

ВИКОРИСТАННЯ РЕАКЦІЇ ДИФУЗНОЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ РИНОПНЕВМОНІЇ КОНЕЙ

Застосування реакції дифузної преципітації дає змогу визначити інфікованість коней герпесвірусом першого типу. Діагностична реакція характеризується простотою постановки, достатньою чутливістю та інформативністю.

Постановка проблеми

Варто відзначити, що в Україні для діагностики ринопневмонії коней (РК) використовується в основному реакція затримки гемаглютинації (РЗГА), а моніторингові дослідження проводяться обмежено та в недостатній мірі. В країнах СНД, зокрема в Україні, препарати для діагностики ГВІ не виробляються, тому пошук основних підходів до виробництва діагностикумів на сьогодні є актуальним напрямком досліджень.

© В.Л. Бегас

* Науковий керівник доктор вет. наук, професор Галатюк Олександр Євстафійович.

Аналіз останніх досліджень

Ринопневмонія коней (РК) – це збірне поняття двох хвороб: ринопневмонії – вірусного аборту, що викликається герпесвірусом першого типу (ГВК-1) і ринопневмонії, викликаній герпесвірусом четвертого типу (ГВК-4). Діагностика РК включає в себе клінічний огляд, облік зростання випадків абортів в другій половині жеребності, виділення та ідентифікація вірусу на культурі клітин, виявлення антитіл методами ретроспективної діагностики [2,4]. Для ідентифікації герпесвірусів широко застосовують такі високочутливі методи дослідження генома, як рестрикційний аналіз, секвенування, молекулярну гібридизацію [1,6,8,9,11]. 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 [8]. Оскільки ГВК-1 і ГВК-4 мають багато спільних антигенів, визначити інфікуючий агент жодним із існуючих серологічних методів (РЗК, РН, ІФА), які виявляють антитіла до компонентів вірусу неможливо [10]. Серологічна діагностика РК 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. Однак демонстрація будь-яким тестом 4-кратного чи більшого підвищення титру антитіл до ГВК-1 чи ГВК-4 протягом клінічної хвороби забезпечує серологічне підтвердження нещодавньої інфекції одним із вірусів, а при груповому дослідженні – наявність 4-кратного збільшення не менше, ніж у 25–30% проб [3].

Реакцію дифузної преципітації (РДП) раніше застосовували для діагностики РК в Японії. Для цього використовували 1% сольовий агар. Реакцію ставили при кімнатній температурі у вологій камері, результати читали через 24 год [10]. Найкращі результати були отримані при постановці реакції через 5–7 діб після клінічного прояву хвороби. Негативна сторона методу – необхідно як мінімум 18 год для постановки діагнозу [7].

При проведенні електрофорезу антигенів в поліакриламідному гелі, що використовують для РДП, ІФА, РЗК було виявлено, що в основному вони складаються з компонента з молекулярною масою 61 000 дальтон [5].

Мета роботи – випробувати та впровадити до практичного застосування реакцію дифузної преципітації для діагностики ринопневмонії коней.

Матеріали і методи

Дослідження проводили в лабораторії наукових досліджень кафедри мікробіології, вірусології та епізоотології та на базі «РАЙЗ-АГРО» (Ягільницький кінний завод) с. Нагірянкa Тернопільської області Чортківського району. Для дослідження були використані сироватки крові різновікових груп коней.

Результати досліджень

Нами розроблено метод отримання антигену для РДП з культурального вірусу. Для культивування культури трахеї теляти використовували ростове середовище такого складу: Ігла 45% + середовище 199 45% + 10% сироватки крові великої рогатої худоби та гентаміцин (200 мкг/см³). Маточні культури пересівали з інтервалом 3-4 доби. Для культивування використовували матраци на 100 см³ та на 1500 см³.

Для культури фібробластів шкіри коня використовували ростове середовище наступного складу: Ігла 90% + 10% сироватки крові ВРХ та гентаміцин (200 мкг/см³).

Через 2-3 доби після пересіву формувался 90–100% моношар, який використовували для зараження. При цьому ростове середовище зливали. Моношар промивали версеном з гентаміцином і вносили 2 см³ з 100 ТЦД₅₀ вірусу на 100 см³ матрац. Даний матрац ставили в термостат при температурі +37,5°C на 40-60 хв і періодично (через 15 хв) моношар клітин 3-4 рази повільно омивали вірусним матеріалом. Потім інокулят зливали і в матрац вносили підтримуюче середовище (аналогічне до ростового, але без сироватки). Щоденно заражені культури продивлялись візуально та під мікроскопом. Паралельно зі зараженими вели спостереження за контрольними незараженими матрацами. Інкубування припиняли при наявності повної деструкції моношару. Отриману таким чином вірусоміщуючу рідину піддавали криогенній деструкції (заморожування при температурі -20 С°, розморожування при температурі +37 С°) і визначали інфекційний титр вірусу.

Внаслідок проведених досліджень прослідкували наступні зміни.

При зараженні культури трахеї теляти культуральним штамом герпесвірусу першого типу цитопатогенна дія починала проявлятися на 5–6 день, через 8 діб руйнувалось 80% моношару клітин. Титри гемаглютининів досягали 1:2–1:4. При проведенні 3–4 пасажів цитопатогенна дія почала проявлятися вже через 1–2 доби, з повною деструкцією клітинного шару – через 3–4 доби. Титри гемаглютининів при цьому підвищувалися до 1:16–1:32. Вірусомісну рідину піддавали криогенній деструкції (заморожування при -20 °С, розморожування при +37 °С). Для видалення клітинного детриту проводили центрифугування при 1,5 тис об/хв протягом 10 хв.

