

УДК 619:616.98:579.843.95-07:57.083.3

Мельник В.В., к. вет. н., доцент (volde-mar@ukr.net)

Ткаченко В.В., асистент[©]

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

ВИГОТОВЛЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СПЕЦИФІЧНОГО АНТИГЕНУ *P. MULTOCIDA* ДЛЯ ПОСТАНОВКИ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

У статті наведені результати дослідження щодо методів виготовлення специфічного антигену *P. multocida*, а також встановлені оптимальні титри отриманого антигену для експериментальної постановки імуноферментного аналізу. Доведено, що більш активним виявився антиген, отриманий методом спиртового осадження, оптимальне розведення якого для постановки ІФА становило 1:400.

Ключові слова: *Pasteurella multocida*, пастерельоз, антиген, імуноферментний аналіз.

Вступ. Незважаючи на значну кількість лікувальних та профілактичних засобів, епізоотична ситуація в світі з пастерельозу тварин була і залишається досить складною. Серед збудників пастерельозу основними є два види бактерій: *P. multocida* і *P. haemolytica*. При цьому роль *P. multocida* у виникненні пастерельозу тварин вивчена досить добре хоча не розроблено методів швидкої діагностики останньої. Саме тому, розвиток промислового тваринництва вимагає оцінки епізоотичної ситуації шляхом проведення моніторингу інфекційних хвороб тварин і, зокрема, пастерельозу [1, 2].

Безумовно, розвиток сучасної біотехнології закономірно супроводжується появою нових методів ідентифікації чужорідних біологічних агентів у макроорганізмі. Так, пошуки простих чутливих методів виявлення і кількісного визначення антигенів і антитіл без застосування аглютинації і радіоактивних позначок призвели до розробки твердофазного імуноферментного аналізу ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), який нині є одним із найбільш розповсюджених методів дослідження [3, 4].

В основі ІФА лежить специфічна взаємодія антитіла і антигену з наступним приєднанням до отриманого комплексу кон'югату (антивидового імуноглобуліну, позначеного ферментом). Фермент викликає розкладання хромогенного субстрату з утворенням забарвленого продукту [4, 5]. Зважаючи на це, важливим етапом створення ІФА-діагностикуму є виготовлення якісного специфічного антигену, що й стало метою проведених досліджень.

Мета та завдання. Провести дослідження за розробки експериментального зразку антигену для проведення імуноферментного аналізу при пастерельозі викликаного *P. multocida*.

Матеріали і методи дослідження. У проведених дослідженнях при розробці експериментального зразку антигену для проведення імуноферментного аналізу нами був використаний антиген ліпополісахаридної природи. Виділення антигену проводили двома методами – шляхом осадження ПЕГ (поліетиленгліколем) та спиртовим осадженням.

Метод отримання антигену шляхом осадження ПЕГ включав дворазове центрифугування бактерійної суспензії в фізіологічному розчині з наступним ресуспендуванням осаду в карбонатно-бікарбонатному буферному розчині. Потім, на льодовій бані, проводили ультразвукову обробку бактерійної суспензії за допомогою апарату УЗДН-2Т при 22000 Hz впродовж 10 хвилин. Суспензію центрифугували 30 хв. при 8000 об/хв. В надосадову рідину додавали ПЕГ до концентрації 14 % і поміщали на дві доби при постійному помішуванні в холодильник ($t+4$ C). Отриману суспензію центрифугували, повторно ресуспендували в розчині ПЕГ і повторювали центрифугування. Осад розчиняли в 10 мл карбонатно-бікарбонатного буферного розчину.

Метод отримання антигену спиртовим осадженням. Для отримання антигену інактивовану в автоклаві суспензію бактеріальних клітин *P. multocida* осаджували центрифугуванням, ресуспендували осад у фізіологічному розчині і обробляли ультразвуком на льодовій бані при 22000 Hz упродовж 10 хвилин. В матеріал вносили водонасичений фенол 1:1 і повторно центрифугували (30 хвилин) при 3000 об/хв. Відбирали верхню водну фазу, додавали до неї 2 об'єми етанолу та витримували впродовж 12 годин для формування осаду. Центрифугуванням відділяли осад і розчиняли у невеликому об'ємі карбонатно-бікарбонатного буферного розчину.

Матеріал, отриманий обома методами, застосовували в якості антигену при проведенні ІФА. Для постановки ІФА з даними серіями антигену використовували кон'югат на основі рекомбінантного білка *G Streptococcus spp.* у розведенні 1:50000, а також позитивні та негативні на пастерельоз, викликаний *P. multocida*, сироватки крові.

Результати досліджень та їх аналіз. Для створення якісного експериментального антигену з метою проведення імуноферментного аналізу нами був обраний антиген, який володіє високою активністю та специфічністю. При проведенні досліджень із бактерійної суспензії двома методами нами було виділено антиген ліпополісахаридної природи.

З метою оцінки якості антигену, отриманого осадженням ПЕГ, сорбували послідовні розведення цього антигену на полістиролові планшети та ставили ІФА із позитивними та негативними на пастерельоз, викликаний *P. multocida*, сироватками крові. Як показали результати проведених досліджень, оптимальним розведенням антигену цієї серії є розведення 1:250, оскільки при подальшому зниженні концентрації антигену різко знижується оптична густина позитивної сироватки. При розведенні цього виду антигену до 1:400 окремі позитивні сироватки крові дають сумнівні результати (табл. 1).

