

Coyne C.P., Lowe B.S., Pelletier N., Raub E.M., Erickson H.H.- Am J Vet Res. — 1992. — № 53. — P. 742-747. **19.** Frusemide attenuates the exercise-induced rise in pulmonary capillary blood pressure in horses / Manohar M., Hutchens E., Coney E. — Equine Vet J. — 1994. — № 26. — P. 51-54. **20.** Effects of furosemide on the racing times of horses with exercise-induced pulmonary hemorrhage / Soma L.R., Laster L., Oppenlander F., Barr-Alderfer V. — Am J Vet Res. — 1985. — № 46. — P. 763-768. **21.** Manohar M., Furosemide attenuates the exercise-induced increase in pulmonary artery wedge pressure in horses // Am J Vet Res. — 1993. — № 54. — P. 952-958. **22.** Exercise-induced pulmonary hemorrhage in racing Thoroughbreds: a preliminary study / Pascoe J.R., Ferraro G.L., Cannon J.H., Arthur R.M.- Am J Vet Res. — 1981. — № 42. — P. 703-707. **23.** Effects of frusemide on pulmonary capillary pressure in horses exercising on a treadmill / Gleed R.D., Ducharme N.G., Hackett R.P., Hakin T.S., Erb H.N., Mitchell L.M., Soderholm L.V. — Equine Vet J Suppl. — 1999. — № 30. — P. 102-106.

HORSES LOAD-INDUCED PULMONARY HEMORRHAGES (the literary review)

Litarov V.Ye., Pyatkina E.A.
Kharkov State Zooveterinary Academy

The literary data about horses load-induced pulmonary hemorrhages, theories of occurrence and features of pathology are considers in the article.

УДК 616-003.811/577.217.5

УДОСКОНАЛЕННЯ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОГО МЕТОДУ ДІАГНОСТИКИ ГУБЧАСТОПОДІБНОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ (ГЕ ВРХ)

Ложкіна О.В.¹

Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики
та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

У статті висвітлено принцип імуногістохімічного методу діагностики ГЕ ВРХ, описано послідовність проведення випробувань з відбору матеріалу до інтерпретації результатів досліджень та впровадження методу на базі патоморфологічного відділу ДНДІ ЛДВСЕ з метою встановлення остаточного діагнозу на це захворювання.

Актуальність теми. На сьогоднішній день можливою є лише посмертна діагностика ГЕ ВРХ та інших пріонних інфекцій [1], яка спрямована на виявлення патологічного пріону (пріон-тести, імуногістохімія) та характерних губчато-подібних змін у головному мозку (гістологія). Імуногістохімічний метод є арбітражним, бо дає можливість найефективніше виявити патологічні пріони в мозку, навіть якщо його піддавали тривалому заморожуванню з подальшою фіксацією або мозок значною мірою аутолізований [2–4]. При позитивному чи сумнівному гістологічному діагнозі на ГЕ ВРХ [5] та у випадку неможливості проведення дослідження і встановлення діагнозу пріон-тестами, остаточний діагноз на ГЕ ВРХ встановлюється на підставі результатів імуногістохімічного дослідження [6].

На сьогодні у світі не існує єдиної стандартизованої методики імуногістохімічного виявлення патологічного пріонового антигену для діагнос-

¹ Науковий керівник – кандидат ветеринарних наук Г.Ф. Рижинко (ІВМ НААНУ)

тики трансмісивних енцефалопатій [7]. Методики, якими користуються в деяких країнах світу [8–11] ґрунтуються на основних принципах, суть яких полягає в якісному виявленні пріону (антигена) за допомогою первинних мишачих антитіл з наступною візуалізацією ділянок зв'язування антигенів з антитілами. Ці методики відрізняються між собою за чутливістю (способом демаскування), способом видалення ендегенної пероксидази, способом візуалізації та технікою приготування реагенту для візуалізації, затратами часу на проведення дослідження.

Мета роботи – удосконалення імуногістохімічного методу діагностики GE ВРХ, розробка процедур, що регламентують порядок проведення досліджень та впровадження методу в роботу патоморфологічного відділу ДНДІЛДВСЕ з метою проведення арбітражних досліджень на GE ВРХ.

