

УДК 619:616.98-097.3:579-07

ХОМЕНКО Я.В.*, e-mail: yaroslavh@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

СПОСІБ ДЕТЕКЦІЇ АНТИТІЛ, СПЕЦИФІЧНИХ ЩОДО *YERSINIA ENTEROCOLITICA* (СЕРОВАР 0:9) ТА *BRUCELLA ABORTUS*

У статті викладено результати дослідження запропонованого способу диференціації специфічних антитіл до бруцельозу (*Brucella abortus*) та *Yersinia enterocolitica* (серовар 0:9) в реакції дот-імуноаналізу. Для отримання імуносорбентів була застосована схема одночасної сорбції на полістироловому гребінці як бруцельозного так і ієрсиніозного (серовар 0:3) ліпополісахаридних антигенів, що дозволило значно спростити схему проведення аналізу. В якості кон'югату використовували рекомбінантний білок *G Streptococcus spp.* у комбінації з колоїдним золотом.

Ключові слова: бруцельоз, ієрсиніоз, колоїдне золото, білок *G*, дот-імуноаналіз.

Вступ. *Yersinia enterocolitica* серовару 0:9 містить спільну з *B. abortus* антигенну імунодомінанту у складі ліпополісахариду (ЛПС) клітинної стінки – 4, 6 – дезокси – 4 – формамідо – L – D-манопіранозил і низку загальних білкових детермінант зовнішньої мембрани, що обумовлює перехрестні серологічні реакції. Проблема наявності перехрестних серологічних реакцій між *Yersinia enterocolitica* серовару 0:9 і *Brucella abortus* в наш час актуальна як в нашій країні, так і за кордоном. При масових дослідженнях тварин на бруцельоз в серологічних реакціях з бруцельозними антигенами часто відмічають наявність перехрестнореагуючих антитіл небруцельозної етіології, більшість із цих реакцій приписують наявності у тварин антитіл до *Yersinia enterocolitica* 0:9.

За іноземними літературними даними контамінація свиней *Yersinia enterocolitica* серовару 0:9 є досить поширеною причиною реакції на бруцельоз [1–3]. Ієрсинії різних сероварів виділяють у 5–10% тварин, включаючи серовар 0:9. У великої рогатої худоби ця інфекція не отримала широкого розповсюдження. Ієрсинії різних серогруп виділяли менше чим у 1% тварин [4].

Також, слід відмітити, що прижиттєва бактеріологічна діагностика ієрсиніозу досить складна, тому важлива роль в діагностиці ієрсиніозу відводиться серологічним методам [5–7].

Мета дослідження. Розробити спосіб диференціації антитіл, специфічних щодо *Yersinia enterocolitica* серовару 0:9 і *Brucella abortus*.

Матеріали і методи дослідження. В основі запропонованого способу – імунологічна реакція – взаємодія специфічних антитіл з антигеном. Детекція імунних комплексів відбувається за допомогою кон'югату – рекомбінантного білка *G Streptococcus spp.*, міченого колоїдним золотом. Постановка реакції здійснюється за принципом дот-

* Науковий керівник - докт. вет. наук, професор **В.Г. Скибіцький**

імуноаналізу. Для сенсibiliзації імуносорбентів – полістиролових гребінців використані ЛПС антигени *B. abortus* та *Yersinia enterocolitica* (серовар 0:3), нанесені у вигляді ізольованих крапок (плям) на зубці гребінця.

У якості контролю використовували сироватки тварин позитивних та негативних на бруцельоз, отриманих з референс-центру МЕБ (Великобританія), сироватки крові кролів гіперімунованих різними сероварами кишкових ієрсиній та сироватки крові тварин, що не містять антитіл до збудника кишкового ієрсиніозу.

Візуалізація результатів реакції відбувається неозброєним оком.

Виготовлення бруцельозного (*B. abortus*) та ієрсиніозного (*Y. enterocolitica*) ЛПС антигенів здійснювали за рекомендованим МЕБ фенольним методом у власній модифікації.

Виготовлення кон'югату білка G, поміченого колоїдним золотом.

Отримання золю золота здійснювали методом Френса (1973). Зв'язування його з білком здійснювали за методикою Hermanson G.T. та ін. [8].

