

ПОРІВНЯЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ДІАГНОСТИЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ІМУНОФЕРМЕНТНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ВІТЧИЗНЯНОГО ТА ЗАКОРДОННОГО ВИРОБНИЦТВА ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТВАРИН НА БРУЦЕЛЬОЗ

**Стегній Б. Т., Драгуть С. С., Куценко В. А., Рамазанова Т. П.,
Марченко Н. В., Обуховська О. В., Болотін В. І.**

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: vbolotin@hotmail.de

Горлов Ю. І., Ганова Л. О., Чумак О. М., Горлов А. Ю., Співак М. Я.
ПрАТ «Науково-виробнича компанія «Діапроф-Мед», Київ, Україна

У роботі представлені результати порівняльного дослідження імуноферментних тест-систем «DIA®-Brucella ab. combi-V» (ПрАТ «НБК Діапроф-Мед», Україна) і «ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species» (IDvet, Франція) за допомогою панелей сироваток крові різних тварин і зразків молока корів, які містять антитіла до збудників бруцельозу в різних концентраціях, а також негативних зразків. В обох тест-системах реакція проводиться у форматі непрямого ІФА. Отримані дані показали, що при аналізі 26 сироваток крові різних тварин і 3 зразків молока корів, які містять антитіла до збудників бруцельозу, тест-система «DIA®-Brucella ab. combi-V» визначила всі зразки позитивними. Тест-система «ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species» виявила специфічні антитіла тільки у 24 зразках, результат аналізу чотирьох зразків був сумнівним і одного — негативним. При аналізі 34 зразків сироваток крові від різних тварин і молока ВРХ, які не містять антитіл до збудників бруцельозу, в обох діагностикумах результат дослідження був негативним. Із трьох зразків гетерологічних сироваток крові ВРХ, з яких два містять антитіла до *Yersinia enterocolitica* та один — до *Francisella tularensis*, при дослідженні у відповідних тест-системах два зразки визначені негативними, при аналізі однієї сироватки з антитілами до *Yersinia enterocolitica* О9 отримано хибнопозитивний результат в обох тестах

Ключові слова: бруцельоз, діагностика, імуноферментні тест-системи

Бруцельоз — висококонтагіозна хронічна інфекція, яка супроводжується ураженням репродуктивних органів. Збудником бруцельозу у сільськогосподарських тварин є бактерії групи *Brucella*: у ВРХ — *B. abortus*, у овець та кіз — *B. melitensis*, у свиней — *B. suis*, у баранів — *B. ovis* [1]. Можлива міграція виду *B. melitensis* від дрібної рогатої худоби на інші види тварин, а також *B. abortus* на верблюдів і коней [2]. Спалахи бруцельозної інфекції завдають великих економічних втрат. Фермерські господарства зазнають суттєвих збитків через аборти, народження ослаблених і мертвонароджених тварин. Антропозоонозний характер захворювання є причиною ризику зараження людини від домашніх тварин [3, 4] при догляді за ними і при вживанні інфікованих продуктів харчування (молока, м'яса, сиру і т. д.).

Рішення проблеми якісної діагностики бруцельозу залишається актуальним завданням, особливо у країнах з розвиненим тваринництвом [2]. Своєчасне виявлення інфікованих тварин визначає успіх ветеринарних і медико-санітарних заходів, спрямованих на оздоровлення тваринницьких господарств і ліквідацію причин поширення захворювання серед людей. Оскільки захворювання часто протікає безсимптомно з хронізацією інфекційного процесу [5, 6], то основним методом виявлення хворих тварин є проведення планових діагностичних досліджень на бруцельоз. З цією метою відповідно до рекомендацій Міжнародного епізоотичного бюро (ОІЕ) для скринінгових досліджень застосовують серологічні тести, серед яких частіше використовують імуноферментний аналіз (ІФА), який дозволяє провести одночасно велику кількість аналізів і отримати результат за короткий час [7, 8]. Створення нових швидких, специфічних і високочутливих діагностичних імуноферментних тест-систем, які дозволяють виявляти бруцельоз у тварин на ранніх стадіях захворювання, є одним з основних напрямків щодо

підвищення точності діагностичних досліджень на бруцельоз, що упередить поширення даного захворювання.

Мета роботи. Проведення порівняльного дослідження діагностичної ефективності імуноферментних тест-систем «DIA®-Brucella ab. combi-V» і «ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species», які призначені для виявлення антитіл до збудників бруцельозу у різних видів сільськогосподарських тварин.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводились на базі Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (м. Харків).

