

УДК 578:579:636.2:619.9

О. Й. ГРИНЕВИЧ, доктор медичних наук

О. Й. ГУЗИК, К. В. АФАНАСЬЄВА, Н. О. БУРЛАКОВА

Державна наукова установа «Державний центр інноваційних біотехнологій»

ВПЛИВ ТЕРМІНУ ТА УМОВ ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ СИРОВАТОК КРОВІ НА ВМІСТ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Проведені дослідження впливу терміну та умов зберігання сироватки крові від хворої на лейкоз великої рогатої худоби, на наявність або відсутність антитіл в зразках. Показано, що зберігання сироватки протягом 1 місяця при температурі -20°C не впливає на вміст антитіл. В той час, як сироватка, яку зберігали протягом 10 місяців при -20°C не придатна для проведення досліджень на наявність протилейкозних антитіл.

Ключові слова: вірус лейкозу великої рогатої худоби, імуноферментний метод аналізу, антитіла.

Лейкоз великої рогатої худоби (лейкоз ВРХ) — злоякісне хронічне захворювання вірусної етіології, яке вражає кровотворну систему та супроводжується неконтрольованим злоякісним розростанням незрілих клітин крові, з подальшим утворенням пухлин у різних органах. На сьогодні лейкоз ВРХ набув великого поширення у США, країнах Центральної Європи, Данії, Швеції, на Близькому Сході, в Африці й Австралії. Лейкоз завдає величезні економічні збитки сільському господарству, які пов'язані з вибраковуванням тварин, загибеллю тварин, необхідністю їх утилізації та витрат на проведення оздоровчих заходів. Діагностику вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ), як правило, здійснюють шляхом виявлення антитіл до цього вірусу у сироватці крові. У зв'язку з цим, виникають актуальні практичні питання стосовно умов та термінів зберігання сироватки для коректного виявлення наявності або відсутності антитіл до ВЛ ВРХ, на випадок виникнення необхідності підтвердження попередніх досліджень зразків крові від тварин, хворих на лейкоз ВРХ[1,2].

Для дослідження більшості зразків біологічного матеріалу вважається можливим його зберігання при кімнатній температурі не більше 6-8 годин. Деякі зразки зберігають протягом тижня при $+4^{\circ}\text{C}$. У зв'язку з ферментативним гідролізом, який здатний кардинально змінити фізіологічний стан багатьох компонентів сироватки крові, при необхідності зберігання сироватки (плазми) більше доби, зразок рекомендується зберігати при -20°C . Однак, навіть при низьких температурах (-20°C та -70°C) біологічна система не завжди стабільна, наслідком чого є коливання рівня деяких компонентів крові при тривалому зберіганні. Виходячи з цього, метою нашого дослідження було визначити вплив терміну та умов зберігання сироваток крові на вміст антитіл до ВЛ ВРХ в

досліджуваних зразках.

Матеріал та методи. В дослідженні використовували зразки сироваток крові здорових тварин та тварин хворих на ВЛ ВРХ, що зберігалася при -20°C терміном 1 та 10 місяців. Для визначення антитіл до ВЛ ВРХ використано тест-системи DIA-BLV-Ab («Діапроф-Мед», Україна) та VMRD (Veterinary Medical Research and Development, USA). Принцип методу ґрунтується на взаємодії антигену та антитіла. Приєднуючись до утворених на твердій фазі комплексів антиген-антитіло, кон'югат сприяє їх виявленню в результаті реакції ферменту (пероксидази хрому) із 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (ТМБ) в розчині, що містить перекис водню [2,3,5,6].

Результати аналізу оцінювали за допомогою спектрофотометра («Sunrise», Austria), при довжині хвиль 450/620 та 450/0 нм. Значення оптичної густини (ОГ) використовували для розрахунку.

