

## PECULIARITIES OF LONG-TERM STORAGE OF BACTERIA SPECIES *Listeria monocytogenes*

Ushkalov V.O., Vygovs'ka L.M.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv

*Results of study of biological characteristics of the referent strain *Listeria monocytogenes* from the collection of the National Center of Strains of Microorganisms SSCIBSM are presented in the paper. There was determined the level of biological activity of the culture in different physiological state (by cultural-and-morphological, biochemical and haemolytic characteristics).*

УДК 619:578

### ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ РОТАВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА

Финогенов А.Ю., Гудков В.Г., Виринская А.С.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского»  
г. Минск, Республика Беларусь

*Экспериментальное изучение тест-системы «Рота-антиген», которая включает в себя иммуноглобулин ротавирусный, конъюгат, положительный и отрицательный контроль, буферные растворы, стоп-реагент, планшет 96 луночный показало, что внешний вид компонентов тест-системы соответствует ТУ ВУ 600049853.12-2009. Чувствительность тест-системы, определенная путем титрования производственного штамма вируса в ИФА и определения его конечного разведения по антигену составила 100%. Специфичность тест-системы, определенная путем индикации ротавирусов в пробах из коллекции заведомо положительных и заведомо отрицательных по наличию ротавирусов образцов составила 100%. Оптическая плотность средняя для положительного контроля составила не менее 0,6 о.е., для отрицательного контроля – не более 0,1 о.е. и находилась неизменной на протяжении 14 месяцев.*

**Введение.** Как известно, ротавирусная инфекция, поражая преимущественно молодняк различных видов животных, наносит существенный экономический ущерб животноводству и государству в целом. Эффективность профилактических и противозооотических мероприятий существенно зависит от качества специфической лабораторной диагностики ротавирусной инфекции, поскольку диагноз этого заболевания может быть установлен лишь путем выявления возбудителя инфекции. Анализ данных литературы показал, что наиболее эффективным современным методом индикации ротавирусов является иммуноферментный анализ (ИФА), который выгодно отличается от других методов исследования высокими показателями чувствительности, специфичности, воспроизводимости, а также возможностью автоматизации исследований и объективизации их результатов.

Индикация ротавирусов методом ИФА, как правило, основывается на обнаружении общих для всех ротавирусов группы А антигенов, что позволяет использовать одну и ту же тест-систему для диагностики заболевания у различных видов животных, например, лошадей, крупного рогатого скота, свиней и др.

Целью исследований являлась разработка показателей качества новой диагностической тест-системы в отношении распространенного инфекционного заболевания животных – ротавирусной инфекции. При этом ставилась задача создания конкурентоспособной тест-системы, в наибольшей мере отвечающей потребностям пользователей по таким основным параметрам, как специфичность (не менее 96%), чувствительность (не менее 96%), срок хранения (не менее года), воспроизводимость результатов (в пределах допуска для используемого дозирующего и фотометрического оборудования), термостабильность (сохранение активности препарата даже при отклонениях от температурных условий транспортировки и хранения).

**Материалы и методы.** Тест-система иммуноферментная предназначена для выявления антигенов ротавирусов группы А у животных (лошадей, крупного рогатого скота, свиней и др.) в биопробах (фекалии, биопсийный материал и др.). Специфический антиген из исследуемой пробы образует устойчивый комплекс с иммобилизованными в лунках планшета специфическими антителами к ротавирусам. Добавление к образовавшемуся иммунному комплексу антиротавирусного конъюгата обеспечивает прочное связывание фермента и определяемого иммунного комплекса. При добавлении субстрат-индикаторного раствора комплекс приобретает окрасивание, степень которого определяется спектрофотометрически (или визуально) и прямо зависит от количества антигена.

