

ВПЛИВ ФІКСУЮЧИХ РЕЧОВИН НА ЕРИТРОЦИТИ ПРИ ВИГОТОВЛЕННІ АНТИГЕНУ АНТИТІЛЬНОГО ЕРИТРОЦИТАРНОГО

В. М. Плис, Державна установа Інститут сільського господарства степової зони НААН України

В статті розглянуто вплив деяких фіксуєчих речовин на еритроцити при виготовленні антигену антитільного еритроцитарного. Встановлено, що для фіксації еритроцитів барана краще використовувати 0,5%-й розчин акролеїну та буферно-солевий розчин Хенкса з рН 7,6 в об'ємі 1000см³ з експозицією 30 хвилин.

Пастерельоз (холера) птиці – це інфекційне захворювання, що уражує сільськогосподарську птицю всіх видів, диких перелітних і синантропних птахів, а також свійських та диких тварин і характеризується септицемією, геморагічним діатезом та високою смертністю. Пастерельозом хворіє і людина.

Успіх боротьби з епізоотіями і ензоотичними спалахами бактеріальних інфекцій у тому числі і пастерельозу (холери) в сучасному птахівництві залежить від своєчасної і правильної діагностики хвороби.

Доступним для ветеринарної практики методом одержання об'єктивної інформації про бактеріальний статус птахопоголів'я на рівні прогнозу є серологічне дослідження. Серологічний прогноз є особливо важливим при технологічному переміщенні птиці в межах господарства і комплектуванні промислового стада. Систематичний серологічний контроль дасть змогу фахівцям птахівничих господарств покращити якість ветеринарних заходів і досягти стійкого епізоотичного благополуччя.

Серологічний діагноз встановлюють при виявленні і зростанні титрів антитіл в парних сироватках.

Враховуючи той факт, що *Pasteurella multocida* не аглютинує еритроцити тварин, необхідно було розробити антиген антитільний еритроцитарний для використання у реакції непрямой гемаглютинації. Для РНГА характерні висока чутливість і специфічність. Основним недоліком РНГА є використання в ній такого нестабільного компонента як еритроцити. Але в останні роки були розроблені та з великим успіхом застосовуються еритроцитарні препарати на основі фіксованих еритроцитів. Перевага фіксованих еритроцитів полягає у тому, що їх можна приготувати заздалегідь і тривалий час зберігати у суспензії. Приготовлені на їх основі препарати можна ліофілізувати без втрати серологічної активності.

Учені різних поколінь для фіксації еритроцитів в основному використовували та використовують формальдегід, пропонуючи концентрацію препарату у межах від 0,5 до 20 %. Час контакту еритроцитів з фіксуєчою речовиною за відомими методиками має значні відмінності. Експозиція формалізації, у залежності від вибраної технології, має визначатися послідовною здатністю рецепторів фіксованих еритроцитів вступати у міц-

ний зв'язок з сенсibiliзуючим компонентом, що у кінцевому результаті забезпечує високу активність антигену.

Метою нашої роботи було вивчити вплив деяких фіксуєчих речовин на еритроцити та підібрати оптимальну схему фіксації еритроцитів.

Матеріали і методи. Дослідження проводились в секторі імуноепізоотологічного моніторингу бактеріальних інфекцій птиці лабораторії епізоотології бактеріальних хвороб птиці та лабораторії епізоотології вірусних хвороб птиці Дніпропетровської дослідної станції Національного наукового центру "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини".

У досліджах використовували еритроцити барана. Активність та специфічність пастерельозного антигену при обробці еритроцитів фіксуєчими речовинами визначали в реакції непрямой гемаглютинації (РНГА) з виготовленим антигеном антитілим еритроцитарним, розробленим спільно з Національним науковим центром "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини" та Дніпропетровською дослідною станцією Національного наукового центру "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини".

Нами проведено дослід, у якому порівняли схеми фіксації еритроцитів при застосуванні деяких фіксуєчих речовин.

Результати досліджень. Для фіксації еритроцитів барана ми використовували декілька схем:

Схема № 1 Фіксацію еритроцитів проводили 3 %-м розчином формальдегіду за методом Вайнбаха у модифікації Батлера. Відмитий осад дефібринованої крові ресуспендували в 0,15-молярний фосфатно-буферний розчин з рН 7,2. До одного об'єму 8 %-ї зависі еритроцитів додавали один об'єм 3 %-го розчину формаліну. Розчин формальдегіду додавали до еритроцитів невеликими порціями постійно перемішуючи. Фіксацію еритроцитів продовжували впродовж 18 годин за температури 37 °С постійно перемішуючи. На наступну добу формалінізовані еритроцити відмивали у фізіологічному розчині хлориду натрію, остаточно ресуспендували у фосфатно-буферний розчин у вигляді 10 %-ї суспензії та зберігали до застосування за температури 4 °С.

