

## ЕФЕКТИВНІСТЬ ДІАГНОСТИКИ ТОКСОПЛАЗМОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА ДОПОМОГОЮ ІМУННОГО БІОСЕНСОРА

М. В. Галат, К. Є. Шаванова, М. Б. Стрільчук, Н. Ф. Шпирка, М. Ф. Стародуб  
galat\_mv@gmail.com

Національний університет біоресурсів і природокористування України,  
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

*Для зажиттєвої діагностики токсоплазмозу запропоновано значну кількість лабораторних методів, однак їх ефективність не завжди відповідає вимогам фахівців ветеринарної медицини. У зв'язку з цим був розроблений і випробуваний новий метод зажиттєвої діагностики цієї хвороби з використанням імунного біосенсора «Плазмотест» на основі поверхневого плазмового резонансу (ППР). Дослідження сироваток крові великої рогатої худоби з метою діагностування токсоплазмозу проведені в лабораторіях біосенсоріки і кафедри паразитології і тропічної ветеринарії НУБіП України у 2014–2016 рр. У досліджах було використано 48 голів великої рогатої худоби різних порід та за різних умов утримання. Їх вік коливався від 5 місяців до 7 років.*

*Результати досліджень сироваток крові, проведених за допомогою імунного біосенсора, показали його вищу ефективність щодо виявлення в організмі великої рогатої худоби збудника одноклітинного паразитичного організму *Toxoplasma gondii* порівняно з результатами, одержаними при застосуванні методу імуноферментного аналізу (ІФА).*

*Не встановлено суттєвої різниці у ступені зараження збудником токсоплазмозу організму самців та самок великої рогатої худоби. Доведено зростання інтенсивності інвазії з віком тварин. Так, у віці до чотирьох років на наявність антитіл до токсоплазм позитивно прореагували 4,8 % тварин, тоді як серед великої рогатої худоби, старшої за чотири роки — 29,6 %.*

**Ключові слова:** ТОКСОПЛАЗМОЗ, ВЕЛИКА РОГАТА ХУДОБА, *TOXOPLASMA GONDII*, СИРОВАТКИ КРОВІ, МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ, ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ, ІМУННИЙ БІОСЕНСОР

## EFFICIENCY OF DIAGNOSTICS OF CATTLE TOXOPLASMOSIS WITH THE HELP OF THE IMMUNE BIOSENSOR

М. V. Halat, K. Ye. Shavanova, M. B. Strilchuk, N. F. Shpyrka, M. F. Starodub  
galat\_mv@gmail.com

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,  
15 Heroiv Oborony str., Kyiv 03041, Ukraine

*For life-time toxoplasmosis diagnostics a significant number of laboratory methods were offered. However, their effectiveness is not always sufficient to the needs of specialists of veterinary medicine. In this regard a new method of life-time diagnostics of this disease using immune biosensor “Plazmotest” based on surface plasma resonance (SPR) was developed and tested. The study of blood serum of cattle in order to establish the diagnosis of toxoplasmosis was conducted in laboratories of Biosensors and Department of Parasitology and Tropical Veterinary NULES of Ukraine during 2014–2016. In the experiments 48 animals of different cattle breeds hold in different conditions were used. The age of animals was from 5 months to 7 years.*

*The results of investigations of blood sera with the help of immune biosensor showed a higher effectiveness regarding its detection an agent of parasitic unicellular organism *Toxoplasma gondii* in the of cattle organism compared to the results obtained by applying the method of enzyme immunoassay (ELISA).*

*No significant difference of the degree of infection with toxoplasmosis agent in cattle males and females was found. An increase of the infestation intensity with the age of animals was proved. So, at the age of four years, 4.8 % of the animals reacted positively to the presence of antibodies to *Toxoplasma*, while in cattle older than four years — 29.6 %.*

**Keywords:** TOXOPLASMOSIS, CATTLE, *TOXOPLASMA GONDII*, SERUMS OF BLOOD, METHODS OF DIAGNOSIS, ELISA, IMMUNE BIOSENSOR

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДИАГНОСТИКИ ТОКСОПЛАЗМОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ПОМОЩЬЮ ИМУННОГО БИОСЕНСОРА

М. В. Галат, К. Е. Шаванова, М. Б. Стрільчук, Н. Ф. Шпырка, М. Ф. Стародуб  
galat\_mv@gmail.com

