

**Метод виявлення вірусу ПГ-3 та антитіл до вірусу ПГ-3 в реакції імуноферментного аналізу.** Імуноферментний аналіз застосовують для виявлення специфічного антигену вірусу ПГ-3 у пробах клінічного та патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин і в культурі інфікованих клітин.

ІФА також застосовують для ретроспективної діагностики парагрипу-3 великої рогатої худоби шляхом виявлення специфічних антитіл у парних пробах сироватки крові хворих і перехворілих тварин.

Суть імуноферментної реакції полягає в специфічній взаємодії антитіл і антигену з наступним приєднанням до отриманого комплексу антивидового імуноглобуліну, міченого ферментом, здатним зумовлювати розпадання субстрату з утворенням кольорового продукту ферментативної реакції.

Склад наборів, хід дослідження і інтерпретація результатів описані фірмами-виробниками у відповідних настановах щодо застосування.

Облік результатів проводять візуально або спектрофотометрично.

**Висновки:** 1. Викладені методи прямої та ретроспективної діагностики парагрипу-3 можуть бути використані в лабораторіях ветеринарної медицини, навчальних закладах та науково-дослідних установах.

2. Своєчасна діагностики ПГ-3 зменшує до мінімуму економічні збитки в господарствах.

#### Список літератури

1. Стеценко, В. І. Особливості серологічної діагностики параінфлюенци-3 великої рогатої худоби [Текст] / В. І. Стеценко // Ветеринарія: Респ. міжвід. тематич. наук. зб. – К., 1975 – Вип. 41. – С. 15 – 20.
2. Стеценко, В. І. Мікрометод РЗГА при параінфлюенци-3 [Текст] / В. І. Стеценко // Ветеринарія: Респ. міжвід. тематич. наук. зб. – К., 1976. – Вип. 44 – С. 8 – 10.
3. Стеценко, В. І. Пневмоентерити великої рогатої худоби: діагностика та специфічна профілактика [Текст] / В. І. Стеценко, Л. І. Кучерявенко, Р. О. Кучерявенко // Наук. вісник Нац. аграрного ун-ту. – К., 2000. – Вип. 28.- С. 72 – 73.
4. Методические рекомендации по дифференциальной диагностике респираторных и желудочно-кишечных заболеваний телят вирусной и бактериальной этиологии / П. А. Красочко, Н. В. Савицкий, Н. А. Ковалев и др. [Текст] // Минск, Энциклопедикс, 2000. – 32 с.
5. Стеценко, В. И. Разработка средств диагностики и специфической профилактики вирусных пневмоэнтеритов телят // Совр. вопр. пат. с.х ж-х /Сб. матер. междунар. научно-практ. конф. 23-24 окт 2003, РНИУП Интс. эксп. вет. им Вышелесского НАН Беларуси, - Минск, 2003, – С. 276-277.

#### METHODS OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF BOVINE PARAINFLUENZA-3

Kucheryavenko V.V.

NSC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary medicine», Kharkiv

*Information concerning traditional and new methods of parainfluenza-3 diagnostics, including methods, where diagnosticums, developed in the virology department of the NSC «IECVM» are used, is presented in the paper.*

УДК 619:578.834.1:636.2:616-076

#### **ВИЯВЛЕННЯ АНТИГЕНУ КОРОНАВІРУСУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

Кучерявенко Р.О.

ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» УААН,  
м. Харків

*У статті викладені методи виявлення й ідентифікації коронавірусу великої рогатої худоби, що сприяють своєчасній діагностиці цієї інфекції, яка наносить значні економічні збитки скотарським господарствам. Описана методика відбору проб, виділення вірусу на культурі клітин, індикації за допомогою електронної мікроскопії та виявлення його в реакції гемаглютинації та зустрічного імуноелектрофорезу.*

Коронавірусна інфекція ВРХ – гостро перебігаюче, висококонтагіозне вірусне захворювання новонародженого молодняка ВРХ, яке характеризується профузним проносом, дегідратацією організму, розвитком катарального або катарально-гемо-

рагічного ентероколіту, виснаженням і високою летальністю. Економічні збитки, які наносить ця інфекція скотарським господарствам, складаються з загибелі та вимушеного забою молодняку, зниження його м'ясної продуктивності на відгодівлі, витрат на лікування хворих тварин. Успішне здійснення боротьби з коронавірусною інфекцією великої рогатої худоби досягається завдяки своєчасній лабораторній діагностиці [4].

