

– М.: Мир, 1984. – 480 с. 5. Меркулов, В.А. Методические подходы к определению чувствительности амплификационных наборов реагентов и прогнозированию ожидаемой концентрации возбудителя в биопробах по результатам ПЦР [Электронный ресурс] /Борисевич И.В., Сизикова Т.Е., Мельникова Е.В., Меркулова О.В., Мельников Д.Г., Петров А.А., Пирожков А.П., Лебедев В.Н., Пантюхов В.Б.// Биопрепараты 2010 – № 4[40] – Режим доступа: [http://www.biopreparaty-magazine.ru/profit/40\\_01](http://www.biopreparaty-magazine.ru/profit/40_01). 6. Яцышина, С. Б. Выявление и типирование возбудителей сальмонеллеза молекулярно-генетическими методами [Текст]: дисс. ... канд. биол. / С.Б. Яцышина. – М., 2003 – 112 с.

## DEVELOPMENT OF PCR-BASED TECHNIQUE FOR INDICATION OF SALMONELLAS' DNA AND IDENTIFICATION OF SALMONELLA ENTERITIDIS AND SALMONELLA TYPHIMURIUM SEROVARS

Arefyev V.L.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov

The technique for *Salmonella* genus-specific and *Salmonella* Enteritidis, and *Salmonella* Typhimurium serovariant-specific detection was developed on the basis of polymerase chain reaction. The optimal annealing temperature was determined for three specific primer pairs' (*Salm3\_4*; *SentF\_R*; *StypF\_R*). The analytic sensitivity was determined for PCR with listed oligos use.

УДК 619-616.98:616.682-002

## ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОСОРБЦІЇ ТЕРМОСТАБІЛЬНИХ ТА ТЕРМОЛАБІЛЬНИХ АНТИГЕНІВ ШТАМІВ *B. OVIS* 67/Б, 76/982, 156/7807 ТА СПЕЦИФІЧНОГО БРУЦЕЛАОВІСНОГО ПЕРОКСИДАЗНОГО КОН'ЮГАТУ В ІФА

Бабкін А.Ф., Михайлова С.А., Обуховська О.В., Близнецов О.Г., Гончаренко-Прокоф'єва В.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Інфекційний епідидиміт баранів (*Brucella ovis* інфекція) небезпечна хронічна хвороба, яка спричиняє суттєві економічні збитки вівчарству багатьох країн. Обраховано, що собівартість збитків від *Brucella ovis* інфекції може перевищувати кошторис утримання неблагополучної отари овець [10]. Барани-плідники відіграють основну роль у розповсюдженні збудника хвороби. У епізоотичному процесі приймають участь також інфіковані вівцематки, які заражають баранів-плідників статевим шляхом у період парувального сезону, а також новонароджених ягнят з молоком. Для виявлення інфікованих дорослих тварин і молодняка застосовують серологічну діагностику. Для діагностики у країнах СНД використовують реакцію тривалого зв'язування комплекменту (РТЗК), реакцію імунодифузії (РІД), алергічну пробу [1, 2, 3]. У країнах ЄС серологічні дослідження на інфекційний епідидиміт баранів проводять у реакції зв'язування комплекменту (РЗК), реакції імунодифузії (РІД), імуноферментному аналізі (ІФА) [5, 6, 8, 9]. Ефективність серодіагностики залежить від епітопних (специфічних) властивостей антигенів. Згідно рекомендацій МЕВ для серологічної діагностики *Brucella ovis* інфекції рекомендується застосовувати сольовий термоекстрагований очищений антиген із суспензії культури серонезалежного еталонного штаму збудника *B. ovis* REO 198 [5, 6, 7, 8, 9]. В Україні чинними серологічними тестами є РТЗК (Набір компонентів для серологічної діагностики інфекційного епідидиміту баранів в РТЗК ТУ У 46.15.059-95) та РІД (Набір компонентів для серологічної діагностики інфекційного епідидиміту баранів в РІД ТУ У 46.15.127-96) з термоекстрагованим антигеном трьох штамів *B. ovis* збудника виділених від клінічно хворих баранів і адаптованих для культивування у поживних середовищах без сироватки і збільшеної концентрації CO<sub>2</sub> в атмосфері [1]. У порівняльних дослідженнях встановлено, що РТЗК і РЗК доповнюють одна одну у діагностиці та проведенні оздоровчих заходів: РЗК – більш специфічна, РТЗК – більш чутлива [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11]. За даними багатьох авторів РІД у діагностиці інфекційного епідидиміту баранів за чутливістю не поступається РЗК і разом з непрямим ІФА рекомендується для виявлення інфікованих *B. ovis* баранів та проведення оздоровчих заходів [3, 4, 6, 7, 11]. Технологія застосування серологічної діагностики інфекційного епідидиміту баранів в ІФА відкриває нові аспекти контролювання інфекційного процесу, зокрема, виявлення латентного бактеріоносійства *B. ovis* на основі не тільки термостабільних, але і термолабільних антигенів як імуносорбентів.

