

Theoretical epidemiology / epizootiology decides the question: "What's going on? and What to do? " by methods of planning and forecasting of development of the epidemic / epizootic situations and / or effectiveness of measures to control the disease.

One promising tool of study, analysis and prediction of the functioning of various ecosystems and their elements is methodology of system analysis.

System - is a group of interacting components that operate together and react to outside influence as a whole, are not influenced by of its own resulting (output parameters), with specific features, caused by the major pathways and feedback mechanisms. A model is a realistic reflection of the current system.

System analysis and modeling are widely used in veterinary medicine from the 70s of last century. It is expedient to use symbolic simulation types and modelsthat allows logical and consistent approach to the problem of making decisions on planning and forecasting of development of the epidemic / epizootic situations and / or effectiveness of measures to control the disease.

Key words: epidemiology, epizootology, system, model, system analysis, simulation

УДК 619:616-072:579.83/.88:615.383

БІОСЕНСОРНА ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* НА ОСНОВІ АУТЕНТИЧНОЇ ГІПЕРІМУННОЇ СИРОВАТКИ

О. Ю. Новгородова, аспірант*
Національний університет біоресурсів
і природокористування України
oleksandra_n@yahoo.com

Роль Pseudomonas aeruginosa в інфекційній патології тварин постійно зростає. Її вважають завершеним патогеном з високою пристосувальною здатністю до навколишнього середовища. Визначальним у системі протиепізootичних заходів у лікуванні цієї інфекції виступає ефективна діагностика хвороби. Створені сироватки, що містять специфічні антитіла проти P. aeruginosa, в подальшому будуть використані для визначення діагностичної специфічності та чутливості імуносенсорної тест-системи для діагностики псевдомонозу.

Ключові слова: Pseudomonas aeruginosa, біосенсор, імуносенсор, поверхневий плазмонний резонанс, гіперімунні сироватки, антитіла

Сучасний рівень розвитку молекулярної біології у поєднанні з досягненнями фізики і хімії визначили новий напрям в діагностиці захворювань

* Науковий керівник – доктор ветеринарних наук, професор Т. В. Сорока

© О. Ю. Новгородова, 2015

– використання розроблених за допомогою хімічних і оптичних методів імуносенсорних тест-систем. На відміну від імуноферментного аналізу, де можливе використання сигнал-генеруючих міток, калібрувальних графіків та спеціальних операцій із середовищем (обробка зразка, оптимізація рН, певна послідовність дій, період витримки 5–30 хв.). Імуносенсори характеризуються ідеальною сигнал - генеративною властивістю. Це здатність визначати антиген (аналіт) менше ніж за 2–3 хв. [2, 7, 9].

Біосенсори складаються з трьох компонентів: біоселективного елемента, детектора, який ідентифікує сигнал; перетворювача, що перетворює сигнал, який з'являється в результаті взаємодії аналіту з біоселективним елементом, в інший сигнал, який простіше виміряти; і система обробки сигналів, яка відповідає, в першу чергу, за відображення результатів в зручному для користувача вигляді. Мета цієї комбінації полягає у використанні високої чутливості та селективності біологічного зондування в різних галузях наукових досліджень і технологій [4, 7, 9].

Головною метою в розробці імуносенсору є створення більш простих антитіл-залежних компонентів, що об'єднують чутливість та специфічність лабораторного імуноаналізу зі зручним обслуговуванням сенсорних приладів. Це дозволить проводити аналіз поза межами медичних установ [2, 4, 7, 9, 11].

Набирають популярності біосенсори на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу (ППР), які належать до класу оптичних, і побудовані на ефекті біоспецифічного фітінгу. Вони дозволяють реєструвати комплекс макромолекул з різною концентраційною чутливістю [4, 11].

Мета досліджень. Отримати гіперімунні сироватки проти *P.aeruginosa* від лабораторних кролів для подальшого створення імуносенсорного діагностикуму на основі ППР, як методу експрес-діагностики псевдомонозної інфекції в лабораторній практиці.

Матеріал і методика досліджень. Для виготовлення антигену *P.aeruginosa* використовували еталонний штам *P. aeruginosa* ATCC 9027. Для отримання антитіл проводили імунізацію кролів віком 3–4 місяці, вагою не менше 1,5 кг [6]. Кров відбирали з поверхневої вушної вени, без тотального знекровлення, з дотриманням принципів біоетики.