Концентрацію вірусу проводили двома способами:

До 180 см³ додавали 33 см³ 50% р-ну ПЕГ-у, збовтували і на 24 год лишали в холодильнику. Тоді центрифугували в пластикових пробірках

при температурі 4 °С 3,5 тис об/хв протягом 40–45 хв, надосадову рідину зливали. Осад ресуспендували в боратному буфері рН 8,4–8,6.

1. Заливали вірусомісну рідину в сосисочний матеріал і концентрували діалізом за допомогою ПЕГ–6000.

Специфічну контрольну сироватку отримували від гіперімунізованих півнів. Для гіперімунізації використовували попередньо очищений центрифугуванням (при 2000 об/хв протягом 10 хв., осад видаляють) вірусний антиген. Гіперімунізацію здійснювали за такою схемою: 4 рази вводили півням внутрішньовенно 2 см³ вірусного антигену з добовим інтервалом, серію введень повторювали через 7 діб двічі. Ще через 7 діб здійснювали відбір крові. Зібрану кров використовували для отримання сироватки. Кров збирали в одноразові стерильні шприци об'ємом 20 см³, залишали в термостаті при температурі 37°С протягом 2–3-х годин. Потім шприц з кров'ю поміщали в холодильник при температурі 4°С і витримували протягом 12 годин. Отриману сироватку після ретракції згустку зливали. Для відділення клітин крові зібрану сироватку центрифугували при 3000 об/хв протягом 30 хв. Сироватку розливали у флакони, добавляли карболову кислоту і зберігали при температурі 20°С.

Для приготування агару до 100 см³ 7,5% розчину кухонної солі доведеної до кипіння, додавали 1,5–2 г агару обережно помішували. Охолоджений до температури 50–60°С агар розливали по 12 см³ на чашку Петрі.

На 199 середовищі готували наступні концентрації антигенів 1:90, 1:60, 1:30, 1:15. І кожне розведення досліджували з 2 гіперімунними сироватками – кроля і півня розведення 1:2–1:64 відповідно. В першому випадку реакція відбувається при температурі 24 °С в другому – при температурі 37 °С. Облік реакції проводили через 24, 48, 72 години. Позитивна реакція характеризується утворенням специфічних ліній преципітації, які добре видно в проникаючому світлі. Сироватки крові коней досліджували в розведеннях: від нативної до – 1:8.

Таблиця 1. Кореляція титрів преципітуючих і гемаглютинуючих антитіл до ринопневмонії коней

№ з/п	Титри гемаглютинуючих антитіл, в РЗГА	Титри преципітуючих антитіл, в РДП
1.	1:1024	1:4
2.	1:512	1:4
3.	1:256	1:2
4.	1:128	+
5.	1:64	±
6.	1:32	±
7.	1:16	0
8.	1:8	0
9.	1:4	0
10.	1:2	0
11.	0	0

Примітка: ± – сумнівна реакція, + – позитивна реакція.

Перший метод концентрації – антиген, отриманий даним способом, для постановки реакції виявився непридатним. Другий метод концентрації дозволив отримати якісний антиген. Результати досліджень в РДП і РЗГА показані в таблиці 1.

Отже, з підвищенням титрів антитіл в РЗГА до 1:16 титри антитіл в РДП відсутні. Титри в РЗГА 1:32 і 1:64 дають слабопозитивну реакцію в РДП. Коні з титрами антитіл в РЗГА 1:256 дають чітку позитивну реакцію в РДП 1:2, а у коней з титрами антитіл в РЗГА 1:512 і 1:1024 відмічаються титри в РДП 1:4.

Висновки

1. Реакція дифузної преципітації корелює з сироватками, в яких високі титри антитіл в реакції затримки гемаглютинації до ринопневмонії коней.
2. Реакцію дифузної преципітації можна використовувати при комплексній діагностиці ринопневмонії коней.

Перспективи подальших досліджень

Буде вивчено ураження різновікових груп коней за допомогою реакції дифузної преципітації та реакції затримки гемаглютинації.

Література

1. *Забегина Е.Ф.* Типирование герпесвирусов лошадей методом рестрикционного анализа ДНК и изыскание вакцинного штамма: Автореф. дис.. канд. биол. наук. – М.: 1998. –24 с.
2. *Юров К.П.* Инфекционные болезни лошадей. –М.: 1988. – 210 с.
3. *Юров К.П.* Герпесвирусные инфекции // Инфекционные болезни лошадей. – М., 2000. – С. 18–37.
4. 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. –N 140.– P. 245–258.
5. *Abodeely R.A.* The proteins of enveloped and deenveloped equine abortion (Herpes) virus and the separated envelope. Virology. – 1971. – N. 44 – P.146–152.
6. *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.
7. 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, N3.– P. 57–61.

8. Official site of O.I.E. [Електрон. ресурс]. – спосіб доступу: URL:http://www.oie.int/eng/en_index.htm.
 9. 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, M. Sabine & J.M. Whalley // *J. Virol. Methods.* – 1994.– N 47. – P 59–72.
 10. Sugiura T., Matsumura T. and Hirano S. Field surveillance of equine herpesvirus type 1 infection in race horses by agar gel immunodiffusion test. // *Bull. Equine Res. Inst.* – 1988. – N 25 – P.15–19.
 11. 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.
-
-