**Матеріали і методи.** У дослідженнях використали *B. ovis* штами 67/Б, 76/982, 156/7807, термоекстрагований антиген для РТЗК, консервованій 0,5 % фенолом, а також моноштамні формолфіксовані, відмиті від формаліну, суспензії антигенів зазначених штамів, пероксидазний кон'югат гамаглобуліну сироватки крові барана інфікованого штамом 67/Б.

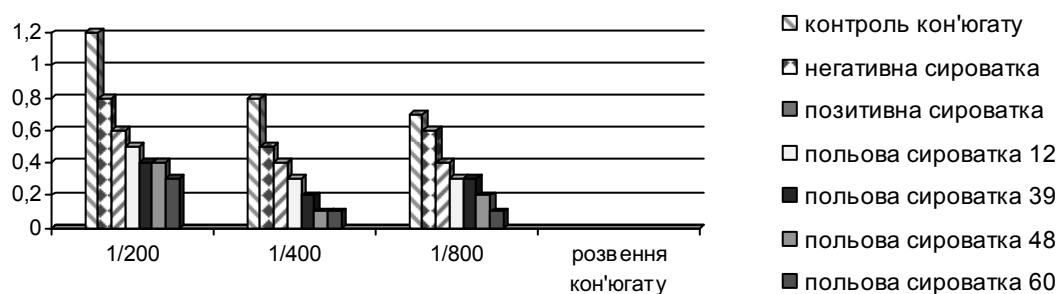
У першому досліді конкурентного ІФА (к-ІФА) визначена сорбційна активність імуносорбенту на основі термоекстрагованого антигену *Brucella ovis* («Набір для серологічної діагностики інфекційного епідидиміту баранів в РТЗК» ТУ У 46.15.059-95). Термоекстрагований антиген для РТЗК розчиняли 1:50 окремо у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) рН 7,4 і карбонатно-бікарбонатному буфері (КББ) рН 9,5, вносили у лунки полістеролової плати і витримували упродовж 16 год. за температури (5,0±1,0) °С, після чого тричі відмивали розчинником ФСБ рН 7,2. У два контрольні ряди лунок з антигеном вносили по 50 мкл фосфатно-сольового розчинника рН 7,2. З метою визначення блокуючої активності антигену у к-ІФА в окремі ряди вносили в розведенні 1:5 нормальну і позитивну контрольні сироватки крові овець зазначеного комерційного набору, а також в розведенні 1:5 чотири сироватки крові від баранів, позитивно реагуючих в РТЗК, з неблагополучної на інфекційний епідидиміт віцеферми. Плати з реагентами витримували за температури (37,0±0,5) °С в умовах термостату упродовж 30 хвилин. Надалі реагенти реакції тричі відмивали розчинником ФСБ рН 7,2 і вносили специфічний бруцелаовісний пероксидазний кон'югат окремо в розведеннях 1:200, 1:400, 1:800. Плати витримували в термостаті 30 хвилин за температури (37,0±0,5) °С, тричі відмивали реагенти розчинником ФСБ рН 7,2, додавали теобромін-субстрат (хромоген) і витримували 20 хвилин за температури (20,0±1,0) °С. Кольорову реакцію зупиняли стоп-реагенту (8N сірчана кислота) і визначали оптичну екстинкцію забарвлення лунок на спектрофотометрі «Sunrise» в однохвильовому режимі з довжиною хвилі 450 нм.

