

12. Павленко Л. М., Павленко Б. М., Павленко М. П. Изучение антишокового действия и санитарных свойств растительных модификаторов, цитоплазматических мембран при консервации спермы быков. *Науково-технічний бюлетень*. 1996. С. 315–321.
13. Ostashko F. I., Pavlenko M. P., Pavlenko L. N. Antychock effect of yolk and components in cooling spermatozooids of bull, ram and boar. *10<sup>th</sup> International Congress of Animal Reproduction*. Illinois (USA), 1984. Vol. 1. P. 209–211.
14. Phillips P. H., Lardy H. A. A yolk-buffered pabulum for the preservation of the bull semen. *J. Dairy Sci.* 1940. Vol. 23. P. 394–396.

## THE RESULTS OF CRYOPRESERVATION OF BULL SPERM IN VEGETABLE FORTIFIER USING SORBENT

**Pavlenko L. M., Stegnyy B. T., Didyk T. B., Pavlenko B. M.**

*National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine*

*The paper presents results of the production and use of the phytofortificant of cytoplasmic sperm membranes based on legume hydrolysate with additional purification with sorbents for cryopreservation of bull sperm as an alternative to yolk diluents. The aim of the research was to achieve biosafety, that is, to avoid infectious gynecological diseases, agents of which can be transmitted by the yolk, to increase the fertility rate of females after artificial insemination and to create the conditions for the development of new long-term cryoprotective diluents. It has been established that legumes grain and their hydrolysates contain a toxic nickel element that adversely affects the cytoplasmic membrane of sperm. To reduce this influence, we conducted a study of the action of different sorbents. Activated charcoal standard, silicon dioxide and fine silica were used as sorbents. Sorbents were added in relation of 3% of the volume of medium. According to the results of the studies, the best results were in semen, diluted with medium using high-dispersion silicon dioxide*

**Keywords:** cryopreservation, semen of bulls, phyto-diluent, soy and lentil extract, sorbents, biosafety, cows, fertilization

УДК 619:616.98-036.22:578.824.11

DOI 10.36016/VM-2019-105-16

## АКТИВНІСТЬ АНТИРАБІЧНИХ АНТИТІЛ У СИРОВАТКАХ КРОВІ ЗА РІЗНИХ УМОВ ЗБЕРІГАННЯ

**Рудой О. В., Дзюба Я. М., Полупан І. М.**

*Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, Київ, Україна, e-mail: [vetmedic@ukr.net](mailto:vetmedic@ukr.net)*

*У статті представлені результати дослідження стабільності титрів антирабічних антитіл у сироватках крові за різних умов зберігання. Встановлено, що оптимальною умовою зберігання сироваток крові є заморожування за температури  $-20^{\circ}\text{C}$ . Заморожування зразків показало стабільність збереження рівня антирабічних антитіл протягом 84 днів. Максимальний термін зберігання сироваток крові за температури  $+4^{\circ}\text{C}$  становив 14 днів. Повторні цикли заморожування-розморожування критично впливали на показники активності антирабічних антитіл, на рівні 3-го циклу титри антирабічних антитіл у сироватках крові були у два-три рази менші ніж вихідні значення*

**Ключові слова:** сироватки крові, антирабічні антитіла, титр антитіл, умови зберігання, температура

Правильний відбір, пересилання й зберігання дослідних проб є необхідною умовою для забезпечення отримання достовірних результатів лабораторних досліджень. Відомо, що «збереженість антитіл» для лабораторних досліджень становить від кількох тижнів до багатьох років, що залежить від властивостей останніх і умов зберігання [1]. Однак для кожного антитіла є як загальні рекомендації, так і свої оптимальні умови щодо зберігання [2].

Нетривале зберігання антитіл відбувається, як правило, за температури  $\leq 4^{\circ}\text{C}$  у стерильних пробірках від одного до декількох тижнів. За більш високих температур відбуваються хімічні реакції, такі як окислення та протеолітична деградація білку, що може бути наслідком мікробного обмінення. Крім того, очищені антитіла за температури  $4^{\circ}\text{C}$  можуть осаджуватись.

Постійні цикли заморожування-розморожування можуть призвести до денатурації білка, як наслідок — зниження специфічної активності антитіл. Тому для збереження антитіл важливо користуватися спеціалізованим лабораторним обладнанням [3].

