

УДК 619:616.98:578.825.1  
© 2012

*П.Ю. Кривошия,*  
кандидат  
ветеринарних наук

Інститут  
сільського господарства  
Західного Полісся НААН

## **СТАНДАРТИЗАЦІЯ УМОВ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦІЇ НЕПРЯМОЇ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ ВІРУСУ РИНОПНЕВМОНІЇ КОНЕЙ**

*Наведено результати досліджень з вивчення впливу різних чинників на один з етапів приготування еритроцитарного діагностичного реактиву за ринопневмонії коней. Установлено, що використання різних доз таніну за танізації еритроцитів істотно впливає на вияв спонтанної гемаглютинації, рівень адсорбції білка поверхнею еритроцита та чутливість реакції.*

Герпесвірусна інфекція поширена серед людей і тварин. До родини герпесвірусів належать віруси, які вражають центральну нервову систему і спричиняють важкі захворювання головного та спинного мозку (енцефаліт, мієліт, енцефаломієліт), органів зору (кератит, кератокон'юнктивіт), слизових оболонок ротової порожнини (стоматит) та шкірного покриву (екзема, везикулярний дерматит).

Однією з цих хвороб є ринопневмонія коней. Основні клінічні ознаки вияву: аборт, респіраторні ураження, кератокон'юнктивіт та мієло-енцефалопатії [7–9]. Нині основними методами ідентифікації антигенів та антитіл для діагностики ринопневмонії коней є такі: метод біологічної нейтралізації (РН) на первинних і перешеплюваних культурах клітин різного походження, імунофлуоресценції (РІФ), зв'язування комплексу (РЗК), дифузної преципітації (РДП), імуноферментного аналізу (ІФА), полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Однак ці методи є складними у виконанні і потребують за використання культури клітин великої кількості реагентів та значних витрат часу на їх проведення.

Спосіб, який не має цих недоліків, — реакція непрямой гемаглютинації (РНГА). Багато дослідників вважають, що вона високочутлива, проста у виконанні та специфічна за проведення діагностичних досліджень [1, 3, 4]. Однак слід зазначити, що за використання цього методу діагностики немає єдиної стандартної методики постановки. Так, танізація еритроцитів проводиться за різної концентрації таніну в еритроцитах, концентрації антигену і танізованих еритроцитів під час їх сенсibiliзації та інших методичних відмінностей, які безпосередньо впливають на результати реакції та її специфічність. Визначення оптимальної концентрації таніну під час танізації еритроцитів має велике значення, оскільки надлишок його призводить до неспецифічної аглютинації еритроцитів, а недостатня кількість не забезпечує

максимальної адсорбційної здатності білка поверхнею еритроцита.

Вивчено один з етапів підготовки до проведення РНГА — обробку еритроцитів таніном (танізація), а саме: вплив цього процесу концентрації таніну на фіксовані еритроцити, адсорбцію таніну на фіксовані еритроцити залежно від їх концентрації та умов інкубації, адсорбцію білка еритроцитами й періоду зберігання танізованих еритроцитів залежно від концентрації таніну, а також рівень титру антитіл у РНГА до вірусу ринопневмонії коней (ВРК).

**Мета досліджень** — вивчити вплив різних чинників на етапі танізації еритроцитів під час приготування еритроцитарного діагностичного реактиву та встановити оптимальні умови постановки РНГА.

**Методика досліджень.** Роботу проводили з вірусним матеріалом, отриманим способом культивування ВРК вакцинного штаму СВ-69 на субкультури клітин курячого ембріона. Інфекційну активність вірусу визначали його титрацією на культурі клітин. Метод отримання гіперімунних сироваток до ВРК описано нами в попередній роботі [5]. Для постановки методу РНГА використано загальноприйнятну схему [8]. Визначення загального білка проводили за методикою В.С. Чумаченка та співавторів [6]. Визначення адсорбції таніну на фіксовані глітаровим альдегідом еритроцити барана залежно від умов інкубації проводили з використанням 1%-го розчину  $\text{FeCl}_3$ , який за взаємодії з таніном викликає появу забарвлення чорного з синім відтінком [2]. Осад фіксованих еритроцитів барана в об'ємі 1 мл титрували до титру 1:1024 та визначали концентрацію еритроцитів у різних розведеннях загальноприйнятим методом. До розведень еритроцитів додавали танін у титрі 1:100 в об'ємі 1 мл. Інкубацію проводили упродовж 30 хв за кімнатної температури та при  $+60^\circ\text{C}$ , періодично перемішуючи. Після закінчення інкубації пробірки з сумішшю оброблених таніном еритроцитів центрифугували на