Дот-імуноаналіз (ДІА). Імобілізацію антигенів здійснювали на листовий білий полістирол (HIPS) завтовшки 0,2 мм. Антиген наносили за допомогою автоматичної піпетки на твердий носій (гребінець) окремими плямами діаметром близько 3 мм на 0,05 М розчині карбонатно-бікарбонатного буфера з рН 9,6. Перед нанесенням антиген попередньо титрували для визначення оптимального розведення.

Щоб максимально спростити схему проведення аналізу була застосована методика постановки ДІА при одночасній сорбції на полістироловому гребінці як бруцельозного, так і ієрсиніозного антигенів (рис. 1).



Рис. 1. Схема нанесення антигенів (*B. abortus* та *Yersinia enterocolitica* серовару 0:3).

Як ванночки для інкубації з сироватками крові, кон'югатом, а також для промивання зубців гребінця використовували стандартні бактеріологічні мікротитрувальні планшети на 96 луночок.

У лунки першого ряду планшету вносили зразки сироваток крові в буфері для зразків (фосфатно-сольовий буфер із додаванням 0,75% желатини, 2,5 М

сечовини і 0,01% бензойної кислоти) по 200 мкл. У лунки другого ряду вносили по 200 мкл робочого розчину кон'югату на основі білка G та золу золота. Оптимальне розведення сироваток крові та кон'югату визначали титруванням. У лунки третього ряду вносили по 250 мкл дистильованої води.

Для проведення аналізу гребінець по черзі вставляли в усі ряди. Інкубували по 20 хв зі зразками сироваток крові та кон'югатом за температури 18–25°C, після інкубації з сироватками гребінець промивали в лунках з дистильованої водою.

Оцінку аналізу проводили візуально за інтенсивністю забарвлення місць нанесення антигена.

При проведенні ДІА були перевірені сироватки крові тварин позитивних і негативних на бруцельоз, сироватки крові кролів, гіперімунізованих різними сероварами кишкових ієрсиній та сироватки крові тварин з благополучних щодо ієрсиніозу господарств.

Результати досліджень та їх обговорення. При дослідженні позитивних на бруцельоз сироваток крові відмічали позитивну реакцію в місці нанесення бруцельозного антигену та відсутність її в місці нанесення ієрсиніозного антигену. При постановці реакції з сироваткою крові кроля, який був імунізований *Yersinia enterocolitica* (серовар 0:9) відмічали чіткий сигнал як з бруцельозним, так і з ієрсиніозним антигеном. При постановці ДІА з сироватками крові кролів, імунізованих іншими сероварами ієрсиній, спостерігали чіткий сигнал лише в місці нанесення антигену *Yersinia enterocolitica* серовару 0:3 (рис. 2).

Слід зазначити, що при постановці ДІА з негеативними на бруцельоз референс-сироватками та сироватками здорових на ієрсиніоз тварин неспецифічних результатів не виявляли з обома антигенами (рис. 2).

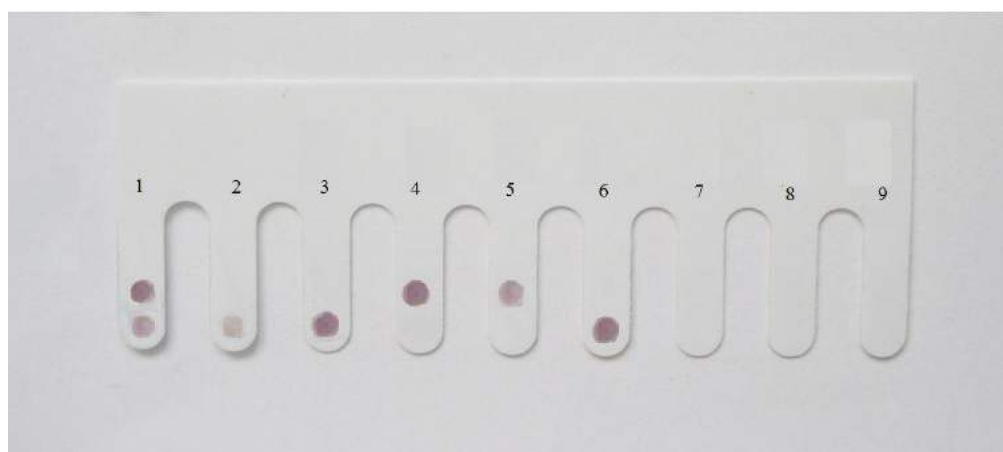


Рис. 2. Результати постановки ДІА для диференційної діагностики ієрсиніозу і бруцельозу.

