

М.Л. РАДЗИХОВСЬКИЙ, аспірант

Науковий керівник - д-р вет. наук, професор О.Є. ГАЛАТЮК

Державний агроекологічний університет, м. Житомир

ВИКОРИСТАННЯ РДП ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ У КОНЕЙ ГЕРПЕСВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ДРУГОГО ТИПУ

Встановлено у 55% сироваток крові наявність специфічних антитіл до антигену герпесвірусу коней другого типу в реакції дифузної преципітації. Як антиген використовували культурний антиген вірусу підтипу LR-10 другого типу.

Актуальність. Герпесвірусні інфекції коней - це гострі інфекційні хвороби, спричинювані герпесвірусами, які клініко-анатомічно характеризуються різнотипним проявом від локального везикулярного висипу на епітеліальних покритвах до системного ураження тканин і органів, від легкого перебігу до гострого спалаху з масовими абортами [1].

На сьогодні для діагностики герпесвірусів коней використовуються такі реакції: нейтралізації (РН), імуофлуоресценції (РІФ), затримки гемаглютинації (РЗГА), полімеразна ланцюгова (ГТЛР), зв'язування комплементу (РЗК), дифузної преципітації (РДП), імуоферментний аналіз (ELISA-метод) [1, 2]. Для діагностики герпесвірусу другого типу (ГВК-2) в Європі використовується ПЛР [3-5]. В Україні ГВК-2 не діагностують. Нами було встановлено непридатність РЗГА для діагностики ГВК-2, можливо через малу кількість гемаглютинуючих антитіл. ПЛР, РН та ELISA-метод - досить дорогі і вимагають обладнання спеціальної лабораторії. РДП - більш проста в постановці і дозволяє об'єктивно оцінити наявність специфічних антитіл у сироватці крові, тому актуальною є розробка та впровадження її для діагностики герпесвірусу коней другого типу.

Мета роботи - розробка технології отримання специфічного антигену на культурах клітин та виявлення можливості його використання для діагностики ГВК-2 в РДП.

Матеріал і методи досліджень. Для отримання культурального антигену використовували перещеплювані культури клітин фібробластів шкіри коня та трахеї теляти. До цих культур була проведена адаптація підтипу LR-10 другого типу герпесвірусу коней. ЦГД проявилася на 7-9-й дні після зараження культур клітин. Вірусний матеріал тричі заморожували і концентрували зворотним діалізом. Потім були проведені дослідження з виявлення оптимальної кон-

центрації антигену, за якої можливе проведення реакції дифузної преципітації.

У чашки Петрі заливали рівномірно 1%-ний агар у кількості 12,5 мл. Після охолодження за допомогою металевої матриці вирізали лунки (рис. 1), компресором відсмоктували частину агару з лунок, після чого над спиртівкою розігрівали лунки з агаром, щоб вони краще трималися скла. У центральну лунку вносили антиген, у дві протилежні - позитивні сироватки, в інші - негативні або дослідні проби. Після цього чашку поміщали у вологу камеру термостата на 24-48 год при температурі 23°C. Реакцію вважали позитивною, якщо в агарі між лунками з дослідними сироватками і антигеном утворювалися лінії преципітації, які співпадали з лініями контрольних сироваток. Відсутність лінії преципітації напроти лунки з негативною сироваткою вказує на те, що сироватка реагує негативно (рис. 2). Спостереження за реакцією проводили за допомогою лупи (x9) та спрямованого проміння світла [6, 7]. Наявність чітких ліній преципітації відмічали через 48 год. Результати реакції зберігаються від 48 до 72 год.

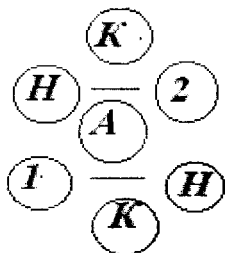


Рисунок 1 - Схема постановки РДП:
А - антиген; К - контрольна позитивна сироватка; Н - контрольна негативна сироватка; 1-2 дослідні сироватки

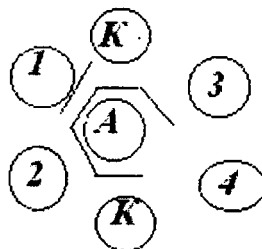


Рисунок 2 - Схема обліку реакції:
А - антиген; К - контрольна позитивна сироватка; 2,3 - позитивні сироватки з однією лінією; 1 - позитивна сироватка з двома лініями; 4 - негативна сироватка

Результати досліджень та їх обговорення. Піддано дослідженням 171 проба сироваток крові коней з різних господарств. Було виявлено, що 55% з них дали позитивний результат. З 94 тварин, позитивних в РДП, 12% проб формували дві лінії преципітації, що означає наявність у таких сироватках антитіл як до поверхневих глікопротеїнів вірусу, так і до внутрішніх протеїнів. Також було проаналізовано ураження коней герпесвірусом другого типу залежно від віку. Результати наведені в таблиці 1.

