

МОСКОВСКАЯ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ВЕТЕРИНАРНАЯ АКАДЕМИЯ имени К.И.СКРЯБИНА

На правах рукописи

Т А У Б А Е В
УТЕГЕН БАЙРАЛИЕВИЧ

РАЗРАБОТКА РЕАКЦИИ ЛАТЕКСАГГЛУТИНАЦИИ ДЛЯ
СЕРОТИПИЗАЦИИ ПАСТЕРЕЛЛ

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

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Москва 1991

Служба
ИН 01-15503

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 М.А.Сидоров (МИПБ)
кандидат ветеринарных наук, доцент Н.А.Масимов (МВА)

Ведущая организация:

Щелковский Всесоюзный научно-технологический институт
биологической промышленности.

Защита диссертации состоится " 24 " 01 _____ 1992 г.
в 10 час на заседании специализированного совета К-120.36.06
по присуждению ученой степени кандидата наук в Московской
ордена Трудового Красного Знамени ветеринарной академии имени
К.И.Скрябина (109472, Москва, ул.Академика Скрябина, 23,
тел.: 377 - 93 - 83).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке академии.

Автореферат разослан " 13 " XII _____ 1991 г.

Ученый секретарь
специализированного совета

Федосеева Т.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Из литературы известно, что пастерелла мультацида является причиной пастереллеза (холеры) птиц, крупного рогатого скота, овец, свиней, буйволов и других животных, и указывается, что заболевание наблюдается во всех странах мира (Н.М.Никифорова, 1948, 1971, 1977; М.К.Ганиев, 1970; Э.И.Вайсман и В.И.Геведзе, 1976; Н.А.Масимов, 1980; А.А.Конопаткин и др. 1987; Э.А.Шегидевич, 1984; P. Perreau, 1960; G.Carter, 1961, 1975; R.Mushin, 1979; I.Bhasin, 1982 et al.).

Пастереллезы у всех животных могут вызывать значительную гибель, что приводит к существенным экономическим потерям. 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 бактериологическим исследованием патматериала. Для серологической диагностики и типирования штаммов возбудителя пастереллеза были предложены реакции агглютинации, непрямой гемагглютинации и преципитации. Однако, практическое применение их в нашей стране остается проблематичным из-за отсутствия налаженного производства стандартных диагностикумов. Из указанных методов лишь в отдельных случаях применяются реакции диффузионной преципитации, а также непрямой гемагглютинации. Эти основные серологические методы имеют ряд недостатков. Реакция преципитации в силу своей низкой чувствительности мало приемлема для выявления антигенов и антител, серотипизации штаммов, а реакция непрямой гемагглютинации, хотя считается основным серологическим тестом при определении серотиповой принадлежности штаммов пастерелл, тоже имеет существенные недостатки. Как известно, в РНГА используются неоднородные биологические объекты-эритроциты, что приводит к их самоагглютинации или нестандартности реакции.

Исходя из сказанного, явствует необходимость разработки новых, более простых, доступных и чувствительных методов диагностики.

Цель и задачи исследований. Целью работы являлось разработка

метода выявления антигенов и антител пастерелла мультотида серотипов А, В и Д на основе реакции латексагглютинации (РЛА). В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- изготовить цельномикробные и капсульные антигены пастерелла мультотида серотипов А, В и Д для иммунизации кроликов и изучения антигенных взаимоотношений пастерелл
- получить гипериммунные антисыворотки на вышеуказанные антигены пастерелла мультотида
- разработать методику постановки реакции латексагглютинации, включая отработку оптимальных режимов постановки реакции для выявления антигенов и противопастереллезных антител
- изучить чувствительность, специфичность реакции и перспективы ее использования для серотипизации пастерелл.

Научная новизна. Впервые при пастереллезе разработана методика постановки реакции латексагглютинации. Отработаны оптимальные режимы постановки реакции, включая получение специфических стандартных компонентов, способ сенсibilизации ими полиакролеиновых латексных частиц, технику постановки и учета результатов для выявления антигенов и антител пастерелла мультотида серотипов А, В и Д. Определены коррелятивные взаимоотношения между РЛА, РДП, РР, а также несéroлогическими методами при типизации штаммов пастерелл. Показано, что РЛА специфичный и чувствительный метод для выявления антигенов и антител пастерелла мультотида серотипов А, В и Д и типирования возбудителя.

