

УДК 636.09:602:57.083.33:616.98

DOI: 10.31073/vet_biotech36-18

ХОМЕНКО В.Г., e-mail: leptospiroz@ukr.net,

ХОМЕНКО Я.В., канд. вет. наук, e-mail: yaroslavh@ukr.net,

УХОВСЬКИЙ В.В., д-р вет. наук, проф., e-mail: uhovskiy@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

ДЯЧЕНКО Т.О., e-mail: ptanya1120@gmail.com

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

ОТРИМАННЯ БРУЦЕЛЬОЗНОГО АНТИГЕНУ ДЛЯ НАСТУПНОГО ВИКОРИСТАННЯ В НЕПРЯМОМУ ВАРІАНТІ ІФА ПРИ ДІАГНОСТИЦІ БРУЦЕЛЬОЗУ ТВАРИН

*У статті викладено результати виготовлення бруцельозного антигену, який може бути застосований в непрямому варіанті імуноферментного аналізу (ІФА) під час діагностики бруцельозу тварин в якості компоненту імуносорбенту. З цією метою отримували ліпополісахарид з клітин *Brucella abortus* 19, за рекомендованою МЕБ технологією в модифікації. На наступному етапі антиген сорбували на полістироловому планшеті та перевіряли його якість, використовуючи заздалегідь відомі позитивні та негативні на бруцельоз тварин сироватки крові та сироватки крові тварин хворих на ієрсиніоз. Отримані дані дозволили застосовувати антиген при конструюванні діагностичних тест-систем на бруцельоз тварин.*

Ключові слова: бруцельоз, антиген, діагностика, ліпополісахарид, імуноферментний аналіз.

Вступ. Бруцельоз (*Brucellosis*) – хронічна інфекційна хвороба, перебіг якої відбувається часто з загостреннями і вираженими клінічними ознаками, які проявляються у вигляді абортів, затримки посліду, ендометритів, орхітів, епідідимітів, порушеннями відтворювальної здатності тварин, ураженням опорно-рухового апарату.

Протягом 40–60-х років ХХ століття в багатьох країнах Європи, Північної Америки та ін. бруцельоз отримав дуже широке розповсюдження і є серйозною проблемою ветеринарно-медичного значення. Справедливим виявилось відоме пророчество французького вченого Шарля Ніколя (1930), який називав бруцельоз «хворобою майбутнього» [1].

Проблема захворюваності бруцельозом і сьогодні залишається актуальною в системі охорони здоров'я людини і тварин [2].

Незважаючи на стабільне епізоотичне благополуччя щодо бруцельозу тварин, в Україні реєструють поодинокі випадки даного захворювання серед

овець, підтверджені факти циркуляції збудника серед диких тварин. Загроза виникнення бруцельозу існує, зокрема через контрабандне завезення тварин, продуктів забою, сировини, молочних продуктів із країн, в яких дана проблема актуальна, а також у разі зараження свійських тварин від диких чи тварин-бактеріоносіїв [3].

Небезпека заносу і поширення бруцельозу існує з території держав, які межують або мають тісні торговельно-економічні зв'язки з нашою державою. Зокрема, Російська Федерація та Казахстан, за даними Міжнародного епізоотичного бюро, є неблагополучними щодо бруцельозу тварин.

Для профілактики бруцельозу у тварин та з метою зниження небезпеки захворювання для людей, не згадуючи про економічний бік справи та про господарські збитки, які спричинює хвороба, оздоровлення тваринництва має першорядне значення.

Серологічна діагностика бруцельозу полягає у виявленні специфічних антитіл в сироватці крові тварин за допомогою реакції аглютинації (РА), реакції зв'язування (або тривалого зв'язування) комплементу (РЗК, РТЗК), пластинкової реакції аглютинації з роз-бенгал антигеном (роз-бенгал проба – РБП), кільцевої реакції з молоком (КР), імуноферментного аналізу (ІФА), дот-імуноаналізу (ДІА) та ін.

Нажаль не існує єдиного серологічного тесту, який міг би бути надійним у різних епізоотичних ситуаціях, оскільки всі мають обмеження, особливо коли потрібно проводити скринінг окремих тварин [4, 5].

Для ІФА, характерні висока чутливість і специфічність, до того ж він досить простий у виконанні, економічно вигідний, не потребує коштовного обладнання і реактивів [6]. Високу точність вимірювань забезпечують тільки спеціальні аналізатори, тому ІФА застосовується, в основному, в лабораторіях. Крім того, властивості полістиролових мікротитрувальних планшетів, які використовують для аналізу, змінюються від партії до партії, від планшету до планшету, і навіть від лунки до лунки (так званий «крайовий ефект») [7, 8].