Результати досліджень. Для виготовлення соматичного (O, H) антигену *P.aeruginosa* використовували еталонний штам *P.aeruginosa* ATCC 9027, попередньо перевіривши його на відсутність спонтанної аглютинації.

Кролів імунізували за схемою імунізації, наведеною на рисунку 1.

Оскільки соматична гіперімунна сироватка є основою для створення імуносенсорного діагностикуму, її готували поетапно перевіряючи активність в реакції аглютинації на склі. Виявлено, що специфічні антитіла у кроликів на введення антигену формувалися активно і вже на 45-ту добу їх рівень становив 1: 213–1: 312.

Введення антигену з адьювантом Фрейнда (1:1) по 1 см³ вздовж хребта

інтервал 45 діб

Підшкірне введення антигену з неповним адьювантом у дозі 0,1 см³ з десятидобовим інтервалом

На 55-добу досліду перевірка титрів антитіл

Підшкірне введення антигену з неповним адьювантом у дозі 0,1 см³ з десятидобовим інтервалом

На 65-ту добу досліду перевірка титрів антитіл

Підшкірне введення антигену без адьюванту у дозі 0,1 см³ десятидобовим інтервалом

На 75-ту добу досліду перевірка титрів антитіл

Відбір крові від кролів та отримання сироватки

Рис.1. Схема імунізації кролів

На 65-ту добу, титри антитіл подвоїлися і досягали рівня 1: 522–1: 650. На 75-ту добу титри сягали рівня 1:750–1:830 (табл. 1).

1. Динаміка титрів антитіл у кролів під час гіперімунізації їх антигеном *P. aeruginosa*

Кролі № п/п	Титри антитіл після імунізації			
	45-та доба	55-та доба	65-та доба	75-та доба
1	1: 213	1: 310	1: 522	1: 750
2	1: 278	1: 287	1: 570	1: 798
3	1: 312	1: 350	1: 650	1: 850

Виходячі зі співставлення титрів, отриманих від кролів, імунізованих антигеном *P.aeruginosa* з літературними даними по темі імуноферментного аналізу, отримані антисироватки можуть бути використані для роботи над створенням імуносенсорного діагностичного апарату.

В подальшому планується перевірити сироватки на активність за допомогою оптичного біосенсору на основі ППР, в лабораторії біосенсо-

рики Національного університету біоресурсів та природокористування України.

Висновки

Отримані антисироватки можуть використовуватись в подальшому для розробки біочипів на основі бактеріальних антигенів *P. aeruginosa* для виявлення специфічних антитіл в сироватках крові хворих тварин методом ППР та проведенням лабораторно-експериментальних досліджень розробленого імуносенсору. Це дозволить створити конкурентоспроможну діагностичну тест-систему експрес-методу діагностики псевдомонозної інфекції свиней в Україні.

Перспектива подальших досліджень

Компоненти, отримані за розробленою методикою, будуть використані у серії досліджень щодо відпрацювання протоколу постановки реакції за допомогою імуносенсора, що ґрунтується на методі постановки ТІФА. Для цього будуть підібрані оптимальні режими відтворення реакції: кількісний, температурний та часовий режими адсорбції реагентів; імуна та ензимна активність, фермент-субстратні співвідношення.