Практическое значение работы: Методика постановки реакции латексагглютинации при пастереллезе может быть использована в ветеринарных лабораториях и исследовательских учреждениях для проведения массовых серологических исследований с дифференциально-диагностическими целями и изучения антигенных взаимоотношений различных серотипов пастерелл. Высокая производительность РЛА, ее чувствительность и специфичность при простоте постановки позволяют рекомендовать эту методику для внедрения в широкую практику. Данные диссертации включены в лекции и практические занятия со студентами 3 курса ветеринарных факультетов МВА и Западно-Казахстанского сельскохозяйственного института, а также в программу факультета повышения квалификации преподавателей-микробиологов сельскохозяйственных вузов страны. Методические указания по постановке реакции латексагглютинации для выявления антигенов и антител пастерелла мультотида серотипов А, В и Д рассмотрены и одобрены научно-методическим и Ученым советом МВА и представлены на утверждение

на секции " Эпизоотология и профилактика инфекционных болезней животных" Отделения ветеринарии ВАСХНИЛ.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и получили положительную оценку на конференции молодых ученых и специалистов в г.Уральске в 1991 г. и на отчетной научной конференции МВА .

Публикация. По теме диссертации опубликовано 2 статьи в сборнике докладов межвузовской конференции молодых ученых и специалистов в г.Уральске и 1 статья находится в печати.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 157 страницах, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, собственные исследования, обсуждение результатов, сведения и рекомендации об использовании научных выводов и приложения (23 стр). Список использованной литературы включает 221 источник. Работа иллюстрирована 22 таблицами, 4 рисунками (фотогр.).

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследования. Работа выполнена в период 1988-1991 гг. в соответствии с плановой тематикой на кафедре вирусологии, микробиологии и биотехнологии Ордена Трудового Красного Знамени Московской ветеринарной академии имени К.И.Скрябина.

В опытах по получению гипериммунных антисывороток, выделению чистой культуры пастерелл из патматериалов были использованы 78 кроликов породы шиншилла в возрасте 7-8 месяцев массой 3-3,5 кг, 356 белых мышей и 34 морских свинки.

В работе были исследованы штаммы пастерелл, выделенные нами из органов животных, павших от пастереллеза, а также из носовых смывов больных пастереллезом и клинически здоровых животных. Эталонные штаммы были получены из музеев лаборатории микробиологии ВИЭВ имени Я.Р.Коваленко, Всесоюзного Государственного научно-контрольного института ветеринарных препаратов, Щелковского Всесоюзного научно-исследовательского технологического института биологической промышленности (ВНИТИБП).

Для выделения и идентификации возбудителей пастереллеза применяли общепринятые методы. Серотиповую принадлежность выделенных штаммов пастерелля определяли в РДП по Оухтерлони. Триптафлавиновый, акрифлавиновый и стафилококковый тест ставили по общепринятым методикам (Э.А.Шегидевич., В.Б.Федотов., И.В.Чернушкина.,

1985;

Для получения общих глобулиновых фракции сывороточных белков использовали методы высаливания с помощью сернокислого аммония и осаждения полиэтиленгликолем (ПЭГ, 6000).

Статистическую обработку результатов исследований проводили согласно методике Ю.К. Барна (1989).

Получение антигенов. В ходе опытов получены антигены, концентрированные с помощью полиэтиленгликоля с одновременной инактивацией культур пастерелл формалином (0,3% по формальдегиду), а также цельномикробные антигены, концентрированные центрифугированием или полученные путем дефростации и капсульные антигены - по методике М.А. Сидорова и др. (1984). Было определено влияние сроков хранения и разных температурных режимов на активность вышеназванных антигенов. Установлено, что активность цельномикробных антигенов, полученных путем центрифугирования, сохраняется до 5 месяцев при хранении их в температурном режиме $0-+4^{\circ}\text{C}$, а к концу 10 месяца хранения активность их снижается более чем на 2-3 титра. При хранении этих антигенов при $-10-18^{\circ}\text{C}$, они сохраняли свою активность до 8 месяцев. Антигены концентрированные полиэтиленгликолем при $0-+4^{\circ}\text{C}$ оставались активными в течение 10 месяцев, а при $-10-18^{\circ}\text{C}$ в течение года, сохраняя при этом свою первоначальную активность. Капсульные антигены постепенно теряли свою активность после 5 мес., а к концу 12 мес. стали неактивными при хранении их при температуре $0-+4^{\circ}\text{C}$. При хранении этих же антигенов в другом температурном режиме ($-10-18^{\circ}\text{C}$) они сохраняли активность до 8 месяцев. Полученные результаты свидетельствуют о том, что антигены концентрированные с помощью полиэтиленгликоля имеют преимущества перед антигенами, полученными другими способами и сохраняют свою активность при хранении их при температуре $-10-18^{\circ}\text{C}$ не менее 8 мес.