Метою роботи було отримання бруцельозного антигену, як компонента діагностичної тест-системи на основі непрямого варіанту імуноферментного аналізу.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для досліджень була інактивована стандартизована культура бруцел із штаму *Brucella abortus* 19, що входить до складу комерційного препарату «Антиген бруцельозний єдиний для РА, РЗК, РТЗК».

Отримання бруцельозного ліполісахариду (ЛПС). ЛПС отримували за рекомендованою МЕБ технологією, яка була оптимізована з метою підвищення показників чутливості і специфічності останнього.

Антигеном є ЛПС, який вилучали з клітин *B. abortus*. Клітини бруцел були автоклавовані, а потім осаджені центрифугуванням протягом 1 год. при 10000 об/хв. Для проведення процедури очищення брали 10 г вологого бактерійного осаду та ресуспендували в 100 см³ дистильованої води.

Для очищення антигену використовували 80% водонасичений розчин фенолу. Для його приготування розплавляли 100% фенол і доливали дистильовану воду у співвідношенні 1:1. Центрифугували отриману суміш для розділення на шари 10 хвилин при 4000g. Нижній шар є водонасиченим фенолом, що являє собою 80% розчин фенолу. МЕБ рекомендує брати 90% фенол.

До суспензії клітин додавали водонасичений фенол у співвідношенні 1:1. Помірно струшували без утворення піни, витримували в температурному діапазоні 60–70°C протягом 30 хвилин, на відміну від 15хвилин, як рекомендовано МЕБ. Потім центрифугували матеріал в умовах 9000 об/хв протягом 1 години. МЕБ рекомендує центрифугувати 15 хв. Відмічали розділення на чотири шари: осад білків, фенольний шар з розчинними білками, міжшаровий осад і водний шар.

Відбирали верхній водний шар. Для осадження ЛПС доливали 2,5 частини об'єму етанолу. МЕБ рекомендує осаджувати метанолом з додаванням насиченого ацетату натрію. Залишали для осадження на 18 год. при температурі 4°C, попередньо перемішавши.

Центрифугували при 7000–9000 об/хв протягом 40 хвилин. Надосад обережно зливали, а осад ресуспендували в 15 см³ 0,05 М карбонат-бікарбонатного буфера, рН 9,6. Згідно класичної методики рекомендованої МЕБ, до сирого ЛПС необхідно додавати трихлороцтову кислоту з подальшим центрифугуванням і діалізом проти дистильованої води. Однак ми від цього відмовились.

Антиген ліофільно висушували і залишали на зберігання при кімнатній температурі.

Виготовлення бруцельозного імуносорбенту. Ліпополісахарид сорбували на полістиролових планшетах фірми «SARSTEDT» (США) в 0,05 М розчині карбонатно-бікарбонатного буфера рН 9,6. З метою визначення найбільш оптимального розведення для ІФА антиген попередньо титрували за допомогою двократного розведення. У кожен лунку планшета вносили по 0,1 см³ розчину антигену і витримували протягом 16–18 год за температури +4°C. Після закінчення інкубації вміст лунк витрушували. Планшети підсушували.

Антиген, який раніше був отриманий за класичною методикою МЕБ, працював в непрямому варіанті ІФА в розведенні 1:12500. ЛПС, який ми отримали за модифікованою нами технологією, мав вищі в 2,4 рази діагностичні характеристики і в ІФА працював у титрі 1:30000.

Результати досліджень та їх обговорення. Специфічність та чутливість антигену перевіряли в непрямому варіанті ІФА. Для розрахунку значень позитивних та негативних результатів, відповідно до рекомендацій МЕБ, було використано розрахунковий метод «cut-off». В даному випадку за граничне значення (cutoff), яке відмежовувало показники позитивних на бруцельоз сироваток від негативних, приймали 0,315 оптичних одиниць (ОО). Було встановлено, що антиген проявляв неспецифічну взаємодію з антитілами до *Yersinia enterocolitica* 0:9. Різниця між показниками ОГ деяких ієрсиніозних сироваток крові та низькопозитивними бруцельозними сироватками крові складала лише 0,086 ОО (табл. 1).

З метою зручності постановки диференційного діагнозу на бруцельоз та ієрсиніоз було застосовано формулу підрахунку для оцінки результатів реакції:

$$\text{ПП} = \frac{\text{ОГ зразку}}{\text{ОГ позитивного контролю}} \times 100, \text{ де}$$

ПП – процент позитивності;

ОГ зразку – оптична густина зразку сироватки крові, що перевіряється;

ОГ позитивного контролю – середнє значення позитивного контролю.

