

ДІАГНОСТИКА ГЕРПЕСВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ПЕРШОГО ТИПУ В РЕАКЦІЯХ ЗАТРИМКИ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ, ДИFUЗНОЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ ТА НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ

О. С. Галатюк¹, В. Л. Бегас¹, А. А. Антонюк¹, О. О. Напненко²

¹Житомирський національний агроекологічний університет

²Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

У статті викладений порівняльний аналіз застосування реакції затримки гемаглютинації, дифузної преципітації та нейтралізації при діагностиці герпесвірусної інфекції першого типу коней. В результаті досліджень виявлено, що результати в реакції дифузної преципітації корелюють з результатами отриманими в реакції затримки аглютинації сироваток крові коней до ринопневмонії. Реакцію дифузної преципітації можна використовувати при комплексній діагностиці ринопневмонії коней. Для проведення моніторингу щодо ринопневмонії коней, крім реакції затримки гемаглютинації необхідно застосовувати реакцію нейтралізації. Для підтвердження діагнозу на ринопневмонію коней при наявності клінічних ознак необхідно використовувати реакцію дифузної преципітації. Реакцію дифузної преципітації можна використовувати при комплексній діагностиці ринопневмонії коней, так як високі титри антитіл в реакції затримки гемаглютинації виявляються у коней з клінічними ознаками хвороби.

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.

Ринопневмонія коней — це збірне поняття двох хвороб: ринопневмонії — вірусного abortу, 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 abortів в другій половині жеребності, виділення та ідентифікація вірусу на культурі клітин, виявлення антитіл методами ретроспективної діагностики [0, 0]. Для ідентифікації герпесвірусів широко застосовують такі високочутливі методи дослідження генома як рестрикційний аналіз, секвенування, молекулярну гібридизацію [0, 0-0]. 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 [0]. 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 [0]. 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. Тим не менше, демонстрація будь-яким тестом чотирикратного чи більшого підвищення титру антитіл до ГВК-1 чи ГВК—4 протягом клінічної хвороби забезпечує серологічне підтвердження нещодавньої інфекції одним з вірусів, а при груповому дослідженні — наявність чотирикратного збільшення не менше, ніж в 25-30 % проб [0].

Реакцію дифузної преципітації (РДП) раніше застосовували для діагностики РК в Японії. Для цього використовували 1 % сольовий агар, Реакцію ставили при кімнатній температурі в вологій камері, читали результати через 24 год. [0]. 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 [0].

При проведенні електрофорезу антигенів в поліакриламідному гелі, що використовуються для РДП, ІФА, РЗК. було виявлено, що вони в основному складаються з компонента з молекулярною масою 61 000 дальтон [0].

Мета роботи — зробити порівняльний аналіз застосування реакції гемаглютинації, реакції дифузної преципітації та реакції нейтралізації для діагностики РК.

Матеріали і методи. Дослідження поводили в лабораторії наукових досліджень кафедри мікробіології, вірусології та епізоотології, а також на базі «Райз-Максимко» (Ягільницький кінний завод, с. Нагірянка Чортківського району Тернопільської області). Для дослідження були використанні сироватки крові різновікових груп коней. У статті проаналізовано результати досліджень 19 коней.

Постановка реакції затримки гемаглютинації (РЗГА). Сироватку перед дослідженням інактивували на водяній бані 30 хвилин при температурі 56-58 °С. Для постановки реакції в усі лунки вносили по 0,02 см³ фізіологічного розчину, далі розтитровували сироватку від 1:2 до 1:2.048, 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 °С у всі луночки вносили по 0,02 см³ 0,5 %-ї суспензії еритроцитів коня. Залишали при кімнатній температурі, читали реакцію через 3-4 години на білому фоні. Для контролю ставили в луночках:

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

Постановка реакції дифузної преципітації (РДП). При приготуванні агару додавали 1,5-2 г агару до 100 см³ 7,5 % розчину кухонної солі, доведеної до кипіння, обережно помішували. Розливали охололий до 50-60 °С агар по 12 см³ на чашку Петрі. Ставили у 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 гіперімунізації кролів.

Для постановки реакції мікронейтралізації (РН) використовували культуральний вірус з штаму «ГВК - 1». Накопичення і визначення інфекційної активності вірусу та постановку РН проводили на культурі клітин трахеї теляти за мікрометодом у 96-лунокових 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. 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 ТЩфіу/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 мікронланшету, 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 мікрогіланшету. Дослід супроводжували контролем інтактною культурою клітин. Суміш вірусу та розведень сироваток у лунках ретельно перемішували піпетуванням та інкубували у СОг-інкубаторі при 37,5 °С 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 й обговорення. Результати дослідження сироваток крові коней в РН, РЗГА, РДП представленні в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати досліджень сироваток крові коней в різних серологічних діагностичних реакціях

№	Клички коней	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	+

З представлених даних видно, що титри вірус-нейтралізуючих антитіл корелюють з титрами антитіл, що виявленні в РЗГА. Сироватки крові коней з високими титрами антитіл в РН і РЗГА були позитивними в РДП.

Було проведено також порівняння результатів досліджень сироваток крові в РЗГА та РДП (табл. 2.).

Таблиця 2

Співвідношення титрів преципітуючих і гемаглютинуючих антитіл до РК

№	Титри гемаглютинуючих антитіл, РЗГА	Титри преципітуючих антитіл, РДП
1	1:1024	1:4
2	1:512	1:4
3	1:256	1:2
4	1:128	4
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.