Получение антисывороток. Полученные капсульные и цельномикробные антигены на штаммы пастерелла мультацида серотипов А, В и Д были использованы для иммунизации кроликов и получения гипериммунных антисывороток по модифицированной в лаборатории схеме иммунизации. Титры антител в этих сыворотках выявляемые в реакции двухмерной иммунодиффузии по Оухтерлони (РДП) составляли 1:32-1:64, а в реакции латексагглютинации - 1:1280-1:2560.

Получение гамма-глобулиновых фракций сывороток. Для сорбции антител на латексные частицы из сывороток предварительно получали гамма-глобулиновые фракции с помощью сульфата аммония или полиэтиленгликоля. В предварительных опытах определяли оптимальную концентрацию полиэтиленгликоля для осаждения гамма-глобулинов. Полученные данные свидетельствовали, что при использовании 7% концентрации ПЭГ, фракции осаждаемых гамма-глобулинов были наиболее активными; титры их с гомологичными антигенами составляли: для типа А- 1:51,2, типа В- 1:44,8 и типа Д- 1:57,6. При использовании общепринятой методики высаливания гамма-глобулинов сульфатом аммония потери активности по сравнению с исходными титрами сывороток были около 30%.

Приготовление латексных конъюгатов. Для приготовления латексного конъюгата к суспензии латекса добавляли гамма-глобулины в концентрации 50, 100 и 150 мкг на 1 мл латекса. После встряхивания на шуттеле (2,5 часа при комнатной температуре) суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в глициновом буфере (методика, применяемая Трифоновым В.Д., 1990). В последующем латексный конъюгат гамма-глобулинов встряхивали на шуттеле в течение 1,5 часа при комнатной температуре. Центрифугировали при вышеописанных режимах, осадок ресуспендировали в фосфатном буфере. Последнюю процедуру повторяли 2-3 раза с целью очистки конъюгата от примесей.

Из результатов опытов следует, что оптимальной концентрацией белка (гамма-глобулина) для сорбции на полиакролеиновые латексные частицы является 100 мкг на 1 мл латексной суспензии. Титры выявляемых гомологичных антигенов достигали 1:921,6. При испытании концентрации конъюгируемого белка из расчета 150 мкг/мл отмечали створоживание латекса, а при постановке реакции такие конъюгаты обычно давали самоагглютинацию.

Установлено, что для сорбции антигена оптимальным является 200 мкг на 1 мл латексной суспензии, активность латексных конъюгатов капсультных антигенов составляет 1:2304, 1:2048 и 1:2560 соответственно с гомологичными сыворотками на серотипы А, В и Д пастереллы мультацида.

Отработка режима постановки реакции латексагглютинации (РЛА).

Основные исследования по разработке РЛА мы продолжали с опре-

деления оптимальной температуры для постановки реакций и влияния температурного режима на скорость течения реакций. Температурный режим был испытан в пределах 0-+4°C, комнатной температуры (+18-+24°C) и 37°C. Оптимальной температурой для постановки РЛА является инкубация ее при 0-+4°C; при этом реакция проявляется полностью за 47,06 мин., при комнатной температуре в среднем за 4 часа, а при температуре 37°C - за 2 часа.

После определения оптимального температурного режима для постановки РЛА, оставалось определить концентрацию латекса, который обеспечивал бы четкость результатов реакции при читке. Опытным путем установлено, что наиболее четкую реакцию обеспечивает использование сусла или латекса в 2% концентрации. При использовании 1% латексных суспензий из-за бледности цвета латекса создается некоторое затруднения при читке результатов реакции.

В ходе опытов установлено, что для получения наибольшего количества положительных реакций при взаимодействии гомологичных систем, полученные латексные конъюгаты следует разбавлять в глициновом буфере с бычьим сывороточным альбумином в соотношении 1:5. Это обеспечивает от 91,42 до 97,14% положительных реакций с четким отрицательным контролем.