**1. Динаміка вияву спонтанної аглютинації еритроцитів залежно від концентрації таніну**

Еритроцити (0,2 %)	Концентрація таніну, мг/мл					
	1·10 <sup>-3</sup>	2·10 <sup>-3</sup>	3·10 <sup>-3</sup>	4·10 <sup>-3</sup>	5·10 <sup>-3</sup>	6·10 <sup>-3</sup>
Коня	+	+	+	—	—	—
Барана	+	+	+	—	—	—
Морської свинки	+	+	+	—	—	—
Кроля	+	+	+	—	—	—
Примітка. + — аглютинація еритроцитів; — — відсутня аглютинація еритроцитів.						

центрифузі з відцентровою силою 200g та відбирали по 1 мл з кожної проби надосад і додавали 0,05 мл індикатора FeCl<sub>3</sub>. Інкубували за кімнатної температури 30 хв. Після закінчення інкубації визначали оптичну густину порівняно з контролем (контроль — дистильована вода) за довжини хвилі 450 нм. Визначали вміст таніну за калібрувальною кривою відповідно до оптичної густини дослідних проб (мг·%) та адсорбцію таніну еритроцитами (%).

**Результати досліджень.** Проведено дослідження з визначення впливу концентрації таніну на еритроцити тварин (табл. 1).

Результати досліджень свідчать, що лише за концентрації таніну 4·10<sup>-3</sup> мг/мл аглютинація еритроцитів відсутня, а за вищих концентрацій вона є. Не встановлено різниці у вияві спонтанної аглютинації за використання фіксованих глюттаровим альдегідом еритроцитів коня, барана, морської свинки та кроля за його різних концентрацій.

Отже, оптимальна концентрація таніну для проведення РНГА становить від 4·10<sup>-3</sup> мг/мл і вище. За такого вмісту таніну спонтанної аглютинації еритроцитів не відбувається.

Визначено адсорбцію таніну на еритроцити барана залежно від концентрації еритроцитів та умов інкубації за постійної дози таніну (табл. 2).

Результати досліджень свідчать, що за концентрації еритроцитів барана 1,26 млн/мл відбувається адсорбція 42% таніну від його загальної кількості. Зі зменшенням концентрації еритроцитів пропорційно зменшується і кількість адсорбованого таніну. Отже, на еритроци-

ти адсорбується лише визначена кількість таніну і за недостатньої його кількості в розчині та стабільної концентрації еритроцитів процес танізації може бути неповним, а надлишок його призведе до спонтанної аглютинації еритроцитів. Різні умови інкубації не вплинули на процес танізації еритроцитів. Так, проведена інкубація за кімнатної температури та за +60°C упродовж 30 хв не вплинула на кількість адсорбованого таніну на еритроцити.

У подальших дослідженнях вивчено вплив постійної дози танізованих еритроцитів з різною концентрацією таніну на адсорбцію білка на поверхню еритроцита. З цією метою використано танізовані фіксовані глюттаровим альдегідом еритроцити в різних розведеннях таніну (від 1:100 до 1:50000).

Лише за танізації еритроцитів при титрі таніну від 1:100 до 1:5000 відбувається адсорбція білка імунної сироватки до ВРК на танізовані еритроцити. За танізації еритроцитів нижчими дозами таніну (від 1:5 000 та нижче) білок на танізовані еритроцити адсорбується в дуже низьких кількостях. Тому в подальших дослідженнях проводили танізацію еритроцитів за концентрації таніну в діапазоні від 1:4000 до 1:5000.

За аналогією до наведених вище досліджень проведено дослід з визначення титру антитіл до ВРК у РНГА з використанням сенсibilізованих еритроцитів, які попередньо танізовані в титрах 1:4000–1:100000.

Зниження титру таніну, використаного за танізації еритроцитів, призводить до зниження визначуваного вмісту антитіл імунної сироватки до ВРК від 1:128 до 1:4. За танізації еритроцитів 1:100000 і сенсibilізації їх ВРК антитіл взагалі не виявлено, що свідчить, можливо, про відсутність адсорбції вірусу на поверхні танізованого еритроцита. Отже, за танізації еритроцитів потрібно використовувати дози таніну в межах титру 1:4000–1:10000 з подальшою їх сенсibilізацією ВРК і визначенням антитіл у РНГА.