З даних таблиці 2 видно, що з підвищенням титрів антитілу РЗГЛ до 1:16 титри антитілу в РДП відсутні. Титри в РЗГА 1:32 і 1:64 дають слабопозитивну реакцію в РДП. Коні з титрами антитілу в РЗГА 1:256 дають чітку позитивну реакцію в РДП 1:2. А п коней з титрами антитілу в РЗГА 1:512 і 1:1024 відмічаються титри в РДП 1:4.

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

Реакцію дифузної преципітації можна використовувати при комплексній діагностиці РК, так як високі титри в РЗГА виявляються у коней з клінічними ознаками хвороби. Наявність низьких титрів Ag (1:2 - 1:64) в пробах сироваток 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 РК при підозрі на цю інфекцію в районних державних лабораторіях ветеринарної медицини або для підтвердження діагнозу.

Таким чином, нами розроблено дві реакції — РДП та РН (мікрометод), які необхідно впроваджувати у виробництво, оскільки на сьогоднішній день в Україні відсутні власні діагностичні тести, які можна використовувати для діагностики РК.

ВИСНОВКИ

1. Результати РДП корелюють з результатами, отриманими в РЗГА сироваток крові коней до ринопневмонії.
2. РДП можна використовувати при комплексній діагностиці РК.
3. Для проведення моніторингу щодо РК, крім РЗГА, необхідно застосовувати РН.
4. Для підтвердження діагнозу на РК, при наявності клінічних ознак, необхідно використовувати РДП.

Перспективи подальших досліджень. Буде вивчено ураження різновікових груп коней за допомогою РН, РДП та РЗГА. Методики постановки реакцій будуть у подальшому удосконалюватись та спрощуватись.

DIAGNOSTICS OF HERPES-VIRUS INFECTION OF THE FIRST TYPE IN THE HEMAGGLUTINATION INHIBITION TEST, AGAR GEL IMMUNE-DIFFUSION TEST AND NEUTRALIZATION TEST

A. Y. Galatyuk¹, V. L. Behas¹, A. A. Antonyuk¹, O. O. Napnenko²

¹Zhytomyr National Agroecological University

²State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms

S U M M A R Y

The comparative analysis of application hemagglutination inhibition test, agar gel immune-diffusion test and neutralization test at diagnostics of infection first type herpes-virus of horses is expounded in the article. It is discovered as a result of researches that results in the agar gel immune-diffusion test correlate with results got in hemagglutination inhibition test, of horse blood whey to rhinopneumonia. The agar gel immunodiffusion test can be used for complex diagnostics of rhinopneumonia of horses. For the leadthrough of monitoring relatively rhinopneumonia of horses, except for the hemagglutination inhibition test it is necessary to apply the neutralization test. For confirmation of diagnosis of rhinopneumonia of horses at presence of clinical signs it is necessary to utilize the agar gel immune-diffusion test. The agar gel immune-diffusion test can be

used for complex diagnostics of rhinopneumonia of horses, because the high titres of antibodies in the hemagglutination inhibition test appear for horse with the clinical signs of illness.

ДИАГНОСТИКА ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПЕРВОГО ТИПА В РЕАКЦИЯХ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНИРОВАНИЯ, ДИФФУЗНОЙ ПРЕЦИПИТАЦИИ И НЕЙТРАЛИЗАЦИИ

А. Е. Галотюк, В. Л. Бегац, А. А. Антонюк, О. О. Напненко²

Житомирский национальный агроэкологический университет
Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье изложен сравнительный анализ применения реакции торможения гемагглютинирования, диффузной преципитации и нейтрализации при диагностике герпесвирусной инфекции первого типа лошадей. В результате исследований обнаружено, что результаты в реакции диффузной преципитации коррелируют с результатами, полученными в реакции торможения гемагглютинирования сывороток крови лошадей к ринопневмонии. Реакцию диффузной преципитации можно использовать при комплексной диагностике ринопневмонии лошадей. Для проведения мониторинга относительно ринопневмонии лошадей, кроме реакции торможения гемагглютинирования необходимо применять реакцию нейтрализации. Для подтверждения диагноза на ринопневмонию лошадей при наличии клинических признаков необходимо использовать реакцию диффузной преципитации. Реакцию диффузной преципитации можно использовать при комплексной диагностике ринопневмонии лошадей, так как высокие титры антител в реакции торможения гемагглютинирования оказываются у лошадей с клиническими признаками болезни.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Юров К. П. Инфекционные болезни лошадей. — М., 1988. — 210 с.
2. 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 // Arch. Virol. — 1995. — N 140, —P. 245-258.
3. Allen G. P. Equine rhinopneumonitis // OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 4th edn., Eds: M. Trusczyński, J. E. Pearson, S. Edwards, B. Schmitt, OIE Press. — Paris. — 2000. — P. 565-575.
4. Official site of O.I.E. [Электрон, ресурс], спосіб доступу: URL:<http://www.oie.int/eng/enjindex.htm>.
5. 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. Virol. Methods. 1994. —N 47. — P. 59-72.
6. Sugiura T., Matsumura T., 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.
7. Юров К. П. Герпесвирусные инфекции // Инфекционные болезни лошадей. — М., 2000. — С. 18-37.
8. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Titration of Antibody to Equine Herpesvirus Type 1 / T. Sugiura, T. Kondo, T. Matsumura, H. Imagawa // J. Equine Sci. — 1997 — Vol. 8, N3. - P. 57 -61. -

9. *Abodeely R. A.* The proteins of enveloped and de enveloped equine abortion (Herpes) virus and the separated envelope. *Virology*. —1971.—N. 44 — P. 146-152.

Рецензент — д. вет. н., професор, завідувачий кафедри паразитології, ветеринарно-санітарної експертизи і зоогієни Ю. Ю. Довгій, ЖНАЕУ.