Изучение возможности использования РЛА для выявления антигенов и антител пастерелла мультотцида серотипов А, В и Д. Для выявления антигенов пастерелла мультотцида серотипов А, В и Д на полиакролеиновые частицы были сорбированы гамма-глобулины гипериммунных антисывороток крови кроликов на штаммы №8683 (тип А), №681 (тип В) и Т-80 (тип Д). Все испытуемые антигены предварительно были раститрованы в глициновом буфере с бычьим сывороточным альбумином. Реакцию ставили в 96-луночных пластинках с U-образным дном. В лунки вносили по одной капле испытуемого антигена начиная с максимального разведения, затем добавляли по одной капле латексных конъюгатов гамма-глобулинов сывороток. Пластинки помещали в холодильник и через 45-50 мин проводили читку реакций. Реакцию считали положительной при выраженности агглютинации на 3-4 креста. В таблице I представлены результаты выявления антигенов пастерелла мультотцида на серотипы А, В и Д.

Как видно из данных таблицы I, антигены (цельномикробные) на штаммы №8683, 681 и Т-80 (серотипы А, В и Д соответственно) реагировали с гомологичными конъюгатами гамма-глобулинов в титрах 1:853,3; 1:853,3 и 1:1706,6 соответственно.

Таблица I

Результаты выявления антигенов пастерелла мультоцида серотипов А, В и Д в РЛА (n=3)

И с п ы т у е м ы е антигены	Латексные конъюгаты гамма-глобулинов кроличьих сывороток на серотипы		
	А	В	Д
Цельномикробный на штамм № 8683 + ПЭГ	I:853,3	I:26,6	I:106,6
Цельномикробный на штамм № 681 + ПЭГ	I:21,3	I:853,3	I:21,3
Цельномикробный на штамм Т-80 + ПЭГ	I:106,6	I:53,3	I:1706,6
Капсульный на штамм №8683	I:1706,6	I:13,3	I:53,3
Капсульный на штамм №681	I:3,33	I:1365,3	I:6,66
Капсульный на штамм Т-80	I:13,3	I:3,33	I:2048
Дефростированный №8683	I:853,3	I:53,3	I:213,3
Дефростированный №681	I:21,3	I:1024	I:106,6
Дефростированный Т-80	I:128	I:53,3	I:1706,6
Эпизоотический штамм №8	I:853,3	I:26,6	I:313,3
Эпизоотический штамм №18	I:213,3	I:26,6	I:213,3
Контрольный (отрицательный антиген)	-	-	-

Титры капсульных антигенов, полученных на серотипы А, В и Д с гомологичными конъюгатами были несколько выше; в то же время эти антигены давали перекрестные реакции в титрах ниже чем цельномикробные антигены. В эпизоотическом штамме №8 выявлены антигены на тип А в титре I:853,3; на тип В- I:26,6 и на тип Д- I: 213,3. В соответствии с выявлением антигенных связей в максималь-

ных титрах с антисывороткой на тип А этот штамм отнесен к типу А. Эпизоотический штамм №18 реагировал с конъюгатами на тип А в титре 1:213,3; на тип В- 1:13,1 и на тип Д- 1:213,3. Этот штамм по результатам серотипизации с антисыворотками на эталонные штаммы типов А, В и Д отнесен к смешанному серотипу А и Д. Контрольные антигены давали четкую отрицательную реакцию.

Для выявления антител на пастерелла мультацида серотипов А, В и Д на полиакролеиновые частицы латекса были сорбированы капсультные антигены разных серотипов. В таблице 2 приведены результаты опытов по выявлению антител на пастерелла мультацида.

Таблица 2
Результаты РЛА при выявлении антител на серотипы
А, В и Д пастерелла мультацида (n=3)

Испытуе- мые сыворотки на	Латексные конъюгаты капсультных антигенов на серотипы		
	А	В	Д
Цельномикробный антиген А	1:1706	1:80	1:186
Цельномикробный антиген В	1:66,6	1:1066	1:80
Цельномикробный антиген Д	1:266,6	1:93,3	1:2133,3
Капсульный антиген А	1:4266	1:16,6	1:66,6
Капсульный антиген В	1:16,6	1:2133	1:13,3
Капсульный антиген Д	1:53,3	1:13,3	1:5120
Нормальная кроличья сыворотка	-	-	-
Лошадиная сыворотка	-	-	-
Гипериммунная сыворотка против пастерелл серотипов А и Д	1:533,3	1:33,3	1:426,6
Сыворотка от неиммунизи- рованной коровы	1:33,3	1:13,3	1:6,6