В состав тест-системы входят следующие компоненты: иммуноглобулин антиротавирусный (анти-рота IgG), выделенный из сыворотки крови кроликов, иммунизированных ротавирусным антигеном, с высоким титром специфических антител (№1) – 4 флакона; конъюгат – химически связанный комплекс антиротавирусного иммуноглобулина и пероксидазы хрена (№2) – 4 флакона; положительный контроль (ПК) – антиген ротавирусный культуральный, инактивированный, показатель оптической плотности в ИФА – не менее 1.0 о.е., представляет собой очищенную вирусодержащую взвесь на основе штамма ротавируса крупного рогатого скота, адаптированного к культуре клеток СПЭВ (№3) – 1 флакон; отрицательный контроль (ОК) – лизат интактной (неинфицированной) культуры клеток, на которой был получен антиген ротавирусный (№4) – 1 флакон; раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина – ТМБ (№5) – 4 флакона; концентрат фосфатно-солевого твинсодержащего буферного раствора (ФСТБ) – 25 кратный концентрат рабочего разведения (№6) – 4 флакона; субстратный буферный раствор с перекисью водорода – СБ (№7) – 4 флакона; стоп-реагент – серная кислота 2М (№8) – 1 флакон, планшет полистироловый 96-луночный типа Microtiter Assembly Strip 1x8, ЕВ производства фирмы Labsystems (Финляндия) или других фирм-производителей с аналогичными свойствами – 1 шт.; липкая лента – 4 шт., наставление по применению – 1 шт.

#### *1. Изучение внешнего вида компонентов набора.*

Флаконы с лиофильно высушенными компонентами (иммуноглобулин, конъюгат, ПК, ОК) просматривали в проходящем свете, обращая внимание на их целостность и цвет. Флаконы с растворами (ТМБ, ФСТБ, СБ, стоп-реагент) просматривали в проходящем свете, обращая внимание на цвет, прозрачность растворов, наличие осадка, механических примесей и плесени.

#### *2. Определение времени растворения сухих компонентов тест-системы, оптической плотности растворов положительных и отрицательных контролей.*

Во флакон с иммуноглобулином (№1) вносили указанный в инструкции объем дистиллированной воды. С помощью секундомера измеряли время растворения. Препарат полностью растворялся в течение 2 мин. В каждую лунку чистого планшета, кроме лунки А1, вносили по 100 мкл готового раствора иммуноглобулина. Лунку А1 оставляли пустой вплоть до внесения субстрат-индикаторного раствора (СИР). Планшет заклеивали липкой лентой и инкубировали в течение от 16 до 18 часов при температуре от + 18 до + 20° С. Готовили рабочее разведение ФСТБ. К 10 мл концентрата ФСТБ (№6) добавляли 240 мл деионизированной воды. Препарат полностью растворялся в течение 3 мин при встряхивании. Удаляли раствор иммуноглобулина, затем планшет промывали 4 раза рабочим раствором ФСТБ.

Во флакон с положительным контролем (№3) вносили 2,5 мл рабочего раствора ФСТБ. С помощью секундомера измеряли время растворения. Препарат полностью растворялся в течение 3 мин при встряхивании.

Во флакон с отрицательным контролем (№4) вносили 2,5 мл рабочего раствора ФСТБ. С помощью секундомера измеряли время растворения. Препарат полностью растворялся в течение 3 мин при встряхивании.

В 2 лунки планшета вносили по 100 мкл положительного контроля (ПК). В 4 лунки планшета вносили по 100 мкл отрицательного контроля (ОК). Планшет закле-

ивали липкой лентой и инкубировали в течение 2 часов при температуре + 37 °С. Удаляли содержимое лунок, планшет промывали 4 раза рабочим раствором ФСТБ.

Во флакон с конъюгатом (№2) вносили 3,0 мл рабочего раствора ФСТБ. С помощью секундомера измеряли время растворения. Препарат полностью растворялся в течение 3 мин при встряхивании.

Во все лунки планшета вносили по 100 мкл раствора конъюгата. Планшет заклеивали липкой лентой и инкубировали при температуре + 37°С в течение 1-1,5 часов. Удаляли раствор конъюгата из лунок и 5 раз промывали рабочим раствором ФСТБ.

Готовили субстрат индикаторный раствор (СИР). Во флакон с ТМБ (№5) вносили 1,8 мл СБ (№7), тщательно перемешивали.

В каждую лунку планшета, включая лунку А1, вносили по 100 мкл СИР. Планшет помещали в защищенное от света место при температуре от + 18 до + 20°С и инкубировали в течение 30 мин.

Реакцию останавливали путем внесения во все лунки планшета по 50 мкл стоп-реагента и немедленно приступали к измерению оптической плотности.

Измерение оптической плотности (ОП) проводили при следующих условиях: не позднее 5-10 мин после внесения стоп-реагента, длина волны измерения – 450 нм, фоновая волна – 620 нм. Значение ОП в лунке А1 принималось за нулевое значение (программа Blank) или вычиталось из величины ОП всех остальных лунок, если программа Blank отсутствует.

