

УДК: 619:579.841.93

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ АНТИГЕННОЇ АКТИВНОСТІ БРУЦЕЛЬОЗНИХ АНТИГЕНІВ З ІНСТРУМЕНТАЛЬНИМ ТА ВІЗУАЛЬНИМ ОБЛІКОМ СЕРОЛОГІЧНИХ РЕАКЦІЙ

Wojciech Iwaniak ¹, Стегній Б. Т.², Герілович А. П.², Обуховська О. В.²,
Драгуть С. С.², Калініченко Т. В.², Близнецов О. Г.², Марченко Н. В.²,
Krzysztof Szulowski ¹, Jolanta Złotnicka ¹, Болотін В. І.²

¹ Національний Інститут Ветеринарії, Національна референтна лабораторія,
м. Пулави, Республіка Польща

² Національний науковий центр «Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

У статті представлений порівняльний аналіз антигенної активності бруцельозних антигенів для серологічної діагностики бруцельозу тварин за РА, РЗК, РТЗК (ННЦ «ІЕКВМ»); для РА та РЗК (Biowet, м. Пулави, Республіка Польща (РП)) і бруцельозного єдиного для РА, РЗК, РТЗК (Херсонська біофабрика, Україна) за різним обліком серологічних реакцій з визначенням можливості стандартизації їх компонентів з метою розрахунку підсумків у міжнародних одиницях.

Ключові слова: бруцельоз; *B. abortus*; серологічна діагностика, реакція аглютинації, реакція зв'язування комплементу

Бруцельоз – контагіозна хронічна інфекційна хвороба з тяжким перебігом, загальна для тварин і людей, яка спричиняється декількома видами збудника, які в процесі філогенезу адаптувались до паразитування в організмі окремих видів тварин, що зумовлює їх циркуляцію та збереження. Бруцельозу притаманні стадійність епізоотичного та інфекційного процесів, обумовлених резервацією та формуванням епізоотичного штаму збудника, виникненням і тривалим збереженням епізоотичних вогнищ. Зазначені закономірності генетично зумовлені не тільки біологічними особливостями збудників, а також соціально-економічними та екологічними умовами на конкретних територіях.

Не зважаючи на стабільне епізоотичне благополуччя щодо бруцельозу, на території України існують потенційні ризики виникнення захворювання людей та сільськогосподарських тварин, джерелом інфекцій в цих випадках можуть бути дикі та синантропні тварини, механічним переносником збудника - кровосисні комахи [1]. Необхідно постійно контролювати та підтримувати епізоотичне благополуччя щодо бруцельозу в Україні проведенням скринінгових та моніторингових досліджень за допомоги ефективних вітчизняних діагностиків. У ННЦ «ІЕКВМ» розроблено та апробовано антиген для серологічної діагностики бруцельозу тварин у РА, РЗК, РТЗК [2]. Встановлено, що порівняно з антигенами для РА та РЗК (Biowet, РП) і комерційним антигеном бруцельозним єдиним для РА, РЗК, РТЗК (Херсонська біофабрика, Україна) він також є безпечним, антигенно активним, специфічним.

Мета роботи. Провести порівняльний аналіз антигенної активності комерційних (Biowet, РП; Херсонська біофабрика, Україна) та розробленого у ННЦ «ІЕКВМ» бруцельозних антигенів з інструментальним та візуальним обліком серологічних реакцій та визначити можливість розрахунку результатів у міжнародних одиницях.

Матеріали та методи. У дослідженнях використані піддослідний «Антиген для серологічної діагностики бруцельозу тварин в РА, РЗК, РТЗК» (ННЦ «ІЕКВМ»), експериментальна серія від 04.02.2013 р., титри 1:10 для РА та 1:75 для РЗК (РТЗК) та комерційні для РА «Brucellognost» (титр 1:10), для РЗК «Antygen Brucella abortus do OWD» з титром 1:100 (Biowet, РП); «Антиген єдиний для РА, РЗК, РТЗК», с. 1, придатний до 03.2018 р. (Херсонська біофабрика, Україна). Дослідження щодо вивчення антигенної активності антигенів провели у присутності й за участі Войцеха Іваніака DVM, PhD (Національна референтна лабораторія PIWet, РП) з використанням панелі польових антитільних бруцельозних сироваток від ВРХ (5 проб), робочих і Національних стандартів для РА та РЗК (PIWet, РП), люб'язно наданих Войцехом Іваніаком.

