

**ПОРІВНЯЛЬНА ЕФЕКТИВНІСТЬ РЕАКЦІЇ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ, РЕАКЦІЇ
ДИФУЗНОЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ ТА ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ
ДІАГНОСТИКИ РИНОПНЕВМОНІЇ КОНЕЙ**

*Встановлено, що результати серологічних досліджень в реакції затримки
гемаглютинації та реакції нейтралізації на 83% співпадають з результатами
імуноферментного аналізу, а результати в реакції дифузної преципітації на 90%
співпадають з результатами імуноферментного аналізу.*

Постановка проблеми

Наразі в Україні недостатньо вивчена епізоотична ситуація та епізоотологічні особливості ринопневмонії коней, тому що відсутні

© В.Л. Бегас

діагностичні набори, які можна використовувати для діагностики цієї хвороби.

Аналіз останніх досліджень

Ринопневмонія коней (РК) може включати в себе респіраторне захворювання, аборт, пневмонію новонароджених лоша́т чи мієлоенцефаліти [1,4]. Ринопневмонія коней може виникнути в результаті інфікування одним з двох близькоспоріднених вірусів – герпес-вірусу коней першого типу (ГВК-1) чи герпес-вірусу коней четвертого типу (ГВК-4) [5,6,7].

При діагностиці ринопневмонії проводять клінічний огляд, облік зростання випадків абортів у другій половині жеребності, виділення та ідентифікацію вірусу на культурі клітин, виявлення антитіл методами ретроспективної діагностики [8,9]. Для ідентифікації герпес-вірусів широко застосовують такі методи дослідження генома, як рестрикційний аналіз, секвенірування, молекулярну гібридизацію [1,5,7,10,11]. Серологічна діагностика ринопневмонії ґрунтується на базі демонстрації суттєвого збільшення титрів антитіл у парних сироватках, що відібрані на стадії гострої форми хвороби і на стадії видужування. Перший зразок потрібно відбирати щонайшвидше після появи клінічних ознак, другий – через 3–4 тижні. Підвищення титру антитіл до ГВК-1 чи ГВК-4 протягом клінічного прояву хвороби забезпечує серологічне підтвердження інфекції, а при груповому дослідженні – наявність чотирикратного збільшення не менше ніж у 25–30% проб сироваток крові [12].

Віруснейтралізуючі антитіла з'являються через 3 тижні після інфікування тварин, досягають максимуму через 12 тижнів і зберігаються протягом 2-х років [13], але при цьому не виключається реінфекція. Найчастіше РН проводиться з постійною дозою вірусу з 100 ТЦД₅₀/см³. Досліджувані сироватки містять специфічні антитіла в титрах від 1:4 до 1:256 [5].

Метою роботи було відпрацювати мікроваріант постановки реакції нейтралізації (РН) та реакції дифузної преципітації (РДП), які можуть бути використані для проведення моніторингу ринопневмонії коней, та порівняти їх з реакцією затримки гемаглютинації (РЗГА) і імуноферментним аналізом.

Матеріали і методи

Дослідження проводили в лабораторії наукових досліджень кафедри мікробіології, вірусології та епізоотології ДАУ (м. Житомир) та на базі кінної частини ЗАТ НВП “Райз-Агро” (Ягільницький кінний завод) с. Нагірянкa Тернопільської області Чортківського району. Для дослідження були використані сироватки крові різновікових груп коней. Імуноферментний аналіз був проведений у відділі імунологічних і

моніторингових досліджень Центральної державної ветеринарної лабораторії.

Результати досліджень

Постановка реакції затримки гемаглютинації (РЗГА). Сироватку перед дослідженням інактивували на водяній бані протягом 30 хвилин при температурі $+56-58^{\circ}\text{C}$. Для постановки реакції в усі лунки вносили по $0,02\text{ см}^3$ фізіологічного розчину, далі розтитровували сироватку від 1:2 до 1:2048, перекачуючи її автоматичною піпеткою по $0,02\text{ см}^3$. В усі лунки вносили по $0,02\text{ см}^3$ вірусу, який містить 4 ГАО. Для перемішування компонентів планшети струшували і на 60 хв ставили в термостат при температурі $+37^{\circ}\text{C}$. Потім у всі луночки вносили по $0,02\text{ см}^3$ 0,5% суспензії еритроцитів коня. Після цього їх залишали при кімнатній температурі, читали реакцію через 3–4 години на білому фоні. При постановці реакції ставили в луночках такі контролі: прояв робочої дози вірусу, наявність чи відсутність спонтанної аглютинації еритроцитів, специфічність постановки реакції з негативною і позитивною сироватками.

