

УДК 636.09:57.083.1:(616.98+579.834):57.083.3

В. В. УХОВСЬКИЙ, кандидат ветеринарних наук

О. О. КУЧЕРЯВЕНКО, кандидат ветеринарних наук

А. В. ПИСКУН, аспірант

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СУЧАСНИХ МЕТОДІВ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЛЕПТОСПІРОЗУ С/Г ТВАРИН ТА ПЕРСПЕКТИВА РОЗРОБКИ ДОТ-ІФА З МЕТОЮ ЇЇ УДОСКОНАЛЕННЯ

В оглядовій статті проаналізовані переваги та недоліки сучасних методів діагностики лептоспірозу с/г тварин (реакція мікроаглютинації, імуноферментний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція), висвітлені перспективи розробки крапкового імуноферментного аналізу за цього зоонозу.

Ключові слова: лептоспіроз, реакція мікроаглютинації, імуноферментний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція, крапковий імуноферментний аналіз, антигени, антитіла.

Лептоспіроз (лат. *Leptospirosis*, син. Хвороба Васильєва-Вейля) – це інфекційна природно-вогнищева хвороба багатьох видів тварин і птиці, яка проявляється короткочасною гарячкою, гемоглобінурією (гематурією), жовтяничним забарвленням і некрозами слизових оболонок та шкіри, атонією шлунково-кишкового тракту, абортами, народженням нежиттєздатного потомства, зниженням продуктивності тварин [1]. Хвороба є одним з найбільш поширених зоонозних захворювань у світі, що завдає тваринництву значних економічних збитків [2].

Мета роботи – проаналізувати переваги і недоліки методів лабораторної діагностики лептоспірозу с/г тварин, розглянути перспективи використання крапкового імуноферментного аналізу (дот-ІФА), як експрес-методу діагностики.

Широкий спектр симптомів значно ускладнює клінічний діагноз і робить його ненадійним, тому на перший план виходять лабораторні методи досліджень, а саме серологічні [3]. У даний час найбільш широко для діагностики лептоспірозу як у тварин, так і у людей використовується реакція мікроаглютинації (РМА). Вона є «золотим стандартом» при діагностиці лептоспірозу і дозволяє виявляти специфічні антитіла на рівні сероварів [4]. Метод РМА має багато плюсів, але є і суттєві недоліки: тест займає багато часу, вимагає використання парних сироваток (у випадку виявлення антитіл у сироватках крові менше, ніж у 20 процентів досліджених тварин в титрі 1:50 у невакцинованих, і 1:100 і більше у вакцинованих та при

негативних, при цьому, результатах мікроскопії сечі) [5, 6], суб'єктивність інтерпретації отриманих результатів, потреба у постійному культивуванні лептоспир, трудомісткість лабораторних досліджень, використання живих мікроорганізмів створює ризик зараження лабораторного персоналу [7].

З метою підвищення специфічності та чутливості діагностики був розроблений метод імуноферментного аналізу ІФА [8]. Отримані за допомогою нього результати можуть бути оцінені як візуально, так і спектрофотометрично (якісно й кількісно). До того ж ІФА дозволяє виявити антитіла і в сироватці крові, і безпосередньо антигени в крові й органах хворих тварин та людей. При його постановці відпадає потреба працювати з живими лептоспірами, що робить цей метод менш небезпечним, порівняно з РМА [9].

Найбільш сучасною і чутливою вважається полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Вона може бути використана також з метою диференціації видів і сероварів, вивчення генетичної мінливості всередині одного серовара [10]. Їй властива висока специфічність (100 %), чутливість (від 10 до 100 копій ДНК у пробі) та висока діагностична ефективність на першому тижні захворювання, навіть на фоні лікування антибактеріальними препаратами. Слід зазначити, що методом ПЛР можливе виявлення збудників не лише в клінічному матеріалі, отриманому від хворого, але і в матеріалі, одержаному із об'єктів зовнішнього середовища (вода, ґрунт і т.д.). Незалежно від фази захворювання, чутливість лабораторної діагностики при лептоспірозі може бути значно підвищена за рахунок паралельного використання серологічних тестів і ПЛР [11].