Активність сироваток визначали в РА та РЗК згідно з настановою по діагностиці бруцельозу тварин (Київ, 1998 р.); методики передбачають візуальний облік реакцій. Зразки Національного стандарту *Anti Brucella abortus* сироватки (ННЦ «ІЕКВМ») [3] сертифіковані у Міжнародному референс-центрі МЕБ з бруцельозу (VLA, м. Вейбридж, Великобританія).

Реакцію мікрометодом (мк-РЗК) проводили за методикою ННЦ «ІЕКВМ» з інструментальним спектрофотометричним обліком ($\lambda=620$ нм) затримки гемолізу (зразу по закінченні реакції) [4]. Візуальне облікування отриманих у мк-РЗК даних здійснювали за методикою, розробленою в Національному Інституті Ветеринарії (PIWet, РП) відповідно гемолітичної шкали за ступенем гемолізу.

Щодо макрометоду РЗК, методики обидвох країн повністю відрізняються (за кількістю компонентів та режиму їх зберігання, тривалістю етапів реакції, ін.), співпадає лише розведення сироваток (1:5, 1:10, 1:20 і т.д.), але за польською методикою додатково користуються розведенням 1:2,5. Відносно РА, методики різняться в основному розведенням сироваток (за діючою в Україні настановою вони становлять 1:25, 1:50 і т. д.; за методикою (PIWet, РП) – 1:20, 1:40 і т.д.) та облікуванням.

В роботі було використано гемолізін (с. 2, придатний до 09.2017 р.) та комплемент (с. 1, придатний до 02.06.2019 р.) виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина». Виготовлену за українською методикою 2,5 % суспензію еритроцитів барана для РЗК було перевірено спектрофотометрично; відповідала за критерієм стандартизації згідно методики (PIWet, РП).

У якості стандартних сироваток використовували робочі стандарти (PIWet, РП): для РА, що містить 1600 МО (міжнародних одиниць) аглютинуючих антитіл та забезпечує відповідність 61,5 МО/см³ сироватки, розведеної 1/40 з оцінкою ++; для РЗК, що містить 600 МО комплементфіксуєчих антитіл та забезпечує відповідність 20 МО/см³ сироватки у розведенні 1/5 з оцінкою ++. Також було використано нативну та розведену позитивну бруцельозну гіперімунну від ВРХ сироватку (ННЦ «ІЕКВМ»). Реакції супроводжували методично необхідними контролями, результати обліковували після їх реєстрації.

Результати досліджень. У першому досліді з комерційним (Херсонська б/ф, Україна) та випробуванням (ННЦ «ІЕКВМ») антигенами за українською методикою в РЗК з візуальним та у мк-РЗК з інструментальним облікуванням результатів досліджували панель бруцельозних сироваток (PIWet, РП) (табл. 1).

Таблиця 1 – Результати дослідження бруцельозних сироваток (PIWet, РП; n=5; ННЦ «ІЕКВМ», n=1) з комерційним (Херсонська б/фабрика, Україна) та випробуванням (ННЦ «ІЕКВМ») антигенами у РЗК

№№ з/п	Номери сироваток	Відомі титри сироваток	Антигени		
			Херсонська б/ф		ННЦ «ІЕКВМ»
			РЗК	мк-РЗК	
Сироватки бруцельозні (PIWet, РП)					
1	1	1:20 ++	1:20 ++	1/20 +++++ 1:40 +	1:10 +++
2	4	1:10 ++	1:10 +	1/10 +++++ 1:20 ++	1:5 +++++ 1:10 +
3	7	1:5 ++	1:10 ++	1/5 +++++ 1:10 +	1:5 +
4	10	1:5 ++	1:10 +	1/5+++++ 1:10 +	1:5 +++++ 1:10 +
5	12	1:5 ++	1:5 +	1:5 +++++	1:5 +
6	Робочий стандарт для РЗК (PIWet, РП)	1:5 ++	1:5 +	1:5+++++	1:5 +
Сироватка ННЦ «ІЕКВМ»					
7	Позитивна бруцельозна	1:320 +++	1:320 +++	1:320 +++++ і більше	1:320 +++