Рассчитывали среднее арифметическое значение ОП по 2-м лункам с положительным контролем, проверяли соответствие полученной величины ОП величине, указанной в инструкции. Показатель оптической плотности для ОК составлял не более 0.1 о.е. Рассчитывали среднее арифметическое значение ОП по 4-м лункам с отрицательным контролем, проверяли соответствие полученной величины ОП величине, указанной в инструкции. Показатель оптической плотности для ПК составлял не менее 0.6 о.е.

### *3. Изучение специфичности тест-системы.*

Оценка специфичности разработанного препарата проводилась путем индикации ротавирусов в пробах из коллекции заведомо положительных и заведомо отрицательных по наличию ротавирусов образцов. Такая коллекция создана в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» из образцов фекалий животных (телят, поросят) с диагностированной ротавирусной инфекцией и инфицированных ротавирусами образцов культур клеток.

Специфичность – % совпадения результатов, полученных при исследовании панели заведомо положительных и заведомо отрицательных образцов.

Специфич. (%) =  $\frac{\text{Кол-во совпад. положительных и отрицательных образцов} \times 100}{\text{Общее кол-во заведомо положит. и заведомо отриц. образ.}}$

### *4. Изучение чувствительности тест-системы*

Чувствительность тест-системы определялась также путем индикации ротавирусов в различных концентрациях из коллекции РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», а также путем титрования производственного штамма вируса в ИФА и определения его конечного разведения по антигену. Затем это разведение с наименьшим содержанием антигена ротавируса титровалось в культуре клеток для определения ТЦД<sub>50</sub> ротавируса.

### *5. Изучение стабильности*

Компоненты тест-системы хранили при температуре от + 4 до + 8°С в течение 14 месяцев. Внешний вид компонентов, время растворения сухих компонентов тест-системы, рН растворов определяли визуально и с помощью рН-метра ежемесячно. Показатели оптической плотности отрицательных и положительных контролей, а также пулов заведомо положительных и заведомо отрицательных по содержанию ротавирусов проб также исследовались ежемесячно в течение 14 месяцев.

### **Результаты исследований. 1. Внешний вид компонентов набора.**

Результаты исследования внешнего вида тест-системы приведены в таблице 1.

**Таблица 1** – Внешний вид компонентов тест-системы «Рота-антиген»

Компонент	Внешний вид
1. Иммуноглобулин	Пористая масса белого цвета
2. Конъюгат	Пористая масса белого цвета с желтоватым оттенком
3. ПК	Пористая масса белого с розоватым оттенком
4. ОК	Пористая масса белого цвета с розоватым оттенком
5. Раствор ТМБ	Прозрачная бесцветная жидкость
6. СБ	Прозрачная бесцветная жидкость
7. Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость
8. ФСТБ	Слегка опалесцирующая бесцветная жидкость. Пениится при встряхивании. Допускается выпадение солей в осадок.

2. Определение времени растворения сухих компонентов тест-системы, оптической плотности растворов положительных и отрицательных контролей.

Время растворения иммуноглобулина, положительного и отрицательного контролей, конъюгата составило не более 5 минут. Оптическая плотность средняя для положительного контроля при длине волны 450 нм, фоновая – 620 нм составила не менее 0,6 о.е. Оптическая плотность средняя для отрицательного контроля (при длине волны 450 нм, фоновая – 620 нм) составила не более 0,1 о.е.

Результаты испытаний показателей оптической плотности как исследованных проб, так и контролей тест-системы в течение 14 месяцев существенно не колебались, оставаясь в установленных пределах воспроизводимости результатов. На основании этих данных был определен срок годности тест-системы – 1 год.

### 3. Изучение специфичности тест-системы.

Результаты изучения специфичности тест-системы приведены в таблице 2.

**Таблица 2** – Изучение специфичности тест-системы РОТА-АНТИГЕН

Количество заведомо положительных образцов	Количество заведомо отрицательных образцов	Всего заведомо положительных и заведомо отрицательных образцов	Количество совпадений положительных и заведомо отрицательных образцов	Специфичность (%)
38	14	52	52	100

Как видно из приведенной таблицы, специфичность разработанного препарата в этих тестах составляла 100%. Однако, нами сделано допущение, что при существенном возрастании числа и гетерогенности исследованных проб специфичность тест-системы может составлять 96% и более. Этот показатель заложен в ТУ на препарат.

