

УДК 636:616.98:57.083.33

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ТРЬОХ НАБОРІВ ДЛЯ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ САПУ В РЕАКЦІЇ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ

Р. В. Козій
rvkoziy@yahoo.com

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна, admin@biocontrol.com.ua

В останні роки сап набуває дедалі більшого значення, оскільки за рахунок руху коней під час міжнародної торгівлі, міжнародних кінних змагань тощо існує ризик занесення цієї хвороби з ендемічних (Бразилія, Близький Схід, Пакистан, Індія, Монголія тощо) у вільні регіони. Єдиним природним джерелом збудника сапу *Burkholderia mallei* є інфіковані тварини. Тому основною передумовою ефективного контролю поширення сапу є своєчасне виявлення та ізоляція хронічно та латентно хворих тварин.

Згідно з чинною Інструкцією щодо профілактики та боротьби з сапом тварин, основним методом серологічної діагностики сапу є реакція аглютинації (РА), що не відповідає міжнародним вимогам. Єдиним методом серологічної діагностики сапу, визнаним МЕБ для міжнародної торгівлі кінськими, є реакція зв'язування комплементу (РЗК). У зв'язку з цим, у лабораторіях ветеринарної медицини України для рутинної діагностики сапу застосовують РЗК з використанням набору виробництва БІОК (Росія).

Метою цієї роботи було провести порівняльну оцінку діагностичної чутливості та специфічності трьох наборів для реакції зв'язування комплементу, а саме с.с.про (Німеччина), БІОК (Росія) та Јовас (Йорданія).

Досліджено лабораторну панель з 711 негативних сироваток та 94 референтних позитивних сироваток. Реакцію проводили мікрометодом згідно із СОП референтної лабораторії ЄС з сапу та інструкції виробника.

Встановлено, що найвища специфічність була у набору БІОК (99,7 %), а найвища чутливість — у набору с.с.про (97,9 %). Враховуючи літературні дані, результати наших досліджень та рекомендації МЕБ щодо серологічної діагностики сапу коней, рекомендуємо внести зміни до Інструкції щодо профілактики та боротьби з сапом тварин та використовувати РЗК як основний метод для серологічної діагностики сапу.

Ключові слова: *BURKHOLDERIA MALLEI*, САП, РЕАКЦІЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ, РЗК

COMPARATIVE EVALUATION OF THREE KITS FOR THE SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF GLANDERS IN COMPLEMENT FIXATION TEST

R. Koziy
rvkoziy@yahoo.com

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms,
30 Donetska str., Kyiv 03151, Ukraine, admin@biocontrol.com.ua

In recent years the problem of glanders becomes more important because there is a growing danger of reintroducing this disease from endemic regions (Brazil, Middle East, Pakistan, India, Mongolia etc.) into glanders-free regions due to the movement of equines for the international trade or competitions. The only natural reservoir of the causative agent of glanders *Burkholderia mallei* is the infected animals. For this reason early identification and isolation of chronically and latently infected animals are essential for an effective control of glanders outbreaks.

According to the current Guideline of prevention and control of glanders in animals, the principal method of the serological diagnosis of glanders is agglutination test which does not comply with the international requirements. The only test for the diagnosis of glanders prescribed by OIE for the international trade is complement fixation test (CFT). Accordingly, CFT using the kit produced by BIOK (Russia) is routinely performed for the diagnosis of glanders at the laboratories of veterinary medicine in Ukraine.

The aim of this work was to evaluate comparatively the diagnostic sensitivity and specificity of three complement fixation test kits, namely *c.c.pro* (Germany), *BIOK* (Russia) and *Jovac* (Jordan).

A laboratory panel of 711 negative sera and 94 referent positive sera were tested. The test was performed using micromethod according to the SOP of the EU reference laboratory for glanders and manufacturer guidelines.

The highest specificity was found for the *BIOK* CFT kit (99.7 %) while the highest sensitivity was found for the *c.c.pro* CFT kit (97.9 %). Taking into account the literature data, results of our study and the OIE recommendations for the serological diagnosis of glanders in horses, changes to the Guidelines for the prevention and eradication of glanders in animals should be made and CFT should be used as the primary test for the serological diagnosis of glanders.

