

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРОЛОГІЧНИХ ДІАГНОСТИЧНИХ ТЕСТІВ
ПРИ РИНОПНЕВМОНІЇ КОНЕЙ

Галатюк О.Є., Бегас В.Л.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Точна діагностика герпесвірусної інфекції у коней завжди відіграє вирішальну роль в проведенні комплексу заходів щодо боротьби з нею, проведення вакцинації тощо. Серологічні методи діагностики відіграють при цьому провідну, і дуже часто, вирішальну роль. Варто відмітити, що в Україні для більшості діагностичних лабораторій вони займають основну частину, а іноді і єдиний можливий варіант діагностувати ринопневмонію коней. Високочутливі методи діагностики є дорогі, а отже недоступні для більшості діагностичних лабораторій. Серед діагностичних тестів, які можна використати при діагностиці ринопневмонії коней, не всі мають однакову ефективність. Отже існує необхідність порівняти діагностичні реакції при даній хворобі.

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання проблеми. Діагностика ринопневмонії коней включає в себе клінічний огляд, облік зростання випадків абортів а другій половині жеребності, виділення та ідентифікація вірусу на культурі клітин, виявлення антитіл методами ретроспективної діагностики [3]. Для ідентифікації герпесвірусів широко застосовують такі високочутливі методи дослідження генома як рестрикційний аналіз, секвенування, молекулярну гібридизацію [1, 4, 6]. Але вони найчастіше використовуються в спеціалізованих референс-лабораторіях. Таким чином для звичайних діагностичних вірусологічних лабораторій, що обробляють велику кількість зразків, основним діагностичним тестом залишається методика виділення вірусу з клітинної культури, з

наступною серологічною ідентифікацією виділених вірусів [6]. Оскільки ГВК-1 і ГВК-4 мають багато спільних антигенів, неможливо визначити інфікуючий агент жодним із існуючих серологічних методів (РЗК, РН, ІФА), які виявляють антитіла до компонентів вірусу. Серологічна діагностика базується на основі демонстрації суттєвого збільшення титрів антитіл в парних сироватках, що зібрані на стадії гострої форми хвороби і на стадії видужування. Перший зразок потрібно відбирати щонайшвидше після появи клінічних ознак, другий - через 3-4 тижні. Тим не менше демонстрація будь-яким тестом чотирьохкратного чи більшого підвищення титру антитіл до ГВК-1 чи ГВК-4 на протязі клінічної хвороби забезпечує серологічне підтвердження нещодавньої інфекції одним з вірусів, а при груповому дослідженні - наявність чотирьохкратного збільшення не менше ніж в 25-30% проб [2].

Реакцію дифузійної преципітації (РДП) раніше застосовували для діагностики ринопневмонії в Японії. Для цього використовували 1% сольовий агар, Реакцію ставили при кімнатній температурі в вологій камері, читали результати через 24 год. Найкращі результати були отримані при постановці реакції через 5-7 діб після клінічного прояву хвороби. Негативна сторона методу - як мінімум необхідно 18 год для постановки діагнозу [5].

Мета роботи - провести порівняльний аналіз застосування реакції гемаглютинації, реакції дифузійної преципітації та реакції нейтралізації для діагностики ринопневмонії коней.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження походились в лабораторії наукових досліджень кафедри мікробіології, вірусології та епізоотології факультету ветеринарної медицини Житомирського національного агроекологічного університету та на базі кінної частини НВП «Райз-Агро» с. Нагірянкa Тернопільської області Чортківського району. Для дослідження були використанні сироватки крові різновікових груп коней.

Постановка реакції затримки гемаглютинації (РЗГА). Сироватку перед дослідженням інактивували на водяній бані 30 хвилин при температурі 56-58°C. Для постановки реакції в усі лунки вносили по 0,02 см³ фізіологічного розчину, далі розтирали сироватку від 1:2 до 1:2048, перекачуючи її автоматичною піпеткою по 0,02 см³. В усі лунки вносили по 0,02 см³ вірусу, який містить 4 ГАО. Для перемішування компонентів плати струшували і через 60 хв термостатування при 37°C у всі луночки вносили по 0,02 см³ 0,5%-ї суспензії еритроцитів коня. Лишали при кімнатній температурі, читали реакцію через 3-4 години на білому фоні. Для контролю ставили в луночках:

- контроль робочої дози вірусу
- та еритроцити на спонтанну аглютинацію
- специфічності (постановка з нормальною і позитивною сироватками)

Постановка реакції дифузійної преципітації (РДП). При приготуванні агару додавали 1,5-2 г агару до 100 см³ 7,5% р-ну кухонної солі доведеної до кипіння, обережно помішували. Розливали прохолодий до 50-60°C агар по 15 см³ на чашку Петрі. Ставили в вологу камеру при температурі 24 °С. Облік реакції проводили через 24, 48, 72 години. Позитивна реакція характеризується утворенням специфічних ліній преципітації, які добре видно в проникаючому світлі. Як позитивну сироватку використовували сироватку, отриману шляхом гіперімуназації кролів.