У другому досліді виготовлені імуносорбенти з формолфіксованих моноштамних антигенів з 3-5 добових агарових культур штамів *Brucella ovis* 67/Б, 76/982, 156/7807, для визначення сорбційної активності корпускулярних формолфіксованих зависей культур *Brucella ovis*, у концентраціях: 2×10<sup>9</sup>, 1×10<sup>9</sup>, 500×10<sup>6</sup>, 250×10<sup>6</sup>, 125×10<sup>6</sup>, 62,5×10<sup>6</sup>, 31,4×10<sup>6</sup> м.к./см<sup>3</sup>, у фосфатно-сольовому буфері рН 7,2, в об'ємі 50 мкл. Сорбцію проводили 16 годин в холодильнику (5,0±1,0) °С. Імуносорбент відмивали ФСБ рН 7,2. Для виявлення сорбованих формолантигенів в ІФА застосовували специфічний пероксидазний бруцелаовісний кон'югат імуноглобулінів G, як і в першому досліді у розведенні 1:200.

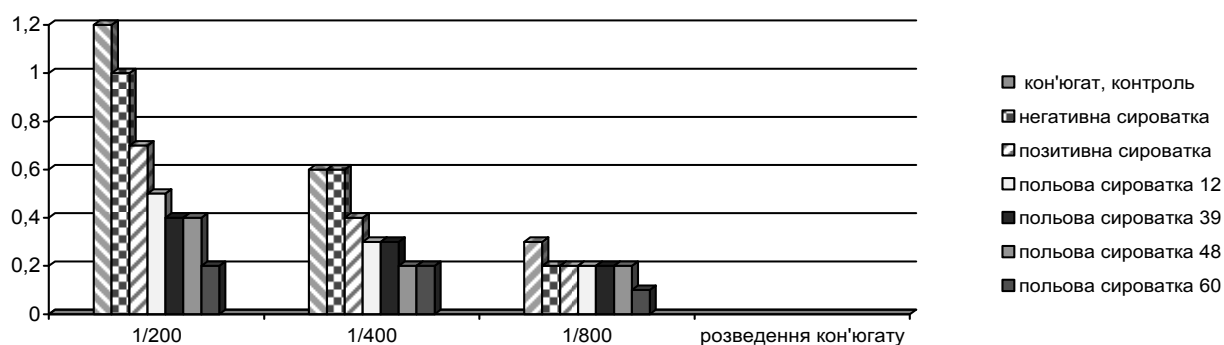
**Результати дослідження.** Одержані результати досліджено в ІФА свідчать про достатню активність бруцелаовісного пероксидазного кон'югату гамаглобуліну G розведень 1:200; 1:400; 1:800, з термоекстрагованим антигеном (контроль). Показник оптичної екстинкції кон'югату прямо залежав від ступеня розведення кон'югату і розчинника антигену: ФСБ рН 7,4 – ОЕ 1,2; 0,8; 0,7 або КББ рН 9,5 – ОЕ 1,2; 0,6; 0,3 (рис. 1 і 2). Проте різниця специфічної конкуренції у блокуванні антигену імуносорбенту стандартними нормальною і позитивно бруцелаовісною сироватками був не високим. Негативна стандартна сироватка мала ОЕ 0,8; 0,8; 0,7, а позитивна – 0,6; 0,5; 0,6 в залежності від розведення кон'югату. Досліджені 4 сироватки баранів з господарств блокували бруцелаовісний антиген імуносорбенту значно більше ніж стандартна позитивна сироватка: ОЕ 0,5; 0,4; 0,4 і 0,3 у

## Розділ 1. Біобезпека та біозахист у ветеринарній медицині, емерджентні трансмісивні та транскордонні хвороби тварин

розведеннях кон'югату 1:200; ОЕ 0,3; 0,2; 0,1; 0,1 у розведеннях кон'югату 1:400; ОЕ 0,3; 0,3; 0,2 і 0,1 у розведеннях кон'югату 1:800. Результати з кон'югатом 1:200 та 1:400 свідчать про наявність специфічних антитіл.