Таблиця 1

Результати титрування антигену, отриманого шляхом осадження ПЕГ, для визначення оптимального розведення у тест-системі

		Оптична густина (ОГ) при 450/620 нм у розведенні						
Істинно позитивні сироватки	№	1:100	1:150	1:200	1:250	1:300	1:350	1:400
		1	2,127	1,951	1,637	1,533	1,211	0,845
	2	1,954	1,745	1,562	1,465	1,099	0,624	0,322
	3	2,011	1,811	1,475	1,192	0,612	0,317	0,187
Істинно негативні сироватки	1	0,541	0,373	0,164	0,056	0,38	0,030	0,027
	2	0,321	0,286	0,109	0,052	0,044	0,021	0,020
	3	0,456	0,269	0,125	0,048	0,41	0,030	0,030

Разом з тим, результати титрування антигену, отриманого спиртовим осадженням, вказують на те, що оптимальне розведення для антигену цієї серії становить 1:400 (рис.1).

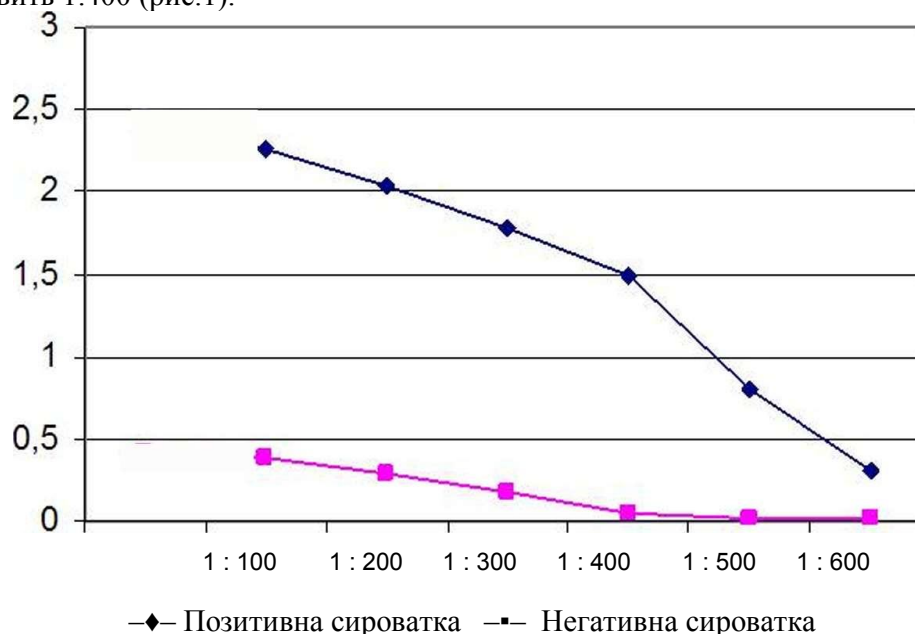


Рис.1. Результати титрування антигену, отриманого спиртовим осадженням, для визначення оптимального розведення при постановці ІФА

Саме при такому розведенні найвищий коефіцієнт співвідношення між значеннями оптичної густини позитивної та негативної до *Pasteurella multocida* сироваток крові. При подальшому розведенні антигену різко знижується значення оптичної густини позитивної сироватки.

Висновки

Отже, проведеними дослідженнями було встановлено, що більш активним, в порівнянні з осадженням ПЕГ, виявився антиген, отриманий методом спиртового осадження. Оптимальне розведення такого антигену для постановки ІФА становило 1:400.

Перспективою подальших досліджень є використання отриманих антигенів для дослідження сироваток крові в ІФА з метою виявлення антитіл до *P. multocida*, а також створення імуноферментної тест-системи, яка може бути використана в якості основного серологічного тесту при моніторингу пастерельозу різних видів тварин.

Література

1. Adlam C. Pasteurella and Pasteurellosis / C. Adlam, J.M. Ritter – London: Academic Press, 1989. – 262 p.
2. Основні інфекційні хвороби свиней у сучасних умовах в Україні / [М.В. Бабкін, Е.В. Прохорятюва, Н.В. Явніков, О.В. Угодовський] // Ветеринарна медицина. – 2005. – Вип. 85, Т. 1. – С. 98 – 101.
3. Новые методы иммуноанализа: перевод с английского / М. Тертон, Д.Р. Бархем, К.А. Колкотт и др. – М.: Мир, 1991. – 280 с.
4. Теория и практика иммуноферментного анализа / Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. – М.: Высшая школа. – 1991. – 288 с.
5. Синицин В.А. Імуноферментний метод у ветеринарній медицині / В.А. Синицин // Науковий вісник Національного аграрного університету. – 2001. – № 36. – С. 123 – 125.

Summary

Melnyk V.V., candidate of veterinary science, associate professor

Tkachenko V.V., assistant

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev

PRODUCTION OF EXPERIMENTAL SPECIFIC ANTIGEN FOR STAGING R. MULTOCIDA ELISA ANALYSIS

*In the articles resulted research results are in relation to the methods of making specific the antigen of *P. multocida*, and also the optimum titles of the got antigens are set for creation of ELISA. It is rotined that an antigen, got the method of the alcoholic besieging the optimum breeding of which for raising of ELISA was 1:400, appeared more active.*

Key words: *Pasteurella multocida*, pasterelosis, antigen ELISA.

Рецензент – д.вет.н., проф. Гуфрій Д.Ф.