

ФГБОУ ВО «Курская ГСХА» и старший научный сотрудник ФГБНУ «Курский НИИ агропромышленного производства»; Россия, 305014; тел.: 8-910-318-99-10.

Ларин Сергей Николаевич, руководитель ОБУ «СББЖ Львовского района и г. Льгова» Курской области.

Михайлова Олеся Николаевна, канд. вет. наук, ст. преп. кафедры биологии, морфологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Донского государственного аграрного университета»; пос. Персиановский, Октябрьский район, Ростовская область, Россия, 346493; тел.: 8-961-268-99-95; e-mail: olnimix0103@mail.ru

Author affiliation:

Evglevsky Aleksei Alekseevich, D.Sc in Veterinary Medicine, Professor, Head of laboratory «Veterinary medicine» of the Federal State budget research institution «Kursk Scientific Research Institute of agroindustrial production», Cheryomushki settlement, Kursk district, Kursk region, Russia, 305526; phone: 8-919-210-71-60; e-mail: evgl46@yandex.ru

Mikhailova Irina Ivanovna, Ph.D. in Veterinary Medicine, Associate Professor of obstetrics, surgery and physiology Department of Don State Agrarian University; Persianovsky settlement, Oktyabrskiy district, Rostov Region, Russia, 346493; phone: 8-928-167-38-86; e-mail: olnimix@mail.ru

Turnaev Sergey Nikolaevich, Head of the veterinary Department of the Kursk region; phone: 8-906-693-16-36.

Tarasov Vyacheslav Yurievich, Ph.D. in Veterinary Medicine, Deputy Head of the veterinary Department of the Kursk region; phone: 8-915-514-84-21.

Evglevskaya Elena Pavlovna, Ph.D. in Agriculture, Associate Professor of the LFI and biotechnology Department of the Federal State budgetary educational institution «Kursk state agricultural Academy», and a Senior Researcher of the Federal State Budgetary Scientific Institution «Kursk research Institute of agroindustrial production»; Russia, 305014; phone: 8-910-318-99-10

Larin Sergey Nikolaevich, Head of OBU «SBBJ Lgovskiy district and the city of Lgov» Kursk region.

Mikhailova Olesya Nikolaevna, Ph.D. in Veterinary Medicine, Senior Lecturer. the Department of biology, morphology and virology of Don State Agrarian University; Persianovsky settlement, Oktyabrskiy district, Rostov Region, Russia, 346493; phone: 8-961-268-99-95; e-mail: olnimix0103@mail.ru

УДК 619:616.98:579.834.115 Л

Бинатова В.В., Каршин С.П., Вережкина М.Н.

СУСПЕНЗИОННЫЙ АНТИГЕННЫЙ ЛЕПТОСПИРОЗНЫЙ ДИАГНОСТИКУМ

Ключевые слова: лептоспироз, антиген, антитело, агглютинация, РМА, РИД, РСА, латекс, полиакролеин, матрица, диагностикум, чувствительность

Резюме: Целью исследования явилось конструирование антигенного латексного диагностикума для индикации лептоспирозных антител. Авторами получен высокоактивный антиген; отработан режим иммобилизации антигена на латексе; оптимизированы условия проведения реакции суспензионной агглютинации (РСА); проведены лабораторные испытания препарата. Для получения антигенных комплексов использованы штаммы лептоспир шести серогрупп. Выделение антигенов проводили по схеме, включающей Х-пресс и ультразвуковую дезинтеграцию с последующей экстракцией неионным детергентом. В результате получены антигены с высокой концентрацией белка – 12-15 мг/мл. Специфическая активность в реакции иммунодиффузии (РИД) для различных серогрупп лептоспир колебалась от 1:32 до 1:64. Изучены структурные характеристики полиакролеиновой матрицы: удельная поверхность матрицы равна 35 м²/г, объем

пор – 1,1 см³/г, радиус пор – 62,8 нм. Проведена иммобилизация латексных частиц полигрупповым антигеном и подобраны оптимальные условия сенсибилизации. Влияние концентрации лиганда и pH реакционной смеси изучали в РСА. В качестве источника антител применяли смесь коммерческих агглютинирующих сывороток кролика против лептоспир 6 серогрупп. Усовершенствованы условия постановки РСА путем использования разделяющей жидкости, обеспечивающей максимальную чувствительность и демонстративность реакции. Оптимальное значение pH реакционной смеси составило 7,0-7,5. Сенсибилизирующая доза антигена – 180 мкг/мл. Результаты исследования показали, что по чувствительности родоспецифический суспензионный лептоспирозный диагностикум превосходит чувствительность стандартного метода – реакции микроагглютинации (РМА) в среднем в 1,7 раза, при использовании препарата не требуется использование живых культур лептоспир. Это свидетельствует о возможности применения диагностикума в широкой медицинской и ветеринарной практике в качестве скрининг-теста на лептоспироз.