Таблиця 1

Результати контролю бруцельозного антигену

Позитивні на бруцельоз			Позитивні на ієрсеніоз			Здорові тварини		
№ зразку	Оптична густина	ПП	№ зразку	Оптична густина	ПП	№ зразку	Оптична густина	ПП
1	1,354	64,1	145	0,098	4,6	30	0,035	1,6
2	0,864	41	113	0,105	4,9	31	0,021	1
3	0,987	46,7	115	0,269	12,7	32	0,036	1,7
4	0,358	16,9	201	0,201	9,5	35	0,028	1,3
5	1,699	80,5	208	0,087	4,1	36	0,019	0,9
6	1,489	70,5	209	0,169	8	38	0,035	1,6
7	1,006	47,6	165	0,101	4,7	39	0,035	1,6
8	0,741	35,1	135	0,158	7,4	40	0,061	2,9
9	0,357	16,9	221	0,065	3	41	0,021	1
10	0,399	18,9	226	0,271	12,8	42	0,126	5,9
Позитивний контроль	2,110	–	–			–		

Позитивними на бруцельоз вважаються сироватки, ПП яких при постановці ІФА з наступним підрахунком за формулою мають числове значення 15 або вище. Так, усі сироватки крові тварин, хворих на ієрсиніоз, при перевірці з використанням очищеного ЛПС бруцел та після перерахування за формулою були віднесені до негативних на бруцельоз.

Очищений антиген взаємодіяв з позитивними на бруцельоз зразками сироваток крові, не мав неспецифічних взаємодій з сироватками крові здорових тварин і тому може бути застосований для виготовлення імуносорбенту при конструюванні діагностичного набору на основі імуноферментного аналізу.

На наступному етапі визначали відтворюваність бруцельозного імуносорбенту. З цією метою визначали коефіцієнт варіації (CV) при дослідженні слабопозитивної бруцельозної референс-сироватки крові у 10 повторях у бруцельозній імуноферментній тест-системі з використанням в якості кон'югату білка G з пероксидазою хрому (рис. 1).

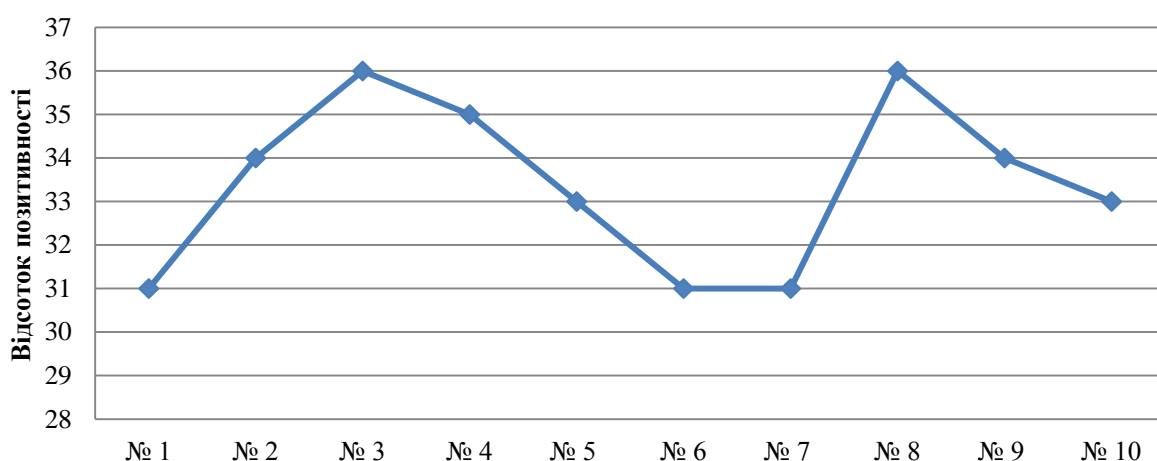


Рис. 1. Варіації результатів постановки референс-сироватки крові в ІФА.

Результати отримані в оптичній густині перераховували в ПП для кожного варіанту та визначали CV, яке становило 5,1%.

Існують різні рекомендації, які допускають відмінні прийнятні значення CV: одні автори рекомендують дозволяти показники CV <10%, інші вважають прийнятними результати CV <20%. Отримані нами результати відтворюваності розроблюваних діагностичних наборів задовольняють вимоги, які накладені на тест-системи даного типу.

Висновки та перспективи подальших досліджень. У статті експериментально обґрунтовано технологію отримання бруцельозного антигену за рекомендованою МЕБ технологією в модифікації.