Однак, незважаючи на значні переваги, ці методи не знайшли широкого застосування на території України через дороговизну реагентів та обладнання і необхідність спеціально обладнаних лабораторій для їх проведення.

Перспективною у цьому напрямі може бути дот-ІФА (крапковий імуноферментний аналіз), що є високоваріативною твердофазною модифікацією класичного ІФА для виявлення як антитіл, так і антигенів. Готова тест-система являє собою смужку із мембранного паперу, що добре адсорбує білки, із нанесеними на неї незначною кількістю реагенту (специфічний антиген чи антитіло в залежності від того, що виявляється) та хромогенного субстрату. Найчастіше у якості твердої фази використовують нітроцелюлозу, якій притаманна дуже висока сорбційна ємність у порівнянні з полістиролом та полівінілхлоридом, з яких виготовляють планшети для ІФА [8, 12]. Також на смужці є два контролі – позитивний та негативний. Зона негативного контролю заблокована інертним білком, що перешкоджає імунологічній реакції, а позитивного – містить імобілізоване антитіло та зв'язаний з ним та з ферментним кон'югатом специфічний антиген. При утворенні комплексу антиген-антитіло після нанесення краплі досліджуваного матеріалу у діагностичну зону, хромоген спричинює появу кольорової крапки на твердій фазі, що легко виявляється візуально [12].

Вперше dot-ELISA був розроблений для діагностики фасціольозу у людей як метод для швидкого виявлення антитіл в польових умовах. Отримані результати повністю співпадали з такими у класичному ІФА. Окрім того було відмічено, що покриті антигеном нітроцелюлозні смужки, що зберігалися протягом 3 місяців за температури – 20 °С показали результати ідентичні свіжим [13]. Зараз дот-ІФА широко застосовується при діагностиці протозоозів та паразитозів у людини і тварин, включаючи амебіаз, бабезіоз, шкірний і вісцеральний лейшманіоз, цистицеркоз, ехінококоз, малярію, шистосомоз, токсокароз, токсоплазмоз, трихінельоз. Dot-ELISA дозволяє визначити рівень зараження векторів інфекційних та паразитарних хвороб, таких як кліщі і москіти [12].

Перевагами дот-ІФА над іншими експрес-методами діагностики є його швидкість (1 дослідження займає до 20 хв), легкість інтерпретації результатів, економічна ефективність, висока чутливість та специфічність, можливість використання у польових умовах [12, 13] (табл. 1).

Таблиця 1

Переваги та недоліки серологічних методів дослідження

Показники	Серологічні реакції			
	РМА	ІФА	ПЛР	дот-ІФА
швидкість проведення 1 дослідження	1 год	2 год	4 - 4,5 год	близько 20 хв
інтерпретація результатів	візуально	візуально і спектрофотометрично	візуально	візуально
використання живих штамів лептоспір	+	–	–	–
детекція збудників у об'єктах зовнішнього середовища	–	–	+	–
необхідність високовартісного обладнання	–	+	+	–
можливість використання у польових умовах	–	–	–	+

Перспективи подальших досліджень. Аналіз переваг та недоліків сучасних методів лабораторної діагностики лептоспірозу с/г тварин дав підтвердження про необхідність розробки дот-ІФА. Цей експрес-метод уже

досить успішно зарекомендував себе при цілому ряді захворювань інфекційної та паразитарної природи і міг би суттєво доповнити сучасні методи діагностики при даному зоонозі.

