

6. Mashero, V.A., & Krasochko, P.A. (2007). Jetiologicheskaja struktura vzbuditelej respiratornyh i zheludochno-kishechnyh infekcij teljat v Respublike Belarus' [Etiologic structure of the respiration and gastrointestinal infection of calves in the Republic of Belarus]. *Uchenye zapiski – Bulletin of the EE "Vitebsk order "Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine"*, Vol. 43, Is. 2, 45, 83-86 [in Russian].

7. Yaromchyk, Y.P., & Borisovec, D.S. (2008). Situacija po virusnoj diaree i rotavirusnoj infekcii teljat v Respublike Belarus' [Situation on the viral diarrhea and rotavirus infections of calves in the Republic of Belarus]. Proceedings from The Research of young scientists in solving problems of animal husbandry: *VI Mezhdunarodnaja nauchno-prakticheskaja konferencija (19–20 maja 2005 g.) – International Scientific and Practical Conference.* (pp. 45). Vitebsk: VGAVM [in Russian].

УДК 619:616.9:578:636.13

КРИВОШИЯ П.Ю., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: p.kryvoshyya@gmail.com

Дослідна станція епізоотології Інституту ветеринарної медицини НААН

РУДЬ О.Г., канд. вет. наук, доц., e-mail: oleg.rud-rud1965@ukr.net

Рівненський державний гуманітарний університет

МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО ВИКОРИСТАННЯ РЕАКЦІЇ РАДІАЛЬНОГО ГЕМОЛІЗУ ПРИ ДІАГНОСТИЦІ ІНФЕКЦІЙНОЇ АНЕМІЇ КОНЕЙ

В статті наведено результати досліджень з вивчення різних методичних підходів з використання реакції радіального гемолізу при діагностиці інфекційної анемії коней (ІНАН).

Встановлено, що концентрація вірусного антигену на сенсibiliзованих еритроцитах, товщина агару, концентрація еритроцитів, присутність комплементу, обробка еритроцитів таніном суттєво впливають на чутливість діагностичного тесту.

Метод має деякі переваги в порівнянні із загальноприйнятим РДП-тестом при діагностиці ІНАН, а саме: можливість використання низькоконцентрованих вірусних препаратів та високу специфічність.

***Ключові слова:** інфекційна анемія коней, метод радіального гемолізу, сенсibiliзовані еритроцити, агар Діфко, танін, культуральний антиген.*

Вступ. На сьогоднішній день для діагностики інфекційної анемії коней діагноз ставлять лише при встановленні специфічних антитіл або збудника. Імунна реакція організму виникає на ряд вірусоспецифічних антигенів, що відповідають за продукцію нейтралізуючих, комплементів'язуючих, преципітуючих антитіл. Однією з перших була запропанована реакція зв'язування комплементу (РЗК). Основним з серологічних методів є реакція дифузної преципітації (тест Коггінса), який дозволяє виявити антитіла до вірусу при різних формах перебігу хвороби [1,2]. По визначенню експертів МЕБ, тест Коггінса є стандартом при діагностиці ІНАН. В якості альтернативних методів використовують виділення вірусу в культурі клітин, полімеразну ланцюгову реакцію із зворотною транскриптазою (ЗТ-ПЛР), імуноферментний аналіз

(ІФА) та імуноблотинг [3].

Повідомлень щодо використання реакції радіального гемолізу (РРГ) при діагностиці інфекційної анемії коней в наявній нам літературі ми не знайшли, а також необхідних методичних рекомендацій з техніки постановки при даному захворюванні. РРГ вперше використано у вірусологічній практиці Schild 1975 р для визначення протигрипозних антитіл. Є повідомлення про використання даного методу у діагностиці червоної висипки, грипу, чумі великої рогатої худоби, парагрипу, хворобі Ньюкасла, кліщового енцефаліту та епідемічного паротиту [4,5]. Принцип реакції полягає у тому, що еритроцити, навантажені вірусними антигенами, лізуються вірусспецифічними антитілами у присутності комплементу в агаровій системі, розміщеній на твердій прозорій основі. Випробування даного методу при ІНАН коней було обумовлене тим, що збудник захворювання адсорбується на еритроцити коней та даний метод має високу імунологічну специфічність, не потребує великої кількості антигену та забезпечує результати досліджень впродовж 1–2 діб.

