

УДК: 619:616.98:579.841.11:616-076

## ВИВЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ СЕРІЙ БРУЦЕЛЬОЗНОГО S-АНТИГЕНУ В ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ

**Обуховська О. В., Стегній Б. Т., Драгуть С. С., Куценко В. А., Марченко Н. В., Рамазанова Т. П.**  
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,  
м. Харків, Україна, e-mail: olgaobukhovska@gmail.com

**Загребельний В. О.**

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики  
та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ, Україна

Бруцельоз – контагіозне особливо небезпечне інфекційне зоонозне захворювання, яке уражує тварин різних видів та людей. Хвороба широко розповсюджена у світі, зокрема, на територіях із розвиненим тваринництвом. Економічні збитки при бруцельозі зумовлені масовими абортами, народженням слабкого та нежиттєздатного молодняка, формуванням стійкого безпліддя у дорослих тварин. Проблема бруцельозу має і епідеміологічний аспект. Основний шлях передачі збудника населенню – аліментарний, люди заражаються при вживанні інфікованих продуктів тваринництва. Для зниження ризиків захворювання людей та попередження спалахів серед тварин в усіх товарних господарствах проводяться планові серологічні дослідження поголів'я. Наявність сучасних активних і специфічних діагностичних засобів є головною умовою забезпечення ефективних заходів щодо контролю цього небезпечного захворювання.

Метою нашої роботи була розробка технології виготовлення бруцельозного S-антигену для пробіркової РА, РЗК (РТЗК).

В якості виробничого застосовували штамп *B. abortus* S19. Усього було виготовлено 7 експериментальних серій бруцельозного S-антигену із концентраціями від  $20 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> до  $60 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>. Активність експериментальних серій антигенів вивчали в ПРА та РЗК із Національною Anti-*Brucella abortus* сироваткою, контрольними бруцельозною позитивною та негативною сироватками (ТУ У 46.15.274, РП № ВВ-00585-06-13). Також застосовували Антиген бруцельозний для реакції аглютинації (Віовет, Пулаву, Польська Народна Республіка).

За вимогами ОІЕ бруцельозний антиген повинен бути стандартизований таким чином, щоб давати 50 % аглютинацію (++) в ПРА із стандартною сироваткою в розведенні 1000 МО. Таким вимогам відповідав антиген експериментальної серії 4 (концентрація  $40 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>), який із національною стандартною Anti-*Brucella abortus* сироваткою демонстрував аглютинацію на ++ у розведенні 1000 МО. Результати візуалізації реакції були оптимальними – чітко визначений аглютинат із контрастною граничною зоною, добре сформована «парасолька». Також було встановлено, що експериментальна серія бруцельозного S-антигену, стандартизована до концентрації 40 КУО/см<sup>3</sup>, у РЗК має робочий титр 1:75 та не має самоаглютинуючих і гемотоксичних властивостей.

Таким чином, у серії лабораторних дослідів була підтверджена ефективність застосування запропонованої технології щодо виготовлення та контролю бруцельозного S-антигену для РА і РЗК та показана перспективність використання такої технології для створення нових вітчизняних діагностиків з метою контролю бруцельозу тварин в Україні.

**Ключові слова:** бруцельоз, серологічна діагностика, бруцельозний антиген

Бруцельоз – контагіозне особливо небезпечне інфекційне зоонозне захворювання, яке уражує тварин різних видів та людей. Захворювання широко розповсюджене у світі, зокрема, на територіях із розвиненим тваринництвом, де застосовують вільний випас тварин [1, 6, 10]. Збудники його належать до роду *Brucella*, який включає 11 видів, найбільш тяжкі форми захворювання зумовлюють *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*. Бруцельоз перебігає в гострій або хронічній формах, особливо небезпечним з епізоотологічної точки зору є латентне бруцеланосійство. У хворих тварин уражуються репродуктивні органи, рідше – інші органи та тканини. Економічні збитки при бруцельозі зумовлені масовими абортами, народженням слабкого та нежиттєздатного молодняка, формуванням стійкого безпліддя у дорослих тварин [1, 9].