Схема № 2 Фіксацію еритроцитів барана здійснювали 5 %-м розчином формальдегіду. 10

%-ву завись еритроцитів барана з'єднували з рівним об'ємом 5 %-го розчину формальдегіду на ізотонічному розчині хлориду натрію за рН 7,2. Фіксуєчий розчин з еритроцитами витримували впродовж доби у термостаті за температури 37 °С періодично струшуючи. Після консервації, еритроцити барана п'ятикратно відмивали фізіологічним розчином рН 7,2.

Схема № 3 Фіксація еритроцитів 0,5 %-м акриловим альдегідом. Осад еритроцитів, отриманий з дефібрированої крові, дворазово відмивали ізотонічним розчином хлориду натрію та добавляли у кількості 2 % до 0,5 %-го розчину акролевого альдегіду. Суміш перемішували на магнітній мішалці впродовж 20 хвилин за кімнатної температури. Фіксовані еритроцити осаджували центрифугуванням упродовж 20 хвилин за 3000 об./хв., потім промивали вісім разів ізотонічним розчином хлориду натрію, суспендували у фосфатно-буферний розчин (ФБР) у вигляді 30 %-ї суспензії, до якої додавали мертиолят натрію до концентрації 1:10000 і зберігали за температури 4°C.

Еритроцити, оброблені акриловим альдегідом, зберігали яскраво-червоний колір безпосередньо після фіксації та за тривалого зберігання (упродовж 2 місяців), легко переводились у гомогенні суспензії за струшування, але фіксовані діагностичними зберігались упродовж 2 місяців.

Схема № 4 Фіксація еритроцитів барана 0,5 %-м розчином акролеїну. Еритроцити барана двократно відмивали у фізіологічному розчині з рН 7,2 в об'ємі 15 см³ за постійного струшування добавляли 0,5 % розчину акролеїну на буферно-сольовому розчині Хенкса з рН 7,6 в об'ємі 1000 см³ упродовж 30 хвилин. У подальшому еритроцити барана за кімнатної температури осаджували центрифугуванням і відмивали у вигляді 10 %-ї суспензії 8 разів у фізіологічному розчині та повторно центрифугували за 1500 об./хв. впродовж 10 хвилин. Акролеїнізовані еритроцити в 10 %-й

концентрації суспендували у буферно-сольовому розчині (БСР) з рН 7,2 до них добавляли мертиолят натрію до концентрації 1:10000 і зберігали у холодильнику за температури 4 °С упродовж 6 місяців у нативному стані.

Дослідження проб сироваток крові сільськогосподарської птиці зі штамом *Pasteurella multocida* № 1931, еритроцити яких фіксували акролеїном, формаліном показали що, за всіх рівних умов виготовлення препаратів, антиген, отриманий на акролеїнізованих еритроцитах, був найбільш активним, реакція була чіткою впродовж 40 хвилин за кімнатної температури. Переваги акролеїнізованої фіксації еритроцитів по чіткості осідання еритроцитів — діагностичний препарат можна зберігати у нативному стані 6 місяців і у ліофілізованому стані 12 місяців з моменту виготовлення без суттєвого зниження його серологічної активності, тоді як з формалінізованими еритроцитами — тільки 3 місяці у нативному стані і 6 місяців у ліофілізованому, а акриловим альдегідом — всього 3 місяці у нативному і 4 місяці у ліофілізованому стані.

У результаті досліджень еритроцитів, оброблених різними фіксуєчими речовинами, ми встановили їх деякі загальні властивості:

- по морфології фіксовані еритроцити практично не відрізняються від свіжих;
- не гемолізуються у гіпотонічних розчинах, воді, після заморожування та розморожування;
- їх поверхневі структури зберігають здатність хімічно модифікуватись і вступати у реакцію взаємодії з антигенами й антитілами.

Головний критерій якості фіксованих еритроцитів — можливість їх використання для отримання сенсibiliзованого препарату за відсутності неспецифічного склеювання у стабілізуючих рідинах.

Результати активності та специфічності пастерельозного антигену при обробці еритроцитів фіксуєчими речовинами наведені у таблиці.

