

АКАДЕМИЯ НАУК КАЗАХСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ЗООЛОГИИ

На правах рукописи

Для служебного пользования

Экз. № 61

Маканова Асия Галихановна

УДК 636.1.636.995.7.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИЧИНОК
РОДОВ *Rhinoestrus*, *Gastrophilus*
И ИММУНОДИАГНОСТИКА ЛАРВАЛЬНЫХ
ЭНТОМОЗОВ ЛОШАДЕЙ

03.00.19 — паразитология

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

Алма-Ата 1989

Работа выполнена на кафедре паразитологии Алма-Атинского
зооветеринарного института

Научный руководитель - доктор биологических наук,
профессор М.В.Хван

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Т.Н.Досжанов
кандидат ветеринарных наук
Ю.А.Попов

Ведущее учреждение - Всесоюзный научно-исследовательский
институт ветеринарной санитарии

Защита состоится "7" апреля 1989 года
на заседании специализированного совета К.С08.17.01 при
Институте зоологии АН КазССР по адресу: 480032, г.Алма-Ата,
Академгородок, Институт зоологии АН Казахской ССР.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
зоологии АН Казахской ССР.

Автореферат разослан "2" марта 1989 года.

Ученый секретарь
Специализированного совета,
кандидат биологических наук

Р.Т.Ахметбекова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Решениями исторического XXII съезда КПСС, XIX Всесоюзной партийной конференции, принятой на Майском (1982г.) Пленуме ЦК КПСС Продовольственной программе СССР указывается, что главной задачей в области сельского хозяйства является значительное увеличение продукции животноводства для более полного удовлетворения потребностей в продуктах питания. Успешное решение поставленной задачи зависит и от благополучия хозяйств по инвазионным болезням. Одними из них, наносящими значительный экономический ущерб коневодству Казахстана, являются ринэстроз и гастрофилез.

В связи с этим существует необходимость в эффективном диагностическом методе, позволяющем прижизненно диагностировать ринэстроз и гастрофилез лошадей, а также контролировать эффективность противооводовых лечебно-профилактических мероприятий и определять оптимальные сроки их проведения. Для этого необходимо разработать методы получения ринэстрозного и гастрофилезного антигенов для их последующего использования в иммунологических исследованиях и изучения диагностической ценности различных серологических тестов.

Цель и задачи исследований. Целью исследований является изучение биологических особенностей личинок родов *Iminoestrus*, *Gastrophilus* при культивировании их *in vitro*, разработка методов получения метаболитных гастрофилезного и ринэстрозного антигенов, изучение их сероиммунологической активности и на этой основе совершенствование иммунодиагностики оводовых болезней лошадей. Для достижения поставленной

цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить биологические особенности личинок оводов при культивировании их *in vitro*, разработать метод выделения метаболитных ринэстрозных и гастрофилезных биополимеров.
2. Изучить антигенную активность ринэстрозных и гастрофилезных метаболитных биополимеров в различных иммунологических тестах.
3. Изучить некоторые физико-химические свойства метаболитных биополимеров.
4. Изучить перекрестную антигенную активность метаболитных и соматических биополимеров личинок оводов родов Ринэструс и Гастрофилус.
5. Сравнить антигенную активность соматических и метаболитных биополимеров в иммунореакциях.
6. Определить пригодность реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) для выявления секретируемых антигенов личинок оводов в пробах из носовой слизи и фекалий от пораженных животных.

Научная новизна. Впервые разработан способ получения метаболитных антигенов личинок оводов родов Ринэструс и Гастрофилус, пригодных для иммунодиагностики ринэстроза и гастрофилеза лошадей. Определены биологические особенности личинок оводов и некоторые физико-химические свойства антигенов из них, специфичность и активность их в сероиммунологических реакциях. Доказано, что реакция непрямой гемагглютинации пригодна для прижизненной диагностики ововых инвазий лошадей, при использовании в качестве сенситина метаболитных антигенов.

Посредством РНГА впервые доказана возможность определения метаболитов в пробах носовой слизи от пораженных ринэстрозом лошадей и в фекалиях от пораженных гастрофилезом лошадей.