Keywords: *BURKHOLDERIA MALLEI*, GLANDERS, COMPLEMENT FIXATION TEST, CFT

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТРЕХ НАБОРОВ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ САПА В РЕАКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

Р. В. Козий

rvkoziy@yahoo.com

Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов, ул. Донецкая, 30, г. Киев, 03151, Украина, admin@biocontrol.com.ua

Значение сапа в последние годы возрастает. Это связано с тем, что за счет передвижения лошадей во время международной торговли, международных конных соревнований существует возможность занесения этой болезни из эндемических (Бразилия, Ближний Восток, Пакистан, Индия, Монголия и т.д.) регионов в свободные. Единственным природным источником возбудителя сапа являются животные, инфицированные *Burkholderia mallei*. Поэтому основой эффективного контроля распространения сапа является своевременное выявление и изоляция хронически и латентно больных животных.

Согласно действующей инструкции по профилактике и борьбе с сапом животных, основным методом серологической диагностики сапа является реакция агглютинации (РА), что не соответствует международным требованиям. Единственным методом серологической диагностики сапа, признанным МЭБ для международной торговли лошадьми, является реакция связывания комплемента (РСК). В связи с этим, в лабораториях ветеринарной медицины Украины для рутинной диагностики сапа применяют РСК с использованием набора производства БИОК (Россия).

Целью данной работы было провести сравнительную оценку диагностической чувствительности и специфичности трех наборов для реакции связывания комплемента, а именно *c.c.pro* (Германия), БИОК (Россия) та *Jovac* (Иордания).

Исследовано лабораторную панель из 711 негативных сывороток и 94 референтных позитивных сывороток. Реакцию проводили микрометодом согласно СОП референтной лаборатории ЕС по сапу и инструкции производителя.

Установлено, что самая высокая специфичность установлена у набора БИОК (99,7 %), а самая высокая чувствительность — у набора *c.c.pro* (97,9 %). Принимая во внимание литературные данные, результаты наших исследований и рекомендации МЭБ по серологической диагностике сапа лошадей, рекомендуем внести изменения в Инструкцию по профилактике и борьбе с сапом животных и использовать РСК в качестве основного метода для серологической диагностики сапа.

Ключевые слова: *BURKHOLDERIA MALLEI*, САП, РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА, РСК

Сап — це інфекційна зоонозна хвороба, спричинена бактерією *Burkholderia mallei*. На сап хворіють здебільшого представники родини конячих — коні, віслюки, мули. Чутливі до сапу і деякі інші види тварин, зокре-

ма верблюди, представники родини котячих та собак, дрібна рогата худоба, а також люди. В останні роки сап набуває дедалі більшого значення, оскільки за рахунок руху коней під час міжнародної торгівлі, міжнародних зма-

гань тощо існує ризик занесення хвороби з ендемічних (Бразилія, Близький Схід, Пакистан, Індія, Монголія тощо) у вільні регіони [1]. Наприклад, у 2006 році у Німеччині сап діагностували у кобили, імпортованої з Бразилії [2]. Результати досліджень цієї тварини на сап під час транспортування та карантинування були негативними. Однак через місяць після імпортування у кобили проявилися характерні для цієї хвороби симптоми. Результати лабораторних досліджень виявились позитивними. Цей випадок ще раз підкреслює важливість проведення ветеринарно-санітарних заходів під час імпортування коней з метою запобігання занесенню сапу на територію України.

Близько 90 % випадків захворювання коней проходить у хронічній або латентній безсимптомній формі [3]. Єдиним природним резервуаром збудника сапу у природі є коні [4]. Основна передумова ефективного контролювання поширення сапу — своєчасне виявлення та ізоляція хронічно та латентно хворих тварин.

Найнадійнішим методом постановки діагнозу на сап є виявлення та ідентифікація *B. mallei* з уражених тканин або секретів інфікованих тварин. Однак навіть у свіжих зразках, отриманих за стерильних умов, ріст *B. mallei* часто інгібується сторонньою мікрофлорою. Внаслідок цього ізоляція збудника сапу значно ускладнюється [5, 6]. Наприклад, у наведеному вище випадку сапу в імпортованій кобилі у Німеччині виділити чисту культуру *B. mallei* з уражених тканин під час діагностичного патрозтину не вдалося.

Малеїнова проба широко застосовувалася для діагностики сапу під час проведення програм з ліквідації сапу і залишається важливим методом діагностики цієї хвороби у багатьох країнах. Однак окремі дослідження [7, 8] показали, що лише 46–75 % клінічно хворих коней мали позитивну реакцію за дослідження цим методом. Крім того, можлива хибно-позитивна реакція у тварин, сенситизованих до збудників меліоїдозу *B. pseudo-mallei* та миту *Streptococcus equi ssp. equi* [9]. Також введення малеїну стимулює гуморальну імунну відповідь, яка у деяких тварин

може бути тривалою і перешкоджати подальшій серологічній діагностиці [10].