Лабораторна діагностика коронавірусної інфекції великої рогатої худоби передбачає методи прямої діагностики – виділення чи виявлення коронавірусу або його антигену в клінічному та патологічному матеріалі й методи ретроспективної (серологічної) діагностики – виявлення антитіл до коронавірусу в сироватці крові й інших біологічних рідинах організму хворих і перехворілих тварин [1, 2, 3, 5]

Методи прямої лабораторної діагностики включають виділення коронавірусу в культурі клітин, ідикації коронавірусу за допомогою прямої й імунної електронної мікроскопії, виявлення коронавірусу в реакції гемаглютинації (РГА) та його ідентифікації в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА), виявлення коронавірусу в реакції зустрічного імуноелектрофорезу (РЗІЕФ), виявлення коронавірусу в реакції імунофлуоресценції (РІФ), виявлення коронавірусу в реакції імуноферментного аналізу (ІФА).

*Відбір проб.* Для виділення коронавірусу беруть проби клінічного та патологічного матеріалу від хворих, вимушено забитих і загиблих тварин.

Від хворих тварин беруть проби фекалій упродовж перших (24-48) годин з моменту появи ознак діареї. Від загиблих тварин відбирають відрізки різних ділянок тонкого відділу кишечника, перев'язані з обох кінців, кладуть у термос з льодом або хладоагентом і доставляють у лабораторію в той же день або наступної доби. Для тривалого зберігання (більше 1 доби) проби заморожують за температури мінус 20 °С та нижче.

Від хворих і перехворілих телят, а також корів-матерів отримують проби крові, які для тривалого зберігання (більше 3 діб) заморожують.

З метою ретроспективної діагностики парні проби крові беруть з інтервалом у часі: першу пробу в перші (2-3) доби хвороби, а другу – через 21 добу після першого відбору. Парні проби сироватки крові до дослідження заморожують і досліджують одночасно. Дозволяється зберігати сироватку крові до дослідження в замороженому стані до 3 міс.

Молозиво та молоко використовують у нативному вигляді або у вигляді сироватки, яку одержують після їх обробки сичужним ферментом.

*Метод виділення коронавірусу в культурі клітин.* Проби фекалій розморожують і, в залежності від консистенції, змішують у співвідношенні 1:5 – 1:10 з фізіологічним розчином, рН 7,0 – 7,2, центрифугують у рефрижераторній центрифугі за температури (4 – 6) °С, при (1500-2000) об/хв., упродовж 30 хвилин. Супернатант відбирають піпеткою в стерильні флакони, до якого додають антибіотики (пеніциліну натрієву сіль та стрептоміцину сульфату по 500 ОД на 1 см<sup>3</sup>) і залишають для контакту на (10-12) годин за температури (4-6) °С. Після цього проводять стерилізуючу фільтрацію отриманої рідини з використанням фільтрів з розміром пор 0,2 мкм.

Отриманий матеріал перевіряють на стерильність і використовують для зараження культури клітин або зберігають до дослідження у замороженому стані до 1 місяця. Для вірусовиділення використовують перещеплювані культури клітин нирки вівці (НВ) або нирки теляти (НТ), вирощені в пробірках. Попередньо культуру клітин тричі відмивають від залишків сироватки розчином Хенксу з антибіотиками (по 200 ОД на 1 см<sup>3</sup> пеніциліну натрієвої солі та стрептоміцину сульфату) і заливають поживним середовищем з (3-5) мкг/см<sup>3</sup> трипсину, залишаючи на 2 години за температури 37 °С до інокуляції досліджуваного матеріалу.

У досліджуваний матеріал додають (5-7) мкг/см<sup>3</sup> трипсину та інокулюють його по 1,0 см<sup>3</sup> у кожную пробірку з культурою клітин, попередньо зливаючи підтримуюче поживне середовище. Після контакту (1,5-2) години за температури 37 °С досліджуваний матеріал зливають, а в кожную пробірку додають по 1,0 см<sup>3</sup> підтримуючого поживного середовища з (3-5) мкг/см<sup>3</sup> трипсину та залишають на (5-7) діб за температури 37 °С,

перевіряючи щодобово на наявність цитопатогенної дії вірусу (ЦПД) під світловим мікроскопом. З метою отримання остаточного висновку щодо наявності коронавірусу в пробах досліджуваного матеріалу проводять не менше 3-х „сліпих” пасажів.