Наведені дані свідчать про більш високу чутливість антигену Херсонської біофабрики, який виявив антитіла у наданих сироватках з відомою активністю (PIWet, РП), зокрема у робочому стандарті у підвищених розведеннях (за винятком проби № 12). Усі 5 проб бруцельозних сироваток (PIWet, РП) за допомоги мікрометоду були оцінені як позитивні, тоді як макрометодом 4 сироватки (№№ 1, 4, 7, 10) визначені позитивними, проба № 12 – сумнівною. Порівняно з цим антиген ННЦ «ІЕКВМ» у цьому досліді проявив нижчу активність в РЗК і виявив робочий стандарт та сироватки №№ 7, 12 (PIWet, РП) як сумнівні. Результати цього досліді свідчать про більшу чутливість мікрометоду порівняно з макрометодом. При цьому обидва антигени за допомоги як мікро-, так і мікрометоду РЗК виявляють граничну кількість антитіл 20 МО/см³ бруцельозної сироватки.

У таблиці 2 представлені результати дослідження панелі сироваток (PIWet, РП) та Національних стандартів *Anti-Brucella abortus* (ВДНКІ ветпрепаратів, Росія; с. 4 від 15.11.1995 р.) і ННЦ «ІЕКВМ» (12.2006 р.), сироваток бруцельозних ННЦ «ІЕКВМ» з використанням трьох антигенів (титри 1:10) у РА.

Сироватки титрували з 0,5 % фенолізованим фізіологічним розчином за схемами розведень обох методик. Облік мк-РА, перевод значень титрів РА в міжнародні одиниці виміру здійснювали за методикою PIWet (РП). РА макрометодом обліковували відповідно до складеної шкали за ступенем аглютинації та просвітлення рідини (слабка, 25 %; часткова, 50 %; неповна, 75 %; повна, 100 %, відповідно).

За робочим стандартом (PIWet, РП) з усіма антигенами виявлені аглютинуючі антитіла кількістю не менше, ніж 61,5 МО/см³ (1/40 з оцінкою +++++). Тобто, отримані дані з трьома антигенами можна враховувати. До цього ж, обидві бруцельозні сироватки ННЦ «ІЕКВМ» цього досліді спрацювали аналогічно робочому стандарту (PIWet, РП); відтитровані дані

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

сироватки можна використовувати у якості робочого стандарту ННЦ «ІЕКВМ» для перерахування титрів у чисельні значення. Макрометодом з усіма антигенами чотири (№№ 1, 4, 10, 12) сироватки (PIWet, РП) спрацювали позитивно; сироватка № 7 у РА визначена як негативна. Мікрометодом з усіма антигенами ці сироватки позитивні.

Таблиця 2 – Результати дослідження бруцельозних сироваток (PIWet, РП; n=5; ННЦ «ІЕКВМ», n=2) з антигенами (1:10) мікро- (мк-РА) та макрометодом у РА

№№ з/п	Номер сироватки	Biowet, РП		Херсонська б/ф		ННЦ «ІЕКВМ»	
		мк-РА	РА	мк-РА	РА	мк-РА	РА
Панель сироваток (PIWet, РП)							
1	1	1:40 +++	1:40 +++	1:80 +++	1:50 +++	1:40 ++	1:50 ++
2	4	1:20 +++++	1:20 +++	1:40 +++++	1:25 +++ 1:50 +	1:20 +++++	1:25 ++
3	7	1:10 +++++ 1:20 ++	1:20 +	1:20 +++ 1:40 +	1:25 +	1:40 +++++	1:25 +
4	10	1:20 +++	1:20 +++	1:40 +++	1:25 ++	1:20 +++	1:25 ++
5	12	1:10 +++	1:10 +++	1:10 +++	1:10 +++	1:10 +++	1:10 +++
Сироватки ННЦ «ІЕКВМ»							
6	Позитивна бруцельозна	1:40 +++++	1:40 +++	1:80 +++	1:50 +++	1:40 +++++	1:25 +++ 1:50 ++
7	Позитивна бруцельозна	1:40 ++	1:40 ++	1:40 +++	1:25 +++ 1:50 +	1:40 ++	1:25 +++ 1:50 +
Стандарти							
8	Робочий стандарт (PIWet, РП)	1:40 +++	1:40 +++	1:40 +++++	1:25 +++++ 1:50 ++	1:40 +++	1:25 +++++ 1:50 ++
9	Націон. стандарт ННЦ «ІЕКВМ»	1:640 +++	1:640 +++	1:640 +++	1:600 +++ 1:800 ++	1:640 +++	1:600 +++
10	Націон. стандарт ВДНКІ	1:640 +++	1:640 +++++	1:1280 +++++ і більше	1:400 +++ 1:800 ++	1:640 +++	1:400 +++ 1:800 ++