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,  
ул. Героев Оборона, 15, г. Киев, 03041, Украина

Для прижизненной диагностики токсоплазмоза предложено значительное количество лабораторных методов, однако их эффективность не всегда соответствует требованиям специалистов ветеринарной медицины. В связи с этим, был разработан и испытан новый метод прижизненной диагностики этой болезни с использованием иммунного биосенсора «Плазмостест» на основе поверхностного плазменного резонанса (ППР). Исследование сывороток крови крупного рогатого скота с целью диагностирования токсоплазмоза проведенные в лабораториях биосенсорики и кафедры паразитологии и тропической ветеринарии НУБиП Украины в 2014–2016 гг. В опытах было использовано 48 голов крупного рогатого скота различных пород и при различных условиях содержания. Их возраст колебался от 5 месяцев до 7 лет.

Результаты исследований сывороток крови, проведенных с помощью иммунного биосенсора, показали более высокую его эффективность по выявлению в организме крупного рогатого скота возбудителя одноклеточного паразитического организма *Toxoplasma gondii* по сравнению с результатами, полученными при применении метода иммуноферментного анализа (ИФА).

Не установлено существенных различий в степени заражения возбудителем токсоплазмоза организма самцов и самок крупного рогатого скота. Доказано рост интенсивности инвазии с возрастом животных. Так, в возрасте до четырех лет на наличие антител к токсоплазмам положительно отреагировали 4,8 % животных, в то время как среди крупного рогатого скота старше четырех лет — 29,6 %.

**Ключевые слова:** ТОКСОПЛАЗМОЗ, КРУПНЫЙ РОГАТЫЙ СКОТ, *TOXOPLASMA GONDII*, СЫВОРОТКА КРОВИ, МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ, ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, ИМУННЫЙ БИОСЕНСОР

Токсоплазмоз — протозойна хвороба домашніх і диких тварин, а також людини, яку спричиняють одноклітинні паразити *Toxoplasma gondii*. Збудник належить до підкласу *Coccidiasina*, класу *Sporozoasida*, типу *Apicomplexa* [2]. Він уражає клітини нервової, ендокринної систем та мононуклеарні фагоцити [4].

Зажиттєво діагноз на токсоплазмоз встановлюють лабораторними методами [3], серед яких нині широко використовують такі: аглютинацію, імунофлуоресценцію, непрямую гемаглютинацію, латексаглютинацію, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) та твердофазний імуноферментний аналіз (ІФА). Останній є найпоширенішим у застосуванні [1]. Разом з тим, слід зазначити, що всі перераховані методи не задовольняють повністю вимог практики, оскільки вони переважно є рутинними, не можуть бути здійснені у польових умовах, вимагають значного часу та додаткових мічених компонентів, як це відбувається за постановки реакції ІФА, та є надто затратними, особливо порівняно з ПЛР. Тому наразі доволі актуальною є проблема пошуку ефективних, надійних

та недорогих методів діагностики цієї хвороби [9]. Так, експериментально був розроблений новий електрохімічний імуносенсор для виявлення *Toxoplasma*-специфічного IgM. Імуносенсор показав хорошу відтворюваність, стійкість, вибірковість [5]. Є відомості щодо вивчення імуноглобуліну класу G збудника токсоплазмозу *Toxoplasma gondii* шляхом утворення сендвіч-комплексу аптамери-білок-аптамери (TGA6-IgG-TGA7) і захоплення його на багатолунковому мікропланшеті. Приймач, що опрацював криві 212-ти клінічних зразків, показав чутливість 94,8 % і 95,7 % специфічність, що, на думку авторів, може бути перспективним для скринінгу токсоплазмозу [6]. Є дані і щодо ефективності імунохроматографічного аналізу за допомогою золотих наночастинок, покритих поліклональними антитілами проти мікоплазми (*Mycoplasma suis*) — якісного тесту з візуальною оцінкою результатів та часом аналізу понад 10 хв [7].

Аналізуючи наявні попередні напрацювання вітчизняних та іноземних науковців, слід зазначити, що заплановані та здійснені

дослідження, зокрема щодо імунохімічного встановлення токсоплазмозу, створили можливість запропонувати принципово новий метод діагностики цієї хвороби. В поданій статті аналізуються результати щодо ефективності імунохімічної діагностики токсоплазмозу з застосуванням імунного біосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР).