Разработаны методические рекомендации по применению реакции непрямой гемагглютинации для диагностики ринэстроза и гастрофилеза лошадей.

Новизна и значимость исследований подтверждены положительным решением государственной научно-технической экспертизы изобретений № 4370735/I4/I85654 на "способ получения антигена у личинок оводов".

Практическая ценность. Разработанные "Методические рекомендации по применению реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) для диагностики ринэстроза и гастрофилеза лошадей", одобрение научно-методическим советом Алма-Атинского зооветеринарного института, могут быть использованы как в научно-практических исследованиях, так и в учебном процессе при подготовке специалистов. Способ получения высокоактивных метаболитных ринэстрозного и гастрофилезного антигенов может широко использоваться в научных и в практических исследованиях. Способ признан изобретением и перспективен прежде всего в иммунодиагностике и профилактике инвазионных болезней.

Результаты диссертации получены в ходе исследований, проводимых кафедрой паразитологии с проблемной лабораторией паразитоценологии по созданию иммунобиологических препаратов (вакцин, диагностикумов) в соответствии с заданием № 296 ГКНТ при СМ СССР "Разработать и внедрить в животноводческих хозяйствах Казахской ССР комплексные меры борьбы с паразитоценозом сельскохозяйственных животных".

Апробация результатов исследований была осуществлена в виде докладов на научной конференции профессорско-преподавательского состава, молодых ученых и специалистов Алма-Атинского зооветеринарного института, 1988г.; на УП областной научно-

практической конференции "Интенсификация агропромышленного комплекса - научную основу" г.Оренбург, 1988год; на конференции молодых ученых и специалистов КазНИВИ г.Алма-Ата, 1988.

Объем работы. Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, заключения, выводов, практических предложений, списка литературы, приложения.

Список литературы включает 121 источник, из них 45 иностранных. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 15 рисунками.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы приводятся данные о биологии личинок оводов родов Ринэструс, Гастрофилус, их систематическом положении, распространении, диагностике заболевания.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал и методы исследований. Материал для исследований был собран на Алма-Атинском мясоконсервном комбинате и в животноводческих хозяйствах Джамбулской области. Методом неполного паразитологического вскрытия нами было исследовано 500 лошадей на наличие личинок оводов родов *Rhinoestrus*, *Gastrophilus*. Количество личинок в сборе составило 1200 экз-земпляров рода *Gastrophilus* и 3700 рода *Rhinoestrus*.

Ринэстрозные и гастрофилезные соматические антигены для иммунологических тестов готовили по методу, предложенному Н.Г.Калининой (1976) и по разработанному нами способу получения метаболитных антигенов от личинок оводов.

Суть последнего заключается в следующем. Личинки родов Ринэструс и Гастрофилус тщательно промытые проточной водой

помещали в питательные среды: № 199, Игла, гидролизат-лактальбумина, а также 0,85%-ный раствор хлористого натрия. Культивирование личинок проводили при 37°C в течение 5-7-ми суток. Для предотвращения загрязнения и размножения микроорганизмов в среды добавляли пенициллиновые и стрептомициновые соли в дозе 100 единиц на 1 мл среды.

В процессе культивирования определяли содержание белка в средах на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 280 нм и по методу O.Lowry (1951). Затем собранные среды центрифугировали, надосадочную жидкость помещали в целлофановые трубки и диализовали против физиологического раствора (0,85%-ный раствор NaCl) в течение 24 часов при температуре +4°C. При этом пятикратно сменяли диализирующий раствор. Диализат концентрировали в целлофановых трубках, помещая его в 30%-ный раствор ПЭГ-600 на пять часов.

Для длительного хранения метаболитные антигены лиофильно высушивали и содержали при -20°C. Хроматографическое разделение метаболитов оводовых личинок проводили методом гель-фильтрации (Г.Детерман, 1970).