Одним із важливих питань у виготовленні еритроцитарних діагностиків є їх зберігання. Так, проведено дослідження на стабільність титрів у кінцевих розведеннях танізованих еритроцитів барана з різною концентрацією тані-

**2. Адсорбція таніну у відсотковому співвідношенні на фіксовані еритроцити барана залежно від їх концентрації та умов інкубації**

Умови інкубації	Концентрація еритроцитів, млн/мл										Контроль концентрації таніну, %
	1,26	1,0	0,43	0,28	0,078	0,054	0,018	0,011	0,005	0,003	
За температури:											
кімнатної (30 хв)	42	38	33	26	19,5	13	7,3	1,5	0	0	100
+60°C (30 хв)	42	38	33	26	19,5	13	7,3	1,5	0	0	100

**3. Вплив концентрації таніну на формування еритроцитарного диска танізованими еритроцитами під час їх зберігання**

Титр таніну під час танізації еритроцитів барана	День спостережень					
	1-й	6-й	14-й	20-й	42-й	62-й
1:10000	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:32
1:20000	1:64	1:64	1:64	1:32	1:16	1:8
1:50000	1:64	1:64	1:64	1:32	1:8	1:4

ну, де чітко візуально видно формування еритроцитарного диска за період спостереження 62 дні при температурі +10°C (табл. 3).

Отже, результати досліджень свідчать, що еритроцити, танізовані таніном 1:10000, мали найвищий кінцевий титр, що становив 1:64

на 42-й день, у титрі таніну 1:20000 і 1:50000 на 14-й день спостережень. На останній день спостережень найвищий кінцевий титр еритроцитів був в еритроцитів, танізованих 1:10000, і найнижчий — в еритроцитів, танізованих 1:50000.

**Висновки**

Потрібно проводити танізацію еритроцитів, фіксованих глютаровим альдегідом за титру таніну в межах 1:4000–1:5000. У концентрації таніну  $3 \cdot 10^{-3}$  мг/мл і вищих спостерігається спонтанна аглютинація еритроцитів коня, барана, морської свинки та кроля. Інкубація за кімнатної температури та за +60°C упродовж 30 хв не вплинула на процес танізації еритроцитів. Кількість адсорбованого білка на танізованому еритроциті прямо пропорційна концентрації таніну, адсорбованого на поверхні еритроцита. Чутливість методу РНГА під час визначення антитіл до вірусу ринопневмонії коней істотно залежить від умісту адсорбованого антигену на поверхню танізованого еритроцита. Доза адсорбованого таніну на поверхні еритроцита впливає на його зберігання.

**Бібліографія**

1. Гайдамович С.Я. Новые пути лабораторной диагностики вирусных инфекций//Вирусные инфекции. — Свердловск, 1979. — С. 88–90.
2. ГФ–10. — М.: Медицина, 1968. — С. 671–672.
3. Дяченко Н.С. Пассивная гемаглютинация и ее применение в вирусологии. — К.: Наук. думка, 1979. — 130 с.
4. Клисенко Г.А., Лаврова Н.А., Аннун К. и др. Реакция непрямой гемаглютинации для индикации вируса Западного Нила в крови животных и комаров при экспериментальной инфекции//Экология вирусов. — М., 1980. — С. 71–76.
5. Кривошия П.Ю., Мандигра М.С., Кот Л.Б. Отримання гіперімунних сироваток до шта-

- мів вірусів ринопневмонії коней//Ветеринарна медицина України. — 2005. — № 7. — С. 21–22.
6. Определение естественной резистентности и обмена веществ у сельскохозяйственных животных//В.Е. Чумаченко, А.М. Высоцкий, Н.А. Сердюк, В.В. Чумаченко. — К., 1990. — 135 с.
7. Старчеус А.П. Герпесвіруси коней//Тваринництво України. — 1999. — № 3. — С. 20–22.
8. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. Диагностика вирусных болезней животных. Справочник. — М., 1991. — С. 345–347.
9. Юров К.П. Профилактика вирусных болезней лошадей. — М., 1984. — 170 с.