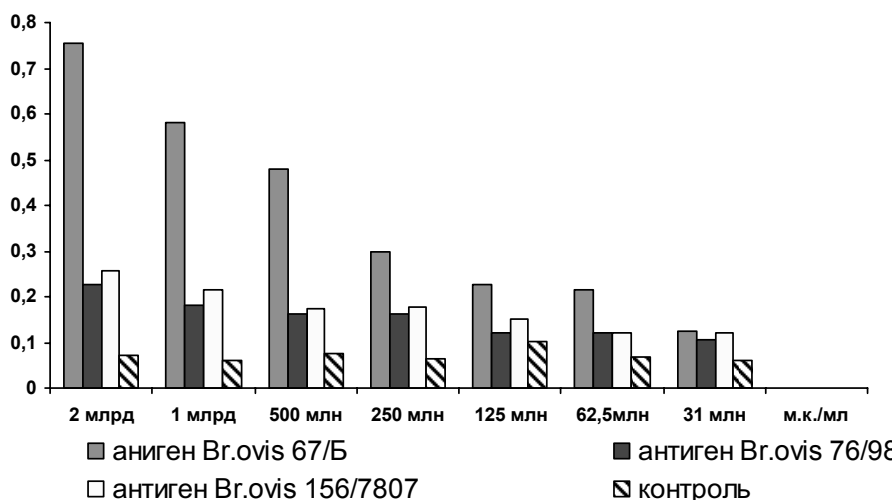


**Рис. 1** Дослідження сироваток овець у конкурентному ІФА (сорбція *B. ovis* термоекстракт антигену, ФСБ рН 7,4)



**Рис. 2** Дослідження сироваток у конкурентному ІФА (сорбція *B. ovis* термоекстракт антигену, КББ рН 9,6)

У досліді з формолфіксованими антигенами з різними концентраціями суспензій штам *Brucella ovis* 67/Б виявлено пряму залежність ОЕ від концентрації мікробних клітин ( $2 \cdot 10^9$  м.к./см<sup>3</sup> –  $31 \cdot 10^6$  м.к./см<sup>3</sup>) відповідно ОЕ від 0,8 до 0,1. Антигени інших штамів *Brucella ovis* (76/982 і 156/7807) мали значно меншу оптичну активність (0,1-0,25). Можливо це пов'язано з тим, що бруцеллавісний пероксидазний кон'югат гамаглобуліну виготовлено з сироватки крові барана, гіперімунізованого культурою *Brucella ovis* 67/Б (рис.3).



**Рис. 3** Активність бруцеллавісного пероксидазного кон'югату *Brucella ovis* 67/Б та корпускулярних імуносорбентів бруцеллавісних антигенів (*Brucella ovis* 67/Б, 76/982 і 156/7807) у конкурентному ІФА.

**Висновки.** 1. Термоекстрагований антиген для РТЗК у розведенні 1:50 сорбувався в лунках на полістеролових платах з розчинниками ФСБ рН- 7,4 або КББ рН – 9,6 і виявлявся в ІФА специфічним пероксидазним бруцеллавісним кон'югатом у титрі 1:200, 1:400, 1:800 з відповідним зниженням оптичної екстинції ФСБ рН 7,4 ОЕ 1,2, 0,8, 0,7; КББ рН 9,6 ОЕ 1,2, 0,6, 0,3.

2. Негативна контрольна сироватка з набору за ступенем блокуючої активності була меншою (ФСБ рН 7,4, ОЕ 0,8, 0,5, 0,4; КББ рН 9,6, ОЕ 1,0, 0,6, 0,2) ніж позитивна бруцеллавісна сироватка (ФСБ рН 7,4, ОЕ 0,6, 0,4, 0,4; КББ рН 9,6, ОЕ 0,7, 0,6, 0,2).

3. У досліді з формолфіксованими антигенами ОЕ імуносорбенту *Brucella ovis* 67/Б знаходився в прямій залежності від концентрації мікробних клітин ( $2 \cdot 10^9$  м.к./см<sup>3</sup> –  $31 \cdot 10^6$  м.к./см<sup>3</sup>) відповідно ОЕ від 0,8 до 0,1). ОЕ інших штамів коливалась в межах 0,25-0,1.