Иммунологическую активность метаболитов оводовых личинок родов *Rhinoestrus*, *Gastrophilus* проверяли в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). РНГА ставили с эритроцитами барана, обработанными формалином, по методу R.Weinbach (1958). Для сенсibilизации эритроцитов антигенами использовали в качестве конъюгирующих агентов танин (S.Boyden, 1951), риванол и амидол (В.А.Шамардин, Б.В.Каральник, 1978), хлористый хром (J.Jandle, R.Simmons, 1957), глутаровый альдегид (J.Chen, Т.В.Томаш, 1972). Иммунизацию кроликов проводили по

методу Н.Рей с соавторами (1976). Содержание антител в антисыворотке определяли методом количественной преципитации по М.Heidelberger (1938). Одновременно иммунологически и паразитологически было обследовано 296 лошадей. От них были взяты пробы сывороток крови, фекалий, носовой слизи. Всего исследовано в РНГА 246 проб сыворотки крови, 178 проб носовой слизи, 91 проба фекалий. Метаболиты личинок, а также соматические антигены из возбудителей ринэстроза и гастрофилеза и антисыворотки к ним исследовали в реакции преципитации в агарозном геле (ПН-гель) по методу Н.Залыман и Б.Мосе (1972) и в реакции иммуноэлектрофореза по J.Schneidegger (1955). При анализе результатов использовались следующие показатели: среднее арифметическое значение титров агглютинирующих антител и среднее количество паразитов по группе животных. Полученные результаты эксперимента обработаны на ЭВМ "Наири-К" методом наименьших квадратов.

2.2. Культивирование личинок оводов в питательных средах.

Одной из основных задач нашего исследования являлось получение максимально большого количества метаболитных биополимеров личинок оводов для последующего изучения их свойств в сероиммунологических тестах. Поскольку методы наработки метаболитов не разработаны, нами для их получения были опробованы различные питательные среды. Оценка пригодности сред проводилась по длительности выживания в них личинок и интенсивности продуцирования метаболитов. Во всех использованных нами средах личинки достаточно долгое время сохранялись живыми и выделяли продукты своей жизнедеятельности. Так, наибольшая продукция метаболитов личинками ринэстрозов была в средах: № 199, Игла и гидролизат-лактальбумине, наименьшая - в 0,85%-ном растворе

хлористого натрия и дистиллированной воде. Иные результаты получены в опытах с личинками гастрофилюсов. Максимум метаболитов продуцировался в 0,85%-ном растворе NaCl, в средах Игла, гидролизат-лактальбумине и № 199. Минимум метаболитов регистрировали в дистиллированной воде. Эти различия в интенсивности секреции - экскреции на наш взгляд объясняются особенностями цикла развития личинок исследуемых оводов. Вероятно, личинки гастрофилюсов, контактирующие *in vivo* с содержимым желудочно-кишечного тракта, менее требовательны к составу среды обитания, нежели ринэструсы, паразитирующие на слизистой носовой полости. Дальнейшие исследования показали, что помимо, среды культивирования на выход метаболитов влияют температура и объем среды. Причем оптимальные параметры выхода метаболитов по этим показателям у личинок разных родов отличаются. Так, для ринэструсов температурный и объемный оптимумы составляют соответственно 37°C и 3,3мл среды на одну личинку. Эти же параметры для личинок гастрофилюсов соответственно равны 37°C и 10мл на одну личинку. Очевидно, что для личинок гастрофилюс наиболее важным показателем является температура культивирования, что объясняется локализацией их *in vivo* в желудочно-кишечном тракте при постоянной температуре. Личинки ринэструс менее критичны к изменениям температуры культивирования, что связано с локализацией их *in vivo* в носовой полости, где температура переменна. Длительность культивирования личинок оводов в инкубационных средах и сроки их выживаемости определялись нами по количеству выделяемых продуктов метаболизма. Мы проводили измерение культуральных сред на спектрофотометре СФ-26 при 280nm, с первого дня культивирования по последний. Прибор фиксировал экстинцию в исследуемых пробах только по

5-й день культивирования. Очевидно, чем длительнее инкубируется личинка оводов, тем меньше ее метаболическая активность. Постепенно содержание метаболитов в среде уменьшается к 5-7 дню культивирования. Следовательно питательные среды не способны полностью заменить живой организм, однако поддерживает жизнеспособность личинок в течение 5-7-ми суток. Общеизвестно, что на различных стадиях жизненного цикла интенсивность обменных процессов у насекомых неодинакова. С учетом этого нами прослежена продукция метаболитов у личинок оводов различных стадий развития. Метаболически наиболее активными оказались личинки первой стадии, затем по мере роста и развития количество выделяемых в среду культивирования метаболитов понижалось достигая минимума у личинок 3-й стадии.