Таблиця 1 - Співвідношення ураження коней герпесвірусом другого типу залежно від віку

№ п/п	Вік коней	Позитивні в РДП		Негативні в РДП	
		голів	у проц.	голів	у проц.
1	Молодняк до року	0	0	36	100
2	Молодняк від 1 до 2 років	1	11	8	89
3	Коні від 2 до 4 років	13	48	14	52
4	Коні від 4 до 10 років	36	78	10	22
5	Коні старше 10 років	44	83	9	17
	Всього	94	55	77	45

З даних таблиці 1 видно, що серед молодняку до року не виявлено тварин, уражених герпесвірусом другого типу. З віком кількість тварин, уражених вірусом, зростає. До двох років 11 % молодняку реагувало позитивно, тоді як серед коней старше 10 років цей показник становить 83 %. Відомо, що ГВК-2 здебільшого може передаватися статевим або аліментарним шляхом. У четвертій та п'ятій групах коней були кобили й жеребці і саме вони найбільш уражені герпесвірусом другого типу, тобто у стаді дорослі тварини є джерелом збудника, сприяючи його збереженню, чим зумовлюють зараження молодняку.

Таким чином, з огляду на отримані результати, відмічаємо високий загальний відсоток коней, уражених ГВК-2, і придатність реакції дифузної преципітації як тест-системи для виявлення серопозитивних тварин.

Висновки.

1. Встановлено, що серед 171 різновікових коней 55 % були уражені ГВК-2.
2. Молодняк до року не уражений ГВК-2, що вказує на значну роль колострального імунітету, оскільки лоша до 6-8 міс. перебувають разом з кобилами і постійно вживають молоко.
3. РДП - ефективний і простий метод виявлення специфічних преципітувальних антитіл до герпесвірусу коней другого типу.

Перспективи подальших досліджень. Планується проведення моніторингових досліджень в РДП у різних регіонах та кінних госпо-

дарствах з метою встановлення поширення ГВК-2.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Потоцький М.К Герпесвірусні інфекції коней // Ветеринарія. - 2003. - № 7. - С. 24.
2. Сюрин В.П., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. Ринопневмония // Диагностика вирусных болезней у животных: Справочник. - Москва: Агропромиздаг, 1991. - С. 130-141.

3. Prevalence of equine herpesvirus types 2 and 5 in horse populations by using type - specific PCR assays / A. Nordengrahn, M. Mereza et al. // Received. 4 January. -2002. -P. 251-259.

4. Badnie wplywu genow EHV-2 na productywnie zakalenie RHV-1 w warunkach in vitro / T. Dzicciatkovski, A. Chmielevska et al. // VI Konferencja Biologia Molekulama w diagnostyce chorob zakanych I biotechnologii 6.12.2003. - Warszawa. - P. 66-74.

5. Myriam VonBorstel. Erweiterte diagnostikverfahren bei keratitiden des des pfedes unter besonderer besonderer berucksichtigung der nachweishaufgkicit des cquinen herpesvirus typ 2 (EHV-2) // Inaugural - dissertation zur F.rlangung des Grades ciner doktorin der veterinarmedizin. - Hannover, 2003 - 52 p.

6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Реакція дифузійної преципітації (РДП) // Вет. вірусологія,- К., 2004. - С. 344-346.

7. Обнаружение и идентификация вирусоспецифического антигена в реакции диффузионной преципитации / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Б.В. Соловьёв, Н.В. Фомина // Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных. - Москва: Агропромиздат, 1986. - С. 258-265.

Использование РДП для диагностики у лошадей герпесвирусной инфекции второго типа

Н.Л. Радзиховский

Определено в 55 % сывороток крови присутствие специфических антител к антигену герпесвируса лошадей второго типа в реакции диффузной преципитации. В качестве антигена использовали культуральный антиген вируса подтипа LR-10 второго типа.

Use RDP for diagnostics beside horses herpesvirus infections of the second type

N. Radzikhovski

It was determined in 55 % whey shelters presence specific antibody to antigen herpesvirus horses of the second type in reactions difusion precipitation. As antigen used cito antigen virus subrange LR-10 second types.