Как видно из таблицы 2, сыворотки полученные на цельно-микробные антигены штаммов №8683, 681 и Т-80 (серотипы А, В и

Д соответственно) положительно реагировали с гомологичными латексными конъюгатами капсульных антигенов в титрах 1:1706, 1:1066 и 1:2133,3 соответственно; в то же время отмечали перекрестные реакции в меньших разведениях (1:66,6-1:80) с гетерологичными конъюгатами. Сыворотки, полученные на капсульные антигены вышеперечисленных штаммов пастерелл с гомологичными латексными конъюгатами реагировали в титрах 1:4266, 1:2133 и 1:5120. Отмечены также перекрестные реакции между гетерологичными системами в незначительных титрах. В сыворотке, полученной от коровы, гипериммунизированной антигенами на серотипы А и Д, с помощью РЛА выявлены антитела на серотип А, В и Д в титрах 1:533,3; 1:13,3 и 1:426,6 соответственно. Все контроли были отрицательными.

Специфичность реакции латексагглютинации при выявлении антител и антигенов пастерелла мультацида серотипов А, В и Д.

При проверке специфичности РЛА изучали возможность выявления перекрестных связей со стандартными сыворотками и антигенами различных возбудителей заболеваний сельскохозяйственных животных. В ходе проведения этих опытов были испытаны следующие биопрепараты: единый бруцеллезный антиген для РСК и РА, антиген респираторного микоплазмоза птиц для РА, антиген сибиреязвенный стандартный, сальмонеллезные антигены, а также культуры стрептококков, стафилококков, сальмонелл и *E. coli*. Для выявления антител при проверке специфичности РЛА были испытаны: сыворотка бруцеллезная для РСК и РА, поливалентная агглютинирующая сальмонеллезная сыворотка, типовая 0-агглютинирующая сальмонеллезная сыворотка, специфическая сыворотка к вирусу гриппа, лечебная сыворотка против энтерококковой инфекции и сборная сыворотка крови крупного рогатого скота биофабричного производства.

В таблице 3 приведены суммированные результаты проверки специфичности предлагаемой реакции.

Из данных таблицы 3 следует, что при использовании конъюгированного противопастереллезных глобулинов не выявлено каких-либо перекрестных реакции с антигенами возбудителей других бактериальных инфекций, которые входили в состав диагностикумов выпускаемых биопромышленностью. Также не отмечено антигенного родства с *E. coli*.

При использовании конъюгатов антигенов пастерелла мультацида для выявления антител в лечебной сыворотке против энтерококковой инфекции и сборной нативной сыворотке, получаемой на мясо-

Таблица 3

Результаты проверки специфичности РЛА (п=3)

Испытуемые биопрепараты	Латексные конъюгаты для выявления					
	антигенов			антител		
	А	В	Д	А	В	Д
Единый бруцелл. антиген	-	-	-			
Антиген респир. микоплазмоза	-	-	-			
Антиген сибиреязвенный	-	-	-			
Антиген сальмонеллезный	-	-	-			
Культура стрептококка	-	-	-			
Культура E. coli	-	-	-			
Культура стафилококка	-	-	-			
Антиген капсульный на тип А I:2048	I:8	I:32				
Сыворотка бруцеллезная позитивная				-	-	-
Поливалентная сальмонеллезная сыворотка				-	-	-
Типовая колисыворотка				-	-	-
Монорецепторные сальмонеллезные сыворотки				-	-	-
Специфические сыворотки к вирусу гриппа птиц				-	-	-
Сыворотка против энтерококковой инфекции				I:20	-	I:20
Сыворотка сборная крупного рог. скота нативная				I:10	I:10	-
Сыворотка на капсульный антиген типа А				I:1280	I:8	I:32

комбинатах (Московский и Киевский) удавалось выявлять противопастереллезные антитела в низких титрах (I:10-I:20). Вероятно, это связано с использованием в качестве доноров отдельных животных, ранее привитых или переболевших пастереллезом.