Матеріали та методи досліджень. Для проведення досліджень відбирали стовбурову частину головного мозку (ділянку затулки) великої рога-тої худоби, віком старше 24 місячного віку, що підлягала обов'язковому діагностичному чи моніторинговому дослідженню на GE ВРХ. Отриманий матеріал досліджували на GE ВРХ гістологічним методом та експрес-методами (Prionics®-Check PrioSTRIP, Prionics®-Check Westrn). Відпрацювання імуногістохімічного методу виявлення патологічної ізоформи пріонного білку PrP^{Sc}, проводили з використанням стандартних позитивного та негативного щодо GE ВРХ контролів.

Результати досліджень. У результаті проведеної роботи розроблено наступну методику: на першому етапі проводиться гістологічна обробка тканин (виготовлення гістопрепаратів) [6] (протокол 1).

Протокол 1 – Гістологічна обробка тканин Підготовка проб

1. Фіксація в 10% сольовому розчині формаліну (розчин змінювали через 7 днів)	14 днів
2. Вирізання шматочків	
3. Фіксація в 10% сольовому розчині формаліну	24 години
Обробка 98% мурашиною кислотою	1 година
Гістологічна обробка тканини	
1. Промивання у проточній воді (t=20-25°C)	120 хвилин
2. Промивання у проточній воді (t=20-25°C)	60 хвилин
3. Знежирення 70°спиртом (t=20-25°C)	90 хвилин
4. Знежирення 80°спиртом (t=20-25°C)	90 хвилин
5. Знежирення спиртом I 96° (t=20-25°C)	60 хвилин
6. Знежирення спиртом II 96° (t=20-25°C)	60 хвилин
7. Знежирення спиртом III 96° (t=20-25°C)	60 хвилин
8. Зневоднення органічним розчинником (t=20-25°C)	90 хвилин
9. Зневоднення органічним розчинником (t=20-25°C)	90 хвилин
10. Ущільнення у парафіні гістологічному I (t=62°C)	120 хвилин
11. Ущільнення у парафіні гістологічному (t=62°C)	120 хвилин
12. Формування парафінових блоків	
13. Мікротомування (товщина зрізу 2-3 μm)	

З кожного дослідного зразка роблять два зрізи.

Для контролю правильності проведення пробопідготовки (видалення фіксатора, знежирення, зневоднення, просочування парафіном) та якості реактивів використовували позитивний контроль – зріз із референтного (позитивного щодо ГЕ ВРХ) матеріалу. Цей контрольний зріз разом з одним дослідним зразком обробляли моноклональним анти-пріон-протеїновим антитілом SAF 84 (SPI bio кат. № 0101, Франція).

Для виявлення ступеню неспецифічного фарбування використовували негативний контроль – зріз із референтного (негативного щодо ГЕ ВРХ) матеріалу. Цей негативний контроль та другий дослідний зріз обробляли реактивними моноклональними мишачими Ат, синтезованими у тканинній культурі, підкласу IgG2b (Dako Cytomation №X 0944).

Імуногістохімічне фарбування проводилося за протоколом 2 з використанням набору для тваринних тканин К 3954, Dako.

Протокол 2 – Депарафінізація та імуногістохімічне фарбування зрізів

Депарафінізація

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. Обробка органічним розчинником | 2 x 5 хвилин |
| 2. Обробка 96%спиртом | 2 x 5 хвилин |
| 3. Промивання у проточній воді | 2 x 5 хвилин |
| 4. Обробка 98% мурашина кислота | 5 – 7 хвилин |
| 5. Промивання у проточній воді | 5 хвилин |
| 6. Промивання у дистильованій воді | 2 x 5 хвилин |
| 7. Автоклавування у ФБР ¹ в паровому стерилізаторі STERIDENT (121°C) | 20 хвилин |
| 8. Охолодження | При кімнатній температурі |

