

**Н.А.Ковалев**, академик ААН Республики Беларусь, доктор ветеринарных наук, профессор  
**М.М.Усеня**, научный сотрудник

Белорусский НИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского  
УДК 636:612.111:619:616.98:578.822.2

## **Эритроцитарный диагностикум для определения противопарвовирусных антител в РНГА**

*На основе метода, J.Jandl et R.Simmons в модификации В.М.Жавненко и местного штамма вируса парвовирусного энтерита КМИЭВ-14 с использованием стабилизированных акриловым альдегидом, танизированных эритроцитов крупного рогатого скота и конъюгирующих веществ хлорида хрома и трипанового синего сконструирован эритроцитарный антигенный диагностикум, который позволяет определить в течение 1,5-2 часов наличие противопарвовирусных антител у больных, переболевших и иммунизированных животных.*

**В** большинстве стран мира, в том числе и Республике Беларусь, серьезную угрозу ведению промышленного звероводства, служебного и частного собаководства представляет парвовирусный энтерит (1).

Для профилактики и лечения данного остроконтагиозного вирусного заболевания требуются огромные материальные затраты. В настоящее время во многих странах сконструированы и производятся моно- и поливалентные вакцины, имеющие в своем составе компонент парвовирусного энтерита. Одна-

*The erythrocytal antigen test in modification of Savnenko on the base of metod of J.Jandl and R.Simmons and regional strain of parvovirus enteritis KMIEV-14 with snabilised erytracytesif cattle and conygate substance CrCl<sub>3</sub> was developed. This test allow to denect anti parvovirus antibodies in ill and immunised animals during 1,5-2 houres.*

ко они не всегда высокоиммуногенны и это требует постоянного контроля за состоянием напряженности иммунитета у животных (2,3,7). Кроме того, очень важно быстро, точно и правильно поставить диагноз у заболевших животных.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) является высокочувствительным, специфичным и сравнительно экономичным методом исследования, используемым при многих болезнях как для обнаружения антигена, так и антител. По чувствительности

Таблица 1. Результаты опытов по определению агглютинации эритроцитов животных и птиц нормальными сыворотками

Вид эритроцитов	Титры кролика	конгломинации КРС	с сыворотками барана	(log <sub>2</sub> ) свиньи	кур
Кролика	0	1	0	2	0
КРС	0	0	1	0	0
Барана	1	0	0	1	1
Свиньи	0	1	1	0	0
Кур	0	1	1	0	0

РНГА близка к иммуноферментному методу (2,5,6).

Цель настоящих исследований — сконструировать эритроцитарный антиген для серологической диагностики парвовирусного энтерита и определить напряженность иммунитета в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

При конструировании эритроцитарного диагностикума с антигеном вируса парвовирусного энтерита за основу взят метод J.Jandl, R.Simmons (1957) в модификации В.М.Жавненко (1988), основанный на использовании в качестве носителя антигена стабилизированных акриловым альдегидом эритроцитов животных, в процессе сенсибилизации которых используется хлорид хрома.

Нами была изучена возможность использования в качестве носителя антигена эритроцитов кролика, крупного рогатого скота, барана, свиньи, кур. При этом изучалась способность эритроцитов агглютинироваться нормальными сыворотками крови кролика, крупного рогатого скота, барана, свиньи, кур (табл. 1).

Как видно из таблицы, наименьшей агглютинирующей способностью обладают эритроциты крупного рогатого скота, тогда как эритроциты других видов животных агглютинируются почти всеми нормальными сыворотками. Исходя из полученных результатов, для дальнейшей работы мы использовали эритроциты крупного рогатого скота.

В целях увеличения сроков хранения эритроцитарного диагностикума проводили стабилизацию эритроцитов. В качестве стабилизирующих веществ испытывали формальдегид и глутаровый альдегид. Наиболее эффективным стабилизирующим средством, дающим наивысшую чувствительность диагностикума, в наших опытах оказался акриловый альдегид (табл.2).