Введение

Лептоспирозные заболевания человека и животных регистрируются во многих странах мира. Это обусловлено широкой распространенностью лептоспир на всех континентах, длительной выживаемостью их в объектах внешней среды и способностью поражать различные виды домашних и диких животных, которые затем служат источниками инфицирования людей [1, 2]. Из широкого круга зооантропонозов комитетом экспертов ВОЗ лептоспирозы выделены как нозологические формы, наиболее значимые в социально-экономическом отношении [3].

В Российской Федерации лептоспироз является одной из наиболее распространенных инфекций. Ежегодно в России регистрируется в среднем от 1,5 до 2,5 тысяч заболеваний людей лептоспирозами [4]. Лептоспирозы постоянно угрожают здоровью и жизни человека и наносят значительный материальный ущерб сельскому хозяйству. Наличие на территории страны значительного числа природных очагов и формирование стойких антропоургических очагов создает постоянную угрозу возникновения заболеваний людей и сельскохозяйственных животных [5, 6, 7, 8].

Лептоспирозная инфекция занимает одно из лидирующих мест среди зоонозов по тяжести клинического течения, частоте летальных исходов и отдаленных клинических последствий.

Клиническая дифференциальная диагностика лептоспирозов затруднена из-за полиморфизма клинической картины, вследствие чего решающими для подтверждения лептоспирозной этиологии заболевания являются результаты лабораторного исследования [9]. В связи с этим своевременная, достоверная, доступная для практических лабораторий диагностика лептоспироза является весьма актуальной.

В диагностике лептоспироза ведущее

место принадлежит серологическим методам. В настоящее время общепринятым стандартным тестом диагностики лептоспироза является иммунологическая реакция микроагглютинации с использованием в качестве антигенов живых культур лептоспир [10]. Ее постановка сопряжена с рядом трудностей. Необходимо постоянно поддерживать большое количество штаммов патогенных лептоспир, относящихся к медленно растущим и трудно культивируемым микроорганизмам. Культивирование производится на питательных средах сложного состава, преимущественно сывороточных, получаемых на основе крови животных-доноров. Учет результатов реакции осуществляется путем микроскопии в темном поле. Эти факторы ограничивают возможность внедрения РМА в широкую практику.

С целью серологического скрининга и ранней диагностики лептоспирозов используется также иммуноферментный анализ (ИФА) [9].

Генетические методы могут осуществляться только в специализированных лабораториях, отличаются значительной дороговизной и сложностью исполнения и поэтому широкого практического распространения не получили.

Это вызывает потребность в разработке более простых и безопасных методов диагностики, обладающих высокой специфической активностью, экспрессностью и информативностью [10, 11].

Материалы и методы исследований

Для получения антигенных комплексов лептоспир использованы штаммы 6 серогрупп: *Leptospira Pomona*, *L. Tarassovi*, *L. Grippotyphosa*, *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Canicola*, *L. Hebdomadis*, имеющих наибольшее эпидемиологическое и эпизоотологическое значение на юге России и входящих в типовой диагностический набор

штаммов для РМА.

Водорастворимые антигены лептоспир получали путем комбинированной дезинтеграции биомассы лептоспир с последующей экстракцией [11].

Количественное определение белка проводили по методу O.Warbyrg, W.Christian [12].

Качество полученных водорастворимых антигенов оценивали в реакции иммунодиффузии в агаровом геле по O. Ouchterlony [13].

Постановку и учет реакции микроагглютинации производили в соответствии с общепринятой методикой [9].

В качестве матрицы при получении диагностикума использовали полиакролеиновый латекс.

Удельную поверхность латекса оценивали по методу А.А. Клячко-Гурвича [14]; объем и радиус пор – по методу Н.В. Кельцева [15].

Постановку реакции суспензионной агглютинации и учет результатов проводили по общепринятой методике в модификации А.А. Зайцева и В.В. Бинатовой [16].