Мета роботи. Провести дослідження з визначення можливостей використання методу радіального гемолізу при діагностиці інфекційної анемії коней. Встановити оптимальні умови її проведення та вплив на її чутливість різних чинників.

Матеріали і методи досліджень. В якості антигену для сенсibilізації еритроцитів коня був використаний культуральний штам вірусу ІНАН «3-ВІЕВ-К» отриманий на первинних та субкультурах органів ембріонів коней та перещеплюваній культурі трахеї теляти (ТТ), а також імунні сироватки до вірусу ІНАН з діагностичного набору – «Набір для діагностики інфекційної анемії коней у реакції дифузної преципітації (РДП)» виробництва ФДУП «Щолківський біокомбінат» (РФ).

РРГ проводили в п'ять етапів. Перший етап – сенсibilізація еритроцитів. До відмитих еритроцитів коня фізіологічним розчином додавали вірусний культуральний антиген, після інкубації впродовж доби при кімнатній температурі відділяли еритроцити центрифугуванням, видаляли надосадову рідину, а сенсibilізовані еритроцити промивали та ресуспендували в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР). Другий етап – підготовка комплементу. До сенсibilізованих еритроцитів додавали комплемент та інкубували суміш при 45°C впродовж 10 хвилин. Третій етап – приготування тест-лунок. Використовували розплавлений та охолоджений до 45°C 2% агар Діфко. З'єднували рівні об'єми сенсibilізованих еритроцитів та розчин агару, обережно перемішуючи та переносили суміш піпеткою в плоскі лунки 6-лункового полістиролового планшета з діаметром лунок 3 см, встановленого в горизонтальному положенні (з розрахунку 1 см³ розплавленого агару на лунку). Після застигання агару пробійником по центру вирізали лунки діаметром 5 мм. Четвертий етап – внесення в тест-лунки досліджуваного матеріалу, тобто сироваток крові. Інкубацію проводили при кімнатній температурі у вологій камері впродовж доби. П'ятий етап – облік результатів. Реакцію обчислювали візуально, вимірюючи діаметр утворених зон гемолізу лінійкою та визначали

площу гемолізу визначали за формулою $S=\pi \times r^2$. Постановку РРГ супроводжували проведенням контролей. Негативний – у лунки замість сироватки крові вносили забуферений ізотонічний розчин натрію хлориду – відсутність зони гемолізу. Позитивний – у лунки титрували гомологічну імунну сироватку – наявність зон гемолізу із зменшенням їх діаметру з розведенням сироватки. Негативний контроль тест-лунок – у агар однієї з них вводили не сенсibilізовані еритроцити, у агар іншої – еритроцити сенсibilізовані матеріалом, що не містить вірус (гомогенат культури клітин в якій вирощували вірус). У разі внесення в такий агар досліджуваних та імунних сироваток зони гемолізу відсутні.

Результати досліджень та їх обговорення. На першому етапі провели дослідження по впливу концентрації сенсibilізованого антигену на еритроцитах. Так культуральний штам вірусу ІНАН «З-ВІЕВ-К» був титрований в конусних полістиролових лунках в об'ємі 1 см³ на забуференому фізіологічному розчині в титрах від 1:2 до 1:64. Після чого було додано відмиті еритроцити коня в 3% - концентрації.. Інкубацію проводили впродовж доби при кімнатній температурі. На другий день надосад був знятий, а сенсibilізовані еритроцити промивали та ресуспендували. Далі з'єднували рівні об'єми сенсibilізованих еритроцитів та розчин 2% агару, обережно перемішуючи та переносячи суміш піпеткою в плоскі лунки. Коли агар застиг робили лунки та вносили імунну сироватку ІНАН в усі лунки в об'ємі 0,05 см³. Інкубація проходила впродовж 20 годин. Облік проводили візуально. Так було встановлено зони гемолізу в усіх лунках та діаметр їх був однаковий. Тобто концентрація адсорбованого вірусу ІНАН на еритроцитах коня не вплинула на рівень чутливості методу. Можливо враховуючи те, що була використана однакова концентрація еритроцитів, то і адсорбція вірусу на ці еритроцити була однакова. Для сенсibilізації еритроцитів і проведення реакції його було достатньо в розведенні 1:64, що дає перспективу використання низько концентрованих вірусних препаратів.