Для постановки реакції мікронейтралізації використовували культуральний вірус з штаму «Буковина». Накопичення і визначення інфекційної активності вірусу та постановку РН проводили на культурі клітин трахеї теляти за мікрметодом у 96-лунокових мікропланшетах з постійною дозою вірусу.

Постановка реакції мікронейтралізації (РН). Проби дослідних сироваток з двократним розведенням розтирали від 1:2 до 1:256 на підтримуючому середовищі ГЛА у лунках мікропланшета в об'ємі 100 мкл. На кожне розведення використовували 2 ряди лунок. Для кожного нового розведення використовували стерильні чисті наконечники. Робоче розведення вірусу готували за результатами попередньо проведеного титрування з використанням того ж розчинника, що і для розведення сироваток з вмістом вірусу 100 ТЦД₆₀/см³. Робоче розведення вірусу в

об'ємі 100 мкл змішували з розведеннями сироваток у лунках 96 лункового планшету. Для контролю вірусу, у вільних лунках того ж мікропланшету, його робоче розведення змішували з рівним об'ємом підтримуючого середовища (100+100 мкл). Крім того для контролю робочої дози вірусу проводили титрування: вносили в лунки по 180 мкл підтримуючого середовища, в першу лунку вносили 20 мкл вірусу і в такій же кількості переносили його в наступні (розведення в 10 раз). Ставили також контроль гіперімунної та нормальної сироваток, при цьому гіперімунну сироватку розтитровували так як і дослідну. Для контролю токсичності дослідних сироваток їх вносили в розведенні 1:4 в лунки мікропланшету. Дослід супроводжували контролем інтактною культурою клітин. Суміш вірусу та розведень сироваток у лунках ретельно перемішували піпетуванням та інкубували у CO₂-інкубаторі при 37,5 °C протягом 60 хвилин. Потім уміст лунок послідовно переносили до мікропланшету з моношаром культури клітин та інкубували як вказано вище. Для контролю реакції моношар клітин кожен день переглядали під малим збільшенням інвертованого світлового мікроскопу. Терміном обліку реакції був час повного руйнування моношару в контрольних лунках з вірусом. Цитопатогенна дія вірусу проявлялась через 3 доби. Титр нейтралізуючих антитіл визначали як найбільше розведення сироватки, яке нейтралізувало цитопатогенну дію вірусу.

Результати власних досліджень та їх обговорення. Внаслідок порівняння результатів серологічних реакцій стало відомо, що у коней з титрами антитіл до ГВК-1 в РЗГА до 4 log₂ результати в РДП негативні. При рівнях титрів у РЗГА 5 і 6 log₂ РДП дає слабопозитивну або сумнівну реакцію, а чіткий позитивний результат у РДП отримується з сироватками крові, в яких титри антигемаглютининів не нижчі 8 log₂. Таким чином, результати в РДП корелюють з результатами, отриманими в РЗГА (r=0,8046). При цьому слід відмітити більш високу чутливість останньої при ретроспективній діагностиці ринопневмонії коней.

Реакцію дифузійної преципітації можна використовувати при комплексній діагностиці ринопневмонії коней, так як високі титри в РЗГА виявляються у коней з клінічними ознаками хвороби. Наявність низьких титрів Ат (1 - 6 log₂) в пробах сироватки крові в РЗГА не дає можливості їх виявити в РДП. Однак, РДП дуже проста в постановці і її можна рекомендувати як додатковий тест з метою виключення ринопневмонії при підозрі на цю інфекцію в районних державних лабораторіях ветеринарної медицини або для підтвердження діагнозу.

Ми також провели порівняльне дослідження 14 проб сироватки крові коней в РЗГА, РН та РДП до вірусу ринопневмонії, результати якого представлені в табл. 1.