### Матеріали і методи

Роботу виконували впродовж 2014–2016 рр. на базі лабораторій біосенсорики і кафедри паразитології та тропічної ветеринарії Національного університету біоресурсів і природокористування України. Було досліджено сироватки крові від 48 тварин великої рогатої худоби (ВРХ) віком від 5 місяців до 7 років, різних порід та за різних умов їх утримання. З них 17 — від тварин, власниками яких були приватні мешканці сіл Тернопільської області, а 31 — від тварин господарства цієї ж області.

Під час виконання роботи використовували імунний біосенсор «Плазмотест» на основі ППР. Для управління приладом, збору та обробки результатів досліджень була розроблена спеціальна програма «Plasmon» [8]. Особливу увагу при використанні імунного біосенсора було приділено формуванню селективного шару на поверхні трансдюсера. Високу щільність іммобілізованого матеріалу

досягали за рахунок нанесення проміжного шару з поліаліламіну гідрохлориду (ПААГ). Блокування вільних місць зв'язування після іммобілізації селективного шару забезпечувалась обробкою поверхні розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА).

Паралельно з імунним біосенсором, цю хворобу діагностували з використанням імуноферментного аналізу за допомогою тест-системи — набору реагентів D1764 для імуноферментного виявлення сумарних антитіл до *Toxoplasma gondii* «ВектоТоксо-антитіла» (виробник ЗАТ «Вектор-бест», Новосибірськ, Російська Федерація).

### Результати й обговорення

З дослідженої за допомогою імунного біосенсора на основі ППР загальної кількості сироваток крові ВРХ позитивними виявилися 9 (18,8 %), сумнівними — 3 (6,2 %). Негативно прореагували 36 тварин (75,0 %).

Для підвищення чутливості і збільшення рівня визначення біосенсора проводили попередню підготовку його трансдюсера. При нанесенні кожного наступного робочого розчину спостерігалася зміна резонансного кута. Із введенням у вимірювальну комірку сироватки крові клінічно хворих на токсоплазмоз тварин величина відгуку біосенсора суттєво збільшувалася. Таким чином, іммобілізація антигену забезпечувала селективне зв'язування специфічних антитіл із сироватки крові тварин. Утворення на поверхні біосенсора імунних комплексів спричинює зсув резонансного кута пропорційно до кількості антитіл у пробі, що відповідає стадії розвитку хвороби (рис. 1).

Позитивні результати були зафіксовані у 2 голів ВРХ, які належали приватним власникам, що становило 11,8 %. Сумнівно прореагували на токсоплазмоз сироватки крові лише від однієї тварини (5,9 %). Водночас більшість тварин (14 голів, 82,3 %) прореагувала негативно.

Позитивні результати щодо виявлення антитіл до *T. gondii* було зареєстровано серед 7 тварин (22,6 %), які належали приватному підприємству; це на 10,8 % більше, ніж серед

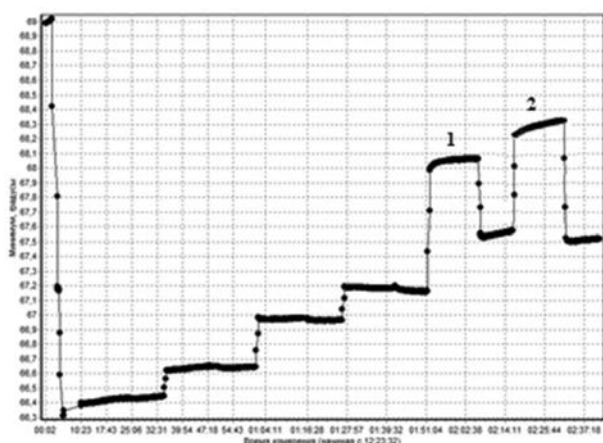


Рис. 1. Відображення на сенсорограмі результатів зчитування програмою «Plasmon» негативної (1) і позитивної (2) на токсоплазмоз сироватки крові  
 Fig. 1. Displaying the results on sensorogram of reading with program “Plasmon” negative (1) and positive (2) on toxoplasmosis blood serum

тварин приватних власників. Сумнівні результати були отримані при дослідженні сироваток крові від 2 тварин (6,5 %), що на 0,6 % більше від аналогічного показника, одержаного серед тварин приватних власників. Негативна реакція зафіксована у 22 випадках (70,9 %). Цей результат виявився на 11,4 % меншим порівняно з аналогічним показником, одержаним при дослідженні тварин, які належали власникам.