В подальших дослідженнях вивчався вплив на результати реакції еритроцитів оброблених таніном в титрі 1:5000. Таким чином були проведені досліди аналогічні вище викладеним з лише тією відмінністю, що сенсibilізація проходила на танізовані еритроцити. Так по закінченню терміну інкубації було встановлено, що площі зон гемолізу пропорційно зменшувались в діаметрі відносно титру адсорбованого вірусу на танізованих еритроцитах. Результати досліджень наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Динаміка площі гемолізу в РРГ відносно концентрації адсорбованого вірусу на еритроцити оброблені таніном

Титр вірусу ІНАН при сенсibilізації еритроцитів					
1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Площа гемолізу, мм ²					
314	192	155	93	62	58

Використання в РРГ танізованих еритроцитів дало можливість отримати чітку пропорційність, між кількістю антигену та активністю взаємодії з ним специфічних антитіл. Хоча з не обробленими таніном еритроцитами такої закономірності не було встановлено, що дає підстави стверджувати про високу адсорбційну здатність танізованих еритроцитів до антигенних детермінант вірусу. Зважаючи на те, що проходила взаємодія з сенсibiliзованими еритроцитами, які були навантажені вірусом в низькій концентрації. Нами було вирішено визначити його титр в реакції дифузної преципітації з імунною сироваткою, що використовували в РРГ. Вірус-культуральна рідина була титрована до титру 1:32 включно. Так чіткі лінії преципітації з імунною сироваткою були встановлені лише до титру 1:4, у вищих титрах спостерігали лише дифузію між лунками, де був антиген та специфічна сироватка, що вказує на те, що для проведення РДП необхідні висококонцентровані антигени. На противагу цьому методу, для проведення РРГ можливе використання не концентрованих антигенів, але потрібно мати еритроцити коня. Так при титрі вірусу 1:64 була встановлена можливість проведення РРГ та обліку реакції, а в РДП було можливим використання антигену лише до розведення 1:4.

Тому як строк зберігання сенсibiliзованих еритроцитів в оптимальних умовах становить 7–10 днів, а при подальшому проходить їх частковий або повний гемоліз, що призводить до непридатності їх використання в РРГ. Нами було вирішено провести дослідження з використанням стабілізованих еритроцитів. Для стабілізації еритроцитів був використаний глутаровий альдегід в концентрації від 0,023% до 0,75%. Так було проведено титрацію глутарового альдегіда на забуференому фізіологічному розчині в об'ємі 1 см³ та додано в тому ж об'ємі 3% суспензію еритроцитів. Стабілізація еритроцитів проводилась впродовж доби. Після чого їх відмили шляхом центрифугування та провели їх обробку таніном в титрі 1:5000. Танізація еритроцитів проходила впродовж 15–20 хвилин при 40°C. До стабілізованих в різній концентрації глутаровим альдегідом і танізованих еритроцитів було додано культуральний вірус ІНАН в розведенні 1:10. Інкубацію проводили впродовж доби при кімнатній температурі. На другий день надосад був знятий, а сенсibiliзовані еритроцити промивали та ресуспендували. В подальшому хід постановки РРГ був аналогічний попередньо вказаним дослідженням. По закінченню періоду інкубації в жодній тест-лунці не було встановлено зон гемолізу, що наводило на думку про те, що стабілізовані еритроцити є непридатними у використанні для проведення РРГ. Тест-лунки ми лишили для подальшої інкубації з надією, що реакція можливо себе проявить. Так на 3-й день інкубації було встановлено в дослідних лунках не зони гемолізу, а затемнені зони у вигляді кола на фоні червоного кольору сенсibiliзованих еритроцитів в агарі. Такі зони були встановлені лише в лунках де еритроцити були оброблені глутаровим альдегідом в концентрації від 0,023% до 0,09%, а у вищих концентраціях таких зон не було встановлено. Результати досліджень наведені в таблиці 2.