Список використаної літератури

1. Хронічні інфекційні хвороби тварин / Л.Є. Корнієнко, В.О. Бусол, В. В. Недосєков та ін.; за ред. В. О. Бусола, Л. Є. Корнієнка. – Біла Церква, 2009. – 291 с.
2. *Ананьина Ю. В.* Этиологическая структура лептоспирозов людей и животных в России / Ю. В. Ананьина, Е. М. Петров // Междун. вестник ветеринарии. – СПб., 2006. – №1. – С. 14 – 19.
3. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism / C. Werts, R. I. Tapping, J. C. Mathison et al. // Nat. Immunol. – 2001. – Vol. 2. – P. 346–352.
4. *Cinco M.* Evaluation of an immunoenzymatic test (ELISA) for the diagnosis of leptospirosis in Italy / M. Cinco, D. Balanzin, E. Banji // Eur. J. Epidemiol. – 1992. – Vol. 8. – P. 677–682.
5. *Sharma R.* Use of locally isolated saprophytic *Leptospira* strain for serological testing of human leptospirosis / R. Sharma, U. Tuteja, H. V. Batra // J. Commun. Dis. – 2000. – Vol. 32. – P. 185–189.
6. Інструкція про заходи з профілактики та оздоровлення тварин від лептоспірозу: Схвалена науково-технічною радою Міністерства сільського господарства і продовольства України 27 квітня 1993 року.
7. *Leptospira in ELISA in the Clinical Microbiology Laboratory* / Wautkins S.A., Zochowski W. J.; Edited by T. G. Wreghitt, P. Morgan-Kapner. – London: Public Health Laboratory Service, 1990. – P. 225–237.
8. Практичний посібник по роботі з імуноферментною тест-системою для визначення антитіл проти лептоспир «ІФА-лептоспіроз-ВРХ» / Н.В. Іванська, О-й.О. Кучерявенко, О-р.О. Кучерявенко та ін.; за ред. М.Я. Співака. – Київ, 2003. – 28 с.
9. *Kurstak E.* Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation // Bull. of the W.H.O. – 1985. – Vol. 63 (4). – P. 793 – 811.
10. ПЦР при діагностиці лептоспірозу / М. Калмыкова, Е. Осипова, А. Шаров и др. // Вет. консультант. – 2006. – № 2. – С. 8 – 9.
11. *Викторова Е. В.* Выявление локализации лептоспир в органах инфицированных животных с помощью ПЦР / С.н.т. ВГНКИ, 2003 – Т.64. – с. 183 – 194.
12. *Pappas M. G.* Recent applications of the Dot-ELISA in immunoparasitology // Vet. Parasitology. – 1988. – Vol. 29(2-3). – P. 105 – 129.
13. Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA) for the Rapid Diagnosis of Human Fascioliasis / Hind I. Shaheen, Karim A. Kamal, Zoheir Farid et al. // The Journal of Parasitology. – 1989. – Vol. 75(4). – P. 549 – 552.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛЕПТОСПИРОЗА С / Х ЖИВОТНЫХ И ПЕРСПЕКТИВА РАЗРАБОТКИ ДОТ-ИФА С ЦЕЛЬЮ ЕЕ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ / Уховский В. В., Кучерявенко О. О., Пискун А. В.

В обзорной статье проанализированы преимущества и недостатки современных методов диагностики лептоспироза с / х животных (реакция микроагглютинации, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция), освещены перспективы разработки точечного иммуноферментного анализа при этом зоонозе.

Ключевые слова: лептоспироз, реакция микроагглютинации, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, точечный иммуноферментный анализ, антигены, антитела.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF MODERN METHODS LABORATORY DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS FARM ANIMALS AND DEVELOPMENT PERSPECTIVE DOT-ELISA FOR THIS PERFECTION / Ukhovskiy V. V., Kucheryavenko O. O., Piskun A. V.

In a review article analyzes the advantages and disadvantages of modern methods diagnosis of leptospirosis farm animals (microscopic agglutination test, enzyme-linked immunosorbent assay, polymerase chain reaction), highlighted the development prospects of dot-enzyme-linked immunosorbent assay with this zoonosis.

Keywords: leptospirosis, microscopic agglutination test, enzyme-linked immunosorbent assay, polymerase chain reaction, dot-enzyme-linked immunosorbent assay, antigens, antibodies.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук О. А.Тарасов

Рукопис надійшов 30. 07. 2013р.