Постановка реакції дифузної преципітації (РДП). Для приготування агару до 100 см^3 7,5% розчину кухонної солі, доведеної до кипіння, вносили 1–2 г сухого агару, який обережно помішували. Охолоджений до $+50-60^{\circ}\text{C}$ агар розливали по 12 см^3 в чашки Петрі. Потім в агарі робили лунки, куди закапували досліджуванні сироватки. В луночках ставили контролі з позитивною та негативною контрольними сироватками. Чашки Петрі ставили у вологу камеру при температурі $+24^{\circ}\text{C}$. Облік реакції проводили через 24, 48, 72 години. Позитивна реакція характеризувалась утворенням специфічних ліній преципітації, які добре було видно у проникаючому світлі.

Постановка реакції нейтралізації (РН) мікрометодом. Для постановки реакції мікронейтралізації використовували герпес-вірус першого типу (з штаму “Буковина”), адаптований до перещеплюваної культури трахеї теляти. Накопичення і визначення інфекційної активності вірусу та постановку РН проводили на культурі клітин трахеї теляти за мікрометодом у 96-луноквих мікропланшетах з постійною дозою вірусу.

Проби дослідних сироваток з двократним розведенням розтитровували від 1:2 до 1:256 на підтримуючому середовищі ГЛА у лунках мікропланшета в об’ємі 100 мкл^3 . На кожне розведення використовували 2 ряди лунок. Для кожного нового розведення використовували стерильні наконечники. Робоче розведення вірусу готували за результатами попередньо проведеного титрування з використанням того ж розчинника, що і для розведення сироваток зі вмістом вірусу $100\text{ ТЦД}_{50/\text{см}^3}$. Робоче розведення вірусу в об’ємі 100 мкл змішували з розведеннями сироваток у лунках 96-луноквого планшета. Для контролю вірусу, у вільних лунках того ж мікропланшета, 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, тобто проводили розведення в 10 разів. Ставили також контроль гіперімунної та нормальної сироваток, при цьому гіперімунну сироватку розтитровували, як і дослідну. Для контролю токсичності дослідних сироваток їх вносили в розведенні 1:4 в лунки мікропланшету. Дослід супроводжували контролем інтактної культури клітин.

Суміш вірусу з розведеними сироватками у лунках ретельно перемішували за допомогою піпетки та інкубували у CO₂-інкубаторі при +37,5°C протягом 60 хвилин. Потім вміст лунок послідовно переносили до мікропланшету з моношаром культури клітин та інкубували, як вказано вище. Для контролю реакції моношар клітин кожної доби переглядали під малим збільшенням інвертованого світлового мікроскопу. Терміном обліку реакції був час повного руйнування моношару в контрольних лунках з вірусом. Цитопатогенна дія вірусу виявлялась через 3 доби.

Титр нейтралізуючих антитіл визначали як найбільше розведення сироватки, яке нейтралізувало цитопатогенну дію вірусу.

Результати досліджень сироваток крові коней в реакції нейтралізації, реакції затримки гемаглютинації, реакції дифузної преципітації представленні в таблиці 1.

Таблиця 1. Результати досліджень сироваток крові коней в РЗГА, РН, РДП до герпес-вірусу першого типу

№	Кличка тварин	Результати досліджень в:		
		РН	РЗГА	РДП
1.	Бафіна	1:2	0	-
2.	Фахос	0	1:4	-
3.	Храбрец	1:2	0	-
4.	Феб	1:4	1:16	-
5.	Гурт	1:16	1:8	-
6.	Белград	1:32	1:16	-
7.	Безупречна	1:128	1:512	+
8.	Бабета	1:64	1:512	+
9.	Біва	1:64	1:1024	+
10.	Фага	1:256	1:1024	+
11.	Нан	0	0	-
12.	Танкіст	0	0	-
13.	Бандура	0	0	-
14.	Ембарго	0	0	-

Примітка: (-) - реакція негативна, (+) - реакція позитивна.

З представлених даних видно, що титри віруснейтралізуючих антитіл корелюють з титрами антитіл, що виявленні в РЗГА. Сироватки крові

коней з високими титрами антитіл в РН і РЗГА були позитивними в РДП.

Також було проведено порівняння результатів досліджень сироваток крові в РЗГА, РН, РДП з ІФА.