Очищений антиген взаємодіяв з позитивними на бруцельоз зразками сироваток крові, не мав неспецифічних взаємодій з сироватками крові здорових тварин і тому може бути застосований для виготовлення імуносорбенту при конструюванні діагностичного набору на основі імуноферментного аналізу.

Отриманий ЛПС може бути застосований для диференційної діагностики антитіл, специфічних щодо *Yersinia enterocolitica* (серовар 0:9) та *B. abortus*.

Показник відтворюваності імуносорбенту з імобілізованим ЛПС, як компоненту діагностичної тест-системи на бруцельоз, повністю відповідає сучасним вимогам щодо тест-систем даного типу ($CV < 10\%$).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Хронічні інфекційні хвороби тварин / Л.Є. Корнієнко, В.О. Бусол, В.В. Недосєков [та ін.]. – Біла Церква: Білоцерківський національний аграрний університет, 2009. – 291 с.
2. McElwain T.F. Animal pathogens and their impact on animal health, the economy, food security, food safety and public health / T.F. McElwain, S.M. Thumbi // Rev Sci Tech. – 2017. – Vol. 36(2). – P. 423–433.
3. Бабкін А.Ф. Бруцельоз: сучасні аспекти епізоотології / А.Ф. Бабкін, О.В. Обуховська // Ветеринарна медицина. – 2012. – Вип. 96. – С. 204–205.
4. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing / J. Godfroid, C. Saegerman, V. Wellemans [et al.] // Vet. Microbiol. – 2002. – V. 90. – P. 461–477.
5. Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* sp. and *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and pigs / K.Nielsen, P.Smith, W.Yu [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2006. – V. 109. – P. 69–78.
6. International reference Standards: antibody standards for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay / P.F. Wright, K. Tounkara, M. Lelenta [et al.] // Rev. Sci. Tech. – 1997. – V. 3. – P. 824–832.
7. Chessum B.S. Inconstant ELISA / B.S. Chessum, J.R. Denmark // Lancet. – 1978. – Vol. 311, Is. 8056. – 161 p.
8. Variability in the adsorption properties of microtiter plates used as solid supports in enzyme immunoassay / L.J. Kricka, T.J.N. Carter, S.M. Burt [et al.] // Clin. Chem. – 1980. – V. 26. – P. 741–744.

ПОЛУЧЕНИЕ БРУЦЕЛЛЁЗНОГО АНТИГЕНА ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В НЕПРЯМОМ ВАРИАНТЕ ИФА ПРИ ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЁЗА ЖИВОТНЫХ / Хоменко В.Г., Хоменко Я.В., Уховский В.В., Дьяченко Т.А.

В статье изложены результаты изготовления бруцеллёзного антигена, который может быть применен в непрямом варианте иммуноферментного анализа (ИФА) при диагностике бруцеллёза животных в качестве компонента имуносорбента. С этой целью получали липополисахарид из клеток *Brucella abortus* 19 по рекомендованной МЭБ технологии в модификации. На следующем этапе антиген сорбировали на полистироловом планшете и проверяли его качество, используя заранее известные положительные и отрицательные на бруцеллёз животных сыворотки крови и сыворотки крови животных больных иерсиниозом. Полученные данные позволили применять антиген при конструировании диагностических тест-систем на бруцеллёз животных.

Ключевые слова: бруцеллёз, антиген, липополисахарид, иммуноферментный анализ.

BRUCELLA ANTIGEN PURIFICATION FOR THE DIAGNOSIS OF ANIMAL BRUCELLOSIS WITH INDIRECT ELISA TEST / Homenko V.G., Homenko Y.V., Ukhovskyi V.V., Diacyenko T.O.

Introduction. *Brucellosis is a zoonosis infection caused by Br. abortus and poses an important medical and veterinary problem, threatening the health of humans and animals. Brucellosis is practically eradicated in Ukraine. Only sporadic cases of the disease were registered among sheep population but the facts of circulation of the pathogen are confirmed in wild animals.*

Improvement of technology for brucellosis antigen purification and its usage for indirect ELISA test will help to solve the problem of brucellosis incidence in farm animals.

ELISA is one of the diagnostic methods, which is widely used all around the world, and has high sensitivity and high specificity.

The goal of the work was to develop a protocol for brucellosis antigen purification and subsequent use of purified antigen as a component of the diagnostic test, which based on an indirect ELISA.