2.3. Физико-химические свойства метаболитных биополимеров, выделяемых личинками оводов. Широко используемыми показателями, характеризующими иммунологическую активность биополимеров являются их хроматографические профили при гель-фильтрации. На колонке с сефадексом G-200 мы исследовали гель-фильтрацией метаболиты личинок рода Ринэструс трех стадий развития, а также биополимеры личинок рода Гастрофилус. Пользуясь графиком зависимости объема выхода белковых фракций от молекулярной массы белков в тонком слое сефадекса G-200 (Г.Детерман, 1970) и построенными нами графиками зависимости объема выхода фракций белков от оптической плотности, мы произвели расчеты молекулярной массы каждой фракции сошедшей с колонки. Хроматографический профиль метаболитов личинок I стадии развития рода Ринэструс был представлен 5 фракциями с молекулярными массами от 10 до 70 тысяч дальтон. Основная масса сошедших с колонки в процессе гель-фильтрации белков состоит

из низкомолекулярных соединений, молекулярные массы которых находятся в пределах 10-17 тысяч дальтон. Гель-фильтрацией метаболитов личинок II стадии развития, получены три фракции биополимеров, разделенные по молекулярным массам от 5-10 до 140-150 тысяч дальтон. По величине пиков метаболитов личинок II стадии развития можно предположить, что в основной массе исследуемых биополимеров незначительное преимущество по объему выхода белков занимают низкомолекулярные соединения. Почти равные объемы занимают белки с молекулярными массами в 140-150 тысяч и в 117-130 тысяч дальтон. Метаболиты личинок ринэструсов третьего возраста развития, подвергнутые гель-фильтрации образовали три фракции. Молекулярные массы по расчетам составили от 5-10 до 140-150 тысяч дальтон. Гель-фильтрацией биополимеры гастрофилюсов разделились на три фракции. Расчет молекулярных масс каждой из них показал следующие результаты: первая фракция - соединения с массой в 100000 дальтон, вторая - фракция - молекулярная масса 10 тысяч дальтон, третья фракция - около 5 тысяч дальтон. Первая фракция биополимеров несет в себе самую значительную объемную часть белков сошедших с колонки. Низкомолекулярные соединения в 5-10 тысяч дальтон составляют лишь пятую часть от количества внесенных в колонку метаболитов личинок желудочного овода.

Таким образом, метод гель-фильтрации позволил нам разделить изучаемые метаболитные биополимеры на отдельные фракции, несущие в себе белки с различными молекулярными массами, в неодинаковом количестве.

2.4. Сравнительная эффективность различных методов сенсibilизации эритроцитов. Приготовление эритроцитарных диагностикумов различными способами сенсibilизации эритроцитов, позволи-

ло нам выбрать наилучший из них и использовать в последующих иммунологических исследованиях. Нами были подготовлены четыре диагностикума с использованием в качестве конъюгирующих агентов риванола, глутарового альдегида, танина и хлористого хрома. В качестве сенситина выступали метаболитные биополимеры личинок оводов родов Ринэструс и Гастрофилюс. Проведенные нами опыты показали, что различные конъюгирующие агенты обеспечивают различную чувствительность эритроцитарных диагностикумов в РНГА с одними и теми же сыворотками крови лошадей пораженных ларвальными энтомозами. При этом имеют значение особенности различных белковых сенситинов, то есть биополимеров ововых личинок, возбудителей ринэстроза и гастрофилеза. Так, глутаровый альдегид наиболее эффективен для сенсibilизации эритроцитов метаболитами гастрофилюсов и не обеспечивает должного уровня сенсibilизации метаболитами личинок ринэструсов. В наших опытах конъюгирующие агенты риванол и хлористый хром обеспечивали высокую чувствительность эритроцитарных диагностикумов в РНГА, независимо от природы метаболитных белков в сенситине, как с ринэстрозным, так и гастрофилезными биополимерами. Чувствительность диагностикума, приготовленного с использованием танина в проведенных нами опытах была существенно ниже, чем в остальных случаях. В каждом из испытанных способов сенсibilизации чувствительность РНГА зависела от количества биополимеров в сенситине. Самая высокая чувствительность определения ринэстрозных антител достигается при применении 125 мкг/мл ринэстрозных метаболитов в сенситине с использованием в качестве конъюгирующего агента хлористого хрома. В таких же количествах расходуется белок гастрофилезных метаболитов. Риванольный способ увеличивает расход метаболитов в сенситине от 125 до