Отже, кількість тварин господарства, що прореагували за цим методом позитивно, виявилася вищою, ніж тварин, власниками яких були мешканці сіл. Цю ситуацію можна пояснити тим, що в цьому господарстві були сприятливіші умови для зараження збудником токсоплазмозу ВРХ (скупченість тварин у приміщенні, неповноцінна годівля).

Паралельно з дослідженням сироваток крові на токсоплазмоз імунологічним біосенсором на основі ППР було проведено визначення антитіл у сироватках крові цих же тварин у порівняльному аспекті за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА).

На основі проведених досліджень було встановлено, що у 9 тварин (18,8 %) сироватка крові показала позитивний результат при використанні ІФА, що відповідає результатам, отриманим за допомогою імунного біосенсора на основі ППР. Водночас 33 (68,8 %) сироватки крові прореагували негативно при їх дослідженні методом ІФА. Цей показник менший від попереднього дослідження імуниним біосенсором на 6,2 %. Методом ІФА отримано 6 (12,5 %) сумнівних результатів, що перевищує результати імунного біосенсора (6,3 %) майже вдвічі (рис. 2). Це дає нам право стверджувати, що дослідження, проведені за допомогою імунобіосенсора на основі ППР, є вірогіднішими при постановці діагнозу на токсоплазмоз порівняно з методом ІФА.

При дослідженні сироваток крові були проаналізовані результати, що стосуються поширення токсоплазмозу залежно від статі і віку тварин. З метою встановлення різниці у кількості тварин різної статі, які реагували позитивно до збудника *T. gondii*, використовували імунобіосенсор на основі ППР та ІФА.

Серед досліджених 10 сироваток крові самок позитивну реакцію зареєстрували

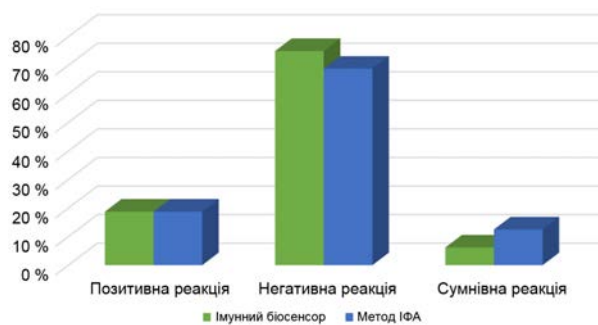


Рис. 2. Порівняння ефективності діагностики токсоплазмозу великої рогатої худоби за використання імунобіосенсора на основі ППР і методу ІФА

Fig. 2. Comparison of the effectiveness of toxoplasmosis diagnostics of cattle using immune SPR biosensor-based method and ELISA

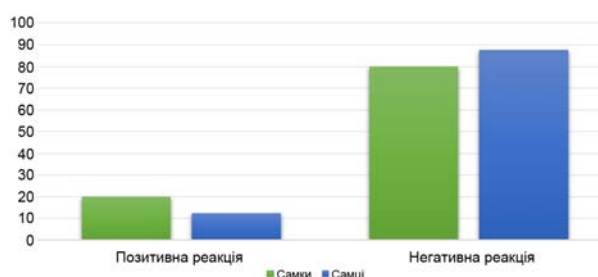


Рис. 3. Поширення токсоплазмозу серед тварин різної статі

Fig. 3. Distribution of toxoplasmosis in animals of different sexes

у 2 (20,0 %), негативну — у 8 тварин (80,0 %). Водночас серед 8 зразків сироваток крові самців ВРХ лише одна проба була позитивною (12,5 %), негативними виявилися 7 (87,5 %). Сумнівних реакцій як у першому, так і в другому випадку не зареєстровано (рис. 3). Ці дані підтверджують, що суттєвої різниці щодо виявлення антитіл до збудника токсоплазмозу у сироватці крові як самців, так і самок ВРХ не виявлено.