Примітки: 1 – сироватка крові з антитілами до *Yersinia enterocolitica* серовару 0:9; 2 – сироватка крові з антитілами до *Yersinia enterocolitica* серовару 0:6; 3 – сироватка крові з антитілами до *Yersinia enterocolitica* серовару 0:3; 4 – сироватка крові з антитілами до *B. abortus*; 5 – сироватка крові з антитілами до *B. abortus*; 6 – сироватка крові з антитілами до *Yersinia enterocolitica* серовару 0:8; 7 – сироватка крові вільна від протибруцельозних антитіл; 8 – сироватка крові вільна від протибруцельозних антитіл; 9 – сироватка крові вільна від проієрсиніозних антитіл.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Розроблена методика на основі ДІА із застосуванням одночасно двох антигенів – дозволяє здійснювати диференціальну діагностику бруцельозу і ієрсиніозу (*Yersinia enterocolitica* серовару 0:9). Отримання позитивної реакції лише з одним із антигенів свідчить про наявність у сироватці крові антитіл лише до відповідного збудника. Зафарбування у червоно-коричневий колір місця сорбції бруцельозного антигену та відсутності зафарбування місця (плями) ієрсиніозного антигену свідчить про те, що у досліджуваній сироватці є антитіла, специфічні збуднику бруцельозу, і навпаки, за яскравого зафарбування місць з адсорбованим антигеном ієрсиній – у сироватці антитіла, індуковані ієрсиніями. У випадку, коли присутній одночасно позитивний сигнал з бруцельозним та ієрсиніозним антигенами говорить про наявність в сироватці крові антитіл до *Yersinia enterocolitica* серовару 0:9.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Brubaker R.R. Mechanisms of bacterial virulence / R.R. Brubaker // Ann. Rev. Microbiol. – 1985, – V. 39. – P. 21–50.
2. Hamdy M. Incidence of *Yersinia enterocolitica* in slaughtered camels / M. Hamdy, F. Khalafalla, N. Yassien. // Fleischwirtschaft 1990. – V. 70, N. 6, – P. 685-686.
3. Toma S. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from swine / S. Toma, V.R. Deidrik // J. Clin. Microbiol. – 1975. – V. 2, N 6. – P. 478–481.
4. Daniels J.J. Untersuchungen an als *Pasteurella pseudotuberculosis* diag-nostizieren Stammen von chinchills / J.J. Daniels // Zbl. Veterinarmed. – 1963. – Bd. 10, N 5. – P. 413–417.
5. Brewer R.A. Characterization of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from cattle, sheep and pigs in the United Kingdom / R.A. Brewer, M.J. Corbel // J. Hyg. – 1983, – V. 90. – P. 425–433.
6. Knapp W. Differentiation of *Yersinia enterocolitica* by biochemical reactions / W. Knapp, E. Thai // Contrib. Microbiol. Immunol. – 1973. – V. 2. – P. 10–16.
7. Wauters G. Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species / G. Wauters, S. Aleksic, J. Charlier // Contrib. Microbiol. Immunol. – 1991. – V. 12. – P. 239–243.
8. Hermanson G.T. Preparation of Colloidal-Gold Labeled Proteins / G.T.Hermanson // Bioconjugate. – 1996. – P. 593–604.

СПОСОБ ДЕТЕКЦИИ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧЕСКИХ К *YERSINIA ENTEROCOLITICA* (СЕРОВАР 0:9) И *BRUCELLA ABORTUS* / Хоменко Я.В.