У літературі описано низку методів серологічної діагностики сапу: реакція зв'язування комплементу (РЗК), імуноферментний аналіз (ІФА), Роз-Бенгал проба (РБП), реакція непрямой гемаглютинації (РНГА), реакція імуноелектрофорезу (РІЕ) тощо [9]. РЗК — єдиний метод серологічної діагностики сапу, визнаний МЕБ для міжнародної торгівлі кінями на сьогодні [5]. Цей метод було розроблено для діагностики сапу К. Шютцем і О. Шубертом у 1909 році. Антитіла проти *B. mallei* виявляються в РЗК уже через 1 тиждень після інфікування [6] і результати тесту залишаються позитивними навіть за хронічного чи латентного перебігу хвороби.

Існують різні комерційні набори РЗК для діагностики сапу коней. В Україні для рутинної діагностики використовують набір РЗК виробництва *БІОК* (Росія).

Мета роботи — вивчити діагностичну чутливість та специфічність трьох комерційних наборів для РЗК для діагностики сапу коней, а саме: ФКП «Курська біофабрика — фірма „БІОК”» (Росія), *s.c.pro* (Німеччина) і *Jovac* (Йорданія) та визначити подальший алгоритм серологічної діагностики сапу в Україні.

Матеріали і методи

Для визначення діагностичної чутливості використовували 94 сироватки крові коней, відібраних з різних ендемічних щодо сапу регіонів — Пакистану, Кувейту, Лівану, ОАЕ (група I). Вони були підтверджені як позитивні шляхом виділення та ідентифікації збудника сапу *B. mallei* або методом імуноблоту. Ці сироватки були надані з колекції референтної лабораторії МЕБ з сапу в Інституті ім. Фрідріха Лефлера, м. Єна, Німеччина. У якості панелі негативних сироваток для визначення специфічності використовували 711 сироваток крові коней, відібраних з різних регіонів України (група II).

РЗК проводили мікрометодом згідно з інструкцією виробника та Стандартною операційною процедурою Референтної лабораторії Європейського Союзу з сапу [11]. Під

час постановки реакції за допомогою антигенів *s.c.pro* та *Jovac* використовували метод реакції тривалого зв'язування комплементу (РТЗК). Дослідження проводили на базі референтної лабораторії МЕБ з сапу в Інституті ім. Фрідріха Лефлера, (м. Єна, Німеччина).

Чутливість визначали за формулою [12]:

$$\frac{РП - ХН}{РП} \times 100\%,$$

де РП — референтні позитивні сироватки;
ХН — хибно негативні результати реакції.

Специфічність реакції визначали за формулою [12]:

$$\frac{РН - ХП}{РН} \times 100\%,$$

де РН — референтні негативні сироватки;
ХП — хибно позитивні результати реакції.

Коефіцієнт погодження (каппа Коена) визначали згідно з методикою, описаною Viera A. J. та Garrett G. M. [13]. Каппа Коена дозволяє встановити співвідношення між фактичним погодженням двох спостережень та погодженням, яке могло виникнути випадково. Каппа Коена визначається за формулою:

$$K = \frac{\text{Фактичне погодження} - \text{Випадкове погодження}}{\text{Максимальне погодження} - \text{Випадкове погодження}},$$

де максимальне погодження дорівнює 1.

Значення коефіцієнта 0 вказує на відсутність погодження результатів дослідження з референтними показниками, а значення 1 — на ідеальне погодження результатів. Значення $\geq 0,75$ вказує на високий ступінь погодження [13].

Результати й обговорення

Результати проведених досліджень наведені у *Таблиці 1*.

За результатами, поданими у *Таблиці 1*, визначали діагностичну чутливість та специфічність наборів для РЗК для діагностики сапу, а також ступінь погодження отриманих результатів з референтними сироватками (*Табл. 2*). Зразки, які показали антикомплемтарну активність, не враховували.

Отже, найвища специфічність була в антигену для РЗК *БИОК* (99,7 %), а найвища чутливість — в антигену *s.c.pro* (97,9 %). Загалом результати РЗК з антигеном *s.c.pro* були найбільш близькими до референтних даних (коефіцієнт погодження каппа 0,903), а результати РЗК з антигенами *БИОК* та *Jovac* були менш відповідними (коефіцієнт погодження каппа — 0,853 та 0,793 відповідно).