Таблиця – Результати активності та специфічності пастерельозного антигену при обробці еритроцитів фіксуєчими речовинами

Фіксуєча речовина	Титр сироватки крові $x \pm m$ (р), n=3				Термін зберігання нативного антигену антитільного еритроцитарного
	нормальна	специфічні до:			
		пастерельозу	ІЛТ	ХН	
3 % розчин формальдегіду метод Вайнбаха в модифікації Батлера	1,0	6,0	1,0	1,0	1 місяць
	1,0	5,25±0,25***	1,0	1,0	3 місяці
	1,0	3,25±0,25***	1,0	1,0	6 місяців
5 % розчин формальдегіду	1,0	6,0	1,0	1,0	1 місяць
	1,0	5,25±0,25***	1,0	1,0	3 місяці
	1,0	3,25±0,25***	1,0	1,0	6 місяців
0,5 % розчин акрилового альдегіду	1,0	5,0	1,0	1,0	1 місяць
	1,0	4,25±0,25***	1,0	1,0	3 місяці
	1,0	3,25±0,25***	1,0	1,0	6 місяців
0,5 % розчином акролеїну	1,0	6,0	1,0	1,0	1 місяць
	1,0	6,0	1,0	1,0	3 місяці
	1,0	5,75±0,35***	1,0	1,0	6 місяців

Примітка. *** — $P < 0,001$ порівняно з іншими фіксуєчими речовинами

Одержані дані таблиці свідчать про те, що консерванти які використані для фіксації

ерритроцитів барана не впливали на виникнення неспецифічної аглютинації в низьких титрах.

Нативні серії пастерельозного антигену з акролеїнованими еритроцитами зберігали свою активність і специфічність на одному рівні впродовж 6 місяців у нативному стані і 12 місяців у ліофілізованому. Антигени, еритроцити барана які фіксували 3 % розчином формаліну методом Вайнбаха в модифікації Батлера, 5 %-м розчином

формальдегіду і акриловим альдегідом, вже до третього місяця зберігання знизили свою активність.

Висновок. Для фіксації еритроцитів барана краще використовувати 0,5 %-й розчин акролеїну на буферно-сольовому розчині Хенкса з рН 7,6 в об'ємі 1000 см³ з експозицією 30 хвилин.

Список використаної літератури:

1. Буткин, Е.И. Пастереллез (холера) птицы [Текст] / Е.И. Буткин — М.: Колос, 1972. — С. 98 — 103.
2. Герман, В.В. Пастерельоз [Текст] / В.В. Герман, Б.Т. Стегний, П.І. Вербицький — Х.: Фоліо, - 2002. — 62 с.
3. Коровин, Р.Н. Справочник ветеринарного врача птицеводческого предприятия [Текст] / Р.Н. Коровин. — Санкт-Петербург. ТОМ 1, 1995. — С. 76 — 80.
4. Кэлнека, Б.У. Пастереллез [Текст] / Б.У. Кэлнека, Х. Джона Барнса, Чарльза У. Биэрда, Ларри Р., Магдугалда И.М. Сэйфа; под ред. Б.У. Кэлнека. - [10-е издание]. — М.: Аквариум, - 2003. — 196 с.
5. Перадзе, Т.В. // Иммунологическая диагностика вирусных инфекций [Текст] : Методы приготовления эритроцитарных диагностикумов учеб. / Т.В. Перадзе, П. Халонена. — М.: "Медицина", 1985. — С. 100—106.
6. Рубан, Б.В. Птицы и птицеводство [Текст]: учебное пособие / Б.В. Рубан. Х.: Эспада, 2006. — 400 с.
7. Ставцева, Л.Я. Режимы приготовления пастереллезных эритроцитарных антигенных диагностикумов [Текст] / Л.Я. Ставцева, Т.Е. Попова, С.Н. Степнова // Ветеринария. — 2001. — № 11. — С. 27 — 29.

В статье рассмотрено влияние некоторых фиксирующих веществ на эритроциты при изготовлении антигена антительного эритроцитарного. Установлено, что для фиксации эритроцитов барана лучше использовать 0,5% раствор акролеина и буферно-солевой раствор Хэнкса с рН 7,6 в объеме 1000см³ с экспозицией 30 минут.

In this paper the data on effect of certain substances on fixing the red blood cells in the production of red blood cell antigen antibody was presented. It was found that for the best of SRBC the 0.5% solution of acrolein and buffer-saline Hanks solution with pH 7.6 in a volume 1000sm³ with exposure of 30 minutes should be used.

Дата надходження в редакцію: 24.02.2013 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Т. І. Фотіна