625 мкг/мл для биополимеров личинок носоглоточного овода и до 250 мкг/мл биополимеров личинок желудочного овода. Способ сенсибилизации с использованием танизированных эритроцитов связан с увеличением расхода гастротрофических белков в сенситине и снижением чувствительности реакции при обеих инвазиях лошадей.

2.5. Сравнительное изучение антигенной активности метаболитных и соматических биополимеров личинок оводов в РНГА.

Антигенная активность метаболитных белков определялась нами по чувствительности и специфичности серологической реакции, в которой мы использовали указанные биополимеры в качестве антигена - диагностикума.

Изучение антигенной активности метаболитов, проводилось нами, в сравнении с активностью соматических антигенов. В поставленных опытах использовались метаболитные и соматические белковые соединения от личинок родов Ринэструс и Гастрофилус. Сопоставление титра антител в сравниваемых сероиммунологических тестах свидетельствует в пользу эритроцитарных диагностикумов (Эд) с метаболитными антигенами. Они обеспечивали большую чувствительность реакции нежели Эд с соматическими сенситинами. При этом средний титр антител сывороток при использовании сенсибилизированных метаболитами Эд превышал их соматические аналоги в три с лишним раза. Предпочтительность использования метаболитных биополимеров подтверждается меньшим расходом их при сенсибилизации эритроцитов (табл. I).

Следовательно, результаты постановки РНГА метаболитных и соматических эритроцитарных диагностикумов с исследуемыми сыворотками крови свидетельствуют о том, что метаболитные антигены предпочтительнее их соматических аналогов.

Таблица I

Результаты РНГА с ринэстрозным и гастро-
филезным эритроцитарными диагностикумами
(ЭД) с использованием метаболитных и
соматических антигенов

Антигены, используемые при приготовлении ЭД	Количество белка антигена в сенси- тине (мг/мл)	Титр агглютинации в среднем по груп- пе исследованных лошадей
Метаболиты личинок рода Ринэструс	0,060-0,120	I:980
Соматические белки личи- нок рода Ринэструс	0,220-0,450	I:276
Метаболиты личинок рода Гастрофилус	0,125-0,250	I:1062
Соматические белки личи- нок рода Гастрофилус	0,350-0,700	I:370

2.6. Сравнительное изучение методов иммунизации кроликов метаболитными антигенами личинок оводов. Многие иммунологические тесты, в качестве необходимого компонента требуют использования антисывороток к паразитарным антигенам. Поэтому, нами были испытаны и сопоставлены различные методы иммунизации кроликов метаболитами личинок рода Ринэструс и Гастрофилус. Согласно первому методу иммунизации 508 мкг антигена в объеме 0,5 мл смешивали с равным объемом неполного адьюванта Фрейнда и инъецировали внутрикожно в область лопатки, в несколько точек. Иммунизацию проводили в I, 14, 28 и 42 дни. По второму методу кроликам вводили 1500 мкг метаболитного антигена от личинок родов Ринэструс, Гастрофилус, смешанного с полным адьювантом Фрейнда. Антиген в объеме 0,25 мл вводили в подушечки лапок. Повторную инъекцию проводили внутримышечно через три недели, полный адьювант Фрейнда заменяли на неполный.

Третий метод иммунизации заключался в добавлении третьей инъекции антигена без применения какого-либо адъюванта. Третья инъекция производилась через 40 дней после последнего крововзятия от кроликов, иммунизированных вторым способом. Инъекция производилась внутривенно. Количество инъецируемого антигена составляло 500 мкг в объеме 0,5 мл. Сравнительный анализ эффективности трех испытанных нами методов свидетельствует о заметном преимуществе второго метода иммунизации (титры антител для ринэстрозного антигена 500–1200 мкг/мл, для гастротрофилезного антигена 600–1900 мкг/мл. Третий метод приемлем не для всех серий антигенов. Он пригоден для гастротрофилезного метаболитного антигена (титр антител 2900–3100 мкг/мл). При иммунизации ринэстрозным метаболитным антигеном наступает гибель кроликов от анафилактического шока. При первом методе иммунный ответ очень низок (титры антител до 100 мкг/мл).