В целом результаты проведенных опытов и комиссионной их проверки позволяли сделать заключение о специфичности РЛА и пригодности ее для выявления серотиповых антигенов и антител при пастереллезе.

Выделение культур пастерелл из патматериалов и изучение их свойств, серотипизация. В ходе работы для выделения пастерелл

проведено бактериологическое исследование 72 проб, из них 21 из органов павших животных (3 от свиней, 6 от кроликов и 12 от телят) и 51 из носовых смывов больных и клинически здоровых телят. Для выделения и идентификации пастерелл применяли бактериологический (микроскопия мазков из патматериала, выделение чистой культуры, изучение культурально-морфологических и биохимических свойств изолятов и биопроба) и серологический методы (проба роста, РДП и РЛА). Всего выделено 55 штаммов пастерелл. На основании культуральных, тинкториальных и биохимических свойств выделенные культуры были дифференцированы как пастерелла мультацида и при постановке биопробы были патогенными для белых мышей. При установлении серотипов изолированных штаммов были использованы РДП, проба роста (ПР), РЛА и несерологические методы (триафлавиновые, акрифлавиновые и стафилококковые тесты). В таблице 4 приведены сравнительные результаты типирования эпизоотических штаммов пастерелл с помощью разных методов.

Таблица 4
Результаты типирования эпизоотических штаммов пастерелл

Патматериал из которого выделены штаммы	Количество штаммов	Методы типирования								
		РДП			РЛА			Акрифл. тест на тип Д	Три- лафл. дооки тест на Д	Стафи- кокк. тест на А
		А	В	Д	А	В	Д			
Легкие	12	3	-	4	4	1	6	3	4	2
Селезенка	6	1	-	1	2	-	3	1	1	1
Носовые смывы	38	8	-	17	11	-	22	14	16	4
	55	12	-	22	17	1	31	18	21	7

Как видно из таблицы 4, из 55 эпизоотических штаммов к серотипу Д отнесены с помощью акрифлавиновой пробы-18, триафлавиновый-21, РДП-22 и РЛА-31; к серотипу А с помощью стафилококкового теста (проба на гиалуронидазы)-7, РДП-12 и РЛА 17 штаммов пастерелла мультацида; для типирования штаммов типа В несерологичес-

кие тесты не рекомендованы. К этому типу в РЛА отнесен только один штамм из 55 выделенных. По данным РДП из-за низкой чувствительности реакции и слабой активности антигена данный штамм типировать не представлялось возможным. Не удалось серотипировать 6 штаммов из-за значительных межтипových перекрестных реакций.

Использование пробы роста для типирования пастерелл. Параллельно с разработкой РЛА нами была изучена возможность использования пробы роста для типирования эпизоотических штаммов пастерелла мультацида и апробирована эта реакция при пастереллезе.

В эксперименте были использованы эталонные штаммы пастерелла мультацида серотипов А, В и Д (штаммы №8683, 681 и Т-80 соответственно) и эпизоотические штаммы пастерелл, выделенные из органов павших и из носовых смывов больных и клинически здоровых телят. В качестве специфической сыворотки были использованы гипериммунные кроличьи сыворотки, полученные на вышеперечисленные штаммы. Сыворотку перед использованием прогревали при температуре 56°C в течение 30 мин или стерилизовали с помощью фильтров "Millex-GU" (0,22 мкм). Реакцию ставили пробирочным методом. Сыворотки раститровывали в стерильном бульоне таким образом, чтобы в первой пробирке в объеме 2 мл была разведка 1:2, во второй—1:4 и т.д. до 1:128 (семь разведений), после чего пробирки выдерживали в термостате при 37°C в течение 24 часов. После проверки на стерильность в каждую пробирку добавляли 0,025 мл асцитной бульонной культуры штаммов пастерелл с концентрацией 1 млрд. микробных тел/мл (по оптическому стандарту мутности) и выращивали в термостате при 37°C 24 часа. При взаимодействии гомологичных систем (тип пастерелл и соответствующий тип антител в разведениях сывороток) отмечали полную задержку роста, которая характеризовалась прозрачностью МПБ и хорошо выраженным агглютинатом на дне пробирки (положительный результат с соответствующими разведениями сывороток) в виде перевернутого зонтика. При наличии осадка и незначительного помутнения среды—реакцию считали сомнительной, а при наличии роста подобного контроля—реакцию оценивали как отрицательную. Контролем служили нормальные (интактные) кроличьи сыворотки раститрованные в МПБ. Различия в титрах гипериммунных сывороток с испытуемыми культурами пастерелл позволяли судить о типовой принадлежности штаммов (изолятов).