Таблиця 1 - Результати досліджень сироватки крові коней в різних діагностичних реакціях на ринопневмонію ЗАТ НВП "Райз-Агро"

№	Кличка	Результати досліджень в		
		РН, log ₂	РЗГА, log ₂	РДП
1.	Бафіна	1	-	-
2.	Фахос	-	2	-
3.	Храбрец	1	0	-
4.	Феб	2	4	-
5.	Гурт	4	3	-
6.	Белград	5	4	-
7.	Безупречна	7	9	+
8.	Бабета	6	9	+
9.	Біва	6	10	+
10.	Фага	8	10	+
11.	Нан	-	-	-
12.	Танкіст	-	-	-
13.	Бандура	-	-	-
14.	Ембарго	-	-	-

Примітки: - - реакція негативна; + - реакція позитивна.

З представлених даних видно, що титри віруснейтралізуючих антитіл корелюють з титрами антитіл, що виявлені в РЗГА. Сироватки крові коней з високими титрами в РН і РЗГА були позитивними в РДП,

Таким чином, результати в РН корелюють з результатами в РЗГА ($r=0,9080$), а результати в РДП корелюють з результатами в РЗГА ($r=0,9151$); результати в РДП корелюють з результатами в РН ($r=0,8491$), при дослідженні на РПК, Дані діагностичні тести можна використовувати при проведенні масштабних досліджень для визначення ступеня поширеності герпесвірусної інфекції першого типу серед коней. Реакцію дифузійної преципітації можна використовувати при комплексній діагностиці ринопневмонії коней, при наявності клінічних ознак хвороби.

Було проведено також порівняння результатів досліджень сироватки крові в РЗГА, РН, РДП з ІФА. При постановці ІФА був використаний діагностичний набір іспанського виробництва.

Таблиця 2 - Результати порівняльного дослідження сироватки крові коней в РЗГА, РН, РДП та ІФА до ГВК-1 ЗАТ НВП "Райз-Агро"

№	Кличка	Результати досліджень в			
		РЗГА, \log_2	РН, \log_2	РДП	ІФА
	Безупречна	9	7	позитивна	позитивна
	Бархатна	негативна	негативна	негативна	негативна
	Бодана	10	не досліджували	позитивна	позитивна
	Гурт	3	4	негативна	негативна
	Фахос	0	2	негативна	негативна
	Вигода	9	не досліджували	позитивна	позитивна
	Бабета	9	4	позитивна	позитивна
	Бива	10	4	позитивна	позитивна
	Ваг	9	не досліджували	позитивна	позитивна
	Тамала	9	не досліджували	позитивна	позитивна

З даних табл. 2 видно, що результати серологічних досліджень в РЗГА співпадають на 90% ($r=0,9752$), а результати в РН - на 66,67% ($r=0,7006$) з результатами ІФА у сироватках крові тварин з високими титрами антитіл до ГВК-1 в РЗГА були виявлені преципітуючі антитіла в РДП, які співпадають на 100% ($r=1$) з результатами ІФА.

Таким чином, нами розроблено дві реакції - РДП та РН (мікрометод), які необхідно впроваджувати у виробництво, так як на сьогоднішній день в Україні існує брак власних діагностичних тестів, які можна використовувати для діагностики ринопневмонії коней.

Висновки:

1. Результати досліджень в ІФА корелюють з результатами в РДП, РН та РЗГА.

2. Розроблені нами реакцію дифузійної преципітації та нейтралізації доцільно використовувати при комплексній діагностиці ринопневмонії коней.

Перспективи подальших досліджень. Буде вивчатись епізоотична ситуація в кінних господарствах України та ураження різновікових груп коней за допомогою реакції дифузійної преципітації та реакції затримки гемаглютинації.

Список літератури:

1. Забегина Е.Ф. Типирование герпесвирусов лошадей методом рестрикционного анализа ДНК и изыскание вакцинного штамма: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.-М.: 1998.-24с.

2. Юров К.П. Герпесвирусные инфекции // Инфекционные болезни лошадей. - М., 2000. - С. 18-37.

3. A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. / B.S. Crabb, C.M. MacPherson, G.H. Reubel, G.F. Browning, M.J. Studdert, and H.E. Drummer // Arch. Virol. - 1995. - №140. - P. 245-253.

4. Allen G.P. Equine rhinopneumonitis // OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 4th edn., Eds: M. Trusczyński, J.E. Pearson, S. Edwards and B. Schmitt, OIE Press. - Paris. - 2000. - P. 565-575.

5. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Titration of Antibody to Equine Herpesvirus Type 1 / T. Sugiura, T. Kondo, T. Matsumura, H. Imagawa, M. Kamada, T. Ihara // J. Equine Sci. - 1997 - Vol.8. - №3. - P. 57-61.

6. Official site of O.I.E. [Электрон, ресурс]. - спосіб доступу:
URL:http://www.oie.int/eng/en_index.htm.

Рецензент - д.вет.н., професор Касич В.Ю.