Результаты и обсуждение

Среди способов диагностики инфекционных заболеваний особое место занимают иммуносорбционные, в основе которых лежит принцип аффинности, базирующийся на специфическом связывании антигенов с комплементарными антителами. В качестве матрицы для сорбции биологических лигандов могут быть использованы латексы различной химической природы.

Альтернативой РМА при индикации лептоспирозных антител в сыворотках крови людей и животных может служить реакция суспензионной агглютинации с использованием препаратов на основе латекса с иммобилизованными на них антигенами [17, 18].

В РСА используется следующий принцип: антиген, сорбированный на частицах латекса взаимодействует со специфическими антителами, что приводит к агглютинации, которая становится видимой, благодаря присутствию латексных частиц [19].

К латексам, используемым в приготовлении диагностических препаратов, предъявляют высокие требования. У них должно отсутствовать неспецифическое связывание с клетками, они должны иметь удобные функциональные группы для фиксации лигандов, быть монодисперсными и стабильными в физиологических растворах. Этим требованиям вполне соответ-

ствует полиакролеиновый латекс, содержащий на своей поверхности альдегидные группы, способные вступать в реакцию с первичными аминогруппами, образуя основание Шиффа [20]. Для такой матрицы отсутствует необходимости добавлять детергенты, однородность суспензии обеспечивается ее природой. Кроме того, полиакролеиновые системы характеризуются низким уровнем неспецифических взаимодействий с клеточными мембранами.

С целью конструирования диагностикума необходимо: получить высокоактивный антиген; отработать режим иммобилизации антигена на латексе; изучить диагностическую ценность сконструированного препарата путем сравнения результатов испытаний с данными, полученными в РМА.

В качестве антигена для детекции антител в иммунологических реакциях антиген-антитело часто используются суспензии убитых микробных клеток. Но для ряда микроорганизмов приготовить такие диагностикумы не представляется возможным. В частности, инактивированные клетки лептоспир быстро подвергаются лизису и становятся непригодными к использованию в практических лабораториях. В связи с этим, возникает необходимость выделения из биомассы лептоспир антигенных комплексов, эффективных при сенсibilизации полимерной матрицы.

Извлечение антигенов из микробных клеток может быть осуществлено с помощью ряда физических и химических методов, таких как температурное воздействие, ультразвук, γ -облучение, баллистическая дезинтеграция, Х-пресс дезинтеграция; экстракция фенолом, этанолом, ацетоном, трихлоруксусной кислотой, формамидом, петролейным эфиром, солевыми растворами; кислотный и щелочной гидролиз и т.д..

Мы сочли целесообразным использовать режим разрушения микробных клеток с помощью Х-пресса и ультразвуковой дезинтеграции в сочетании с экстракцией детергентом. Выход водорастворимых белковых компонентов составил 12-15 мг/мл.

Проведено изучение иммунохимических характеристик в реакции иммунодиффузии. Для постановки РИД использовали иммуноглобулины класса G, выделенные из кроличьей полигрупповой лептоспирозной сыворотки, и моноантигенные комплексы в убывающих концентрациях (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64). Положительным считалось последнее разведение

в лунке, которое давало наиболее четкую линию преципитации. Антигены из различных серогрупп лептоспир проявляли специфическую активность в титрах 1:32-1:64 (табл. 1).

Для получения полигруппового антигена использовали смесь из аликвот моноспецифических антигенов из лептоспир серогрупп *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *Canicola*, *Hebdomadis*, *Tarassovi* с

Таблица 1. Специфическая активность лептоспирозных антигенов в РИД

№ п/п	Серогруппа лептоспир	Разведение антигена		
		Повторности опыта		
		1	2	3
1	<i>L. Pomona</i>	1:64	1:64	1:64
2	<i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	1:64	1:32	1:64
3	<i>L. Grippotyphosa</i>	1:32	1:64	1:64
4	<i>L. Canicola</i>	1:64	1:64	1:64
5	<i>L. Hebdomadis</i>	1:32	1:32	1:32
6	<i>L. Tarassovi</i>	1:64	1:64	1:64

концентрациями белка $C_6 = 1$ мг/мл.

Таким образом, нами получен родоспецифический антиген с $C_6=1$ мг/мл, который был применен для иммобилизации матрицы в качестве лиганда.

Для конструирования суспензионного антигенного диагностикума нами был использован полиакролеиновый латекс со следующими структурными характеристиками: удельная поверхность 1 г латексной матрицы – 35 м²/г; суммарный объем пор – 1,1 см³/г, суммарный радиус пор – 62,8 нм. Матрица окрашена в розовый цвет.