За титрами РА з антигенами (Biowet, РП; Херсонської б/ф; ННЦ «ІЕКВМ») встановлено, що Національні стандарти ННЦ «ІЕКВМ» та ВДНКІ містять, відповідно, 1149 та 1413 МО антибруцельозних антитіл у 1 см³, тобто відповідають вимогам МЕБ. Отже, результати чутливості усіх досліджуваних антигенів корелюють.

Титрування антигенів з позитивно бруцельозною контрольною сироваткою (ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина») з відомим у РЗК титром 1/40 ++ було проведено за допомоги мк-РЗК (за методикою ННЦ «ІЕКВМ») з подальшим інструментальним (по закінченні реакції) та візуальним (після витримання реакції протягом 16–18 годин за температури 4 °С) облікуванням результатів. Отримані дані наведені у таблицях 3, 4.

Візуальним обліком після тривалого витримання реакції встановлено ідентичні результати дослідження усіх антигенів з максимальною їх активністю в середньому у титрі 1:80 (антиген Biowet, РП 1/40-1/160, антиген ННЦ «ІЕКВМ» – 1/80, комерційний український антиген – 1/40-1/80) та виявленням антитіл у контрольній бруцельозній сироватці (ННЦ «ІЕКВМ»), розведений 1/80. Інструментальний облік результатів, здійснений за методикою ННЦ «ІЕКВМ» одразу по закінченні реакції, показав аналогічну активність антигенів, відповідно, 1/80-1/160, 1/40-1/160, 1/80. Проте антитіла в контрольній сироватці у титрі 1/160 з оцінкою +++-++++ виявили перший та третій антигени; максимальне розведення даної сироватки з бруцельозними антитілами, що виявив антиген ННЦ «ІЕКВМ», становило 1/80. За цим дослідженням можна стверджувати про стабільність результатів мк-РЗК за методикою ННЦ «ІЕКВМ». Подальші дослідження доцільно спрямувати на доповнення вітчизняної методики мікрометодом РЗК.

Титрування антигенів у мк-РЗК за методикою ННЦ «ІЕКВМ» було проведено і з робочим стандартом для РЗК (PIWet, РП) з подальшим інструментальним (по закінченні реакції) та візуальним (після витримання реакції протягом 16–18 годин за температури 4 °С) облікуванням результатів. Результати наведені у таблицях 5, 6.

Таблиця 3 – Титрування антигенів з позитивною бруцельозною контрольною сироваткою (ННЦ «ІЕКВМ», титр 1/40 ++) з інструментальним обліком у мк-РЗК

Розведення антигенів	Віовет, РП						Херсонська б/ф						ННЦ «ІЕКВМ»					
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
1/10	#	#	#	++	-	-	#	#	#	#	-	#	#	#	-	-	-	-
1/20	#	#	#	#	-	-	#	#	#	++	-	#	#	#	#	#	-	-
1/40	#	#	#	#	#	-	#	#	#	#	-	#	#	#	#	#	+++	-
1/80	#	#	#	#	#	+++	#	#	#	#	+++	#	#	#	#	#	#	-
1/160	#	#	#	#	+++	#	#	#	+++	+++	+	#	#	#	#	#	#	+
1/320	#	+++	+	+	+	-	++	+	+	+	-	+++	+	+++	+	+	+	-
1/640	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Таблиця 4 – Титрування антигенів з позитивною бруцельозною контрольною сироваткою (ННЦ «ІЕКВМ», титр 1/40 ++) з візуальним обліком у мк-РЗК

Розведення антигенів	Віовет, РП						Херсонська б/ф						ННЦ «ІЕКВМ»					
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
1/10	#	#	#	-	-	-	#	#	#	+	-	-	#	#	#	-	-	-
1/20	#	#	#	+++	-	-	#	#	+++	-	-	-	#	#	#	++	-	-
1/40	#	#	#	#	++	-	#	#	#	+	+++	-	#	#	#	+++	-	-
1/80	#	#	#	#	+++	-	#	#	+++	++	-	-	#	#	#	+++	++	-
1/160	+++	+++	++	++	++	+	++	++	+	-	-	-	+++	+++	++	+	+	-
1/320	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
1/640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблиця 5 – Титрування антигенів з робочим стандартом (PIWet, РП) 1/5 (20 МО/см³) з інструментальним обліком у мк-РЗК

