунизации брали кровь из ушных вен кроликов для проверки преципитирующей активности сывороток в РДП методом двойной диффузии (двухмерной) по Оухтерлони. Сыворотки отделяли бесцентрифужным методом путем отстаивания при температуре +4°C.

Сыворотки, полученные на цельномикробном и капсульном антигенах, проверяли на активность в РДП.

Иммунные глобулиновые фракции сывороток крови получали высаживанием сульфатом аммония при 50% насыщении (Ю.Н.Зубицкий, 1964). Переосаждение и центрифугирование проводили трижды, в конечном итоге осадок растворяли в небольшом количестве физиологического раствора, переносили в целлофановый мешочек и, для освобождения от солей аммония, диализировали против 0,15 М раствора хлорида натрия на фосфатном буфере pH-7,4.

Метку белков изотиоцианатом Na (флуоресцеина) проводили по методике Соопс и Карлеа в модификации Regge и Marshall.

Конъюгаты очищали от свободного флуорохрома гельфилтрацией через сефадекс G-25 и методом исчерпывающего диализа (Л.А.Зильбер, 1968).

Приготовленные люминесцирующие сыворотки консервировали мертиолатом из расчета 1:10000 и хранили в холодильнике при 4°C.

Для контрастирования неспецифического свечения мы использовали бычий альбумин меченый родамином. Сыворотки и антигены, полученные нами контролировали на активность в РДП и наиболее активные использовали для отработки прямого и непрямого вариантов ГИФ. Были отработаны следующие параметры постановки реакции: оптимальное время инкубации препаратов в термостате - 25-30 мин при первоначальной фиксации их ацетоном в течение 15 мин (тканевые препараты) или метанолом - 5-10 мин; после инкубации препараты тщательно промывали дважды в 0,15 хлориде натрия pH - 7,2-7,4 по 10 мин.

Реакцию считали:

- положительной при оценке ее на ++++ и +++ креста;
- сомнительной - ++ и + крест. В этом случае проводили повторное исследование, при получении повторного сомнительного результате пробу считали отрицательной;
- отрицательной - свечение не наблюдали.

С целью определения активности иммунных сывороток, полученных на цельнобактериальные и капсульные антигены серотипов А, В и Д, мы проводили их титрование в непрямом варианте ГИФ и РДП.

В сыворотках большинство кроликов преципитирующие антигена выявляли в значительных титрах с гомологичными антигенами (1:8-1:32), с гетерологичными антигенами их активность была ниже на 1-2 разведения.

Результаты титрования сывороток в РИФ были выше, чем в РДП, с гомологичными антигенами титры антител в сыворотках на цельномикробные антигены были 1:512.

Титры антисывороток на капсульные антигены с гомологичными антигенами также были высокими: 1:16-1:32 в РДП и 1:512-1024 в РИФ.

Титры антител с гетерологичными антигенами в обеих реакциях были значительно меньше. Таким образом, с полученными антигенами и гипериммунными сыворотками кроликов (и конъюгатами) нам удалось отработать реакцию иммунофлуоресценции, которая при относительной простоте постановки, возможности ускоренного получения результатов позволяла надеяться на перспективность применения ее для изучения распределения антигенов в тканях и контроля выработанных антител у иммунизированных животных.

### 2.2.2. Выявление антигенов и антител

Для выявления антигенов в культурах мы использовали в качестве испытуемых цельномикробные антигены музейных штаммов № 8683, № 682 и № Т-80 серотипов А, В и Д соответственно. В прямом варианте РИФ культуры исследовали без разведения.

В непрямом варианте РИФ использовали иммунные сыворотки, полученные нами и антивидовую люминесцирующую сыворотку против глобулинов кролика.

Антигены раститровывали с коэффициентом 2 от 1:2 до 1:4096; иммунную сыворотку и конъюгаты использовали в рабочем разведении 1:16 и 1:32 соответственно.

В качестве контроля использовали отрицательный антиген и нормальную кроличью сыворотку.

Цельномикробные антигены на серотипы А, В и Д реагировали с гомологичными сыворотками в титрах 1:1024, 1:2048 и 1:512 соответственно.

Перекрестные реакции выявлялись в титрах намного ниже по сравнению с таковыми на гомологичные комплексы антиген-антитело - контрольные антигены давали отрицательную реакцию.