С целью получения диагностического препарата для обнаружения лептоспирозных антител отработан режим иммобилизации полиакролеиновой матрицы родоспецифическим антигеном лептоспир.

Для получения диагностикума соединяли аликвоты 2% полимерной матрицы и 0,1 М фосфатно-солевого буферного раствора рН 7,3-7,4 и добавляли 100-200 мкг белка лептоспирозного антигена, содержащегося в 0,9% раствора хлорида натрия рН 7,2-7,4. Смесь инкубировали при температуре 4-6°С в термостате и постоянном перемешивании без вспенивания на мешалке в течение 16-18 ч.

Суспензию осаждали центрифугированием и дважды отмывали в белковом стабилизаторе от избытка реагентов путем центрифугирования. Отмытый осадок суспензии диагностикума взвешивали в 1 мл защитной среды.

Для оптимизации условий иммобилизации антигена были исследованы такие параметры как концентрация белка лептоспирозного антигена и влияние рН среды на иммобилизацию. Изучена кинетика

процесса иммобилизации, произведена количественная оценка встраивания антигенов в матрицу.

Чувствительность диагностикумов определяли в РСА. В качестве антител использовали смесь коммерческих агглютинирующих кроличьих сывороток к 6 серогруппам лептоспир, взятым в одинаковых количествах. Постановку РСА производили в микропланшетах.

Реакцию ставили, начиная с разведения 1:200 и готовили последовательно двухкратное ее разведение во всех лунках до 1:102400, кроме последних двух, которые служили контролем оседания модифицированной дисперсии в растворителе. В качестве растворителя использована разводящая жидкость, состоящая из 0,1 М фосфатно-солевого буфера, белкового стабилизатора из белка куриного яйца и неионного детергента твин-80. Данная рецептура растворителя обеспечивает максимальную чувствительность и демонстративность реакции.

Далее в каждую лунку вносили по одной капле суспензионного диагностикума с помощью пипетки Токачи или пастеровской пипеткой с тонко оттянутым концом.

Микропланшеты встряхивают до равномерного распределения суспензии в лунках и через 2 ч или 16-18 ч учитывают результата реакции. В случае положительной реакции суспензия диагностикума равномерно устилает дно лунки в виде «зонтика» (+). При отрицательном результате реакции и в контроле – суспензия диагностикума выпадает на дно лунки в виде чистой «пуговки» или узкого колечка с ровным краем (-).

При этом антиген, сорбированный на частицах латекса взаимодействует со специфическими антителами, что приводит к агглютинации, которая становится видимой. РСА намного демонстративнее других агглютинационных тестов за счет окрашивания носителя.

Результаты подбора оптимальной сенсибилизирующей дозы антигена представлены в таблице 2.

Анализ результатов реакции показал, что при сенсибилизирующей дозе антигена (концентрации белка в антигене) $S_b=110-120$ мкг/мл положительный ответ наблюдался в разведении 1:1600, при $S_b=130-160$ – в разведении 1:3200, при $S_b=170$ – в разведении 1:12800 – четкий положительный ответ и сомнительный в разведении 1:25600. Диагностикум с нагрузкой лиганда по белку $S_b=180-200$ мкг/мл стабильно выяв-

Таблица 2. Результаты подбора оптимальной сенсибилизирующей дозы антигена

№ п/п	Разведения полигрупповой лептоспирозной сыворотки	Концентрация белка антигена, мкг/мл											
		100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
1	1:200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2	1:400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3	1:800	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
4	1:1600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
5	1:3200	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
6	1:6400	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
7	1:12800	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
8	1:25600	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	
9	1:51200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	
10	1:102400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	контроль 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	контроль 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

ляет антитела в разведении 1:25600. Таким образом, определена оптимальная концентрация антигена – 180 мкг/мл.

При определении влияния pH раствора антигена на иммобилизацию доводили pH реакционной смеси от 5 до 9 с помощью 0,1 Н раствора едкого натра и 10% раствора соляной кислоты.

Установлено, что оптимальное значение pH реакционной смеси составило 7,0-7,5.

Таким образом, отработана оптимизированная схема получения антигенного лептоспирозного латексного диагностикума, включающая стадии иммобилизации, центрифугирования, отмывки, стабилизации в белковом стабилизаторе и стандартизации препарата.

Были проведены лабораторные испытания 3-х серий сконструированной полигрупповой тест-системы для индикации противолептоспирозных антител в РСА и сравнение их результатов со стандартным тестом – РМА.