Проблема бруцельозу має і епідеміологічний аспект. Основний шлях передачі збудника населенню – аліментарний, люди заражаються при вживанні інфікованих продуктів тваринництва [5, 8, 10, 11]. Для зниження ризиків захворювання людей та попередження спалахів серед тварин в усіх товарних господарствах проводяться планові серологічні дослідження поголів'я із застосуванням РБП, РА та РЗК за стандартними методиками [3, 4, 7, 12]. Наявність сучасних активних і специфічних діагностичних засобів є головною умовою забезпечення ефективних заходів щодо контролю цього небезпечного захворювання.

**Метою нашої роботи** була розробка технології виготовлення бруцельозного S-антигену для пробіркової РА, РЗК (РТЗК).

**Матеріали та методи.** В якості виробничого застосовували штам *B. abortus* S19. Виробничий штам вирощували на МППГГА протягом трьох діб, перевіряли на типовість росту, відсутність дисоціації та аглютинаційні властивості із стандартними сироватками, потім культуру змивали стерильним 0,5 % фенолізованим фізрозчином (рН 7,0–7,2). Стандартизували фізрозчином із застосуванням бруцельозних оптичних стандартів та інактивували на водяній бані за температури (80±0,5) °С протягом 60 хв. Контроль повноти інактивації бактерійної суспензії здійснювали шляхом висіву на МППГГА і МППГГБ.

Суспензії інактивованих клітин витримували за температури (2–8) °С впродовж 10 діб. Контроль стерильності експериментальних серій антигену проводили за ДСТУ 4483.

Пробіркову реакцію аглютинації (ПРА) та реакцію зв'язування комплементу (РЗК) ставили за стандартними методиками [2, 7].

У дослідженнях застосовували Національний стандарт Anti-*Brucella abortus* сироватку (ТУ У) і контрольні бруцельозні позитивну та негативну сироватки (ТУ У 46.15.274, РП № ВВ-00585-06-13), а також Антиген бруцельозний для реакції аглютинації (БІОВЕТ, Польська народна республіка).

**Результати досліджень.** Усього було виготовлено 7 експериментальних серій бруцельозного S-антигену із концентраціями 20х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup>, 30х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup>, 35х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup>, 40х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup>, 45х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup>, 50х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup>, 60х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup>. На першому етапі досліджень активність експериментальних серій антигенів вивчали в ПРА із Національною Anti-*Brucella abortus* сироваткою шляхом титрування за квадратною схемою (див. табл. 1).

За вимогами ОІЕ бруцельозний антиген повинен бути стандартизований таким чином, щоб давати 50 % аглютинацію (++) в ПРА із стандартною сироваткою в розведенні 1000 МО. Як видно з даних табл. 1 таким вимогам відповідав антиген серії 4 (концентрація – 40х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup>), який із національною стандартною Anti-*Brucella abortus* сироваткою демонстрував аглютинацію на ++ у розведенні 1000 МО. У розведеннях сироватки від 1:100 до 1:700 із антигеном цієї серії була отримана реакція із діагностичною оцінкою на +++, результати візуалізації реакції були оптимальними – чітко визначений аглютинат із контрастною граничною зоною, добре сформована «парасолька». У порівнянні комерційний польський стандартний бруцельозний антиген давав із національною стандартною Anti-*Brucella abortus* сироваткою аналогічний результат.

Антигени серій 1, 2 та 3 із концентраціями від 20х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup> до 35х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup> мали активність, що перевищувала стандартні міжнародні вимоги (реакція на ++++ із стандартною Anti-*Brucella abortus* сироваткою в розведенні 1000 МО). Антигени серій 5, 6 та 7 із концентраціями від 45х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup> до 60х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup> хоча і показували в реакції із контрольним розведенням міжнародної сироватки реакцію на ++, але візуалізація результатів реакції була значно гіршою – аглютинат блідий, погано сформований, без чіткої граничної зони, що значно ускладнювало діагностичну оцінку результатів реакції.

Надалі активність експериментальних серій антигену вивчали в ПРА із контрольною позитивною бруцельозною сироваткою та національною стандартною Anti-*Brucella abortus* сироваткою при розведенні їх від 1:100 до 1:3200 (табл. 2–3). При цьому було встановлено, що саме антиген серії 4 показав найбільш збалансовану активність, що дуже важливо при використанні його в польових умовах. Так, із контрольною позитивною бруцельозною сироваткою він давав реакцію на # у розведенні 1:400, а також +++ – у розведенні 1:800, ++ – у розведенні 1:1600, + – у розведенні 1:3200 відповідно.