С целью изучения динамики накопления и распределения возбудителя в паренхиматозных органах мышей заражали культурами и убивали через 6, 12, 18 и 24 ч после заражения, брали кусочки орга-

нов (сердце, легкие, печень, селезенка, почки) и готовили мазки-отпечатки. Кроме того, из всех органов (в том числе и убитых в соответствующие сроки интактных (контрольных) мышей стерильно готовили концентрированные экстракты и нарезали мелкие кусочки для использования их в качестве испытуемых антигенов в реакции диффузионной преципитации в агаровом геле.

Динамика накопления и распределение возбудителя в органах и тканях мышей были прямо пропорциональны срокам после заражения; так через 6 ч преципитирующий антиген не выявлен, а через 18 и 24 ч после заражения его выявляли в экстрактах и кусочках сердца и легких (тип А). Антиген серотипа В регистрировали уже через 12 ч после заражения в печени, селезенке и почках, типа Д через 18 ч обнаруживали в легких и сердце, но линии преципитации были слабыми.

В реакции диффузионной преципитации встречали перекрестные реакции с гетерологичными сыворотками (титры сывороток 1:2-1:4).

Иммунофлуоресцентное свечение было видно в препаратах, приготовленных из легких мышей, убитых через 6 ч после заражения (тип А), а через 12, 18 и 24 ч антигены обнаруживали во всех исследуемых органах.

Сроки выявления и распределения антигенов серотипов В и Д были довольно сходными с данными, полученными для типа А. Антиген типа В в печени и селезенке выявляли раньше, чем в легких и сердце. Накопление *F. multocida* серотипа Д регистрировали больше всего в легких и печени через 18 и 24 ч после заражения; причем свечение клеток микроорганизмов было слабее, чем у других серотипов.

В целом в РИФ антигены *F. multocida* в органах и тканях мышей удавалось выявлять раньше и в больших титрах, чем в РДП, следовательно, реакция иммунофлуоресценции по чувствительности превышала РДП. В прямом варианте РИФ вообще не встречали перекрестных реакций.

С целью изучения накопления и распределения антигенов в паренхиматозных органах у кроликов после экспериментального заражения готовили мазки-отпечатки из органов павших кроликов.

Для контрастирования неспецифического свечения мы использовали бычий альбумин и черную роданином.

Реакция ставили многократно с целью достичь наилучшего свечения в препаратах и избежать ошибок. От каждого павшего кролика было приготовлено по 100 мазков-отпечатков. Реакцию ставили как с гомологичными сыворотками, так и с гетерологичными в разведении 1:5 и в разведении, в 4 раза превышающем предельный титр с гомологичным антигеном (рабочий титр).

Наиболее интенсивная окрашенность отмечалась в мазках-отпечатках из селезенки, печени, легких и почек (тип А и В), легких, селезенки и почек.

В препаратах с гетерологичными антисыворотками также выявляли антигены различных типов, включая тип Д, лишь интенсивность свечения чаще всего была менее интенсивной.

Все контрольные препараты показали четкую отрицательную реакцию. Свечение препаратов, обработанных иммунной сывороткой, полученной на капсульный антиген, отличалось от свечения препаратов, обработанных антисывороткой на цельномикробный антиген тем, что в первом случае свечение наблюдалось во внутреннем слое капсулы, а с сыворотками на цельномикробные антигены свечение было по всей клеточной стенке бактериальной клетки.

В последующем проводились испытания непрямого варианта РИФ для выявления антител в гипериммунных сыворотках и сывороток кроликов, привитых вакцинами против пастереллеза.

Гипериммунные сыворотки, полученные на цельномикробные антигены серотипов А, В и Д, реагировали с гомологичными антигенами в титрах 1:1280, 1:2560 и 1:1280 соответственно, в то же время отмечали и перекрестные реакции, но в меньших разведениях (1:40-1:80) с гетерологичными антигенами. Сыворотки, полученные на капсульные антигены тех же штаммов пастерелл, реагировали с гомологичными антигенами в наиболее высоких титрах - 1:5120, 1:2560, 1:2560; перекрестные реакции между гетерологичными системами в незначительных титрах также имели место. Все контроли были отрицательными.