Разведенную исследуемую сыворотку

и живую культуру из диагностического набора штаммов лептоспир смешивали в равных объемах (по одной капле в лунках полистироловых планшетов). Контролями служили 0,9% раствора хлорида натрия и живык культуры лептоспир с концентраций микробов в темном поле микроскопа при увеличении 400 не менее 80 м. кл. в поле зрения.

После инкубации производили окончательный учет реакции в препаратах «раздавленная капля». Капли наносили на стекло бактериологической петлей из большого разведения к меньшему. Вследствие добавления к разведенной сыворотке равного объема живой культуры лептоспир разведение сыворотки удваивалось.

Чувствительность данного метода характеризуется разведениями серогруппоспецифических сывороток, которые представлены в таблице 3.

Лептоспиры в контроле оставались подвижными, не лизировались и не агглютинировались, не имели зернистости. Агглютинация проявлялась в склеивании

Таблица 3. Чувствительность родоспецифических лептоспирозных антигенов в РМА

№ п/п	Наименование серогрупп	Титры специфических антител
1	<i>L. Pomona</i>	1:25600 ++++
2	<i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	1:12800 +++
3	<i>L. Grippotyphosa</i>	1:25600 +++
4	<i>L. Canicola</i>	1:12800 ++++
5	<i>L. Hebdomadis</i>	1:6400 +++
6	<i>L. Tarassovi</i>	1:25600 ++++

лептоспир и образовании «паучков», «бантиков», «кос». Учет реакции производили в крестах. Положительной считали реакцию, оцененную в +++, +++++. В положительных случаях наблюдали обездвиживание, лизис и агглютинацию лептоспир. Ти-

тром сыворотки считали наибольшее ее разведение.

Данные по сравнению чувствительности диагностикумов в РМА и РСА с применением живых антигенов представлены в таблице 4.

Таблица 4. Чувствительность суспензионного лептоспирозного антигенного диагностикума в РСА по сравнению с РМА

Наименование серогруппы	Титры специфических антител в РМА			Титры специфических антител в РСА		
	Повторности опыта			№ серии диагностикума		
	1	2	3	1	2	3
<i>L. Pomona</i>	1:12800	1:25600	1:25600	1:51200	1:51200	1:25600
<i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	1:12800	1:6400	1:12800	1:12800	1:25600	1:25600
<i>L. Grippotyphosa</i>	1:25600	1:51200	1:25600	1:51200	1:25600	1:51200
<i>L. Canicola</i>	1:25600	1:12800	1:12800	1:25600	1:12800	1:25600
<i>L. Hebdomadis</i>	1:6400	1:6400	1:12800	1:25600	1:25600	1:12800
<i>L. Tarassovi</i>	1:25600	1:25600	1:25600	1:51200	1:51200	1:51200

Результаты исследования показали, что по чувствительности суспензионный лептоспирозный диагностикум на базе полиакролеинового латекса превосходит чувствительность метода с применением живых культур в среднем в 1,7 раза. Диагностикум выявляет антитела против шести серогрупп лептоспир, т.е. является родоспецифическим.

Заключение

1. Получены высокоактивные антигенные комплексы лептоспир.
2. Оптимизированы условия сенсibili-

зации матрицы лигандом, определена сенсibiliзирующая доза антигена и оптимальная рН реакционной смеси.

3. Усовершенствованы условия проведения реакции латексной агглютинации путем варьирования компонентного состава разводящей жидкости.

4. На основе латекса разработаны высокоактивные родоспецифические лептоспирозные антигенные диагностикумы. В результате лабораторных испытаний выявлена высокая чувствительность полученного диагностикума и безопасность работы в сравнении со стандартным тестом.

Библиографический список:

1. Ананьин В.В. Лептоспирозы людей и животных / В.В. Ананьин, И.Л. Коковин, Е.В. Карасева, Л.Н. Кац и др.// – М.: Медицина, 1971. – 352 с.

2. Бернасовская Е.П. Лептоспироз / Е.П. Бернасовская, Б.Л. Угрюмов, А.Д. Вовк // – К.: Здоровье, 1989. – 151 с.

3. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control / WHO, 2003.

4. Таран А.В. Совершенствование методов лабора-

торной диагностики лептоспироза и детекции его возбудителя: дис. ... канд. мед. наук (03.00.07 – микробиология) /А.В. Таран; рук. работы И.В. Жарникова. – Ставрополь: ФГУЗ СтавроНИПЧИ, 2008. – 150 с.