Таблиця 2. Результати порівняльного дослідження сироваток крові коней в РЗГА, РН, РДП та ІФА до герпес-вірусу першого типу

№	Кличка тварин	Результати досліджень в:			
		РЗГА	РН	РДП	ІФА
1.	Безупречна	1:512	1:128	позитивна	позитивна
2.	Бархатна	-	-	негативна	негативна
3.	Бодана	1:1024	не досліджували	позитивна	позитивна
4.	Гурт	1:8	1:16	негативна	негативна
5.	Фахос	0	1:4	негативна	негативна
6.	Вигода	1:512	не досліджували	позитивна	позитивна
7.	Бабета	1:512	1:16	позитивна	позитивна
8.	Бива	1:1024	1:16	позитивна	позитивна
9.	Ваг	1:512	не досліджували	позитивна	позитивна
10.	Тамала	1:512	не досліджували	позитивна	позитивна

З даних таблиці 2 видно, що результати серологічних досліджень в РЗГА та РН співпадають на 83% з результатами ІФА. У сироватках крові тварин з високими титрами антитіл до ГВК-1 в РЗГА були виявлені преципітуючі антитіла в РДП, які на 90% співпадають з результатами ІФА.

Для проведення моніторингу на ринопневмонію коней, крім РЗГА необхідно застосовувати реакцію нейтралізації. Для підтвердження діагнозу на ринопневмонію коней при наявності клінічних ознак необхідно використовувати РДП.

Реакцію дифузної 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 (1:2 – 1:64) в пробах сироваток крові в РЗГА не дає можливості виявити їх в РДП. Однак РДП дуже проста у застосуванні і її можна рекомендувати як додатковий тест з метою виключення РК при підозрі на цю інфекцію навіть в районних державних лабораторіях ветеринарної медицини. Таким чином, нами розроблено дві реакції – РДП та РН (мікрометод), які необхідно впроваджувати у виробництво, так як на сьогоднішній день в Україні відсутні власні діагностичні тести, які можна використовувати для діагностики ринопневмонії коней.

Висновки

1. Використання розробленої нами реакції нейтралізації дозволило провести серологічні дослідження в РЗГА та РН і встановити

- співпадання даних на 83% з результатами ІФА.
- У сироватках крові тварин з високими титрами антитіл до ГВК-1 в РЗГА були виявлені преципітуючі антитіла в РДП, на 90% які співпадають з результатами ІФА.
 - Для проведення моніторингових досліджень на ринопневмонію коней, крім РЗГА необхідно застосовувати реакцію нейтралізації.
 - При наявності клінічних ознак на ринопневмонію коней для підтвердження діагнозу необхідно використовувати РДП.

Перспективи подальших досліджень

Буде вивчено ураження різновікових груп коней за допомогою реакції нейтралізації, реакції дифузної преципітації та реакції затримки гемаглютинації. Методики постановки реакцій в подальшому будуть удосконалюватись.

Література

- Allen G.P., Kydd J.H., Slater J.D., Smith K.C.* Recent advances in understanding the pathogenesis, epidemiology, and immunological control of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion // *Equine Infect. Dis.* – 1999. – №8. – P. 129–146.
- Allen G.P., Bryans J.T.* Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections // *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* – 1986. – №2. – P. 78–144.
- Bryans J.T., Allen G.P.* Herpesviral diseases of the horse. In: *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*, Ed: G. Wittmann, Kluwer, Boston. – 1989. – P.176–229.
- Crabb B.S., Studdert M.J.* Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus) // *Adv. Virus. Res.* – 1995. - Vol.45. – P. 153–190.
- Official site of O.I.E. [Електрон. ресурс]. – спосіб доступу: URL:http://www.oie.int/eng/en_index.htm.
- The DNA sequence of equine herpesvirus 1 / E.A. Telford, M.S. Watson, K. McBride, et al.// *Virology.* – 1992. – Vol.189. – P. 304–316.
- The DNA sequence of equine herpesvirus 4. / E.A. Telford, M.S. Watson, J. Perry et al. // *J. Gen. Virol.* – 1998.– N 79.– P.1197–1203.
- Юров К.П.* Инфекционные болезни лошадей. – М., 1988. – 210 с.
- A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. / B.S. Crabb, C.M. MacPherson, G.H. Reubel et al. // *Arch. Virol.* – 1995. – N 140.– P. 245–258.
- 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.

11. Rapid, single-step differentiation of equid herpesvirus 1 and 4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus-specific primers. / G.L. Lawrence, J. Gilkerson, D.N. Love et al. // J. Virol. Methods. – 1994.– N 47. – P 59–72.
 12. Юров К.П. Герпесвирусные инфекции // Инфекционные болезни лошадей. – М., 2000. – С. 18–37.
 13. Bagust T.J., Pascoe R.R. Studies on equine herpes viruses: Characterization of a strain of equine rhinopneumonitis virus isolated in Queensland // Australian Veterinary Journal. – 1970. – Vol. 46, №4. – P. 21–428.
-
-