Для збільшення терміну зберігання антитіл, особливо очищених, потрібно застосувати відповідні діапазони температур, підтримку рН та, за потреби, додавання стабілізуючих речовин ікріопротекторів (сахароза, гліцерин, етиленгліколь тощо). Так, наприклад, кінцева концентрація гліцерину становить 10 або 50 %, а БСА — 0,05–0,5 % відповідно. Для стерилізації слід використовувати мембранні фільтри з діаметром пор близько 0,20–0,45 мкм та/чи обробку протимікробними засобами. Найбільш поширеними з останніх є тіомерсал натрію у кінцевій концентрації 0,01 %, ProClin 300 — 0,02 %, азид натрію — 0,02–0,05 % відповідно, гентаміцину сульфат — 50 мкг/см<sup>3</sup> [2]. Азид натрію не слід застосовувати у дослідженнях *in vivo* та *in vitro*, так як він індукує апоптозклітин і перешкоджає більшості реакцій кон'югації [4].

**Метою** наших досліджень було визначити активність антирабічних антитіл у сироватках крові за різних умов зберігання.

**Матеріали і методи.** Зразки сироваток крові були відібрані від собак і котів, що надійшли на дослідження до лабораторії з діагностики сказу науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ. Дослідження антирабічної віруснейтралізуючої активності сироваток крові проводилося методом FAVN-тест. Реакцію проводили в культурі клітин ВНК-21 С13 (ATCC CCL-10), вирощеній в 96-лункових мікропанелях з постійною дозою референс-штаму вірусу сказу CVS-11 (ATCC VR 959) [5].

Дослідні сироватки крові були розділені за видом, віком тварин й величиною титру антитіл. Крім індивідуальних досліджень, сформовано пули сироваток крові, які були розділені на декілька аліквот. Окремо було відібрано моносироватки з мінімальним захисним рівнем титру антитіл до вірусу сказу (0,50–0,87 МО/см<sup>3</sup>). Сироватки крові від собак (D) і котів (C) були об'єднані в пули (p) і розділені: 1 — тварини від 3 до 12 міс.; 2 — від 1 до 5 років; 3 — старше 5 років. Аналогічно відібрані моносироватки (m). Аліквоти зберігали за температури +4 ± 0,5 °С та замороженими (–20 ± 0,2 °С). Аналіз сироваток проводили за допомогою FAVN-тесту в день досліджень та відбору аліквот, через 7, 14, 21 і 28 діб, а також на 56-ту та 84-ту доби. Окремі аліквоти піддавали 5-ти разовому розморожуванню-заморожуванню з визначенням титру антитіл до вірусу сказу.

**Результати досліджень.** Зберігання сироваток крові за t +4 ± 0,5 °С залежить від первинного отримання та часу транспортування зразків до лабораторій. Перед дослідженням зразки сироваток крові були інактивовані за температури +56 ± 0,5 °С протягом 30 хв.

Показники титрів антирабічних антитіл у дослідних сироватках крові представлені в табл. 1.

**Таблиця 1** — Показники титрів антирабічних антитіл у сироватках крові тварин, що зберігалися за температури +4 ± 0,5 °С

№ з/п	Пул (p) сироватки крові	Вихідний титр, МО/см <sup>3</sup>	Зберігання за температури +4 ± 0,5 °С; період досліджень, діб; МО/см <sup>3</sup>				
			7	14	21	28	56
1	Dp1	1,95	1,95	2,56	2,56	1,95	–
2	Dp2	5,87	5,87	5,87	–	–	–
3	Dp3	5,87	10,21	5,87	5,87	–	–
4	Cp1	4,46	4,46	3,38	3,38	–	–
5	Cp2	17,74	17,74	17,74	–	–	–
6	Cp3	40,64	17,74	3,38	–	–	–

Примітка: «–» — непридатна — згортання білку, контамінація мікроорганізмами.

З табл. 1 видно, що на 7-му та 14-ту доби відмічали незначне зниження титру антитіл порівняно з вихідними значеннями. За результатами досліджень початковий титр у дослідних сироватках становив від 1,95 до 17,74 МО/см<sup>3</sup> і зберігався відносно сталим упродовж дослідження. У дослідній сироватці Cp3 спостерігали значне зниження титру антитіл. Так, на 7-му добу з 0,36 log<sub>50</sub> розведення сироватки — 17,74 МО/см<sup>3</sup> та на 14-ту — 1,08 log<sub>50</sub> — відповідно 3,38 МО/см<sup>3</sup> (заражаюча доза вірусу сказу CVS-11 була в межах 127–253 TCID<sub>50</sub>). Максимальний термін зберігання за звичайних умов холодильника становив для усіх сироваток крові 14 діб, на 21-шу добу були придатними 50 % сироваток крові, а на 28-му добу — лише одна відповідно.

У подальшому сироватки крові для досліджень були не придатними — у більшості випадків контаміновані.