В статье представлены результаты исследования предложенного способа дифференциации специфических к бруцеллёзу (*Brucella abortus*) и *Yersinia enterocolitica* (серовар 0:9) антител при постановке реакции дот-иммуноанализа. Для получения иммуносорбентов была использована схема одновременной сорбции на полистироловый гребешок как бруцеллёзного так и иерсиниозного (серовар 0:3) липо-полисахаридных антигенов, что позволило значительно сократить схему проведения анализа. В качестве конъюгата использовали рекомбинантный белок *G Streptococcus spp.* в комплексе с коллоидным золотом.

Ключевые слова: бруцеллёз, иерсиниоз, коллоидное золото, белок G, дот-иммуноанализ.

METHOD FOR DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES TO *YERSINIA ENTEROCOLITICA* (SEROVAR 0:9) AND *BRUCELLA ABORTUS* / Homenko I.V.

Introduction. Results of evaluation of dot-blot immunoassay for differentiation of antibodies, specific to *B. abortus* or *Yersinia enterocolitica* (serovar 0:9). The protocol of immunoassay includes simultaneous sorption of *B. abortus* and *Yersinia enterocolitica* antigens on polystyrene comb. Recombinant protein G conjugated with colloid gold was used as conjugate.

The goal of the work. To develop the dot-blot immunoassay to distinguish antibodies specific for *Yersinia enterocolitica* (serovar 0:9) and *Brucella abortus*.

Materials and methods. The main principle of suggested method is immunologic reaction between antibody and antigen. Immune complexes are detected with recombinant protein G (*Streptococcus* spp.) conjugated with colloid gold. The protocol of reaction is based on dot-blot immunoassay. For sensibilisation of polystyrene combs lipopolysaccharides of *B. abortus* and *Yersinia enterocolitica* (serovar 0:3) were used.

In the investigation the next control materials were used: sera of animals, which are positive or negative for brucellosis obtained from MEB reference-center, sera of rabbits immunized with different serovars of *Yersinia enterocolitica*, sera of nonimmunized rabbits.

Results of research and discussion. During investigation of sera of animals, which are positive for brucellosis specific reaction was detected with *B. abortus* antigen and no reaction was detected with *Yersinia enterocolitica* antigen. Hyperimmune rabbit serum to *Yersinia enterocolitica* (serovar 0:9) reacted with both *Yersinia enterocolitica* and *B. abortus* antigens. Sera of rabbits immunized with another serovars of *Yersinia enterocolitica* specific reaction was detected with antigen of *Yersinia enterocolitica* (serovar 0:3).

Conclusions and prospects for further research. Dot-blot immunoassay based on simultaneous sorption of *Yersinia enterocolitica* (serovar 0:9) and *Brucella abortus* antigens was developed to differentiate brucellosis and yersiniosis.

Keywords: brucellosis, yersiniosis, colloidal gold, protein G, dot-blot immunoassay.

REFERENCES

1. Brubaker R.R. (1985). Mechanisms of bacterial virulence. *Ann. Rev. Microbiol*, 39, 21-50.
2. Hamdy, M., Khalafalla, F., & Yassien, N. (1990). Incidence of *Yersinia enterocolitica* in slaughtered camels. *Fleischwirtschaft*, 70, 6, 685-686.
3. Toma, S., & Deidrik, V.R. (1975). Isolation of *Yersinia enterocolitica* from swine. *J. Clin. Microbiol*, 2, 6, 478-481.
4. Daniels, J.J. (1963). Untersuchungen an als *Pasteurella pseudotuberculosis* diagnostizieren Stammen von chinchills. *Zbl. Veterinarmed*, 10, 5, 413-417.
5. Brewer, R.A., & Corbel, M.J. (1983). Characterization of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from cattle, sheep and pigs in the United Kingdom. *J. Hyg.*, 90, 425-433.
6. Knapp, W., & Thai, E. (1973). Differentiation of *Yersinia enterocolitica* by biochemical reactions. *Contrib. Microbiol. Immunol*, 2, 10-16.
7. Wauters, G., Aleksic, S., & Charlier, J. (1991). Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species. *Contrib. Microbiol. Immunol.*, 12, 239-243.
8. Hermanson, G.T. (1996). Preparation of Colloidal-Gold Labeled Proteins. *Bioconjugate*, 593-604.