2.7. Перекрестная антигенная активность метаболитных биополимеров личинок оводов родов *Rhinoestrus*, *Gastrophilus*. Важным параметром, характеризующим эффективность иммунологических методов диагностики является их специфичность. Для чего мы исследовали на перекрестную антигенную активность метаболиты личинок возбудителей ринэстроза и гастротрофилеза. Метаболитные антигены и антисыворотки к ним мы анализировали в реакции иммуноэлектрофореза и в реакции диффузной преципитации в агарозном геле. По результатам реакций оказалось, что метаболитные антигены образуют линии преципитации с гомологичными, специфичными им антисыворотками. В реакциях РП-гель, иммуноэлектрофорезе не установлено общих антигенных компонентов в изученных нами секретах личинок указанных оводов. Это позволяет сделать вывод о строгой специфичности полученных

нами метаболитных антигенов. Следовательно, метаболитные антигены от возбудителей ринэстроза и гастрофилеза строго специфичны и могут без дальнейшей очистки использоваться при конструировании диагностических тест-систем.

2.8. Перекрестная антигенная активность соматических биополимеров из личинок оводов родов Ринэструс и Гастрофилус.

В ходе эксперимента нас заинтересовала возможность определения перекрестной антигенной активности соматических биополимеров личинок указанных родов оводов. Оказалось, что гастрофилезный соматический антиген образует с гомологичной ему антисывороткой около трех линий преципитации, отражающих наличие трех антигенных фракций. Ринэстрозный соматический антиген с неспецифической ему антисывороткой образует одну линию, сливающуюся с преципитатом гастрофилезного антигена, что свидетельствует о наличии антигенной общности. Ринэстрозный соматический антиген с гомологичной ему антисывороткой дает около трех линий преципитации. Гастрофилезный соматический антиген с гетерологичной ему сывороткой образует до двух линий преципитации. При этом на месте слияния преципитатов от двух различных антигенов образуются "шпоры", что является свидетельством частичного слияния полос преципитации и указывает на наличие антигенных фракций характерных только для ринэстрозного антигена. Следовательно, проведенный анализ результатов постановки РП-гель на перекрестную антигенную активность соматических биополимеров личинок оводов родов *Rhinoestrus*, *Gastrophilus* свидетельствует о наличии у них общих антигенных компонентов.

2.9. Способы хранения и стабилизации метаболитных антигенов.

В ходе исследований мы изучили влияние на активность метаболит-

тов таких широко распространенных методов, как лиофильное высушивание и криоконсервация.

Активность антигенов, лиофилизированных и хранящихся в рефрижираторе, мы проверяли в различные сроки после приготовления в РНГА. Активность ринэстрозного антигена сохраняется, и при замораживании, и при лиофилизации. Однако, при лиофилизации снижается активность гастрофилезного метаболитного антигена, тогда как замораживание не оказывает подобного действия. Поэтому замораживание более предпочтительный способ для сохранения активности метаболитных антигенов от личинок рода *Гастрофилус*.

Исходная активность метаболитных гастрофилезных и ринэстрозных антигенов при хранении в рефрижираторе при -20°C сохранялась более 1 года. Лиофилизированные же антигены не теряли своей активности в течение 1 года, а в последующем их титры снижались. Вышеприведенные результаты проверки активности метаболитных антигенов после их лиофилизации и замораживания, дают основание сделать заключение о том, что оба способа стабилизации приемлемы для данных антигенов.

2.10. Эффективность РНГА в диагностике ринэстроза и гастрофилеза. В силу высокой специфичности и чувствительности мы использовали РНГА в диагностике ринэстроза и гастрофилеза лошадей.

В качестве сенситинов использовали метаболитные антигены личинок родов *Ринэструс*, *Гастрофилус*. Концентрация антигенов, используемых для сенсибилизации колебалась в диапазоне значений от 180 до 370 мкг/мл по белку.