Активність експериментальної серії 4 бруцельозного S-антигену (40х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup>) була також вивчена у РЗК за титрування за квадратною схемою із стандартною Anti-*Brucella abortus* сироваткою та контрольною позитивною бруцельозною сироваткою в розведеннях від 1:5 до 1:640. Антиген при цьому розводили від 1:50 до 1:250 (див. табл. 4–5). Було встановлено граничний титр експериментальної серії антигену, що дорівнює 1:150. При такому розведенні спостерігали повну затримку гемолізу з найвищим розведенням стандартної Anti-*Brucella abortus* сироватки. Визначено робочий титр антигену в РЗК, що дорівнює подвійному значенню граничного титру – 1:75.

Специфічність експериментальної серії вивчено в РА. Встановлено, що в розведенні 1:10 в РА він не дає самоаглютинації (із фізрозчином) та не дає аглютинацію із негативною контрольною сироваткою в розведеннях 1:25, 1:50. Також встановлено, що в РЗК та РТЗК експериментальна серія антигену не дає затримки гемолізу в розведенні 1:75 з фізрозчином і негативною сироваткою в розведеннях 1:5, 1:10 не спостерігали затримки гемолізу. Таким чином, було встановлено, що експериментальна серія 4 бруцельозного антигену є специфічною та не має самоаглютинуючих і гемотоксичних властивостей.

У подальшому активність та специфічність експериментальної серії антигену 4 в РА і РЗК було підтверджено при дослідженні в робочих титрах (1:10 і 1:75 відповідно) із комерційними контрольними позитивною бруцельозною і негативною сироватками (див. табл. 4–5).

Таким чином, доведено, що запропонована технологія дозволяє отримати активний та специфічний бруцельозний S-антиген для РА та РЗК.

Таблиця 1 – Результати вивчення активності експериментальних серій бруцельозного S- антигену в ПРА із Національним стандартом *Anti-Brucella abortus* сироваткою

Серії антигенів та їх концентрація, КУО/см <sup>3</sup>	Титр Національної <i>Anti-Brucella abortus</i> сироватки, МО											Контроль антигену з негативною сироваткою		
	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100		1200	Контроль антигену з фізіологічним розчином
серія 1 (20x10 <sup>9</sup> )	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	+++	+++	-	-
серія 2 (30x10 <sup>9</sup> )	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	+++	+++	-	-
серія 3 (35x10 <sup>9</sup> )	#	#	#	#	#	#	#	#	+++	+++	+++	++	-	-
серія 4 (40x10 <sup>9</sup> )	#	#	#	#	#	+++	+++	+++	+++	++	±	-	-	-
серія 5 (45x10 <sup>9</sup> )	#	#	#	#	#	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
серія 6 (50x10 <sup>9</sup> )	#	#	#	#	#	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
серія 7 (60x10 <sup>9</sup> )	#	#	#	#	#	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-
Контроль														
Антиген бруцельозний для ПРА (Biowet, Pulawy, Polish People's Republic)	#	#	#	#	#	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-

**Розділ 5. Біотехнологія**

**Таблиця 2** – Результати вивчення активності експериментальних серій бруцельозного S- антигену в ПРА із Національним стандартом *Anti-Brucella abortus* сироваткою та контрольною позитивною бруцельозною сироваткою

Концентрація антигену (КУО/см <sup>3</sup> )	Контрольні бруцельозні сироватки	Титр сироватки				Контроль антигену (з фізрозчином)	Контроль антигену з негативною сироваткою
		1:200	1:400	1:800	1:1600		
серія 1 (20x10 <sup>9</sup> )	<i>Anti-Brucella abortus</i> сироватка	#	#	+++	+	-	-
	Позитивна бруцельозна серія	#	#	#	++	-	
серія 2 (30x10 <sup>9</sup> )	<i>Anti-Brucella abortus</i> сироватка	#	#	+++	++	-	-
	Позитивна бруцельозна серія	#	#	+++	++	-	
серія 4 (40x10 <sup>9</sup> )	<i>Anti-Brucella abortus</i> сироватка	#	#	+++	+	-	-
	Позитивна бруцельозна серія	#	#	+++	++	-	
серія 7 (60x10 <sup>9</sup> )	<i>Anti-Brucella abortus</i> сироватка	#	#	++	-	-	-
	Позитивна бруцельозна серія	#	#	+++	-	-	
Антиген бруцельозний (Biowet, Pulawy, Polish People's Republic)	<i>Anti-Brucella abortus</i> сироватка	#	+++	-	-	-	-
	Позитивна бруцельозна серія	#	+++	+	-	-	

