

П. Ю. КРИВОШИЯ, кандидат ветеринарних наук

Інститут сільського господарства Західного Полісся НААН, м. Рівне

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ СПОСОБІВ УСУНЕННЯ НЕ СПЕЦИФІЧНИХ ГЕМАГЛЮТИНІНІВ СИРОВАТКИ КРОВІ КОНЕЙ

Проведено оцінку різних методичних підходів по усуненню неспецифічних гемаглютининів сироватки крові коней та визначено найефективніші з них.

Ключові слова: коні, сироватка, гемаглютинини, очищення.

При діагностиці багатьох інфекційних захворювань коней широко використовують такі серологічні реакції, як реакція гальмування гемаглютинації (РГГА) та реакція непрямой гемаглютинації (РНГА)[1-5]. Механізм РГГА полягає в тому, що противірусні антигемаглютинини перешкоджають вірусам аглютинувати еритроцити чутливих видів тварин. РГГА застосовують у вірусології для ідентифікації гемаглютинуючих вірусів, серологічної діагностики вірусних інфекцій (за приростом титру антитіл або за розділним визначенням IgM та IgG) та контролем рівня імунітету при масових епізоотологічних дослідженнях. Відмінністю РНГА від РГГА є використання в реакції еритроцитів оброблених таніном, що дозволяє адсорбувати на поверхню еритроцита різні білкові субстанції, токсини та вірусні агенти.

Одним із етапів проведення таких досліджень є підготовка сироваток крові. До використання придатні сироватки, в яких відсутні неспецифічні гемаглютинини до еритроцитів, які будуть використовуватись в РНГА та РГГА як одних із складових при проведенні діагностичних реакцій. При наявності гемаглютининів в сироватках необхідно провести їх очищення.

Так деякі автори [6] пропонують до таких сироваток крові тварин додавати еритроцити для того, щоб адсорбувати аглютинини, здатні реагувати з еритроцитами того ж виду тварин. Так на кожний 1 мл сироватки розведеної 1:10 додавали по 0,1 мл 50% -ої суспензії еритроцитів у фізіологічному розчині. Суміш інкубували при 4⁰С протягом години, після чого сироватка була придатна для використання. Інші [7] до 1 мл розведеної сироватки крові додавали по 0,025 мл еритроцитів 20-50% концентрації та експозицію проводили протягом 2-ох годин при 4⁰С. Концентрація еритроцитів при обробці сироваток в цих дослідженнях складала від 0,13% до 5% та експозиція від однієї години до двох.

Мета досліджень. Випробувати різні методичні підходи та визначити оптимальні умови по усуненню неспецифічних гемаглютининів сироватки крові коней.

Методика досліджень. Використовували сироватку крові від коней отриману загальноприйнятими методами[8]. Для отримання еритроцитів кров брали в асептичних умовах з вени коней в пробірки з антикоагулянтом (трилон Б). Після чого проводили осадження еритроцитів крові шляхом центрифугування з прискоренням 200g. Надосад після центрифугування зливали, а осад еритроцитів відмивали фізіологічним розчином до отримання прозорої рідини над осадом еритроцитів. Відмиті еритроцити зберігали у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) рН-7,2. Визначення вмісту неспецифічних гемаглютининів до еритроцитів коня в сироватці крові проводили в 96 – лункових полістиролових планшетах для імунологічних досліджень. Так за допомогою автоматичного мікродозатора в об'ємі

0,025 мл готували послідовні розведення сироваток від (1:10 до 1:320). В подальшому в лунки з розведеними сироватками додавали по 0,025 мл 0,2% суспензії еритроцитів коня. Плашки злегка струшували та залишали при кімнатній температурі на 2-3 години. Облік результатів реакції проводили по формуванню в контролі чіткого осаду еритроцитів у вигляді кола з рівними межами. Для досліджень були відібрані сироватки з високим вмістом неспецифічних гемаглютининів до еритроцитів коня (1:64-1:128).

Обробку сироваток від неспецифічних гемаглютининів проводили при концентрації еритроцитів від 1% до 20%. Змішували сироватки з еритроцитами протягом 15 хв. на змішувач-апараті в одному варіанті, а в другому – проби сироваток з еритроцитами лишали на добу при +10⁰С. Так як при проведенні лабораторних досліджень було помічено зниження рівня неспецифічних гемаглютининів при інактивації сироваток. Нами проведено досліди по впливу інактивації в різних температурних режимах +50⁰С, +60⁰С та +70⁰С протягом 30 хвилин на вміст гемаглютининів сироватки.

Результати досліджень. Отримані результати по інактивації сироваток з впливу на рівень неспецифічних гемаглютининів наведені в таблиці 1. З якої видно, що при інактивації сироваток при +50⁰С – титри неспецифічних гемаглютининів в пробі №3 були знижені в 4 рази, в № 5 – в 3 рази, №1 і №2 – в 2- а та в №4 – зниження титру не спостерігали. При +60⁰С простежується ще більше зниження титрів, а при +70⁰С досить суттєве. Так в пробі №3 гемаглютинини взагалі були відсутні при такій інактивації, а в пробах №1, №2 і №5 залишились в досить низьких титрах (1:2-1:8). Висока температурна інактивація при +70⁰С суттєво знизил титри неспецифічних гемаглютининів в усіх дослідних сироватках, крім сироватки №4, що дає підстави стверджувати про термостійкість гемаглютининів в даній сироватці. Необхідно зазначити, що при такому температурному режимі проходить часткова інактивація антигемаглютининів і такі сироватки не є придатними для використання в діагностичних цілях. Таким чином під дією високих температур сироваток проходить зниження вмісту неспецифічних гемаглютининів

Таблиця 1.