Анализ приведенных данных показал, что РНГА с приготовлен-

ными нами диагностикумами позволяет выявить всех пораженных ринэстрозом и гастрофилезом лошадей независимо от интенсивности инвазии. Сопоставление результатов РНГА с сыворотками крови от пораженных энтомозами и от здоровых лошадей позволило определить минимальный диагностический титр, который в наших исследованиях составил 1:80. Максимальный титр в РНГА достигал 1:2560. Однако, следует отметить, что высокая интенсивность инвазии не всегда сопровождается высоким титром антител в РНГА.

2.II. Выявление антигенов личинок оводов у пораженных ими животных в РНГА с использованием антительного эритроцитарного диагностикума. Выявление компонентов метаболитов, выделяемых живыми ововыми личинками родов Ринэструс и Гастрофилус с естественными выделениями пораженных энтомозами лошадей, имеет существенное значение для диагностики заболеваний ринэстрозом и гастрофилезом. В качестве исследуемых проб нами были взяты выделения носовой слизи от животных, пораженных личинками рода Ринэструс. С одновременным исследованием проб носовой слизи от пораженных ринэстрозом лошадей в РНГА, при этом мы проводили паразитологический осмотр. Контрольными являлись пробы слизи от здоровых, неинвазированных лошадей. При постановке РНГА использовали антительный эритроцитарный диагностикум (Эд). В качестве сенсирина использовали антисыворотку к метаболитному ринэстрозному антигену. Результаты РНГА с носовой слизью от пораженных ринэстрозом лошадей отражены на рис. I, в виде графика зависимости титра РНГА от интенсивности инвазии (ИИ). Полученная зависимость не имела строго линейный характер, тем не менее она вполне пригодна для количественного определения ИИ. В силу этого сфера приложения выявленной нами зависимости может иметь очень широкое применение для самых разнообраз-

разных научных и практических целей.

Следующей нашей задачей являлось определить наличие антигенных компонентов оводов рода Гастрофилус в фекалиях пораженных гастрофилезом лошадей. В связи с этим мы производили паразитологический осмотр с одновременным серологическим тестированием этих же лошадей на наличие или отсутствие гастрофилюсов после убоя на мясокомбинате. Пробы фекалий мы исследовали в РНГА. Для этого готовили антительный ЭД.

В качестве сенсирина использовали активную антисыворотку, полученную иммунизацией кроликов метаболитным гастрофилезным антигеном. Результаты постановки РНГА с пробами фекалий отражены на графике зависимости титров антигенов гастрофилюсов от ИИ.

Соединив все точки графика, мы получили кривую, которая идет по возрастающей линии, что говорит об увеличении титров антигенов гастрофилюсов в фекалиях с увеличением ИИ (рис. I).

Данные полученные при постановке РНГА и результаты произведенного нами паразитологического обследования мы анализировали на ЭВМ. При этом определили форму связи между показателями интенсивности инвазии (y) и титрами агглютинации (x), как линейную. Рассчитанное значение коэффициента корреляции свидетельствует о высокой, тесной связи между (y) и (x) ($r_1=0,835$, $r_2=0,91$). Полученные нами, экспериментально, зависимости (y) от (x) имеют следующий вид:

$$y_1 = 21,75 + 1,22x_1$$

$$y_2 = 38,85 + 38,64x_2$$

где y - интенсивность инвазии

x - титр агглютинации



Рис. I Зависимость титра метаболитного антигена от интенсивности инвазии

Примечание: 1 - личинки рода Ринэструс
2 - личинки рода Гастрофилюс

В Ы В О Д Ы

1. Методом культивирования личинок оводов родов Ринэструс и Гастрофилюс на питательных средах получены метаболитные, иммунологически активные антигены.

2. Наиболее подходящими средами культивирования, позволяющими получить удовлетворительный выход метаболитного антигена являются 0,85%-ный раствор хлористого натрия, Игла, № 199, гидролизат-лактальбумина.