Розведення антигенів	Biowet, РП			ННЦ «ІЕКВМ»			Херсонська б/ф		
	1/2,5	1/5	1/10	1/2,5	1/5	1/10	1/2,5	1/5	1/10
1/10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/20	++	-	-	-	-	-	++	-	-
1/40	#	+	-	#	-	-	#	-	-
1/80	#	#	-	#	-	-	#	+	-
1/160	#	#	++	#	++	-	#	++	-
1/320	-	++	+	++	+	-	-	-	-
1/640	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблиця 6 – Титрування антигенів з робочим стандартом (PIWet, РП) 1/5 (20 МО/см³) з візуальним обліком у мк-РЗК

Розведення антигенів	Biowet, РП			ННЦ «ІЕКВМ»			Херсонська б/ф		
	1/2,5	1/5	1/10	1/2,5	1/5	1/10	1/2,5	1/5	1/10
1/10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/40	++	-	-	++	-	-	+++	-	-
1/80	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
1/160	++	-	-	++	-	-	++	-	-
1/320	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/640	-	-	-	-	-	-	-	-	-

За наведеними даними, при проведенні інструментального обліку мк-РЗК антибруцельозні комплементзв'язуючі антитіла (20 МО/см³) виявили антигени у розведеннях: перший (РП) – 1:320, інші – 1:160. Проведенням обліку візуально після тривалого холодого витримування реакції жоден з антигенів не виявив такої кількості антитіл. Результати занижені; враховувати не можна при цьому ні інструментальні показники, ні візуальні, тому що із-за значної чутливості мікрометоду титрувати антигени слід тільки макрометодом. Мікрометод може слугувати в якості додаткового для отримання попередніх результатів або для комплексного дослідження. До того ж, на даний результат вплинув надмір комплементу.

Подальші досліді були спрямовані на виявлення зазначеної кількості антитіл дрібно розведеними антигенами. У таблиці 7 надані результати дослідження трьох антигенів з робочим стандартом (PIWet, РП) у РЗК (мікро- та макрометодами). Постановку та інструментальний (спектрофотометричний) облік мк-РЗК і постановку, облік РЗК макрометодом здійснювали за методикою ННЦ «ІЕКВМ», також візуально обліковували результати за методикою, розробленою в PIWet (м. Пулави, РП) з використанням складеної гемолітичної шкали.

З даними таблиці, інструментальним обліком мк-РЗК за ступенем затримки гемолізу встановили, що антигени виявляють 20 МО комплементфіксуючих антитіл у 1 см³ (за робочим стандартом (РП) 1/5 +++++) у розведеннях: перший (Biowet, РП) - від 1/110 до 1/130; другий (ННЦ «ІЕКВМ») – від 1/130 до 1/160; комерційний (Херсонська б/ф) – 1/100. Візуальним обліком цієї реакції відповідно до гемолітичної шкали за ступенем гемолізу після центрифугування планшетів (2000 об/хв. протягом 5 хв.) отримані аналогічні розведення антигенів: перший (Biowet, РП) – 1/120–1/130; другий (ННЦ «ІЕКВМ») – 1/130–1/160; комерційний (Херсонська б/ф) – 1/100. За цим дослідом можна зробити висновок про повну кореляцію результатів мк-РЗК, отриманих зразу після реакції спектрофотометрично (за ступенем затримки гемолізу) та візуально (за ступенем гемолізу) згідно методик двох країн.

Таблиця 7 – Результати дослідження антигенів з робочим стандартом (РiWet, РП) мікро- та макрометодом у РЗК