Імуногістохімічне фарбування

- | | |
|--|--------------|
| 1. Промивання у ФБР ¹ (0,1М рН 7,4) | 10 хвилин |
| 2. Обробка 3% H ₂ O ₂ в метанолі | 5-7 хвилин |
| 3. Промивання у ФБР ¹ (0,1М рН 7,4) | 3 x 5 хвилин |
| 4. Обробка протеїназою К (100 µl) | 10 хвилин |
| 5. Промивання у ФБР ¹ (0,1М рН 7,4) | 3 x 5 хвилин |
| 6. Обробка біотинилуючим реагентом (100 µl) | 15 хвилин |
| 7. Промивання у ФБР ¹ (0,1М рН 7,4) | 3 x 5 хвилин |
| 8. Обробка стрептовідин пероксидазою (100 µl) | 15 хвилин |
| 9. Промивання у ФБР ¹ (0,1М рН 7,4) | 5 хвилин |
| 10. Обробка діамінобензидином (100 µl) | 5 хвилин |
| 11. Промивання у ФБР ¹ (0,1М рН 7,4) | 5 хвилин |
| 12. Промивання у дистильованій воді | 5 хвилин |
| 13. Фарбування | |
| 14. Фарбування гематоксиліном Маєра (водний) | 5 хвилин |
| 15. Промивання у дистильованій воді | 2 x 5 хвилин |
| 16. Заклучення у заключаюче водне середовище | |

Інтерпретація результатів. У позитивних випадках патологічний пріон – збудник ГЕ ВРХ мікроскопічно виявляється у вигляді гранул, зерен, бля-

шок, зірочок коричневого кольору, розташованих перинейрально, внутрішньонейрально (навколо ядра) та лінійно — за ходом відростків нейронів. Мозкова тканина зафарбована в світло-синій колір.

Діагноз вважається негативним якщо при мікроскопічному дослідженні в тканині мозку патологічний пріон не виявлено.

У результаті проведеної роботи отримали чітко позитивну (рис.1) та чітко негативну (рис.2) реакції контрольних зрізів (що свідчить про достовірність проведення методики) та негативну реакцію (рис 3) у дослідних зразках, що свідчить про те, що у дослідному матеріалі патологічного пріону не виявлено.

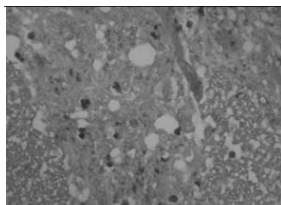


Рис.1 Позитивний контроль

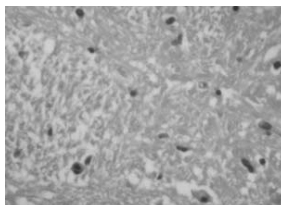


Рис.2 Негативний контроль

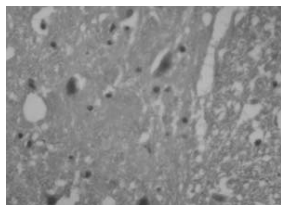


Рис.3 Дослідний матеріал

Запропонований нами імуногістохімічний метод діагностики ГЕ ВРХ має такі переваги перед аналогами:

- для відновлення патологічного пріон-протеїну використовують комбінований ферментативно-термічний регламент, який полягає у інкубації зразків з розчином 98 % мурашиної кислоти, протеїнази К та автоклавування;

- використання першого антитіла SAF 84 та високочутливої системи візуалізації (ARK – Animal Research Kit), спеціально розробленої для роботи із тваринними зразками, дозволяє значно підвищити специфічність та чутливість методу. Система візуалізації створена на основі авідин-біотинного та стрептавідин-пероксидазного методів, поєднання яких суттєво зменшує ймовірність неспецифічного зв'язування антитіл;

- перед нанесенням первинних антитіл на зразки ці антитіла *in vitro* з'єднують з біотинилуючим реагентом — модифікованим біотинильованими анти-мишачими імуноглобулінами, в результаті чого первинні антитіла зв'язуються з біотинильованими вторинними антитілами. Потім у розчин вносять блокуючий реагент, що містить нормальну мишачу сироватку. Імуноглобуліни останньої зв'язуються з залишком біотинильованого реагенту, що не зв'язався з первинними антитілами. При цьому мінімізується можлива взаємодія біотинильованого реагенту з ендogenous протейном досліджуваного зразка, що виключає можливість виникнення неспецифічної реакції;

- за рахунок удосконалення технологічних принципів при здійсненні досліджень максимальна тривалість імуногістохімічного фарбування становить 4-5 год.