Динаміка площі зон в РРГ відносно концентрації глютарового альдегіда при стабілізації еритроцитів коня

Концентрація глютарового альдегіда при стабілізації еритроцитів, %					
0,75	0,38	0,19	0,09	0,05	0,023
Площа, мм ²					
0	0	0	155	170	192

Результати досліджень вказують на те, що вірус не адсорбувався на еритроцити, які були оброблені глютаровим альдегідом в концентрації 0,75–0,19%. У нижчих концентраціях адсорбція проходила. При зниженні концентрації альдегіда пропорційно збільшувалась площа утворених зон. Якщо результатом прояву РРГ з не стабілізованими еритроцитами були зони гемолізу то із стабілізованими гемолізу не було, а були зони затемнення, що можливо пов'язано з аглютинацією, тобто взаємодією сенсibilізованих еритроцитів антигеном та специфічних антитіл в товщі агару. Виходячи з вище наведених результатів досліджень використання стабілізованих еритроцитів при постановці РРГ є можливим, але стабілізацію еритроцитів необхідно проводити в досить низьких дозах стабілізатора.

В подальших дослідженнях нами було вивчено вплив комплекменту, концентрації сенсibilізованих еритроцитів в агарі та товщини шару агару при проведенні РРГ. Так в якості комплекменту використовували сироватку морської свинки. В одному варіанті комплекмент вводили безпосередньо в суспензію сенсibilізованих еритроцитів, в другому його наносили на поверхню агару з сенсibilізованими еритроцитами та інкубували впродовж 2-х годин. Після чого комплекмент був відібраний з поверхні агару. За контроль слугувала тест – лунка без комплекменту. В результаті проведених дослідів було встановлено, що зона гемолізу була чіткою та більшою по площі де був використаний комплекмент в суспензії, а де він був нанесений на поверхню та в контролі де не використовували комплекмент зони гемолізу також були, але по розмірам вони були меншими. Використання різної концентрації сенсibilізованих еритроцитів та товщини агару показало, що чим менша концентрація еритроцитів та товщина агару то тим більша чутливість методу.

Специфічність сенсibilізованих еритроцитів культуральним вірусом ІНАН була перевірена нами з сироватками крові здорових коней, а також з імунними сироватками до вірусу ринотрахеїту великої рогатої худоби, лейкозу великої рогатої худоби, грипу коней (штам А/кінь-2/Маямі/63), еталонних штамів ринопневмонії коней 1-типу (штам RAC-H/PK-15, штам СВ-69). З проведених досліджень на специфічність, зони гемолізу були встановлені лише з імунними сироватками на комерційний антиген ІНАН з усіма іншими взаємодії не встановлено.

Використання методу радіального гемолізу має переваги над іншими методами діагностики, а саме:

- методична простота постановки;
- висока специфічність;

- швидкість дослідження;
- використання низькоконцентрованих антигенних;
- препаратів та сироваток крові в малих кількостях;
- можливість застосування в польових умовах.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Встановлена можливість використання реакції радіального гемолізу при діагностиці інфекційної анемії коней;
2. Визначено, що приготування сенсibiliзованих еритроцитів, товщина агару, концентрація еритроцитів, присутність комплекменту, обробка еритроцитів таніном та їх стабілізація суттєво впливають на чутливість діагностичного методу;
3. Методична простота постановки дає широкі можливості до використання його при діагностиці інфекційної анемії коней;
4. Для покращення епізоотичної ситуації по інфекційній анемії коней необхідно проводити планові діагностичні дослідження з максимальним охопленням поголів'я коней та проведенням протиепізоотичних заходів з оздоровлення господарств;
5. По багатьом інфекційним захворюванням коней в Україні діагностичні та профілактичні засоби не виробляються, що стримує ефективне проведення протиепізоотичних заходів в галузі.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Coggins L. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test / L. Coggins, N. L. Norcross // Am. J. Vet. Res. – 1972. – Vol.33. – № 1. – P. 11 - 18.
2. Coggins L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia / L. Coggins, N.L. Norcross // Journell Vet. – 1970. – № 3. – P. 330 - 335.
3. Nagarajan M. M. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction / M. M. Nagarajan, C. Simard // J. Virol. Methods. – 2001. – Vol. 94. – P. 97 - 109.
4. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н. В. Диагностика вирусных болезней животных: / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина - М.: Агропромиздат, 1991. – 528 с.
5. Чайка Н.А. Современные методы иммунологической диагностики вирусных инфекций. / Н.А. Чайка - М.: ВНИИМИ, 1981. – 423 с.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕАКЦИИ РАДИАЛЬНОГО ГЕМОЛИЗА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЛОШАДЕЙ / Кривошея П.Ю., Рудь О.Г.