Важливою особливістю токсоплазмозу є підвищення інвазованості тварин з віком. Для підтвердження цих даних було проведено дослідження сироваток крові ВРХ з використанням імунобіосенсора із врахуванням кількості тварин з позитивною реакцією залежно від віку. З цією метою було сформовано дві групи: перша — тварини віком до чотирьох років, друга — понад чотири роки. У групі ВРХ віком до чотирьох років (21 особина) позитивно прореагувала лише одна (4,8 %), а негативно — 19 (90,4 %). Один зі зразків (4,8 %) виявився сумнівним. Серед 27 тварин віком

понад 4 роки позитивні показники були у 8 (29,6 %), а негативні — у 17 особин (63,0 %). У двох випадках (7,4 %) зареєстровано сумнівні результати досліджень.

Як видно із наведених вище результатів, випадки позитивної реакції на токсоплазмоз зареєстровано серед тварин різного віку, проте основна їх кількість виявлена у групі, вік тварин якої становив понад 4 роки. На нашу думку, це пов'язано з тим, що у старших за віком тварин збільшується імовірність зараження збудником хвороби.

### Висновки

При дослідженні 48 сироваток крові ВРХ з використанням імунного біосенсора на основі ППР позитивними на токсоплазмоз виявилися 9 (18,8 %), сумнівними — 3 (6,2 %). Негативно прореагували на наявність збудника інвазійної хвороби 36 тварин (75,0 %). Методом ІФА зареєстровано 6 сумнівних результатів (12,5 %). Цей показник удвічі перевищує результати імунного біосенсора. Таким чином, дослідження, проведені за допомогою імунного біосенсора на основі ППР, є ефективнішими при діагностиці токсоплазмозу.

Хворіють на токсоплазмоз як самці, так і самки. Не зареєстровано суттєвої різниці щодо поширення хвороби у ВРХ різної статі.

Частіше антитіла до токсоплазм виявляли у сироватці крові тварин віком понад чотири роки. Це пояснюється тим, що у старших за віком тварин збільшується імовірність зараження збудником хвороби.

**Перспективи подальших досліджень.** У подальшому планується продовження до-

сліджень з метою вивчення особливостей і алгоритму використання імунного біосенсора з метою встановлення діагнозу на токсоплазмоз серед різних видів тварин.

1. Dubey J. P. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2<sup>nd</sup> edition. 2013, 317 p.

2. Dubey J. P., Jones J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal of Parasitology*, 2008, no. 38, pp. 1257–1278.

3. Dubey J. P., Prowell M. Ante-mortem diagnosis, diarrhea, oocyst shedding, treatment, isolation, and genetic typing of *Toxoplasma gondii* associated with clinical toxoplasmosis in a naturally infected cat. *Journal of Parasitology*, 2013, vol. 99 (1), pp. 158–160.

4. Galat M. V. *Toxoplasma gondii* — dangerous parasite of ruminants and man. *Veterinary Medicine of Ukraine*, 2015, no. 7, pp. 25–27. (in Ukrainian)

5. Jiang S., Hua E., Liang M., Liu B., Xie G. A novel immunosensor for detecting *Toxoplasma gondii*-specific IgM based on goldmag nanoparticles and graphene sheets. *Colloids and surfaces. B. Biointerfaces.*, 2013, no. 101, pp. 481–486.

6. Luo Y., Liu X., Jiang T., Liao P., Fu W. Dual-aptamer-based biosensing of toxoplasma antibody. *Analytical Chemistry*, 2013, no. 85 (17), pp. 8354–8360.

7. Meng K., Sun W., Zhao P., Zhang L., Cai D., Cheng Z., Guo H., Liu J., Yang D., Wang S., Chai T. Development of colloidal gold-based immunochromatographic assay for rapid detection of *Mycoplasma suis* in porcine plasma. *Biosensors Bioelectronics*, 2014, no. 55, pp. 396–399.

8. Starodub N. F. *Biosensors for the Control of Biochemical Parameters in the Diagnostics of Diseases*. Book of series in sensors, Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants, CRC Press, Taylor & Francis Croup Boca Raton London, New York, 2013, pp. 743–775.

9. Wang H., Lei C., Li J., Wu Z., Shen G., Yu R. A piezoelectric immunoagglutination assay for *Toxoplasma gondii* antibodies using gold nanoparticles. *Biosensors Bioelectronics*, 2004, no. 19 (7), pp. 701–709.