Слід відзначити, що запропонована нами методика схвалена Європейською референтною лабораторією з діагностики трансмісивних

спонгіформних енцефалопатій м. Вейбридж (Англія), за результатами проведених досліджень одержано патент України № 33945, 2008. З використанням цієї методики успішно проводяться дослідження у науково-дослідному патоморфологічному відділі ДНДІ ЛДВСЕ з метою встановлення остаточного діагнозу на ГЕ ВРХ.

Висновки. Розроблена методика імуногістохімічної діагностики ГЕ ВРХ є високоефективною, достовірною, легко відтворюється та може бути впроваджена в діагностичній мережі в якості арбітражної (для встановлення остаточного діагнозу на ГЕ ВРХ)

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть проводитись з метою стандартизації методики та акредитації її в міжнародній системі акредитації DAP.

Список літератури

1. Діагностика губчастоподібної енцефалопатії великої рогатої худоби: методичні рекомендації / [Влізло В.В., Вербицький П.І., Вержиковський та ін.].— К., 2007 — 61с.
2. Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. / Haritani M., Spencer Y.I. & Wells G.A.H.: Acta Neuropathol. — Berl. , 1994. — 90 p. 3. Immunohistochemistry of PrPsc Within Bovine Spongiform Encephalopathy Brain Samples with Graded Autolysis / Sabine O.S. Debeer, Thierry G.M. Baron, and Anna A. Bencsik: Volume 49(12): 1519-1524. 2001. — The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 4. Transmissible Spongiform Encephalopathy Diagnosis Using PrPsc Immunohistochemistry on Fixed but Previously Frozen Brain Samples/ Sabine O.S. Debeer, Thierry G.M. Baron, and Anna A. Bencsik: 50(5): 611-616, 2002. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 5. Інструкція щодо діагностики, профілактики та боротьби з губчастоподібною енцефалопатією великої рогатої худоби / П.І. Вербицький, В.М. Горжеєв, та ін. — Київ, 2008. — 7 с. 6. Методичні вказівки з гістологічної діагностики губчастоподібною енцефалопатії великої рогатої худоби / Абрамов А.В., Ложкіна О.В., Калиновська І.Г. /— К., 2007 — 27с. 7. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [http://www.oie.int/]. 8. Standard operating procedure for detection of prion protein (PrP) in brain and lymphoid tissue of ruminant livestock using monoclonal antibody immunohistochemistry. — 2001. — VMRD, Inc., PULLMAN TSE_IHC/99. 9. Instructions/ The DAKO ARK™ (Animal Research Kit), Peroxidase. For Mouse Primary Antibodies. 10. Gu J, et al. A primary-secondary antibody complex method of immunohistochemistry using rabbit polyclonal antibodies to detect antigens in rabbit tissue. Cell Vision, 1995. — 2 (1): 52. 11. Sabine Debeer, Thierry Baron, Anna Bencsik. Neuropathological characterization of French bovine spongiform encephalopathy cases //Histochem Cell Biol. — 2003. — 120: 513-521.

THE IMPROVEMENT OF IMMUNOHISTOCHEMICAL METHOD OF DIAGNOSTIC OF BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY IN CATTLE (BSE IN CATTLE)

Lozhkina O.V.

State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Vet.-San. Expertise, Kyiv

The article describes the principle of immunohistochemical method of diagnostic of bovine spongiform encephalopathy in cattle, the test procedure protocol is explained, beginning from the sampling to the interpretation of the results, and finally the introduction of the method to the pathomorphology department of State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Vet.-San. Expertise in order to ascertain the final diagnosis of BSE.