Результати та їх обговорення. Для дослідження було відібрано 20 зразків сироватки крові, які попередньо були перевірені на наявність антитіл до вірусу лейкозу ВРХ. Із них 10 зразків містили антитіла до ВЛ ВРХ, а в інших 10 антитіл виявлено не було. Зразки було розділено на дві групи відповідно до терміну зберігання: 10 з терміном зберігання 1 місяць та 10 із терміном зберігання 10 місяців. Кожна група зразків була поділена на 5 позитивних та 5 негативних. Всі сироватки крові зберігали при температурі -20°C .

На першому етапі дослідження проводили аналіз наявності антитіл до ВЛ ВРХ при зберіганні сироватки за температури -20°C протягом 1 місяця. Зразки, які були досліджені перед заморожуванням становили контрольну групу. Сироватки крові, які досліджено на вміст антитіл до ВЛ ВРХ на тест-системі DIA-BLV-Ab віднесли до першої дослідної групи. Ці ж сироватки було досліджено паралельно на тест-системі VMRD, їх віднесли до другої дослідної групи (таб.1).

При дослідженні сироватки через 1 місяць зберігання, було виявлено позитивний результат на антитіла до ВЛ ВРХ у тварин (інвентарні номери: 1332, 1296, 3594, 1889 та 6897; позначені «+» в таб.№1). У зразках сироваток крові, у яких під час першого дослідження виявлено негативний результат, при повторному дослідженні не відзначено змін (позначені «-» в таб.№1).

Таблиця 1

**Вміст антитіл в сироватці крові від тварин, хворих на ВЛ ВРХ, яку зберігали
1 місяць (t° - 20°С)**

Поряд. №	Інв. № ВРХ	Наявність або відсутність антитіл в сироватці крові		
		Контрольна група	Дослідна група №1	Дослідна група №2
1	1332	+	+	+
2	1296	+	+	+
3	3594	+	+	+
4	1889	+	+	+
5	6897	+	+	+
6	3454	-	-	-
7	1299	-	-	-
8	1653	-	-	-
9	9151	-	-	-
10	2814	-	-	-

Згідно результату проведених досліджень наведених в табл.№1, вміст антитіл, який був виявлений в сироватці крові до замороження зразків, зберігся в цих зразках при повторному дослідженні через місяць. Таким чином, збереження сироватки крові протягом одного місяця при -20 °С не вплинуло на вміст антитіл в досліджуваних зразках.

Наступним етапом роботи був аналіз наявності антитіл до ВЛ ВРХ при зберіганні сироватки крові при -20 °С протягом 10 місяців. Відповідно до попередніх досліджень, контрольна група – зразки сироватки крові, проаналізовані до заморожування, перша дослідна група – зразки, які досліджено на вміст антитіл до ВЛ ВРХ на тест-системі DIA-BLV-Ab, друга дослідна група – зразки, які досліджено на вміст антитіл до ВЛ ВРХ на тест – системі VMRD. Результати представлені в таб.№2 свідчать про те, що з 5 позитивних зразків сироватки від тварин (інвентарні номери: 1243, 9154, 6928, 6882 та 1317), які були проаналізовані на тест-системі DIA-BLV-Ab до заморожування, лише у 2 тварин (інвентарні номери: 9154, 6928) було виявлено позитивний результат при повторному аналізі. Дослідивши ці ж сироватки крові на тест-системі VMRD позитивний результат було виявлено у 3 тварин (інвентарні номери: 1243, 6928, 6882; табл.№2).

Таблиця 2

Вміст антитіл в сироватці крові від тварин, хворих на ВЛ ВРХ, яку зберігали 10 місяців (t° - 20°С)

Поряд. №	Інв. № ВРХ	Наявність або відсутність антитіл в сироватці крові		
		Контрольна група	Дослідна група №1	Дослідна група №2
1	1243	+	-	+
2	9154	+	+	-
3	6928	+	+	+
4	6882	+	-	+
5	1317	+	-	-
6	2488	-	-	-
7	1836	-	-	-
8	3603	-	-	-
9	3334	-	-	-
10	3279	-	-	-

Такі результати можуть бути наслідком деградації певної частини антитіл в умовах довготривалого збереження сироватки при -20 °С.