**Таблиця 3** – Результати вивчення активності експериментальних серій бруцельозного S- антигену в ПРА із контрольною позитивною бруцельозною сироваткою

Серії антигенів та їх концентрація, КУО/см <sup>3</sup>	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	Контроль антигену з фізіологічним розчином	Контроль антигену з негативною сироваткою
серія 4 (40x10 <sup>9</sup> )	#	#	#	+++	++	+	-	-
серія 5 (45x10 <sup>9</sup> )	#	#	#	#	+++	++	-	-

**Таблиця 4** – Активність та специфічність експериментальної серії 4 бруцельозного S-антигену в РЗК із контрольною позитивною бруцельозною сироваткою

Розведення антигену	Титр бруцельозної сироватки								Контроль: негативна сироватка
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	
1:50	#	#	#	#	#	+	-	-	-
1:100	#	#	#	#	#	++	+	-	-
1:150	#	#	#	#	#	+++	+	-	н/д
1:200	#	#	#	#	#	+++	-	-	н/д
1:250	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	н/д
Контроль: без антигену	-	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д

**Примітка:** н/д – не досліджували

**Таблиця 5** – Активність та специфічність експериментальної серії 4 бруцельозного S-антигену в РЗК із Національним стандартом *Anti-Brucella abortus* сироваткою

Розведення антигену	Титр <i>Anti-Brucella abortus</i> сироватки								Контроль: негативна сироватка	
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:5	1:10
1:50	#	#	#	#	#	+	-	-	-	-
1:100	#	#	#	#	#	++	+	-	-	-
1:150	#	#	#	#	#	+++	+	-	-	-
1:200	#	#	#	#	#	+++	-	-	-	-
1:250	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
Контроль сироватки (без антигену)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Перспективи подальших досліджень.** Експериментальна серія антигену буде перевірена на активність та специфічність в польових умовах. За умов отримання позитивних результатів запропонована технологія буде застосована для виготовлення нових вітчизняних діагностиків з метою контролю бруцельозу тварин в Україні.

**Висновки.** У серії лабораторних дослідів підтверджена доцільність застосування запропонованої технології виготовлення бруцельозного S-антигену для РА та РЗК із застосуванням в якості виробничого штаму *Brucella abortus* S19.

Експериментальна серія бруцельозного S-антигену, стандартизована до концентрації 40 КУО/см<sup>3</sup>, за активністю та специфічністю відповідає міжнародним вимогам і демонструє найкращі показники візуалізації позитивного результату реакції у ПРА.

Також доведено, що експериментальна серія бруцельозного S-антигену, стандартизована до концентрації 40 КУО/см<sup>3</sup>, в РЗК має робочий титр 1:75 та не має самоаглютинуючих і гемотоксичних властивостей.