Розведення антигенів	Biowet, РП				Херсонська б/ф				ННЦ «ІЕКВМ»								
	мк-РЗК		РЗК *		мк-РЗК		РЗК *		мк-РЗК		РЗК *						
	1/2,5	1/5	1/10	1/2,5	1/5	1/10	1/2,5	1/5	1/10	1/2,5	1/5	1/10					
1/80	н/д	н/д	н/д	#	+	-	н/д	н/д	н/д	#	+	-	н/д	н/д	#	-	-
1/90	н/д	н/д	н/д	#	+	-	н/д	н/д	н/д	#	+	-	н/д	н/д	#	-	-
1/100	#	+	-	#	+	-	+	++	-	#	+	-	-	-	#	+	-
1/110	#	+++	-	#	+	-	#	#	-	#	++	-	-	-	#	+	-
1/120	#	+++	-	#	++	-	#	#	-	#	++	-	-	-	#	+	-
1/130	#	+++	-	#	++	-	#	#	-	#	++	-	-	-	#	+	-
1/140	#	#	-	#	++	-	#	#	-	#	++	-	-	-	#	+	-
1/150	#	#	-	#	++	-	#	#	-	#	++	-	-	-	#	+	-
1/160	#	#	-	#	++	-	#	#	-	#	+++	-	-	-	#	++	-
1/170	#	#	-	#	++	-	#	#	-	#	+++	-	-	-	#	++	-

Примітки: н/д – не досліджували; * - візуальний облік проведений після тривалого холодого витримування реакції

Таблиця 8 – Результати порівняльного дослідження бруцельозних антигенів з Національним стандартом (РiWet, РП) у РА

Розведення антигенів	Biowet, РП				Херсонська б/ф				ННЦ «ІЕКВМ»						
	мк-РЗК		РЗК *		мк-РЗК		РЗК *		мк-РЗК		РЗК *				
	1:450	1:550	1:650	1:750	1:850	1:450	1:550	1:650	1:750	1:850	1:450	1:550	1:650	1:750	1:850
1/7	#	+++	+	-	-	#	+++	++	+	+	+++	+++	++	++	+
1/8	#	+++	+++	++	+	#	+++	+++	++	+	#	+++	+++	++	+
1/9	#	#	#	+++	++	#	#	+++	++	++	#	+++	+++	+++	++
1/10	#	#	#	+++	++	#	#	+++	++	++	#	+++	+++	+++	++
1/11	#	#	#	+++	+++	#	#	+++	++	++	#	+++	+++	+++	++
1/12	#	#	#	+++	+++	#	#	+++	+++	++	#	+++	+++	+++	++

Порівняно з цим після витримання цієї ж реакції (мк-РЗК), але з половиною дозою комплекменту впродовж 16–18 годин за температури 4 °С візуально визначили активність антигенів щодо виявлення зазначеної кількості бруцельозних антитіл, відповідно, у титрах 1/90–110; 1/110–1/150; 1/90–1/110. Отже, за різним облікуванням мк-РЗК, як спектрофотометричним, так і візуальним отримано кореляційні дані, особливо з антигеном Херсонської біофабрики. При цьому зменшення кількості комплекменту значно не вплинуло на антигенні властивості антигенів. Лише спостерігали незначне зниження чутливості першого та другого антигенів. Самим «стійким» до кількісного коливання (особливо надлишку) комплекменту, відповідно, самим стабільним виявлено антиген Херсонської б/ф. Результати цього дослідження підтверджують, що концентрація комплекменту є одним з основних факторів, що впливає на чутливість антигену.

У таблиці 8 надані результати порівняльного дослідження антигенів у РА (розведених від 1/7 до 1/12) з Національним стандартом для РА (PIWet, РП), що в розведенні 1:650 з оцінкою ++ містить 1000 МО аглютинуючих антибруцельозних антитіл.

За даними таблиці, усі антигени працюють активно, забезпечують виявлення не меншої за 1000 МО кількості аглютинуючих антибруцельозних антитіл (у розведенні 1:650 з оцінкою +++-++++ спрацювали антигени: *Biowet*, РП у титрі 1/8; Херсонської б/ф від 1/7 до 1/11; ННЦ «ІЕКВМ» від 1/7 до 1/12). Проте точніше відповідають своїм антигенним властивостям у робочому титрі 1/10 останні два антигени.

Одночасно з постановкою реакцій було розтитровано шкалу аглютинації з кожним розведенням кожного з антигенів. Постановку та оцінювання реакції здійснювали за методикою, розробленою в PIWet (м. Пулави, ПР). При цьому постановка РА не відрізняється від стандартної, але облік різниться з чинною в Україні методикою. А саме, враховується ступінь просвітлення рідини без критерію характеру осаду. У вітчизняній практиці облік РА проводиться більш комплексно, за ступенем просвітлення рідини та характером осаду. Проте це значно не вплинуло на отримані результати.