5. Каршин С.П. Эпизоотическая ситуация по лептоспирозу сельскохозяйственных животных в Ставропольском крае. Профилактика и методы борьбы / С.П. Каршин, В.В. Бинатова // Ветери-

- нарная служба Ставрополя. – 2008. – №4. – С. 22-26.
6. Каршин С.П. Эпизоотология лептоспироза в Ставропольском крае / С.П. Каршин, В.В. Бинатова, М.Н. Вереvкина // Ветеринария. – 2010. – №7 – С. 31-33.
 7. Каршин С.П. Ландшафтно-эпизоотологическое районирование Ставропольского края по лептоспирозу / С.П., Каршин, М.Н. Вереvкина // Ветеринарная патология. – 2013. – №2 (44) – С.92-96.
 8. Каршин С.П. Лептоспироз сельскохозяйственных животных в Ставропольском крае / С.П. Каршин, М.Н. Вереvкина // Вестник АПК Ставрополя. – 2015 – №8 – С. 84-86.
 9. Методические указания от 03.07.2002 N МУ 3.1.1128-02. – 3.1. Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний людей лептоспирозами – М., 2002. – 38 с.
 10. Малахов Ю.А. Лептоспироз животных / Ю.А. Малахов, А.Н. Панин, Г.Л. Соболева // – Ярославль: ДИА-пресс, 2001. – 584 с.
 11. Бинатова В.В. Совершенствование методов лабораторной диагностики лептоспироза: дисс. ... канд. биол. наук (03.00.07 – микробиология, 14.00.30 – эпидемиология / В.В. Бинатова; рук. работы И.С. Тюменцева, В.И. Ефременко. – Ставрополь: СтавНИПЧИ, 1999. – 175 с.
 12. Warburg O. Isolierung und Kristallisation des Garugsterments Enolase / O. Warburg, W Christian // Biochem. J. 1941. – Vol. 310. – P. 384-421.
 13. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gel / O. Ouchterlony // Acta path, microbiol. med. 1949. – Vol. 26. – P. 507-515.
 14. Клячко-Гурвич А.А. Методы определения удельной поверхности / А.А. Клячко-Гурвич // Изд-во АН СССР. – 1964. – № 10. – С. 1885.
 15. Кельцев Н.В. Основы адсорбционной техники / Н.В. Кельцев // – М: Химия, 1984. – 280 с.
 16. Пат. 2198407 Российской Федерации, МПК7 G 01 N 33/531, 33/569. Способ постановки реакции латексной агглютинации / Зайцев А.А., Бинатова В.В., заявитель и патентообладатель Ставроп. науч.-исслед. противоч. ин-т. – №2001104761/13. заявл. 20.02.01, опубл. 27.02.03, Бюл. №6. – 5 с.: ил.
 17. Филь А.А. Безопасная диагностика лептоспироза / А.А. Филь, В.В. Бинатова // VII международная экологическая студенческая конференция «Экология России и сопредельных территорий». Сборник научных трудов. – Новосибирск, НГУ. – 2002. – С. 204-207.
 18. Бинатова В.В. Конструирование диагностических препаратов для обнаружения лептоспирозных антител в реакции латексной агглютинации / В.В. Бинатова, А.А. Филь // 2-я Всероссийская научно-техническая конференция «Современные достижения биотехнологии». Сборник научных трудов. – Ставрополь, Сев-Кав ГТУ. – 2002. – С. 139-140.
 19. Лефковитс И. Иммунологические методы исследований / под ред. И. Лефковитса, Б. Перниса; пер. с англ. – М: Мир, 1988. – 530 с.
 20. Гармонов И.В. Синтетический каучук / И.В. Гармонов, Е.Г. Эренбург, И.Я. Поддубный и др.; под ред. И.В. Гармонова. – Л.: Госхимиздат, 1983. – 559 с.
- References:**
1. Ananyin V.V. Leptospirosis lyudei iivotnikh [The leptospirosis of humans and animals] / V.V. Ananyin, I.L. Kokovin, E.V. Karasyova, L.N. Kaz i dr. // – М.: Medizina, 1971. – 352 p.
 2. Bernasovskaya E.P. Leptospirosis [Leptospirosis] / E.P. Bernasovskaya, B.L. Ugryumov, A. D. Wowk. // – К.: Zdorovye, 1989. – 151 p.
 3. Vide supra.
 4. Taran A. V. Soverchenstvovanie metodov laboratornoi diagnostiki leptospiroza i detekcii ego vzbuditelya [Improvement of methods of laboratory diagnostics of leptospirosis and the detection of its pathogen]; diss. ... kand. med. nauk (03.00.07 – microbiologiya / A.V. Taran, ruk. raboty I.V. Garnikova. – Stavropol: FGUZ StavNIPCHI, 2008. – 150 p.