Вплив температурної інактивації сироваток крові коней на вміст неспецифічних гемаглютининів.

Порядковий номер сироватки	Титри неспецифічних гемаглютининів			
	Нагивні сироватки	Інактивовані при +50 ⁰ С протягом 30 хвилин.	Інактивовані при +60 ⁰ С протягом 30 хвилин.	Інактивовані при +70 ⁰ С протягом 30 хвилин.
1	1:64	1:32	1:16	1:2
2	1:128	1:64	1:64	1:2
3	1:64	1:8	1:4	0
4	1:64	1:64	1:16	1:64
5	1:64	1:16	1:16	1:8

Наступним етапом було проведення досліджень по усуненню гемаглютининів сироватки з допомогою обробки її еритроцитами коня в різній концентрації та інкубації протягом доби при +10⁰С та без інкубації, а лише струшуванням на змішувач-апараті протягом 15 хвилин. Результати досліджень наведені в таблиці 2.

Результати досліджень обробки сироваток еритроцитами коней

Порядковий номер сироваток	Титри неспецифічних гемаглютининів сироватки						
	Сироватки без обробки еритроцитами коня	Інкубація протягом доби при +10 ⁰ С			Змішування на апараті протягом 15 хвилин.		
		Концентрація еритроцитів, %					
		1%	5%	20%	1%	5%	20%
1	1:64	1:4	1:4	1:2	1:4	1:4	0
2	1:128	1:8	1:16	1:2	1:4	1:4	1:2
3	1:64	1:4	1:4	0	0	1:4	0
4	1:64	1:8	1:4	0	1:4	0	0
5	1:64	1:8	0	1:2	1:4	1:4	0

Так, якщо розглянути усунення неспецифічних гемаглютининів з обробкою еритроцитами та інкубацією +10⁰С протягом доби, то простежується тенденція до зниження титрів гемаглютининів із збільшенням концентрації еритроцитів. Титри неспецифічних гемаглютининів при змішуванні з 1% – концентрацією еритроцитів були в межах (1:4 -1:8), при 5% – (1:4 -1:16) та 20% – (0 -1:2), але повне очищення від гемаглютининів при 20% – й концентрації еритроцитів було лише в двох пробах із п'яти. З обробкою на змішувач–апараті титри аглютининів при 1% та 5% – концентрації суттєво не відрізнялись і були в межах 0- 1:4, а при 20% – (0 -1:2), що було в 2 – рази нижче ніж при концентрації 1% та 5%. З п'яти дослідних проб сироваток лише в пробі №2 не пройшло повного очищення від гемаглютининів.

Висновки

Для усунення неспецифічних гемаглютининів з сироватки крові коней пропонуємо використовувати 20% – концентрацію еритроцитів та проводити обробку за допомогою змішувач–апарата. Дія високих температур на сироватку, знижує вміст неспецифічних гемаглютининів. В подальших дослідженнях плануємо провести досліді по впливу на вміст неспецифічних гемаглютининів обробки сироваток від термостабільних та термолабільних інгібіторів.

Список використаної літератури

1. *Старчеус, А. П.* Герпесвіруси коней /А. П.Старчеус//Тваринництво України. – 1999. – №3.-С. 20 – 22.
2. *Сюрин В. Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В.* Диагностика вирусных болезней животных. Справочник. – М., 1991. – 528 с.
3. *Юров, К.П.* Профилактика вирусных болезней лошадей /К.П. Юров – М., 1984. – 170 с.
4. *Орлов, Ф.М.* Ифекционные и инвазионные болезни лошадей. / Ф. М. Орлов. – М., 1976. – 384 с.
5. *Болезни лошадей.* Справочник /И. А. Калашник, С. К. Горбатенко, А.А. Заволока, и др.; Под ред.И. А. Калашника. – К.: Урожай, 1992. – 256 с.
6. *Сюрин, В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В.* Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных. Справочник.- М.: 1986. –235 с.
7. *Посібник з медичної вірусології.* / За ред. В.М. Гиріна – Київ: Здоров'я, 1995.-С.134.
8. *Определение естественной резистентности и обмена веществ у сельскохозяйственных животных* /В.Е.Чумаченко, А.М.Высоцкий, Н.А. Сердюк, В.В.Чумаченко, К.: 1990.- 135с.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБОВ УСТРАНЕНИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЕМАГЛЮТИНИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДЕЙ/
Кривошея П. Ю.

Приведены результаты исследований по изучению способов устранения неспецифических гемагглютининов сыворотки крови лошадей, как одного из этапов подготовки её к использованию в диагностических тестах. Установлено, что обработка сыворотки при 20% – концентрации эритроцитов при помощи смеситель–аппарата наиболее эффективна.

Ключевые слова: лошади, сыворотка, гемагглютинины, очищение.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE WAYS TO ELIMINATE NON-SPECIFIC SERUM HEMAGGLUTININ IN HORSES/ Kryvosheiya P.Y.

The results of research of ways to eliminate non-specific serum hemagglutinin in horses as a step in preparingt for use in diagnostic tests. Set that treatment of serum at 20% concentration of red blood cells with mixer unit is most effective.

Keywords: horse, serum, hemagglutinin, purification.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук Н. В. Гудзь.