### Список літератури

1. Бабкін, А.Ф. Бруцельоз: сучасні аспекти епізоотології [Текст] / А.Ф. Бабкін, О.В. Обуховська // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. — X., 2012. — Вип. 96. — С. 204–205.
2. Настанова по діагностиці бруцельозу тварин, затв. Наказом Голови Державного департаменту ветеринарної медицини України № 15-14/55 від 10.02.1998 р.
3. A case-control study of risk factors for bovine brucellosis seropositivity in Peninsular Malaysia [Text] / M.S. Anka [et al.] // PLoS One. — 2015. — Mode to access: URL : <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0108673>. pdf. — Title from the screen.
4. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis [Text] / M.J. Ducrotov, R. Conde-Alvarez, J.M. Blanco, I. Morivon // Vet. Immunol and Immunopathol. — 2016. — Vol. 171. — P. 81–171.
5. Brucellosis as an emerging threat in developing economies: lessons from Nigeria [Text] / M.J. Ducrotov [et al.] // PLoS One. — 2014. — Mode to access : URL : <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003008>. pdf. — Title from the screen.
6. Brucellosis in dairy cattle and goats in northern Ecuador [Text] / K.P. Poulsen [et al.] // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 2015. — Vol. 90 (4) — P. 712–715.
7. Chapter 2.4.3 Bovine brucellosis // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. — Mode to access : URL : [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.03\\_BOVINE\\_BRUCELL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf). — Title from the screen.
8. Integrating serological and genetic data to quantify cross-species transmission: brucellosis as a case study [Text] / M. Viana [et al.] // Parasitology. — 2016. — Vol. 3. — P. 1–14.
9. Olsen, S.C. Advancement of knowledge of Brucella over the past 50 years [Text] / S.C. Olsen, M.V. Palmer // Vet. Pathol. — 2015. — Vol. 51 (6). — P. 1076–1089.
10. Serological survey of bovine brucellosis in Fulani nomadic cattle breeds (Bos indicus) of North-central Nigeria: Potential risk factors and zoonotic implications [Text] / N.B. Alhaji, Y.S. Wundak, W.J. Bertu // Acta Trop. — 2016. — Vol. 153. — P. 28–35.
11. Systematic review of brucellosis in the Middle East: disease frequency in ruminants and humans and risk factors for human infection [Text] / I.I. Musallam [et al.] // Epidemiol. Infect. — 2016. — Vol. 144 (4). — P. 671–685.
12. Use of serology and real time PCR to control an outbreak of bovine brucellosis at a dairy cattle farm in the Nile Delta region, Egypt [Text] / M. Gwida [et al.] // Irish Vet. J. — 2016. — Vol. 24. — P. 69–73.

### BRUCELLA S-ANTIGEN EXPERIMENTAL SERIES ACTIVITY STUDING IN THE LABORATORY CONDITIONS

**Obukhovska O. V., Stegnyy B. T., Dragut S. S., Kutsenko V. A., Marchenko N. V., Ramazanova T. P.**  
*National Science Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine*

**Zahrebelniy V. O.**

*State Scientific Research Institute of Laboratory Diagnostics and veterinary and sanitary expertise, Kyiv, Ukraine*

*Brucellosis – a contagious dangerous infectious zoonotic disease affecting animals of different species and people. The disease is widespread in the world, in particular in areas with animal husbandry. Economic losses due to brucellosis when mass abortion, birth of weak calves, formation of stable fertility in adult animals. Brucellosis problem has epidemiological aspect too. The main route of the pathogen transmission for population – nutritional, people get pathogen when consuming infected animal products. To reduce the risk of human infection and the prevention of outbreaks in livestock in all commercial farms applaid serological studies. Availability of modern active and specific diagnostic tools is essential for ensuring effective interventions for the control of this dangerous disease.*

*The aim of our work was to developing a Brucella S-antigen manufacturing technology for the tube agglutination test and complement fixation test.*

*As production strain was used B. abortus S19. A total of 7 experimental series of Brucella S-antigen was produced with concentrations from  $20 \times 10^9$  CFU/cm<sup>3</sup> to  $60 \times 10^9$  CFU/cm<sup>3</sup>. The activity of the experimental series of antigens were studied in SAT and CFT with National Anti-Brucella abortus serum and brucellosis control positive and negative sera (TC U 46.15.274, RC BB-00585-06-13). It is also used Brucella antigen for serum agglutination test (Biowet, Pulawy, Polish People's Republic).*

*In accordance with the requirements of the OIE Brucella antigen should be standardized in such a way as to show 50% agglutination (++) in SAT with standard serum at a dilution of 1,000 IU. Such requirements are met Brucella antigen of experimental series 4 (concentration  $40 \times 10^9$  CFU/cm<sup>3</sup>), which with National Standard Anti-Brucella abortus serum showed agglutination at a dilution ++ 1,000 IU. The result has optimal visualization of the reaction – a clearly defined agglutinate with contrasting boundary area, well-formed «umbrella». It was also found that the experimental series Brucella S-antigen, standardized to a concentration of 40 CFU/cm<sup>3</sup> in CFT has a working titer 1:75 and has not ownagglutination and hemototoxic properties.*

*Thus, in a series of laboratory experiments, the efficiency of the proposed technology for the production and control of Brucella S-antigen for SAT and CFT has been confirmed and shows the prospect of application of this technology for creating a new diagnostics for animal brucellosis monitoring in Ukraine.*

**Keywords:** *Brucellosis, serological diagnostics, Brucella antigen*