 5. Karshin S.P. Epizooticheskaya situaziya po leptospirozu selskokhosaistvennykhivotnikh v Stavropolskom krae. Profilaktika i metodyi borby [Epizootic situation on leptospirosis in farm animals in the Stavropol region. Prevention and methods of struggle] / S.P. Karshin, V.V. Binatova // Veterinarnaya slujba Stavropolja. – 2008. – №4. – pp. 22-26.
 6. Karshin S.P. Epizootologiya leptospiroza v Stavropolskom krae [Epizootiology of leptospirosis in the Stavropol region] / S.P. Karshin, V.V. Binatova, M.N. Verevkin // Veterinariya. – 2010. – №7 – pp. 31-33.
 7. Karshin S.P. Landshaftno-epizooticheskoye raionirovanie Stavropolskogo kraja po leptospirozu [Landscape epizootological regionalization of the Stavropol territory on leptospirosis] / S.P. Karshin, M.N. Verevkin // Veterinarnaya patologiya. – 2013. – №2 (44) – pp. 92-96.
 8. Karshin S.P. Leptospirosis selskokhosaistvennykhivotnikh v Stavropolskom krae [Leptospirosis of agricultural animals in the Stavropol region] / S.P. Karshin, M.N. Verevkin // Vestnik APK Stavropolja. – 2015 – №8 – pp. 84-86.
 9. Metodicheskie ukazaniya ot 03.07.2002 N MU 3.1.1128-02. – 3.1. Profilaktika infekcionnykhbolesnei. Epidemiologiya, diagnostika i profilaktika zabolevaniya lyudei leptospirosami [Prevention of infectious diseases. Epidemiology, diagnosis and prevention of human disease leptospirosis]. – М., – 2002. – 38 p.
 10. Malakhov Yu. A. Leptospirosisivotnikh [Leptospirosis of animals] / Yu. A. Malakhov, A.N. Panin, G.L. Sobeleva // – Yaroslavl: DIA-press, 2001. – 584 p.
 11. Binatova V.V. Soverchenstvovanie metodov laboratornoi diagnostiki leptospiroza [Improvement of methods of laboratory diagnostics of leptospirosis]; diss. ... kand. biol. nauk (03.00.07 – microbiologiya, 14.00.30 – epidemiologiya / V.V. Binatova, ruk. raboty. I.S. Tyumenzeva, V.I. Efremenko – Stavropol: StavNIPCHI, 1999. – 175 p.
 - 12.-13. Vide supra.
 14. Klyachko-Gurvich A.A. Metody opredelenia udelnoi poverkhnosti [Methods for determining specific surface area] / A.A. Klyachko-Gurvich // Izd-vo AN SSSR. – 1964. – № 10. – s. 1885.
 15. Kelzev N.V. Osnovy adsorbtionnoi tekhniki [The basics of adsorption technique] / N.V. Kelzev. – М.: Chimiya, 1984. – p. 280.
 16. Pat. 2198407 Rossiyskaya Federaziya, MPK7 G 01 N 33/531, 33/569. Sposob postanovki reakzii latexnoi agglutinazii [The way of the formulation of the latex agglutination reaction] / Zaicv A.A., Binatova V.V., zayavitel i patentoobladatel Stavrop. nauch-issled. protivoch. in-t. – №2001104761/13. zayavl. 20.02.01., opubl. 27.02.03. , Byul. №6. – 5 p.: il.
 17. Fil A. A. Besopasnaya diagnostika leptospiroza [Safe diagnosis of leptospirosis] / A.A. Fil, V.V. Binatova // Materialy VII megdunarodnoi ekologicheskoi studencheskoy konferencii «Ecologia Rossii i sopredelnykh territorii». – Novosibirsk, NGU. – 2002. – pp. 204-207.
 18. Binatova V.V. Konstruirovaniye diagnosticheskikh preparatov dlya obnaruzheniya leptospirosnykh antitel v reakzii larexnoi agglutinazii [The design of diagnostic preparations for the detection of

- leptospiral antibodies in the latex agglutination reaction] / V.V. Binatova, A.A. Fil // Material 2-i Wserossiiskoi nauchno-tehnicheskoi konferencii «Sovremennye dostigneniya biotekhnologii».
19. Lefkovits I. Immunologicheskie metody issledovani [Immunological methods of research] / pod. red. I. Lefkovitsa, B. Pernisa; per. s angl. – M.: Mir, 1988, 530 p.
20. Garmonov I.V. Sineticheski kauchuk [Synthetic caoutchouc] / I.V. Garmonov, E.G. Erenburg, I. Ya. Poddubnyi i dr.; pod. red. I.V. Garmonova. – L.: Goschimizdat, 1983. – 559 p.