У заморожених зразках сироваток крові спостерігали стабільність титру антитіл до вірусу сказу впродовж усього дослідного періоду. У деяких зразках встановлені відхилення специфічної активності до вірусу сказу в межах статистичної похибки реакції (табл. 2).

**Таблиця 2** — Стабільність титру антирабічних антитіл, що зберігалися за температури  $-20 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$

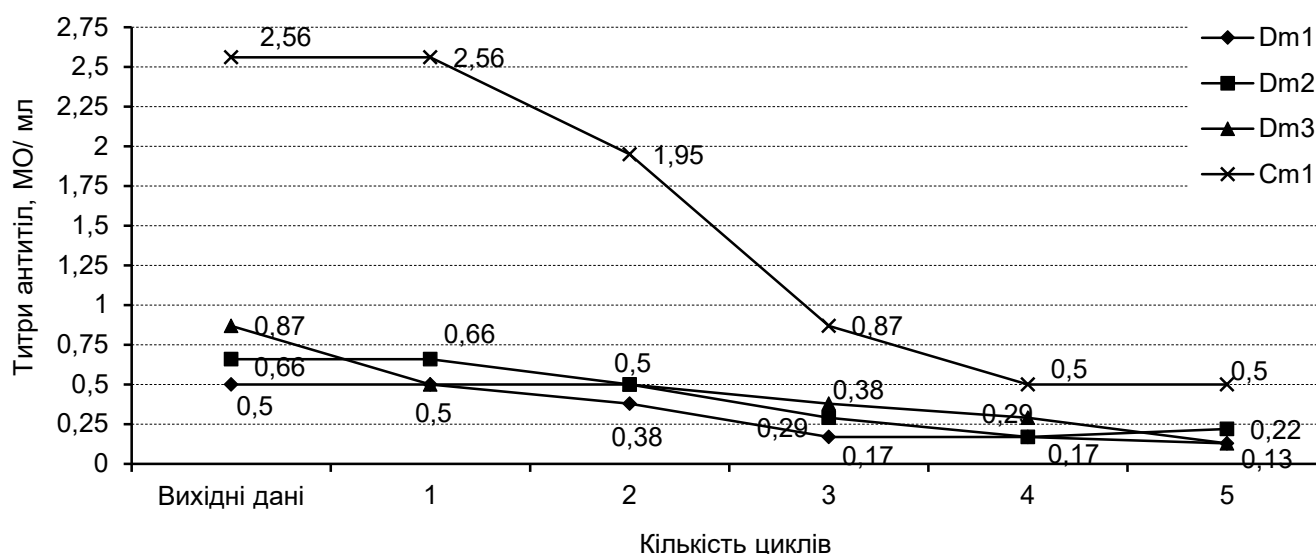
№ з/п	Пул (р) сироватки крові	Вихідний титр, МО/см <sup>3</sup>	Зберігання за температури $-20 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ; період досліджень, діб; МО/см <sup>3</sup>					
			7	14	21	28	56	84
1	Dp1	1,95	1,95	2,56	2,56	1,95	2,56	2,56
2	Dp2	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87
3	Dp3	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87
4	Ср1	3,38	4,46	4,46	3,38	4,46	3,38	3,38
5	Ср2	17,74	17,74	17,74	17,74	17,74	17,74	17,74
6	Ср3	40,64	17,74	17,74	17,74	17,74	17,74	17,74

Наступним етапом досліджень було визначення впливу п'ятикратного заморожування-розморожування на антирабічну активність сироваток крові (табл. 3).

**Таблиця 3** — Вплив температурних перепадів на титр антирабічних антитіл

№ з/п	Моно (т) сироватки крові	Вихідний титр, МО/см <sup>3</sup>	Зберігання за температури $-20 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ; період досліджень через кожні 7–14 діб; МО/см <sup>3</sup>				
			кратність заморожування-розморожування				
			1	2	3	4	5
1	Dm1	0,50	0,50	0,38	0,17	0,17	0,13
2	Dm2	0,66	0,66	0,50	0,29	0,17	0,22
3	Dm3	0,87	0,50	0,50	0,38	0,29	0,13
4	См1	2,56	2,56	1,95	0,87	0,50	0,50

У результаті заморожування та розморожування сироваток крові спостерігали значне зниження титру антитіл вже після 2-го циклу. Так, вже на рівні 3-го циклу заморожування-розморожування показники активності антирабічних антитіл сироватках крові становили у два-три рази менше значення порівняно з вихідними титрами (рис.).