За даними різних авторів, а також за попередніми результатами наших досліджень, специфічність та особливо чутливість РЗК

Таблиця 1

Результати досліджень референтних зразків сироватки крові за допомогою різних наборів для діагностики сапу в РЗК

Група	n	<i>s.c.pro</i>			<i>БИОК</i>			<i>Jovac</i>		
		АКА	Поз	Нег	АКА	Поз	Нег	АКА	Поз	Нег
I	94	0	92	2	6	69	19	1	68	25
II	711	9	15	687	1	2	708	9	6	696

Примітка: АКА — антикомплемтарна активність, Поз — позитивний результат, Нег — негативний результат

Таблиця 2

Діагностична специфічність та чутливість наборів РЗК для діагностики сапу

Показники	<i>s.c.pro</i>	<i>БИОК</i>	<i>Jovac</i>
Специфічність, %	97,9	99,7	99,1
Чутливість, %	97,9	78,4	73,1
Коефіцієнт погодження (каппа)	0,903	0,853	0,793

можуть суттєво варіювати. Так, I. Khan зі співавт. [14] проводили порівняльне дослідження трьох комерційних антигенів для РЗК — *USDA*, *CIDC* та *c.c.pro* і виявили, що чутливість антигену *USDA* склала 62,2 %, *CIDC* — 100 %, *c.c.pro* — 99,4 %. Результати проведених нами досліджень вказують на подібні відмінності чутливості РЗК при порівняльному дослідженні антигенів *c.c.pro* (97,9 %), *БІОК* (78,4 %) та *Jovac* (73,1 %). Варто погодитися, що ці відмінності можуть залежати від штаму *B. mallei*, який використовується для виробництва антигену, методики постановки реакції, походження досліджуваних сироваток з ендемічних чи вільних від сапу регіонів [15].

Також існують повідомлення про те, що застосування реакції тривалого зв'язування комплементу (РТЗК) замість РЗК дозволяє підвищити чутливість реакції [16], що підтверджується результатами наших досліджень. Крім того, потрібно враховувати, що, за даними I. Khan та співавт. [16], використання РТЗК може призводити до зниження діагностичної специфічності методу.

Діагностична специфічність усіх антигенів була менш варіабельною і склала 97,9 % (*c.c.pro*), 99,7 % (*БІОК*), 99,1 % (*Jovac*). Khan I. зі співавт. [14] встановили, що діагностична специфічність *c.c.pro* склала 96,5 %, *CIDC* — 97,04 %, та *USDA* — 100 %, що відповідає результатам наших досліджень.

Отже, РЗК — досить простий і доступний метод серологічної діагностики сапу. Серед недоліків РЗК — небажана антикомплементарна активність сироваток, використання антигенів з цілих клітин *B. mallei*, що знижує специфічність та чутливість методу.

Перспективними напрямками удосконалення серологічної діагностики сапу може бути виготовлення очищених антигенів на основі ліпополісахаридів та О-полісахариду клітинної стінки *B. mallei*, використання рекомбінантних видоспецифічних протеїнів у якості антигену тощо [3].

В Україні відсутні набори для серологічної діагностики сапу власного виробництва. За результатами наших досліджень, набір для РЗК для діагностики сапу виробництва *БІОК* (Росія) мав високу діагностичну

специфічність (99,7 %), однак діагностична чутливість цього набору була значно нижчою (78,4 %) порівняно з набором *c.c.pro* (97,9 %), який використовується референтною лабораторією МЕБ з сапу. Тому, на нашу думку, для підвищення діагностичної чутливості методу перспективним є впровадження РТЗК для серологічної діагностики сапу.

Висновки

1. За порівняння діагностичної чутливості та специфічності трьох комерційних наборів для РЗК для діагностики сапу найвища специфічність встановлена у набору *БІОК* (99,7 %), найвища чутливість — у набору *c.c.pro* (97,9 %).

2. На сьогодні РЗК залишається єдиним методом, визнаним МЕБ для міжнародної торгівлі кінями. Однак чинною в Україні Інструкцією щодо профілактики та боротьби із сапом тварин, рекомендованим методом серологічної діагностики, є реакція аглютинації (РА).