## Список літератури

1. Бусол, В.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных [Текст] / Бусол В.А., Бабкин А.Ф., Жованик П.Н. – К.: Урожай, 1991. – 176 с. 2. Бабкин, А.Ф. Комплемент фіксуючий тест у діагностиці інфекційного епідидиміти баранів [Текст] / Бабкин А.Ф., Медвідь О.О., Райко Д.Ю. // Вет. медицина : Міжвід. темат. наук зб. – Х., 2009. – Вип. 92. – С. 38-42. 3. Дейнеш, А.А., Бабкин, А.Ф. Применение РИД и ИФА при оздоровлении овцеводческих хозяйств от инфекционного эпидидимита баранов. // Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и совершенствование мер борьбы с болезнями в условиях интенсивного ведения животноводства и создания фермерских хозяйств: Тез. докл. Всесоюз. конф. 17-22 сентября 1991 г. – Харьков, 1991. – с. 115. 4. Комісійні випробування нової технології комплемент фіксуючого тесту для виявлення антитіл проти збудників інфекційних хвороб. [Текст] / Б. Т. Стегній [та ін.] // Вет. медицина : Міжвід. темат. наук зб. – Х., 2011. – Вип. 95. – С. 221-224. 5. Chapter 2.4.1 [Text] // OIE. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals (mammal, birds and bees).- 5<sup>th</sup> ed. – Paris, 2004. – Vol. 1.- P. 245-250. 6. Chapter 2.4.1 [Text] // OIE. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals (mammal, birds and bees).- 6<sup>th</sup> ed. – Paris, 2004. – Vol. 1. – P. 257-263. 7. Comparison of polyclonal, monoclonal and protein G peroxidase conjugates an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. / Marin C.M., Alonso-Urmeneta B., Morlion J., Perez S.L., Blasco J.M. // Vet. Rec. 1998, V. 143, P. 390-394. 8. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. / Marin C.M., Jimenes Z de Bagues U.P., Blasco J.M., Yamazo C., Moriyon J. and Diaz R. // Vet. Rec. 1989, V. 125, P. 504-508. 9. Comparison of an enzyme linked immunospecific assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. / Ris D.R., Hamel K.L. and Long D.J. // Vet. J. 1984, V. 32, P. 18-20. 10. Test can help improve range ram fertility // New Zealand veterinary journal 1987, – №35(6), P. 25-26. 11. Searson J.E. Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation tests diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams // Austr. Veterinary journal 1982, V.58 – P. 67.

**RESEARCH OF IMMUNOSORPTION OF THERMOSTABLE AND THERMOLABILE ANTIGENS OF THE STRAINS *B. OVIS* 67/B, 76/982, 156/7807 AND SPECIFIC BRUCELLA OVIS PEROXIDASE CONJUGATE IN ELISA****Babkin A.F., Mikhailova S.A., Obukhovska O.V., Blyznetsov A.G., Goncharenko-Prokof'yeva V.V.***National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv*

*Preliminary results of study of sorption activity of salt thermo extracted (thermostable) and thermolabile antigens bacterial suspensions of three industrial strains *B. ovis* in standard polystyrene plates of the company «Nunc MaxiSorp», are presented in the paper. Indication of adsorbed antigens was carried out with peroxidase conjugate gammaglobulin G made from positive blood of sheep, infected with the strain *B. ovis* 67/B serum.*

УДК 619:616.98:578

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА И ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, К ВИРУСАМ *IN VITRO*****Викторова Е.В., Шуляк А.Ф., Гулюкин М.И., Савченкова И.П.***ГНУ ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко, г. Москва*