**Рис.** Динаміка титрів антирабічних антитіл залежно від кратності заморожування-розморожування.

Отримані результати досліджень свідчать, що повторні цикли температурних перепадів критично впливають на титр антирабічних антитіл. Так, у дослідній сироватки Sm1 з вихідний рівень антитіл до вірусу сказу становив 2,56 МО/см<sup>3</sup>, після 5 циклів заморожування-розморожування рівень антитіл знизився до мінімального захисного — 0,50 МО/см<sup>3</sup> (рис.). Інші дослідні сироватки Dm1, Dm2, Dm3, в яких початкові показники були 0,50–0,66–0,87 МО/см<sup>3</sup> відповідно, вже на 2–3-му циклах мали рівень антитіл нижче за мінімально захисний — 0,38–0,29–0,17 МО/см<sup>3</sup>.

**Висновки.** Результати, представлені в нашому дослідженні, показали, що для неочищених сироваток крові заморожування за температури  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  є оптимальною умовою для зберігання. Заморожування зразків показало стабільність у збереженні рівня антирабічних антитіл. Після розморожування дослідних зразків сироваток крові в подальшому їх слід зберігати за температури  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Однак, зберігання сироваток крові за температури  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  придатне лише для короткочасного зберігання (не більше 14 діб).

Отримані результати свідчать, що температура й тривалість зберігання сироваток крові є важливим фактором в отриманні достовірних результатів, що необхідно враховувати спеціалістам ветеринарної медицини при надсиланні зразків на дослідження у спеціалізовані лабораторії.

### Список літератури

1. Argentieri M. [et al.] Antibodies are forever: a study using 12–26-year-old expired antibodies. *Histopathology*. 2013. Vol. 63. P. 869–876.
2. Johnson M. Antibody shelf life/How to store antibodies. *Materials and Methods*. 2012. Vol. 2. P. 120.
3. De Ceuninck F. [et al.]. Development of an enzyme-linked immunoassay for the quantification of YKL-40 (cartilage gp-39) in guinea pig serum using hen egg yolk antibodies. *Journal of Immunological Methods*. 2001. Vol. 252. P. 153–161.
4. Ji D., Kamalden T. A., del Olmo-Aguado S., Osborne N. N. Light- and sodium azide-induced death of RGC-5 cells in culture occurs via different mechanisms. *Apoptosis*. 2011. Vol. 16, No. 4. P. 425–437.
5. OIE (World Organisation for Animal Health). Chapter 3.1.17. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses) [Electronic Resource]. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*. Paris: OIE, 2018. Access mode : [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.17\\_RABIES.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf).

### ACTIVITY OF ANTIRABIC ANTIBODIES IN BLOOD SERUM UNDER THE DIFFERENT STORAGE CONDITIONS

**Rudoi O. V., Dzyuba Ya. M., Polupan I. M.**

*State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv, Ukraine*

*Objective: to determine of the activity of antirabic antibodies in blood serum under the different conditions of storage. Materials and methods. Samples of serums from dogs and cats, which got into the laboratory of rabies diagnostics of SSRILDVSE for research. Rabies virus-neutralizing activity of blood serum was tested using the FAVN test. Serum samples were sorted by species, age of animals and titer of rabies antibodies. Aliquots were stored at a temperature of  $+4 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $-20 \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  and exposed to 5-fold defrosting-freezing. The tests were carried out at the beginning, after 7, 14, 21, 28, 56, 84 days. Results. Period of storage of blood serum at a temperature  $+4 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  was 28 days for one of test samples, three of samples were stored for 21 days, but the maximum period for all samples was 14 days. The initial titers of rabies antibodies in sera ranged from 1.95 to 17.74 IU/cm<sup>3</sup> and were relatively stable during the period of experiment. In frozen samples of serum the stability of the titer of rabies antibodies was observed throughout the period of experiment. As a result of freezing and thawing of serum, a decrease in the activity of anti-rabies antibodies was observed. Two to three times decrease compared with the initial values was already observed on the 3<sup>rd</sup> cycle. The initial indicators were at the level of 0.50–0.66–0.87 IU/cm<sup>3</sup>. On the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> cycles, the antibody level was 0.38–0.29–0.17 IU/cm<sup>3</sup>, respectively, which is below the minimum protective titer — 0.50 IU/cm<sup>3</sup>. Conclusion: The results presented in our study, showed that for serum freezing the temperature of  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  is the optimal condition for storage. Freezing samples showed stability in maintaining the level of titers of rabies antibodies. After thawing of experimental samples of serum, they should be stored at a temperature of  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , but not longer than for 14 days. The results obtained indicate that the temperature and duration of storage of serum is an important factor in obtaining reliable results. It should be taken into account by veterinary medicine specialists when transfer samples for research in laboratory*

**Keywords:** serum, rabies antibodies, antibody titer, storage conditions, temperature