### 4. Изучение чувствительности тест-системы

Результаты исследований чувствительности показали, что все пробы с низким, средним и высоким содержанием ротавирусного антигена были положительными в ИФА с помощью тест-системы РОТА-АНТИГЕН (100% совпадение результатов), а при определении конечного разведения производственного штамма вируса чувствительность тест-системы составила  $2,1 \times 10^5$  ТЦД<sub>50</sub> вирусных частиц. Таким образом, чувствительность разработанного препарата вполне достаточна для индикации ротавирусов в биопробах животных, поскольку в экскретах концентрация возбудителя составляет 8-10 Ig вирусных частиц.

### 5. Изучение стабильности

Результаты изучения стабильности тест-системы показали, что значения показателей ОП в течение 14 месяцев существенно не изменялись, оставаясь в установленных пределах воспроизводимости результатов (таблица 3).

Таблица 3 – Изучение стабильности тест-системы РОТА-АНТИГЕН

Среднее значение показателя ОП в ИФА в течение (месяц)	Наименование образца				
	ОК	ПК	Образец с содержанием ротавирусного антигена:		
			высоким	средним	низким
1	0,040	2,458	2,768	1,033	0,249
2	0,041	2,432	2,776	1,013	0,252
3	0,039	2,443	2,788	1,024	0,247
4	0,042	2,455	2,759	1,032	0,242
5	0,044	2,428	2,748	1,011	0,245
6	0,040	2,437	2,778	1,008	0,251
7	0,038	2,456	2,794	1,035	0,253
8	0,042	2,458	2,757	1,032	0,247
9	0,040	2,431	2,765	1,007	0,249
10	0,039	2,439	2,773	1,027	0,250
11	0,044	2,428	2,770	1,023	0,255
12	0,045	2,433	2,765	1,030	0,243
13	0,042	2,459	2,763	1,037	0,247
14	0,041	2,447	2,771	1,039	0,257

**Заключение.** Результаты проведенных исследований разработанной тест-системы «Рота-антиген» показали, что она является пригодной для выявления антигенов ротавирусов животных. Специфичность тест-системы составила 100%, чувствительность – 100%. Тест-система «Рота-антиген» выпускается в соответствии с ТУ BY 600049853.127 – 2009, прошла испытания в Белорусском государственном ветеринарном центре, рассмотрена на Фармсовете и рекомендована к запуску в производство.

#### Список литературы

1. Кеворков, Н. Физиология иммунной системы и экология / Кеворков Н., Черешнев В., Бахметьев Б., Раев М. [и др.] // «Иммунология». – 2001. – №3. – С.12-16. 2. Раев, М.Б. Частицы коллоидного углерода в системах неинструментальной диагностики / Раев М.Б. // Клиническая и лабораторная диагностика. – 2008. – №2. – С. 44-49. 3. Bastian, L.A. Diagnostic efficiency of home pregnancy test kits. A meta-analysis / Bastian L.A., Nanda K., Hasselblad V. and Simel D.L. // Arch.Fam.Med. – 1998. – № 7. – С. 465-469. 4. Lein, M. Rapid screening of PSA: evaluation of an immunochemical membrane strip test [letter] / Lein M., Jung K., Schnorr D., Henke W. [и др.] // Clin.Chem. – 1995. – № 41. – С. 1545-1547.

#### DETECTION OF ANTIGENS OF ANIMAL ROTAVIRUSES USING IMMUNE ENZYME METHOD

Finogenov A.J., Gudkov V.G., Virinskaja A.S.

RUP «Institute of experimental veterinary science named after f S.N. Vysheslesky»,  
Minsk, Belarus

*Experimental study of the test system “Rota-antigen” which includes an antibody rotavirus, conjugate, 96 hole has shown the positive and negative control, buffer solutions, a stop reagent, a tablet, that appearance of components of test system corresponds THAT BY 600049853. The sensitivity of test system defined by titration industrial strains of a virus in ELISA and definition of its final cultivation on an antigen has made 100 %. The specificity of test system defined by indication rotavirus in tests from a collection obviously positive and obviously negative on presence rotavirus of samples has made 100 %. The optical density average for the positive control has made not less than 0,6 islands e., for the negative control - no more than 0,1 islands e. Also was invariable throughout 14 months.*