В статье приведены результаты исследований с изучения разных методических подходов с использования реакции радиального гемоліза при диагностике инфекционной анеміи лошадей (ИНАН).

Установлено, что концентрация вирусного антигена на сенсibiliзованных эритроцитах, толщина агара, концентрация эритроцитов, присутствие комплекмента, обработка эритроцитов таніном существенно влияет на чувствительность диагностического теста.

Метод имеет некоторые преимущества по сравнению с общепринятым РДП-тестом при диагностике ИНАН, а именно: возможность использования низькоконцентрированных вирусных препаратов и высокая специфичность.

Ключевые слова: *инфекционная анемія, метод радиального гемоліза, сенсibiliзованные эритроциты, агар Дифко, танин, культуральный антиген.*

METHODICAL APPROACHES TO THE RADIAL HEMOLYSIS REACTION USE FOR EQUINE INFECTIOUS ANEMIA DIAGNOSTICS /Kryvoshya P.Yu., Rud O.G.

Introduction. *Of Equine Infectious Anemia (EIA) is one of the most important issue that constantly registers in many countries with the developed horse breeding. Diagnostics of EIA is a basic element of the preventive measures system. The basic serum method of diagnostics is a reaction of diffuse precipitation (Coggins test). In accessible sources, we did not find any reports on the radial hemolysis reaction in EIA diagnostics, as well as the necessary guidelines on the technique of its performance.*

The goal of the work. *To conduct a study on the possibilities to use the method of radial hemolysis in the diagnosis of EIA. To establish optimal conditions for its implementation and influence of various factors on its sensitivity.*

Materials and methods. *The EIA virus strain "3-BIEB-K" was cultivated on initial and subculture of horse embryos organs and passaged culture of trachea of calf (TC). Immune sera against EIA virus were used from the test-kit «A set for the diagnosis of infectious anemia of horses in the reaction of diffuse precipitation (RDP)» produced by FSE «Shchelkovo Biocombinat» (RF).*

RDP was performed in the following sequence: erythrocytes sensibilization complement preparation, preparation of test wells, samples introduction into the test wells, account of the results.

Results of research and discussion. *It is established that the method has advantages over the conventional RDP-test in the EIA diagnosis, namely: the possibility of using low-concentration viral preparations and high specificity.*

Conclusions and prospects for further research. *For the improvement of epizootic situation on EIA it is necessary to conduct the continuous diagnostic researches with the maximal scope of horse population and performe preventive measures to control this disease.*

Keywords: *infectious anemia, radial hemolysis reaction, sensitized erythrocytes, Difco agar, culture antigen.*

REFERENCES

1. Coggins, L., & Norcross, N. L. (1972). Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.*, 33, 1, 11-18.
2. Coggins, L., & Norcross, N. L. (1970). Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Jornell Vet.*, 3, 330-335.
3. Nagarajan, M. M., & Simard, C. (2001). Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.*, 94, 97-109.
4. Sjurin V.N., Belousova R.V. & Fomina N.V. (1991). *Diagnostika virusnyh boleznej zhivotnyh [Diagnosis of viral diseases in animals]*. M.: Agropromizdat [in Russian].
5. Chajka, N.A. (1981). *Sovremennye metody immunologicheskoy diagnostiki virusnyh infekcij [Modern methods of immunological diagnostics of viral diseases]*. M.: VNIIMI [in Russian].