Першою ознакою репродукції та накопичення коронавірусу в інфікованій культурі клітин є позитивна реакція гемадсорбції, завдяки його здатності аглютинувати еритроцити півнів, щурів і мишей. У разі виділення вірусу його ідентифікацію проводять з використанням специфічної антикоронавірусної сироватки в реакції затримки гемадсорбції, зустрічного імуоелектрофорезу або методом електронної й імуоелектронної мікроскопії.

*Індикація коронавірусу за допомогою електронної та імуоелектронної мікроскопії.* Під час пошуку коронавірусних частинок у матеріалі необхідно враховувати крихкість пепломерів, які можуть відриватися при тривалому зберіганні, а також при заморожуванні з наступним відтаванням інфекційного матеріалу. Навіть дотримуючись своєчасної процедури підготовки проб фекалій до дослідження можуть зустрічатися препарати, в яких віріони частково або повністю позбавлені пепломерів. Ідентифікація вірусу в цих випадках ускладнена. Значний поліморфізм вірусу також створює труднощі морфологічної оцінки. Таким чином результати електронної мікроскопії необхідно враховувати й оцінювати в комплексі з іншими тестами.

Для індикації коронавірусів використовують прямий метод електронної мікроскопії, при якому ультрацентрифугування не застосовують, щоб уникнути відриву пепломерів від вірусних часток, а концентрують їх шляхом обробки сульфатом амонію. З цією метою 4 см<sup>3</sup> 10 % суспензії фекалій, освітленої низькошвидкісним центрифугуванням (3000 об/хв, впродовж 30 хв.), змішують з 6,6 см<sup>3</sup> насиченого розчину 60% сульфату амонію. Витримують 1 годину за температури 4°C й потім центрифугують упродовж 10 хв. при (5000- 6000) об/хв. Надосадову рідину видаляють, а осад ресуспендують у 4 краплях дистильованої води.

Контрастування проводять краплинним способом. Для цього на предметному склі змішують рівні об'єми обробленого досліджуваного матеріалу й розчину контрастєру, у якості якого застосовують 2 % фосфорно-вольфрамову кислоту. Краплю суміші наносять на сіточку, вкриту 2 % розчином колодію в амілацетаті. Через 40 сек. надлишок вологи видаляють фільтрувальним папером, препарат висушують протягом (15-20) хв. за температури (20-24) °C.

Перегляд сіточок в електронному мікроскопі проводять при збільшенні 50 тис.

Імунна електронна мікроскопія (ІЕМ) у десятки разів більш чутлива в порівнянні з прямою електронною мікроскопією у зв'язку з можливістю візуалізації коронавірусних частинок, які агреговані імунною сироваткою. Під час постановки ІЕМ застосовують гіперімунну сироватку крові теляти або сироватку крові реконвалесцентів з високим титром специфічних антитіл (не менш 1:32 - 1:64 в реакції нейтралізації).

Для ідентифікації вірусу попередньо з'єднують сироватку в об'ємі 0,2см<sup>3</sup>і 0,1 см<sup>3</sup> у розведеннях: 1:10 і 1:100 з 10 % суспензією досліджуваних фекалій в обсязі 0,8 і 0,9 см<sup>3</sup> відповідно. Суміш інкубують за 37°C упродовж 60 хв., після чого залишають за 4° C на (8- 12) годин. Потім роблять осадження імунних комплексів шляхом центрифугування за 6000 об/хв. упродовж 30 хв. Отриманий осад ресуспендують у декількох краплях дистильованої води і препарат контрастують за вищевказаною методикою.

Роблять перегляд не менше 5 полів зору опорної сіточки. Ступінь покриття одиночних або агрегованих часток антитілами сироватки оцінюють умовно від “0” до 4- х хрестів («0» – відсутність антитіл на поверхні вірусних часток; два, три й чотири хрести – більше або менше покриття окремих вірусних часток або агрегатів частинок антитілами).

*Виявлення коронавірусу в реакції гемаглютинації (РГА).* Коронавірус виявляють у суспензії фекалій за допомогою реакції гемаглютинації, яку ставлять у планшетах. З цією метою в лунки вносять за допомогою піпетки 25 мкл фізіологічного розчину й роблять серійні розведення фекальної суспензії попередньо освітленої низькошвидкісним центрифугуванням 2000 об/хв упродовж 15 хвилин. Після цього в лунки вносять по одній краплі 1% суспензії еритроцитів, панель обережно струшують і залишають за кімнатної температури до повного осідання еритроцитів у конт-

ролі. На спонтанну аглютинацію еритроцитів у лунки вносять по одній краплі фізіологічного розчину й 1% суспензію еритроцитів.