Таким чином, зразки сироваток крові, які зберігали протягом 1 місяця при t° - 20°С при дослідженні не зазнали суттєвих змін в коливанні рівня антитіл до ВЛ ВРХ. Зразки сироваток крові, які зберігали протягом 10 місяців при t° - 20°С зазнали суттєвих змін відносно вмісту антитіл до ВЛ ВРХ .

Висновок: умови та термін зберігання зразків сироваток крові впливають на вміст антитіл до вірусу лейкозу в сироватці ВРХ, що підтверджується дослідженнями з використанням ІФА тест-системи вітчизняного та зарубіжного виробництва. При довготривалому зберіганні (10 місяців, t° - 20°С) рівень антитіл до ВЛ ВРХ знижується.

Список використаної літератури

1. *Гриневич О. Й.* Використання різних методів діагностики з метою вивчення інфекційного процесу на прикладі лейкозу великої рогатої худоби / О. Й. Гриневич, І. Г. Маркович, Г .А. Завірюха [і ін.]//Ветеринарна медицина України. – 2012. – №11(201). – С.20–23.

2. *Ярчук Б. М.* Лейкоз великої рогатої худоби / Б. М. Ярчук, О. Б. Домбровський, Р. В.Тирсін, Л. Є. Корнієнко, О. В. Довгаль. – Київ: –2000. – 64с.

3. *Таранов А. Г.* Диагностические тест-системы. Радиоиммунный и иммуноферментный методы диагностики / А. Г. Таранов– М.: Издатель Мокеев, 2002. – 288с.

4. *Кучеренко М. Є.* Сучасні методи біохімічних досліджень/ М.Є.Кучеренко, Ю.Д.Бабенко, В.М. Войцицький – К.: Фітосоціоцентр – 2001. – С.179-181.

5. Нагаєва Л. І. Діагностика та профілактика лейкозу великої рогатої худоби/Л.І.Нагаєва,С.В. Аранчій, В.А.Синицин[і ін.] // Бібліотека ветеринарної медицини. – К. - 2003. – № 9-12. – 64с.

6. Спивак Н. Я. Иммуноферментная система для диагностики лейкоза крупного рогатого скота / Н.Я.Спивак, Л.А. Ганова, Т.Б.Стегний[і ін.] // Ветеринарная медицина – 2004. – Т.84. – С.641-646.

ВЛИЯНИЕ СРОКА И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТОК КРОВИ НА НАЛИЧИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА / А.Й. Гриневич, О. Й. Гузык, К.В. Афанасьева, Н.А. Бурлакова.

Проведено исследование влияния срока и условий хранения образцов сывороток крови от больного на лейкоз крупного рогатого скота, на наличие или отсутствие антител. Показано, что хранение сыворотки в течение 1 месяца при температуре -20°C существенно не влияет на содержание антител в сохраняемых образцах. В то время, уровень антител в образцах сывороток, которые сохраняли в течение 10 месяцев при температуре -20°C , снижался.

Ключевые слова: вирус лейкоза крупного рогатого скота, иммуноферментный метод анализа, антитела.

ANTIBODI'S PRESENCE IN A SAMPLEX BLOOD SERUM OF TRIAL CATTLE LEUKOSIS UNDER THE INFLUENCE OF TERM AND CONDITION OF KEEPING/ O. Grynevych, O. Gusyk, K. Afanasieva, N. Burlakova.

Research of antibody's presence in the samples blood serum of trial cattle leukosis under the influence of term and condition of keeping. Analysed of influence of these processes on the antibodies presence in the saves samples. Research of blood serum was done before keeping and after.

It is shown that the storage of serum for 1 month at -20°C did not significantly affect the content of antibodies in the stored samples. At that time, the level of antibodies in the serum samples, which lasts for 10 months at -20°C , declined.

Keys words: leukemia virus in cattle, ELISA, antibodies.

Рецензент – кандидат біологічних наук П. Ю. Ліпський.

Рукопис надійшов 22. 03. 2013р