3. Враховуючи літературні дані, результати наших досліджень та рекомендації МЕБ щодо серологічної діагностики сапу коней, вважаємо за необхідне внести зміни до Інструкції щодо профілактики та боротьби з сапом тварин та використовувати РЗК як основний метод для серологічної діагностики сапу.

Перспективи подальших досліджень.

У зв'язку з особливостями патогенезу сапу та властивостями збудника *B. Mallei*, серологічні методи досліджень продовжують відігравати вирішальну роль у лабораторній діагностиці сапу. Розроблено низку методів серологічної діагностики сапу, серед яких можна виокремити РЗК, РА, РБП, ІФА, РНГА, Вестерн блот, зустрічний імуоелектрофорез тощо. Серед перспективних напрямків удосконалення серологічних методів діагностики сапу, зокрема ІФА та Вестерн блоту, є отримання та характеристика моноклональних антитіл, специфічних до видоспецифічних епітопів ЛПС *B. mallei*. Ідентифікація нових білкових антигенів, а також вивчення специфічних епітопів ліпополісахараду та капсульного полісахариду дозволить значно підвищи-

ти чутливість та специфічність серологічних методів діагностики сапу. Ці антигени необхідно оцінити при постановці ІФА, Вестерн блоту та РЗК для визначення можливості їх використання для скринінгових досліджень на сап тварин.

1. Pal V., Kumar S., Malik P., Rai G. P. Evaluation of recombinant proteins of *Burkholderia mallei* for serodiagnosis of glanders. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2012, 19 (8), pp. 1190–1198.

2. Elschner M., Liebler-Tenorio E., Wohlsein P., Lange E., Kaden V. Rotz — Ein im Jahr 2006 nach Deutschland importierter Rotz-Fall zeigt, dass diese Erkrankung eine allgegenwärtige Gefahr ist. *FLI Jahresbericht.*, 2006, pp. 67–71.

3. Neubauer H., Sprague L. D., Zacharia R., Tomaso H., Al Dahouk S., Wernery R., Wernery U., Scholz H. C. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *J. Vet. Med.*, 2005, 52, pp. 201–205.

4. Gregory B. C., Waag D. M. Chapter 6. Glanders. *Medical Aspects of Biological Warfare*. 2006, pp. 95–106.

5. OIE Terrestrial Manual 7th Edition, Chapter 2.5.11. Glanders, 2013. Available at: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

6. Dvorak G. D., Spickler A. R. Glanders *JAVMA*, 2008, 233 (4), pp. 570–577.

7. Muhammad G., Khan M. Z., Athar M. Clinico-microbiological and Therapeutic aspects of Glanders in Equines. *J. Equine Sci.*, 1998, 9 (3), pp. 93–96.

8. Naureen A., Saqib M., Muhammad G., Husain M. H., Asi M. N. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagno-

sis of equine glanders. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2007, 19, pp. 362–367.

9. Al-Ani F. K., Robertson J. Glanders in horses: a review of literature. *Veterinary Archive*, 2007, 77 (3), pp. 203–218.

10. Hagebock J. M., Schlater L. K., Frerichs W. M., Olson D. P. Serologic responses to the mallein test for glanders in solipeds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1993, 5, pp. 97–99.

11. Glanders complement fixation test (EU RL cold technique) Standard operating procedure. 2012. Available at: <https://sites.anses.fr/sites/default/files/documents/EQU-Ts-Glanders-CFT.pdf>

12. Martin S. W. The Evaluation of Tests *Can. J. comp. med.*, 1977, 41, pp. 19–25.

13. Viera A. J., Garrett G. M. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med.*, 2005, 37 (5), pp. 360–363.

14. Khan I., Wieler L. H., Melzer F., Gwida M., Santana V. L. de A., de Souza M. M. A., Saqib M., Elschner M. C., Neubauer H. Comparative evaluation of three commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of glanders. *Veterinary Record*, 2011, 169. DOI: 10.1136/vr.d5410

15. Khan I., Wieler L. H., Melzer F., Elschner M. C., Muhammad G., Ali S., Sprague L. D., Neubauer H., Saqib M. Glanders in animals: a review of epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2013, 60 (3), pp. 204–221. DOI:10.1111/j.1865-1682.2012.01342.x

16. Khan. I., Wieler L. H., Saqib M., Melzer F., Santana V. L. de A., Neubauer H., Elschner M. C. Effect of incubation temperature on the diagnostic sensitivity of the glanders complement fixation test. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 2014, 33 (3).