Таким образом в результате проведенных исследований был разработан метод постановки РЛА, пригодный для выявления антигенов и

антител при пастереллезе и для типизации штаммов возбудителя этого заболевания. Результаты лабораторных разработок подтверждены комиссионными испытаниями и 2 удостоверениями на разпределение.

В ы в о д ы

1. Получены активные концентрированные антигены и антисыворотки для РДП и РЛА при пастереллезе. Модифицированная схема иммунизации обеспечила получение антисывороток на цельноклеточные антигены с активностью в РДП 1:8-1:16 и на капсульные антигены-1:32-1:64. Диагностикумы сохраняли активность до 10-12 месяцев при хранении их в температурном режиме -10- -18°C.

2. Для приготовления латексных конъюгатов антигенов пригодны капсульные антигены серотипов А, В и Д пастерелла мультацида, а для получения латексных конъюгатов антител- гамма-глобулиновые фракции гипериммунных кроличьих антисывороток.

3. Разработана методика постановки РЛА для выявления антигенов и антител, и типизации пастерелла мультацида серотипов А, В и Д. Титры антигенов в культуральных антигенах-до 1:1024-1:2048; антител в гипериммунных сыворотках кроликов- до 1:2560-1:5120; показатели активных компонентов в гомологичных системах в 2-8 раз превышали таковые при использовании гетерологичных антигенов или антител.

Определены оптимальные параметры постановки РЛА:

- концентрация белков для конъюгирования антител-100 мкг/мл, антигенов-200 мкг/мл, концентрация латексных частиц в суспензии-2%, оптимальная температура инкубации- +4°C с учетом результатов реакции через 45-50 мин.

4. Из патматериалов павших и больных пастереллезом телят, свиней и кроликов выделено 55 штаммов пастерелл, из которых 31 отнесены к серотипу Д, 17-к серотипу А, 1-к серотипу В и 6-нетипированы.

5. Реакция латексагглютинации была специфичной и наиболее чувствительной в опытах сравнительной типизации штаммов пастерелла мультацида в РДП, пробе роста, акрифлавиновом, трипафлавиновом и стафилококковом тестах.

Сведения о практическом использовании полученных автором научных выводов: 1. Данные диссертации включены в лекции и практи-

ИИД. 13503

ческие занятия со студентами 3 курса ветеринарных факультетов МВА и Западно-Казахстанского СХИ, а также в программу факультета повышения квалификации преподавателей-микробиологов сельскохозяйственных вузов страны.

2. Методические указания по постановке РЛА для выявления антител и антигенов пастерелла мультацида серотипов А, В и Д рассмотрены и одобрены научно-методическим и Ученым советом МВА и представлены для утверждения на секции "Эпизоотология и профилактика инфекционных болезней животных" отделения ветеринарки ВАСХНИИ.

3. Методика постановки пробы роста для серотипизации пастерелл используется на кафедрах вирусологии, микробиологии, биотехнологии и эпизоотологии МВА.

Рекомендации по использованию научных выводов.

1. Результаты исследования по получению специфических сывороток и антигенов, и соответствующих конъюгатов на типы А, В и Д пастерелла мультацида рекомендуется использовать как нормативные характеристики для изготовления и контроля стандартных диагностических кумов с целью выявления антигенов и антител, а также для типирования штаммов возбудителя пастереллеза в РЛА.

2. Реакция латексагглютинации (РЛА) и проба роста (ПР) рекомендуется для использования в работе научно-исследовательских и диагностических ветеринарных лабораторий.

Список опубликованных работ по теме диссертации.

1. Таубаев У.В. Динамика индукции антител на пастерелла мультацида серотипов А, В и Д при введении его кроликам // Материалы межвузовской конференции молодых ученых и специалистов / Актуальные проблемы сельскохозяйственного производства., Уральск.Зап. Каз СХИ., -1991. -С.67.

2. Таубаев У.В., Трифонов В.Д. Реакция латексагглютинации (РЛА) при пастереллезе // Там же. -С.68-69.

Подписано в печать 9.12.91. Заказ 640
Формат 60x90/16 Тираж 120

Москва. Типография ВАСХНИИ