При позитивній РГА в розведенні 1:16 і вище специфічність фекального гемаглютиніну встановлюють у РЗГА зі специфічною антикоронавірусною сироваткою або сироваткою тварин-реконвалесцентів. Дослідження повторюють у такий спосіб. У першому ряді лунок готують серійні розведення випробуваного матеріалу на фізіологічному розчині, як і в попередньому дослідженні. У другому ж ряді лунок замість фізіологічного розчину вносять по одній краплі специфічної антикоронавірусної сироватки в розведенні 1:10, на якій також готують серійні розведення фекального матеріалу, що містить гемаглютинін. Панелі залишають для контакту на 1 годину за 37°C, після чого в усі лунки вносять по дві краплі 1% суспензії еритроцитів і враховують результати через 45 хвилин після повного осідання еритроцитів за температури (20-24) °С.

Зниження титру фекального гемаглютиніну в 4 і більше разів у ряді зі специфічною сироваткою служить підставою для підтвердження його коронавірусної природи.

*Метод виявлення коронавірусу в реакції зустрічного імуноелектрофорезу (РЗІЕФ).* Принцип методу заснований на утворенні в гелевому середовищі видимого преципітату в результаті зустрічного руху під впливом електричного струму гомологічних антигенів і антитіл.

Реакція зустрічного імуноелектрофорезу завдяки високій чутливості, специфічності та простоті постановки з успіхом застосовується для експрес-діагностики коронавірусної інфекції. РЗІЕФ проводять в апаратах для електрофорезу. До складу тест-системи для індикації коронавірусного антигену в пробах клінічного та патологічного матеріалу входять: специфічна коронавірусна антисироватка телят з титром антитіл не нижче 1:64, сироватка телят, без антитіл до коронавірусу, чи ембріональна теляча сироватка, культуральний антиген коронавірусу з гемаглютинуючою активністю 1:128-1:512, культуральна рідина з незараженими клітинами (негативний антиген).

У якості гелевого покриття використовують суміш з рівних частин сухого агару Діфко та сухої агарози. Гель готують у вигляді 1 % розчину на трис-барбіталовому буфері, рН 8,6, з іонною силою 0,05.

Для приготування трис-барбіталового буферу, рН 8,6, 0,05М беруть 2 розчини наступного складу:

I розчин:	барбітал	10,31 г
	дистильована вода	1,0 л
II розчин:	трис-(оксиметил)/амінометан	6,057 г
	дистильована вода	1,0 л

Обидва розчини змішують у рівних об'ємах, рН доводять до 8,6 за допомогою 0,1 N соляної кислоти, фільтрують через паперовий фільтр і зберігають за температури +4° С.

Для приготування гелевого покриття беруть рівні частини агару й агарози, заливають трис-барбіталовим буфером у кількості, необхідній для одержання 1 % концентрації (на 1 л буферу – 50 г агару і 50 г агарози) і розплавляють на водяній бані. Фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають по 30,0 см<sup>3</sup> у стерильні скляні флакони. Зберігають під гумовими пробками за температури +4° С не більше 6 міс.

*Постановка реакції.* На ретельно знежирену скляну пластинку розміром 9x12 см наливають 20,0 см<sup>3</sup> розпавленої й охолодженої до 50°C 1%-вої агаро-агарозної суміші на трис-барбіталовому буфері. Товщина гелю на склі повинна становити (2-3) мм. Після застигання гелю в ньому по заздалегідь наміченому трафареті за допомогою пробійника прорізають лунки, розташовані паралельними рядами. Діаметр лунок дорівнює 4 мм, відстань між їхніми центрами – 1 см. Для виявлення антигену коронавірусу досліджуваний матеріал вносять у катодні лунки, а в анодні – специфічну коронавірусну антисироватку.

У три останні пари лунок вносять контрольні зразки: коронавірусний антиген і коронавірусну антисироватку; коронавірусний антиген і нормальну ембріональну сироватку; негативний антиген (культуральна рідина з незаражених клітин) і коронавірусну антисироватку.

Після заповнення лунок пластинки поміщають у камеру для електрофорезу таким чином, щоб ряди лунок з антитілами розташовувалися з “+” з'єднувальної колод-

ки блоку живлення, а ряди лунок з досліджуваними пробами фекалій і антигенами контролів – з “-” з’єднувальної колодки.