Binatova V.V., Karshin S.P., Verevkina M.N.

SUSPENSION LEPTOSPIRA ANTIGENS DIAGNOSTICUM

Key Words: leptospirosis, antigen, antibody, agglutination, MA test, ID test, SA test, latex, polyacrolein, matrix, diagnostic sensitivity

Abstract: The aim of the study was to design an antigen latex diagnostic test to indicate Leptospira antibodies. The authors have obtained the highly active antigen; regime of immobilization of the antigen to the latex. Conditions of slurry agglutination reaction was optimized and laboratory tests of the drug was conducted. For antigenic complexes used six strains of Leptospira serogroups. Antigens were isolated by the scheme comprising X-press and an ultrasonic disintegration with followed by extraction with a non-ionic detergent. In the result was obtained by protein antigens with high concentration (12-15 mg / ml). The specific activity in the immunodiffusion reaction for different serogroups of Leptospira ranged from 1:32 to 1:64. The structural characteristics of polyacrolein matrix was shown. The specific surface area of the matrix was 35 m² / g, pore volume was 1.1 cm³ / g, pore radius was 62.8 nm. Immobilization latex particles by polyantigenic was performed. Optimal conditions for sensitization were chosen. Influence of ligand concentration and pH of the reaction mixture was studied in the test suspension agglutination. The source of the antibodies was a mixture of commercial agglutinating rabbit sera against Leptospira serogroups 6. Conditions for suspension agglutination test Improved using a dilution fluid, which provides maximum sensitivity reaction. Optimum reaction pH was 7.0-7.5. Sensitizing antigen dose was 180 mg / ml. The results showed that the sensitivity of the suspension Leptospira Diagnosticum above standard method in 1.7 times. When using the drug does not require the use of live cultures of Leptospira. This suggests the possibility of using diagnostic kit in human and veterinary medicine as a screening test for leptospirosis.

Сведения об авторе:

Бинатова Виктория Васильевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории инфекционных, незаразных и паразитарных болезней ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства»; д.15, пер. Зоотехнический, Ставрополь, Россия, 355017; тел.: +7(265)2 71-70-05; e-mail: v_binatova@mail.ru

Каршин Сергей Петрович, канд. сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории инфекционных, незаразных и паразитарных болезней ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства»; д.15, пер. Зоотехнический, Ставрополь, Россия, 355017; тел.: +7(265)271-70-05; e-mail: Serhs619no@mail.ru

Вереvkина Марина Николаевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры эпизоотологии и микробиологии ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет»; д.12, пер. Зоотехнический, Ставрополь, Россия, 355017; тел.: +7-919-741-40-67; e-mail: staffmwb@mail.ru

Author affiliation:

Binatova Viktoria Vasilievna, Ph.D. in Biology, Senior Researcher of the Laboratory of infectious, noninfectious and parasitic diseases of the Federal State Budgetary Scientific Institution «All-Russian research Institute of sheep breeding and goat breeding»; 15, Zootekhnicheskii str., Stavropol, Russia, 355017; phone: +7(265)2 71-70-05; e-mail: v_binatova@mail.ru

Karshin Sergei Petrovich, Ph.D. in Agriculture, Senior Researcher of the Laboratory of infectious, noninfectious and parasitic diseases of the Federal State Budgetary Scientific Institution «All-Russian research Institute of sheep breeding and goat breeding»; 15, Zootekhnicheskii str., Stavropol, Russia, 355017; phone: +7(265)2 71-70-05; e-mail: Serhs619no@mail.ru

Verevkina Marina Nikolaevna, Ph.D. in Biology, Associate Professor of Department of microbiology, epizootology of the Federal State budgetary educational institution «Stavropol State Agrarian University»; 12, Zootekhnicheskii str., Stavropol, Russia, 355017; phone: +7-919-741-40-67; e-mail: staffmwb@mail.ru