Для визначення специфічності бруцельозних антигенів комерційного (Херсонська б/ф) та дослідного ННЦ «ІЕКВМ», проведеного раніше, як гетерологічні використовували ієрсиніозні (*Yersinia enterocolitica* О3, О6.30, О9) сироватки («Набір компонентів для серологічної діагностики ієрсиніозів тварин» ТУУ 46.15.091) та сироватку діагностичну сальмонельозну адсорбовану суху Н- для РА (С-Пб. НДІ вакцин та сироваток; 08-2005 р.); позитивну ІЕ («Набір компонентів для серологічної діагностики інфекційного епідидиміту баранів в РТЗК» ТУУ 46.15.059, виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина», с. 1, придатність до квітня 2017 р.) та позитивну лістеріозну сироватку («Лістеріозна сироватка ІЕКВМ для реакції зв'язування комплекменту (РЗК)» виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина», с. 1, придатність до червня 2018 р.).

Було встановлено, що у РЗК (РТЗК) антигени не проявили позитивної реакції із зазначеними сироватками, окрім *Yersinia enterocolitica* О9, яка прореагувала у титрі 1/20 # з антигеном ННЦ «ІЕКВМ» та 1/20 +++ 1/40 + з комерційним антигеном. У РА ця сироватка реагувала позитивно до розведень 1:400 ++ 1:800 +, що і повинно бути; перехресні реакції обумовлені наявністю у штамів *B. abortus* та *Yersinia enterocolitica* О9 загального структурного елементу у полісахаридному комплексі, тобто вони мають аналогічний ліпополісахарид. З негативними бруцельозними сироватками (польовими та контрольною комерційною («Набір позитивної бруцельозної та негативної контрольних сироваток для РБП, РА, РЗК (РТЗК)» ТУУ 46.15.274 виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина», с. 3, придатність до грудня 2017 р.) дані антигени не реагували.

Специфічність антигенів комерційного (Херсонська б/ф) та ННЦ «ІЕКВМ» у РА, РЗК (РТЗК) підтверджується відсутністю позитивної реакції з негативною контрольною та гетерологічними сироватками.

Висновки. Отже, усі три антигени безпечні, активні, забезпечують виявлення граничної кількості 30 МО аглютинуючих та 20 МО комплекментфіксуєчих антитіл у 1 см³ бруцельозної сироватки, тобто, не меншої за 1000 МО кількості аглютинуючих та комплекментфіксуєчих антибруцельозних антитіл як макро-, так і мікрометодом.

Встановлено з усіма антигенами (*Biowet*, РП; Херсонської б/ф; ННЦ «ІЕКВМ»), що Національні стандарти ННЦ «ІЕКВМ» (2006 р.) та ВДНКІ (Росія, 1995 р.) містять, відповідно, 1149 та 1413 МО антибруцельозних антитіл у 1 см³, тобто відповідають вимогам МЕМ.

Досліджено, що результати чутливості усіх досліджуваних антигенів корелюють. При цьому самим «стійким» до кількісного коливання (особливо надлишку) комплекменту, відповідно, самим стабільним виявлено антиген Херсонської б/ф. Результати дослідів підтверджують, що концентрація комплекменту є одним з основних факторів, що впливає на чутливість антигену. Антигени Херсонської б/ф та ННЦ «ІЕКВМ» визначені також специфічними.

Візуальним обліком мк-РЗК за методикою *PIWet* (м. Пулави, ПР) антигени виявляють 20 МО комплекментфіксуєчих антитіл у 1 см³ (за робочим стандартом (РП) 1/5 ++)) у розведеннях: перший (*Biowet*, РП) - від 1/110 до 1/130; другий (ННЦ «ІЕКВМ») – від 1/130 до 1/160; комерційний (Херсонська б/ф) – 1/100. Після довготривалого холододового витримання цієї ж реакції, але з половиною дозою комплекменту активність антигенів значно не змінюється (відповідно, титри 1/90-110; 1/110-1/150; 1/90-1/110). За інструментального обліку мк-РЗК антигени ННЦ «ІЕКВМ» та комерційний (Херсонська б/ф) виявляють антибруцельозні комплекментзв'язуючі антитіла (20 МО) у титрі 1:160, антиген (ПР) – у титрі 1:320, що свідчить про більшу чутливість мікрометоду РЗК. При цьому суспензія еритроцитів (2,5 %) для РЗК відповідає європейським нормам (спектрофотометрично за λ=540 нм екстинкція оптичної щільності гемолізованої рідини складала 0,610).