Чтобы составить общее представление о показании реакции иммунофлуоресценции в процессе иммунологической перестройки организма животных, мы изучали динамику выявления антител в РИФ и РДП у кроликов, привитых экспериментальной политиповой ГОА-вакци-

ной и стандартной формолвакциной против пастереллеза.

Установлено, что кролики в ответ на введение вакцин ответили выраженной иммунологической перестройкой организма. Титр преципитирующих антител, а также показания реакции иммунофлуоресценции достигали своих максимальных величин на 21-28-35 сутки. Однако, динамика нарастания титров антител в РДП и РИФ имели свои особенности.

К периоду максимальных серологических сдвигов, определяемых в РИФ и РДП, титры антител в иммунофлуоресценции, как правило, были выше, но довольно близки к показаниям уровней антител в РДП. На заключительном этапе исследований (49-56 сутки) обнаруживали резкое снижение уровня антител, в первую очередь преципитирующих и разница в показаниях этих реакций становилась значительной.

Было показано, что в носовых смывах от кроликов через 14-28 дней после прививки стандартной формолвакциной в РИФ выявляли антитела регулярно с антигеном серотипа В, а с антигенами серотипов А и Д положительные результаты регистрировали лишь с носовыми смывами от отдельных кроликов.

Все препараты-смывы от кроликов, привитых полтитиповой ГОА-вакциной, давали положительный результат с антигенами серотипов А, В и Д в сроки от 14 до 28 дней после прививки.

На заключительном этапе исследований (1,5-2 мес) со смывами от кроликов, привитых обоими типами вакцин, были получены отрицательные результаты (отсутствие антител).

Таким образом была продемонстрирована перспективность реакции иммунофлуоресценции сравнительно с РДП для выявления всех типов антигенов и антител при пастереллезе. Необходимо было убедиться в специфичности такой реакции.

### 2.2.3. Специфичность реакции иммунофлуоресценции при пастереллезе

При проверке специфичности РИФ изучали возможность выявления перекрестных связей со стандартными сыворотками и антигенами различных возбудителей заболеваний сельскохозяйственных животных: бруцеллеза, респираторного микоплазмоза, сальмонеллеза, сибирской язвы, колибактериоза, стрептококкоза, стафилококкоза и др.

При использовании противопастереллезных сывороток на капсульные антигены не выявлено каких-либо перекрестных реакций с антигенами возбудителей других бактериальных инфекций.

При использовании цельномикробных антигенов пастерелла мультотцида не было получено каких-либо перекрестных реакций с антигенами возбудителей других инфекций, но в сборной нативной сыворотке крупного рогатого скота удавалось выявить противопастереллезные антитела в низких титрах (1:5-1:10). Вероятно, это связано с тем, что отдельные животные-доноры были привиты или переболели ранее пастереллезом.

В целом результаты проведенных опытов позволяли сделать заключение о специфичности РИФ и пригодности ее для выявления антигенов и антител пастерелла мультотцида и, возможно для серотипирования выделяемых культур пастерелл.

#### 2.2.4. Выделение культур пастерелл из патматериалов и изучение их свойств, серотипизация

Для выделения пастерелл были использованы 25 проб из органов павших животных (8 от кроликов, 6 от свиней, 1 от норки и 10 от телят). Всего было выделено 15 изолятов, которые по морфологии, культуральным, биохимическим свойствам и патогенности были характеризованы как *P. multocida*. Почти все выделенные штаммы не ферментировали арабинозу, ксилозу, мальтозу и лактозу, ферментировали галактозу, глюкозу, сахарозу, сорбит, маннозу.

Все культуры не изменяли цвет лакмусового молока, не разжижали желатину и почти больше половины штаммов образовывали индол и сероводород.

Выделенные культуры при постановке биопробы были патогенными для белых мышей. При введении их белым мышам внутривентриально в дозе 0,5 мл последние погибали в течение 18-24 ч.

Из 15 штаммов при типизации их в РИФ 3 были отнесены к серотипу А, 2 - к серотипу В и 6 - к серотипу Д. Серотиповую принадлежность 4 штаммов установить не удалось.