Проведение фундаментальных медико-биологических исследований, связанных с безопасностью как животных, так и человека, а также производство вакцин, антигенов, диагностических препаратов, репродукция существующих и выделение новых штаммов вирусов, осуществление вирусологических и иммунологических исследований связано с культивированием вирусов *in vitro* в чувствительных биологических объектах. Отсутствие адекватных клеточных систем существенно сдерживает исследования в данном направлении. В связи с этим неизменно существует острая необходимость в разработке эффективных клеточных систем и изучении развития в них инфекционных процессов. Мезенхимные стеловые клетки мультипотентны и могут дифференцироваться в нескольких направлениях в пределах тканевых производных одного зародышевого листка. Легкость выделения и доступность биологического материала (подкожный жир, костный мозг, кожа) делает их перспективным материалом для изучения инфекций животных и человека. Направленная дифференцировка мультипотентных мезенхимных стеловых клеток (ММСК) *in vitro* позволяет создавать новые уникальные клеточные системы для проведения сравнительного анализа динамики развития вирусной инфекции в стеловых клетках различного происхождения, а также в процессе их дифференцировки в разные типы клеток [1]. Использование ММСК в качестве клеточной модели особенно перспективно для проведения фундаментальных исследований, связанных с изучением механизмов взаимодействия вируса и клетки-хозяина. Такие исследования являются ключевыми для понимания сложных процессов, происходящих на молекулярном и клеточном уровнях, и позволяют получить новые данные о роли факторов, рецепторов, генов, ответственных как за связывание, так и за блокирование этого взаимодействия. Появились первые работы в этом направлении [2; 3].

Целью настоящего исследования было оценить чувствительность ММСК, выделенных из жировой ткани (ЖТ) и костного мозга (КМ) крупного рогатого скота (КРС), к ДНК- и РНК-содержащим вирусам различных видов животных.

**Материалы и методы. Клеточные культуры.** В экспериментах использовали сыворотку плодов коров фирмы Cibus (США), свободную от контаминации вирусами ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и от соответствующих антител.

В качестве клеточной модели были использованы ММСК, выделенные из жировой ткани и костного мозга КРС по методике, разработанной нами ранее [4]. Экспрессию коллагена 1-го типа в ММСК определяли посредством измерения уровня матричной РНК (мРНК) методом ПЦР в реальном времени (ПЦРРВ). Дифференцировку ММСК в клетки костной и жировой тканей проводили по методике, описанной нами ранее [4, 5]. Спустя 21 сутки после начала индукции клетки фиксировали ледяным метанолом в течение 5-6 минут и окрашивали по von Kossa, алizarиновым красным S и жирным красным O. **Вирусы.** В экспериментах использовали штаммы вирусов, хранившиеся в лиофилизированном состоянии в музее отдела вирусологии ВИЭВ им. Я.П. Коваленко: референтные штаммы «К-40» вируса инфекционного ринотрахеита (ИРТ) КРС, «Орегон» вируса диареи – болезни слизистых оболочек (ВД-БС), «Мовар» вируса герпеса КРС типа 4, энцефаломиокардита мышей (ЕМС), производственные вакцинные штаммы «ВК-1» ВД-БС, «ПТК 45/86» вируса парагриппа-3 (ПГ-3), «СВ/69» вируса ринопневмонии лошадей (РПЛ) и штамм вируса ИРТ, выделенный из вакцины Bovilis IBR-marker «Интервет». Все штаммы обладали типичной для своего вида морфологией и антигенной структурой. До лиофилизации вирусы культивировали только в первичных культурах или в их субкультурах.

**Инфицирование культур клеток.** Вирусы инокулировали в культуру ММСК непосредственно после растворения лиофилизата. Множественность заражения (МЗ) в первом пассаже не учитывали. При дальнейшем пассировании МЗ составляла 0,1 ТЦД<sub>50</sub> на клетку. Инокулум оставляли на 1 час для адсорбции вируса на клетках, затем его удаляли и культуру промывали поддерживающей средой. После внесения поддерживающей среды в объеме, составляющем 10 % от емкости культурального флакона, культуру помещали в СО<sub>2</sub>-инкубатор с 5 % СО<sub>2</sub> при температуре 37 °С. Репродукцию вирусов учитывали по ЦПД. В качестве контроля использовали неинфицированные ММСК (рис. 1 б, г). Для сравнения в эксперимент были включены зараженные и интактные культуры клеток (СПТ, СПЭВ, МДВК, ФЭЧ), которые традиционно применяются для культивирования включенных в опыт вирусов. Эти культуры использовали для титрования вирусов общепринятым методом.