3. Гель-фильтрацией метаболитных антигенов из личинок I стадии рода Ринэструс установлено наличие 5 фракций и по 3 фракции метаболитов личинок II и III стадий. Гастрофилезный метаболитный антиген представлен тремя фракциями. Основная масса метаболитного ринэстрозного антигена состоит из низкомолекулярных белков до 10 тысяч дальтон. Для метаболитного гастрофилезного антигена они представлены фракцией с молекулярной

массой около 100 тысяч дальтон.

4. Доказана возможность применения РНГА для выявления антител в сыворотке крови пораженных ларвальными энтомозами лошадей. Антигеном для сенсibilизации эритроцитов служат метаболитные антигены личинок оводов Ринэструс и Гастрофилус.

5. Определены наиболее эффективные конъюгирующие агенты (хлористый хром, риванол) для метаболитных сенситинов от личинок родов Ринэструс и Гастрофилус при приготовлении эритроцитарных диагностикумов.

6. Стработаны оптимальные количества метаболитных антигенов в сенситине, при приготовлении эритроцитарных диагностикумов (125-625 мкг/мл для метаболитов от личинок рода Ринэструс, 125-250 мкг/мл для метаболитов от личинок рода Гастрофилус).

7. Установлена, в сравнительном аспекте, более высокая сероиммунологическая активность в РНГА метаболитных антигенов от личинок возбудителей ринэстроза и гастрофилеоза, нежели соматических. Применение метаболитных антигенов в РНГА повышает чувствительность реакции в три с лишним раза.

8. Доказана возможность применения РНГА для выявления антигенных компонентов личинок рода Ринэструс в пробах носовой слизи лошадей, пораженных личинками носоглоточного овода, а также антигенных компонентов личинок рода Гастрофилус в пробах фекалий от лошадей больных гастрофилезом.

9. Выявлена зависимость титров агглютинации антигенов личинок рода Ринэструс в РНГА от интенсивности ринэстрозной инвазии, а также зависимость титров агглютинации антигенов

личинок рода Гастрофилюс в РНГА от интенсивности гастрофилезной инвазии, когда увеличение интенсивности инвазии сопровождается увеличением титров агглютинации антигенов.

10. Разработан наиболее практичный способ сбора носовой слизи от лошадей (на фильтровальной бумаге) для анализа в РНГА.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Предлагается способ получения метаболитных антигенов личинок оводов родов Ринэструс и Гастрофилюс, которые рекомендуем использовать в качестве диагностикума в сероиммунологических методах (Положительное решение Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР № 4370735/14/185654 на способ получения антигена у личинок оводов).

2. Рекомендуем для прижизненной диагностики ововых болезней лошадей и для контроля за эффективностью проводимых лечебно-профилактических обработок против ринэстроза и гастрофилеза антигенный вариант РНГА.

3. Рекомендуем для диагностики ринэстроза и гастрофилеза лошадей разработанные нами и одобренные научно-методическим советом Алма-Атинского зооветеринарного института методические рекомендации "По применению реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) для диагностики ринэстроза и гастрофилеза лошадей".

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Маканова А.Г. К биологии носоглоточного овода лошадей рода Ринэструс. - Тезисы докл. респ. научно-практич. конф. молодых ученых и спец. в г. Чимкенте (15-17 окт., 1986). В сб.: - Проблемы интенсификации животноводства в Казахской ССР, Алма-Ата, 1986 г., часть I, с. 146.

2. Маканова А.Г. Приготовление антисывороток к антигенам возбудителей ларвальных энтомозов - Тезисы докл. УП научно-практич. конф. молодых ученых и спец. в г. Оренбурге "Интенсификации агропромышленного комплекса - научную основу", Оренбург, 1988, с.23-24.

3. Хван М.В., Маканова А.Г., Ананьев О.П. Иммунологическая диагностика ринестроза лошадей - Информационный листок № 316, КазНИИНТИ, Алма-Ата, 1988, с.1-3.

4. Маканова А.Г. Реакция непрямой гемагглютинации в диагностике гастрофилеза - Информационный листок № 310, КазНИИНТИ, Алма-Ата, 1988, с.1-3.

5. Хван М.В., Ананьев О.П., Маканова А.Г., Аязбаев Д.М., Алпаев Н.С., Капанов А.А. Положительное решение Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР № 4370736/14/185654/ "Способ получения антигена у личинок овода".