При отработке параметров стабилизации эритроцитов крупного рогатого скота акриловым альдеги-

Таблица 2. Чувствительность диагностикумов при стабилизации эритроцитов различными альдегидами (log<sub>2</sub>)

Стабилизирующее вещество	Титры антигена (log <sub>2</sub> )	
	с положительной сывороткой	с отрицательной сывороткой
Формальдегид	0,3+-0,15	1,0
Акриловый альдегид	7,34+-0,15	1,34+-0,15
Нативные эритроциты	3,5+-0,3	0,3+-0,15

дом установлено, что эритроцитарный диагностикум имеет наибольшую чувствительность, когда используется суспензия эритроцитов в пределах 5-10% при экспозиции 50-60 мин., температуре 35-37°C и концентрации акрилового альдегида 0,2%.

С целью повышения активности диагностикума применяли танин, который, как известно, повышает сорбционную емкость эритроцитов в отношении белков, а также их проницаемость и скорость оседания.

Использовались концентрации танина от 1:10000 до 1:50000 и длительность экспозиции от 20 до 90 мин. при температуре от 4 до 40°C. При этом установлено, что наивысшая чувствительность эритроцитарного диагностикума отмечена при концентрации танина от 1:20000 до 1:50000, температуре 37°C и экспозиции 50-60 мин.

Чувствительность полученного эритроцитарного диагностикума при таком режиме танизации составляла 12-13 log<sub>2</sub>, тогда как при других режимах — от 8 до 10 log<sub>2</sub>.

С целью определения оптимальной концентрации эритроцитов при конструировании диагностикума на этапе сенсибилизации их вирусным антигеном — синцитином использовали эритроциты 10, 20, 30, 40, 50 и 60%-ной концентрации. Наиболее высокая активность эритроцитарного антигена отмечалась при использовании 50%-ной концентрации взвеси эритроцитов (табл. 3).

Таблица 3. Чувствительность диагностикумов в зависимости от концентрации эритроцитов

Концентрация эритроцитов в диагностикуме (%)	Титры с гипериммунной сывороткой в РНГА (log <sub>2</sub> )
10	3
20	3
30	4
40	6
50	10
60	9

Для сенсибилизации эритроцитов были использованы очищенный антиген из суспензии тонкого отдела кишечника больных парвовирусной инфекцией собак и культуральная вирусосодержащая жидкость штамм КМИЭВ-14. Наиболее оптимальной оказалась культуральная жидкость вируса парвовирусного энтерита штамм КМИЭВ-14.

С целью повышения чувствительности, специфичности и срока хранения диагностикума в качестве конъюгирующего вещества использовали хлорид хрома и трипановый синий.

Таблица 4. Результаты исследования сывороток крови собак в РНГА с помощью эритроцитарного антигенного диагностикума

Сыворотки	Исследовано проб	СГтитры антител ( $\log_2$ )
Гипериммунные коммерческие	3	9
Больных собак	4	6
Переболевших собак	4	10
Иммунизированных собак	30	8
Кроличья сыворотка	5	0

На этапе определения оптимальной концентрации хлорида хрома при сенсибилизации эритроцитов использовали 50%-ную концентрацию последних, в которую вносили вирусный компонент и после тщательного перемешивания прибавляли хлорид хрома в диапазоне концентраций от 0,01 до 0,4%. Полученные эритроцитарные диагностикумы испытывались в РНГА с гипериммунными моноспецифическими сыворотками. Наиболее высокая специфическая чувствительность эритроцитарного антигена была при использовании 0,1%-ной концентрации хлорида хрома. Исследования по определению оптимальных объемов 0,1%-ного раствора хлорида хрома в процессе сенсибилизации эритроцитов показали, что наиболее оптимальным является использование его в 5-ти объемах.

При определении длительности сенсибилизации эритроцитов вирусом парвовирусного энтерита испытаны различные сроки сенсибилизации (от 1 до 20 мин.). Установлено, что наиболее оптимальный срок сенсибилизации составляет 5-6 мин. при температуре 18-20°C.

Таким образом, в процессе конструирования эритроцитарного антигенного диагностикума на основе вируса парвовирусного энтерита экспериментально установлены оптимальные концентрации антигена-сенситина, сорбируемого на эритроцитах, взвеси эритроцитов, объемы и концентрация антигена и хлорида хрома, время сенсибилизации эритроцитов. Наиболее эффективный диагностикум получен при использовании эритроцитов крупного рогатого скота.