С целью сравнения и подтверждения результатов типизации, полученных в РИФ, мы исследовали выделенные культуры в реакции диффузионной преципитации по Оухтерлони, акрифлавиновым, трипафлавиновым и стафилококковым тестам.

С помощью акрифлавиновой пробы из 15 штаммов 4 отнесены к серотипу Д, а в триафлавиновой пробе к этому типу отнесены 6 штаммов. При типизации с помощью стафилококкового теста к серотипу А отнесены 2 штамма, принадлежность к типу А этих штаммов подтверждена и результатами РИФ и РДП. К серотипу А отнесены 3 штамма из 15 по данным РИФ и РДП.

Результаты идентификации культур по отношению к типу Д в РИФ и РДП были также аналогичны - 6 культур из 15.

Для типирования штаммов типа В несерологические тесты не рекомендованы. К этому типу в РИФ были отнесены два штамма из 15 выделенных, в РДП определить культуры серотипа В не удалось.

Как показали наши исследования, для выявления антигенов, контроля распределения возбудителя в тканях и уровня антител у привитых лабораторных животных, а также для типизации выделенных культур, отработанные нами варианты реакции иммунофлуоресценции оказались достаточно чувствительными, специфичными, а также лишены ряда недостатков, присущих двухфазным серологическим реакциям. Реакция иммунофлуоресценции безусловно заслуживает большого внимания и дальнейшего изучения как метод серодиагностики пастереллеза сельскохозяйственных животных.

### 3. В В В О Д Ы

1. Получены активные концентрированные антигены и антисыворотки на целномикробные антигены с активностью в РДП 1:8-1:16 и на калсультные антигены с активностью 1:16-1:32, а также меченые люминесцирующие противопастереллезные коньюгаты (1:512-2048).

2. Отработаны методики постановки прямого и непрямого вариантов реакции иммунофлуоресценции (РИФ) с использованием калсультных и целномикробных антигенов и соответствующих антисывороток или меченых коньюгатов серотипов А, В и Д *P. multocida*.

Режимы постановки реакции предусматривали: оптимальное время инкубации препаратов в термостате 25-60 мин, при первоначальной фиксации их ацетоном 15 мин (тканевые препараты) или метанолом 5-10 мин (культуральные препараты); после инкубации препараты тщательно промываются дважды в 0,15 М хлориде натрия pH - 7,2-7,4 по 10 мин.

3. Реакция иммунофлуоресценции позволяла выявлять антигены непосредственно в мазках-отпечатках органов убитых или павших экспериментально зараженных мышей и кроликов (прямой вариант): максимальные титры антител в гипериммунных сыворотках или сыворотках вакцинированных кроликов достигали титров 1:1280-1:5120 (непрямой вариант).

4. Изучена динамика антителообразования (РИФ и РДП) при вакцинации кроликов стандартной гидроокисьалюминиевой формолвакциной и экспериментальной политиповой пастереллезной вакцинами.

5. Из патматериалов павших телят, свиней, кроликов и норки выделено 15 штаммов, из которых по данным РИФ, подтвержденным принятыми тестами, 3 отнесены к серотипу А, 2 - к серотипу В и 6 - к серотипу Д и 4 штамма не типированы.

6. Реакция иммунофлуоресценции более чувствительна, чем РДП, специфична, проще по технике постановки, и результаты опытов свидетельствуют о ее перспективности как метода для серодиагностики заболевания и идентификации возбудителя при пастереллезе.

#### 4. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

Целесообразно внедрение отработанных методов постановки прямого и непрямого вариантов РИФ в практику работы ветеринарных лабораторий с целью выявления антител у вакцинированных или переболевших животных и для ускоренной диагностики заболевания путем непосредственного выявления в тканях антигенов различных патогенных типов пастерелла мультацида.

#### 5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Тариг Эль Махади Эль Авад. Уровень бактерионосительства крупного рогатого скота при вспышке геморрагической септицемии в Судане.

Сб. науч. трудов МВА "Опыт подготовки специалистов для сельского хозяйства зарубежных стран". 1992, стр.63.

2. Бурлаков В.А., Тариг Эль Махади Эль Авад. Реакция иммунофлуоресценции для выявления антигенов пастерелла мультацида в органах белых мышей. Сборник научных трудов (межведомственный), 1992, стр.63.