Спостережена стабільність результатів мк-РЗК за методикою ННЦ «ІЕКВМ» (повна кореляція результатів мк-РЗК, отриманих зразу після реакції спектрофотометрично (за ступенем затримки гемолізу) та візуально (за ступенем гемолізу) згідно методик двох країн). Подальші дослідження доцільно спрямувати на доповнення вітчизняної методики мікрометодом РЗК у якості додаткового для отримання попередніх результатів при масових або комплексних дослідженнях.

Таким чином, отримано кореляційні дані активності антигенів за різним облікуванням мк-РЗК, як спектрофотометричним, так і візуальним. При цьому зменшення кількості комплементу значно не впливає на антигенні властивості антигенів, тоді як збільшення значно знижує їх, що підтверджує значимість концентрації комплементу як одного з основних факторів, що впливає на чутливість антигенів.

Перспектива подальших досліджень. Комісійно виявлено, що за наявності стандартних сироваток МЕБ на базі вітчизняних методик та діагностиків ННЦ «ІЕКВМ», як провідний заклад Країни з вивчення бруцельозу, спроможний вже сьогодні надавати результати в міжнародних одиницях. Стандартизація компонентів серологічних реакцій для діагностики бруцельозу тварин в Україні з метою розрахунку підсумків у міжнародних одиницях триває.

Список літератури

1. Бабкін А.Ф. Бруцельоз: сучасні аспекти епізоотології/ А.Ф. Бабкін, О.В. Обухівська // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.-Х., 2012.- Вип. 96.- С. 204-205.
2. Деклараційний патент № 107685 Україна, МПК А61К 39/10С12N1/20 Спосіб виготовлення антигену для серологічної діагностики бруцельозу тварин в РА, РЗК, РТЗК [Текст] / О.В. Обухівська, Б.Т. Стегній, С.М. Орлов, С.С. Драгут, В.А. Куценко, Н.В. Марченко, Т.П. Рамазанова; ННЦ «ІЕКВМ» – № у 201510225; заявл. 19.10.2015; опубл. 24.06.2016, Бюл. № 12.
3. Stegny B. Development of Ukraine national standard for National Brucella strain collection maintenance in accordance with European requirements for biosafety and biosecurity / B. Stegny, O. Obukhovska, M. Bashenko, A. Mandygra, A. Gerilovich, A. Zavgorodny// 18th Annual Conference of the European Biosafety Association (April, 21-24, 2015, Vienna, Austria).
4. Деклараційний патент № 60429 Україна, А61К 39/00 G01N 33/569 Спосіб інструментального обліку результатів дослідження мікрометодом реакції зв'язування комплементу [Текст] / А.Ф. Бабкін, Б.Т. Стегній, О.Г. Близнєцов ННЦ «ІЕКВМ» – № у 2010 11475; заявл. 27.09.2010; опубл.25.06.2011 р., Бюль. № 12.

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTIGENIC ACTIVITY OF BRUCELLOSIS ANTIGENS USING TOOL AND VISUAL RESULTS REGISTRATION OF THE SEROLOGICAL TESTS

Iwaniak W.¹, Stegny B.², Gerilovych A.², Obukhovska O.², Dragut S.², Kalinichenko T.², Bliznecov O.², Marchenko N.², Szulowski K.¹, Zlotnicka J.¹, Bolotin V.²

¹ National Veterinary Research Institute, National Reference Laboratory, Pulawy, Poland

² National scientific center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

To conduct comparative analysis of antigenic activity of commercial and experimental (NSC IECVM) Brucella antigens using tools and visual results registration of the serological investigations. To determine the possibility of increasing standardization of components titration.

Methods. Serological (serum agglutination test (SAT); complement fixation test (CFT).

Results. During the studies developed in NSC "IECVM" antigen for serological investigations of animal brucellosis were tested using SAT, CFT. It was found that the antigen is active, specific and safety in comparing with antigens for SAT and CFT (Biowet, Pulawy, RP) and commercial antigen from (Kherson biofactory production).

It is necessary to increase standardization of all components for serological tests in the diagnosis of animal brucellosis with the aim of implementation of the international units.

Keywords: Brucellosis; *B. abortus*; serological diagnosis; serum agglutination test (SAT); complement fixation test (CFT)