Список літератури

1. Выдрин В. Н. Заболеваемость скота в зависимости от условий содержания и кормления / В. Н. Выдрин и др. // Ветеринария. – № 1. – 1998 – 42 с.
2. Головенко М. Я. Наномедицина: досягнення та перспективи розвитку новітніх технологій у діагностиці та лікуванні (огляд літератури) / М. Я Головенко // Журн. АМН України. – 2007. – №4. – Т. 13. – С. 617–636.
3. Инфекционные болезни свиней: учеб. Пособие /сост. И.А. Болоцкий .[и др] – Ростов-на Дону. – «Феникс», 2007. – С. 188-195. (Высшее образование) 2.
4. Пирогова Л. В., Стародуб М. Ф., Артюх В. П. Експресна діагностика лейкозу великої рогатої худоби за допомогою імунного сенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу / Л. В. Пирогова, М. Ф. Стародуб, В. П. Артюх та ін. // Укр. біохім. журн. – 2002. – №3. – Т. 74. – С. 88–92.
5. Псевдомоноз животных / И. А. Болоцкий, С. В. Пруцаков, В. И. Семенов и др. – Москва: Колос. – 2010 – 223 с.
6. Виготовлення діагностичного імунофлуоресцентного індикатора та ідентифікації *Pseudomonas aeruginosa*: методичні рекомендації для спеціалістів ветеринарної медицини, науковців та студентів / О. П. Бойко, Р. О. Кучерявенко, П. К. Бойко, В. О. Бусол та ін. – К.: НУБіП, 2010.– 20 с.
7. Byrne B., Stack E., Gilmartin N. O’Kennedy R. Antibody-Based Sensors: Principles, Problems and Potential for Detection of Pathogens and Associated Toxins / B. Byrne, E. Stack, N. Gilmartin R. O’Kennedy // Sensors. – 2009. – N9. – P. 4407–4445.
8. Dubrous P., Cavallo J. D., Hernandez B., Nordmann P. Bactericidie sur différents phenotypes de resistance aux p-lactamines de 8 antibiotiques et 7 associations: [Pap.] / P. Dubrous, J. D. Cavallo, B. Hernandez, P. Nordmann et al. // Interdiscip. Meet Anti-Infec. Chemother, Paris, Dec. 5th-6th, 1996. Pathol. Biol. – 1997. – 45. – P. 31.
9. Jongerius Gortemaker B. G., Goverde R. L., Bergwerff A. A. Surface plasmon resonance (BIACORE) detection of serum antibodies against *Salmonella*

enteritidis and *Salmonella typhimurium* / B. G. Jongerius, Gortemaker, R. L. Goverde, A. A. Bergwerff // J. Immun. Meth. – 2002. – 266. – P. 33–44.

10. Troillet N., Samorc M. H., Carmeli Y. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk factors and antibiotic susceptibility patterns / N. Troillet, M. H. Samorc, Y. Carmeli // Clin. Infect. Dis., 1997. – 25. – P. 1094-1098.

11. Vaisocherova H., Mrkvova K., Piliarik M. Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibody against Epstein Barr virus / H. Vaisocherova, K. Mrkvova, M. Piliarik et al. // Biosens. Bioelectr. – 2007. – N6. – V. 22. – P. 1020–1026 11.

БИОСЕНСОРНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ PSEUDOMONAS AERUGINOSA НА ОСНОВЕ АУТЕНТИЧНЫХ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК

А. Ю. Новгородова

*Возможность применения биосенсоров для выявления специфических антител в сыворотках крови животных и человека подтверждается многочисленными публикациями. Созданные сыворотки содержат антитела против *P. aeruginosa*, в будущем будут использованы для определения диагностической специфичности и чувствительности иммуносенсорной тест-системы. Иммуносенсорная тест-система имеет ряд преимуществ перед другими методами, а именно: простоту проведения анализа, не требует использования меченых реагентов, позволяет видеть динамику процесса и получать информацию о ходе проведения анализа, что может быть весьма перспективным для использования в лабораторной диагностике инфекций.*

Ключевые слова: ****P. aeruginosa*, биосенсор, иммуносенсор, поверхностный плазмонный резонанс, гипериммунные сыворотки, антитела***

BIOSENSOR BASIC ON THE AUTHENTIC HYPERIMMUNE SERA FOR THE DETECTION PSEUDOMONAS AERUGINOSA

O. Novgorodova

*The possibility of using biosensors for the detection of specific antibodies in the blood serum of animals and humans is confirmed by numerous publications. By serum containing antibodies against *P. aeruginosa*, in the future will be used to determine the specificity and sensitivity of the immunosensor diagnostic test-systems. Immunosensor test-system has several advantages over other methods, namely simplest analysis does not require the use of labeled reagents, allows to see the dynamics of the process. Information obtained on the progress of the analysis can be very promising for use in the laboratory diagnosis of infections.*

Key words: ****P. aeruginosa*, a biosensor, immunosensor, surface plasmon resonance, hyperimmune antiserum, antibodies***