Результаты изучения активности сконструированного эритроцитарного диагностикума определяли в реакции непрямой гемагглютинации с коммерческими гипериммунными сыворотками, содержащими антитела к вирусу парвовирусного энтерита, сыворотками крови собак, больных и переболевших пар-

вовирусным энтеритом, и сыворотками крови собак, иммунизированных различными коммерческими вакцинами (табл. 4).

Из таблицы видно, что сконструированный диагностикум специфичен и позволяет определять титры противопарвовирусных антител у восприимчивых животных. Так, если в сыворотках крови не интактных кроликов противопарвовирусные антитела отсутствовали, то в сыворотках крови вакцинированных, больных и переболевших собак титры антител варьировали от 6 до 10  $\log_2$ .

Сконструированный диагностикум был исследован на специфичность в зависимости от сроков хранения. Определение параметров сохранности, стабильности и специфической чувствительности эритроцитарного диагностикума для определения противопарвовирусных антител в РНГА проводили с тремя сериями препарата. Диагностикум хранили в холодильнике при температуре 2-10°C. Образцы препарата исследовали через 3, 6, 9 и 12 месяцев со дня изготовления с коммерческими гипериммунными сыворотками и сыворотками крови от не интактных кроликов. Результаты опытов представлены в таблице 5.

Как видно из таблицы, сконструированный диагностикум в течение 12 месяцев сохранял высокую специфичность и стабильность. Незначительное снижение чувствительности к этому сроку мы объясняем снижением титров противопарвовирусных антител в гипериммунной сыворотке при ее хранении.

#### Заключение.

На основе местного штамма вируса парвовирусного энтерита КМИЭВ-14 с использованием стабилизированных акриловым альдегидом, таннизированных эритроцитов крупного рогатого скота сконструирован эритроцитарный антигенный диагностикум для определения противопарвовирусных антител в РНГА, который позволяет определить в течение 1-2 часов наличие противопарвовирусных антител у больных, переболевших и иммунизированных животных. РНГА высокоспецифична и проста в применении.

#### Литература

1. Б.Г.Орлянкин и др. Парвовирусные инфекции и их влияние на продуктивность животных. -Москва: 1985. -63с.
2. М.М.Рахманина, А.А.Сулимов, А.В.Селиванов Биологические свойства парвовируса собак.//Ветеринария №7-8, -1992, -С. 21-26.
3. В.Н.Симонович, В.В.Бондаренко Парвовирусный энтерит собак.// Ветеринария. №12, 1991. -С.65-66.
4. В.Н.Сюрин, Р.В.Белоусова, Н.В.Фомина. Диагности-

Таблица 5. Результаты опытов по определению длительности хранения эритроцитарных диагностикумов в РНГА

№ серии диагностикумов	Титры противопарвовирусных антител ( $\log_2$ ) в зависимости от длительности хранения (мес.)							
	3 мес.		6 мес.		9 мес.		12 мес.	
	У-сыворотка	отрицат. сыв-ка	У-сыворотка	отрицат. сыв-ка	У-сыворотка	отрицат. сыв-ка	У-сыворотка	отрицат. сыв-ка
1	8	0	8	0	8	0	7	0
2	8	0	8	0	8	0	7	0
3	8	0	8	0	8	0	7	0

ка вирусных болезней животных. Москва: Агропромиздат, 1991. -528 с.

5. Н.И.Троценко, Р.В.Белоусова, Э.А.Преображенская. Практикум по ветеринарной вирусологии - Москва: Агропромиздат, 1989. -287 с.

6. А.С.Шашенько, Н.А.Ковалев, М.М.Усея. Использование РНГА для серологической диагностики чумы

плотоядных.//Технология получения и выращивания здорового молодняка с/х животных и рыбопосадочного материала: Тез. докл. респ. науч.-практ. конф. - Минск. 1993, -С. 139-140.

7. Rimmeizman G.F. Canine parvovirus infection: novel approaches to diagnosis and immune prophylaxis Canine parvovirus infectie: nieuwe benaderingswijzen van diagnostiek en immunprohylaxis: Proefschr.-Utrecht, [1990]. -160 с.