В електрофоретичну камеру заливають до 2/3 об’єму той же буфер, на основі якого виготовлено гель. Кювети з буфером і пластинки з’єднують смужкою фільтрувального паперу, змоченого буфером. Один кінець смужки фільтрувального паперу накладають майже впритул до наповнених лунок так, щоб вони щільно прилягали до поверхні гелевого шару. Інший кінець смужки фільтрувального паперу занурюють у буфер. Камеру підключають до блоку живлення. Електрофорез проводять за умови напруги 180 В і сили струму (15–20) мА упродовж 90 хвилин.

Через (15–20) хвилин після відключення приладу від електромережі витягають пластинку з електрофоретичної камери й переглядають її в проникаючому світлі. Реакцію враховують за наявності чіткої лінії преципітації в контролі – між коронавірусним антигеном і коронавірусною антисироваткою та відсутності її між коронавірусним антигеном і неімуною сироваткою теляти, а також негативним антигеном і коронавірусною антисироваткою.

Облік результатів ведуть за чотирихрестовою системою. Добре виражені й чіткі преципітати оцінюють на 3 і 4 хрести, а слабо виражені – на один і два хрести.

Для кращої візуалізації ліній преципітації імуноелектрофореграми фарбують. З цією метою відразу ж після закінчення електрофорезу пластинку обертають фільтрувальним папером і занурюють у фізіологічний розчин на (15–20) годин. Потім виймають з фізіологічного розчину, обережно звільняють від фільтрувального паперу й протягом (5–10) хвилин підсушують на повітрі за температури (20 – 25)°С. Фарбують 1%-вим розчином амідо-чорного барвника протягом (5–10) хвилин з наступним відмиванням 7%-вим розчином оцтової кислоти. Фарбування смуг преципітації можна робити також 1%-вим розчином таніну протягом 15 хвилин, після чого необхідно промити фізіологічним розчином і зробити остаточний облік реакції.

Інші методи, які використовуються в лабораторній практиці для діагностики коронавірусної інфекції, а саме: реакція гемаглютинації й ідентифікація вірусу в реакції затримки гемаглютинації, методи виявлення коронавірусу в реакції імунофлуоресценції та в реакції імуноферментного аналізу (методи виявлення антитіл до коронавірусу в реакції затримки гемаглютинації та імуноферментному аналізу описані в СОУ 85.20-37-308:2005 «Велика рогата худоба. Методи лабораторної діагностики коронавірусної інфекції»).

**Висновки:** У статті викладені методи виявлення й ідентифікації коронавірусу, що сприяють сучасній діагностиці коронавірусної інфекції, яка наносить значні збитки тваринницьким господарствам.

#### Список літератури

1. Методические рекомендации по лабораторной индикации и лечебно-профилактическим мероприятиям при рота- и коронавирусных энтеритах новорожденных телят / В.И. Стеценко, Е.В. Андреев, З.П. Наумец, В.Н. Коновалов, Л.П. Тризна, С.И. Вовк / УНИИЭВ. – Харьков, 1983. – 18 с. 2. Методические рекомендации по применению метода иммуноферментного анализа для выявления коронавируса и специфических антител / Г.Ф. Коромыслов, В.С. Авилов, Л.А. Мникова, М.М. Гоголев, А.М. Егоров, Б.Б. Дзантиев / ВАСХНИЛ – Москва, 1984. – 11 с. 3. Серологические и вирусологические исследования рота-коронавирусных инфекций при диареях новорожденных телят [Текст] / В.И. Стеценко, С.И. Вовк, Л.П. Тризна, В.Н. Коновалов // Ветеринария: Респ. межвед. тематич. науч. сб. – К., 1986. – Вып.61. – С.20-23. 4. Диагностика, профилактика и лечение желудочно-кишечных болезней телят: Рекомендации / А.М. Карпуть, Ю.Г. Зелютков, Г.Ф. Макаревич – Горки: Витебский ветеринарный институт, 1993. – 48 с. 5. Стеценко, В.И. Удосконалення серологічної діагностики коронавірусної інфекції в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА) [Текст] / В.И. Стеценко, Л.П. Тризна // Вет. медицина: Міжвід. тематич. наук. зб. – К., 1994. – Вып. 69. – С. 76-80.

## DETECTION OF BOVINE CORONAVIRUS ANTIGEN

Kucheryavenko R.O.

NSC “Institute of Experimental and Clinical veterinary Medicine”, Kharkiv

*Methods of detection and identification of bovine coronavirus, which ensure timely diagnostics of this infection, are presented in the paper. Methods of sampling, virus isolation on cell culture, virus indication with the help of electronic microscopy and its detection in the reaction of hemagglutination and counterimmunoelectrophoresis are described in the paper.*