Materials and methods. The standardized inactivated culture of brucella from strain Brucella abortus 19 was used as a source of antigen. Brucellous lipopolysaccharide (LPS) was prepared according to the OIE-recommendation in modification. The parameters of centrifugation, temperature regime, etc. were optimized, which made it possible to increase the production of brucellosis antigen. Polystyrene plates (SARSTEDT, USA) were coated with LPS diluted in a 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6. To determine the most optimal dilution for ELISA antigen was pre-titrated by double dilution.

Next, quantity of antigen was tested using positive and negative for brucellosis animal sera, and also using blood sera of animals with yersiniosis.

Results of research and discussion. Antigen was previously purified using classical OIE protocol and was used for the indirect of ELISA test at 1:12 500 dilution. The new purification technology allowed to use LPS at 1:30 000 dilution. Moreover, test kits based on the antigen had a 2.4-fold higher diagnostic performance.

The purified antigen interacted with brucellosis-positive serum samples and had no nonspecific interactions with the sera of healthy animals. The tested yersiniosis sera of the animals were also classified as negative for brucellosis.

Conclusions and prospects for further research. The obtained data allowed to use the purified antigen for the design of diagnostic test kits for animal brucellosis diagnostics.

Keywords: brucellosis, antigen, lipopolysaccharide, enzyme immunoassay.

REFERENCES

1. Korniyenko, L.E., Busol, V.O., Nedosekov, V.V., et al. (2009). *Hronichni infekcijni hворoby tvaryn [Chronic infectious diseases of animals]*. Bila Tserkva: Bilotserkivskyi natsionalnyi ahrarnyi universytet [in Ukrainian].
2. Mcelwain, T.F., & Thumbi, S.M. (2017). Animal pathogens and their impact on animal health, the economy, food security, food safety and public health. *Revue scientifique et technique*, 36(2), 423-433.
3. Babkin, A.F., & Obukhovskaya, O.V. (2012). Brucelyoz: suchasni aspekty epizootologii [Brucellosis: modern epizootology issues]. *Veterinary medicine – Veterynarna medicina*, 96, 204-205 [in Ukrainian].

4. Godfroid, J., Saegerman, C., Wellemans, V., et al. (2002). How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Veterinary microbiology*, 90, 461-477.
5. Nielsen, K., Smith, P., Yu, W., et al. (2006). Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* sp. and *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 109, 69-78.
6. Wright, P.F., Tounkara, K., Lelenta, M., et al. (1997). International reference Standards: antibody standards for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Revue scientifique et technique*, 3, 824-832.
7. Chessum, B.S., & Denmark, J.R. (1978). Inconstant ELISA. *Lancet*, Vol. 1, 161.
8. Kricka, L.J., Carter, T.J.N., Burt, S.M., et al. (1980). Variability in the adsorption properties of microtiter plates used as solid supports in enzyme immunoassay. *Clin. Chem.*, V. 26, 741-744.

УДК 639:615.9:639.085

DOI: 10.31073/vet_biotech36-19

ЯНГОЛЬ Ю.А., e-mail: 2019yangol@gmail.com

Інститут ветеринарної медицини НААН

ДОСЛІДЖЕННЯ КОНТАМІНАЦІЇ КОРМІВ МІКРОСКОПІЧНИМИ ПЛІСНЯВИМИ ГРИБАМИ ТА ЇХ МІКОТОКСИНАМИ

*Проведено мікотоксикологічні дослідження зразків кормів з господарства Київської області. Всього ідентифіковано 128 зразків корму. Шляхом дослідження на тест-об'єкті *Tetrachium piriformis* встановлено 64 токсичних штамів. Найбільше активних штамів було встановлено серед грибів роду *Fusarium* – T-2 токсин продукувало 57%, зеараленон – 21%, та *Aspergillus* – найбільше продукували афлатоксин В1 – 54%. Найбільшу кількість мікотоксинів виявляли в кукурудзі та комбікормах, майже всі досліджувані проби кормів містили по декілька мікотоксинів одночасно.*

Ключові слова: мікотоксини, гриби, корми, моніторинг, штами, фузарії.

Вступ. Мікотоксини – метаболіти повсюдно розповсюджених мікроскопічних (плісневих) грибів, які за ступенем ризику для здоров'я тварин та людини займають одне з перших місць серед відомих забруднювачів кормів, продовольчої сировини та продуктів харчування [1].

У сільському господарстві, в тому числі в тваринництві, значні втрати пов'язані з ураженням кормів мікроскопічними пліснявими грибами, адаптованими до певних умов біоценозу, що розрізняються за біологічними властивостями. Багато видів цих грибів можуть утворювати високотоксичні вторинні метаболіти – мікотоксини, які здатні викликати інтоксикації у всіх видів сільськогосподарських тварин та птиці. Мікотоксини накопичуються в