Тест-системи «DIA®-Brucella ab. combi-V» (ПрАТ «НБК Діапроф-Мед», Україна) і «ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species» (IDvet, Франція) сконструйовані у форматі твердофазного непрямого ІФА. В обох діагностикумах імуносорбент виготовлений з використанням LPS *Brucella abortus*, який має спільні ділянки з антигенами інших видів бруцел — збудників захворювання у сільськогосподарських тварин. При внесенні в лунки планшету досліджуваних зразків сироваток або молока специфічні антитіла зв'язуються з антигенами у складі імуносорбенту, утворюючи комплекси антиген-антитіло. На другому етапі реакції після етапу промивання в лунки вноситься пероксидазний кон'югат, який виявляє специфічні імунні комплекси. У тест-системі «DIA®-Brucella ab. combi-V» кон'югат виготовлено на основі рекомбінантного білка G *Streptococcus*. В обох тест-системах в якості проявника використовують однокомпонентний ТМБ. Реакцію зупиняють стоп-реагентом і визначають оптичну густину (ОГ) суміші в лунках, яка прямо пропорційна концентрації специфічних антитіл. У тест-системі «DIA®-Brucella ab. combi-V» вимір проводять при довжині хвилі 450 нм/620 нм, у тест-системі «ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species» — при 450 нм.

У тест-системі «DIA®-Brucella ab. combi-V» для розрахунку граничного значення (cut off) до середньої величини трьох значень негативного контролю додають константний коефіцієнт 0,15. Результат аналізу вважається позитивним, якщо ОГ досліджуваного зразку більше cut off і негативним при ОГ менше cut off.

Результати ІФА в тест-системі «ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species» представлено величиною SP %, яка розраховується за формулою:

$$SP \% = \frac{OG_{\text{зразка}} - OGK_{\text{нег}}}{OGK_{\text{поз}} - OGK_{\text{нег}}} \times 100\%$$

де: $OG_{\text{зразка}}$ — оптична густина досліджуваного зразка,

$OG_{\text{нег}}$ — оптична густина негативного контролю,

$OG_{\text{поз}}$ — оптична густина позитивного контролю.

Якщо значення $SP \geq 120\%$ результат аналізу вважається позитивним, якщо значення $SP \leq 110\%$ — негативним, якщо $110\% < SP < 120\%$ — сумнівним.

Для коректного порівняння результатів аналізів у двох тест-системах ми використовували розрахунок індексу позитивності (ІП), як співвідношення $OG/cut\ off$ для діагностикуму «DIA®-Brucella ab. combi-V» і $SP/cut\ off$ у тест-системі «ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species». При такому підході ІП для cut off буде складати 1,0. Розрахунок результатів з використанням ІП буде наступний: для тест-системи «DIA®-Brucella ab. combi-V» при значеннях $IP \geq 1,0$ — результат позитивний; при $IP < 1,0$ — негативний; для тест-системи «ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species» при значеннях $IP \geq 1,0$ — результат позитивний; при $IP > 0,9$, але $< 1,0$ — невизначений, при $IP < 0,9$ — негативний.

Для аналізу використовували такі панелі зразків:

— 22 сироватки крові ВРХ, що містять антитіла до *B. abortus*, з яких зразок № 11 досліджували нерозведений і розведений у 4 рази негативною сироваткою;

— 4 сироватки крові від інших тварин, що позитивні на бруцельоз, з яких 2 зразки від свиней, 1 — від кози та 1 — від верблюда;

— 3 зразки молока корів, які розведені позитивною на бруцельоз сироваткою (№ 17 у 4 рази, № 18 у 10 разів і 16 разів);

— 23 сироватки крові ВРХ, які не містять антитіл до збудників бруцельозу;

— 9 зразків сироваток крові від інших тварин, що не містять антитіл до збудників бруцельозу, з яких 6 — від овець, 2 — від свиней, 1 — від кози;

— 2 зразки молока корів, які не містять антитіл до збудників бруцельозу;

— 3 зразки сироваток крові ВРХ, з яких 1 містить антитіла до *Yersinia enterocolitica* O9, 1 — до *Yersinia enterocolitica* O3 і 1 — до *Francisella tularensis*.

Результати досліджень. Результати аналізу сироваток крові ВРХ, які містять антитіла до *B. abortus*, у тест-системах «DIA®-Brucella ab. combi-V» та «ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species» представлені на рис. 1.

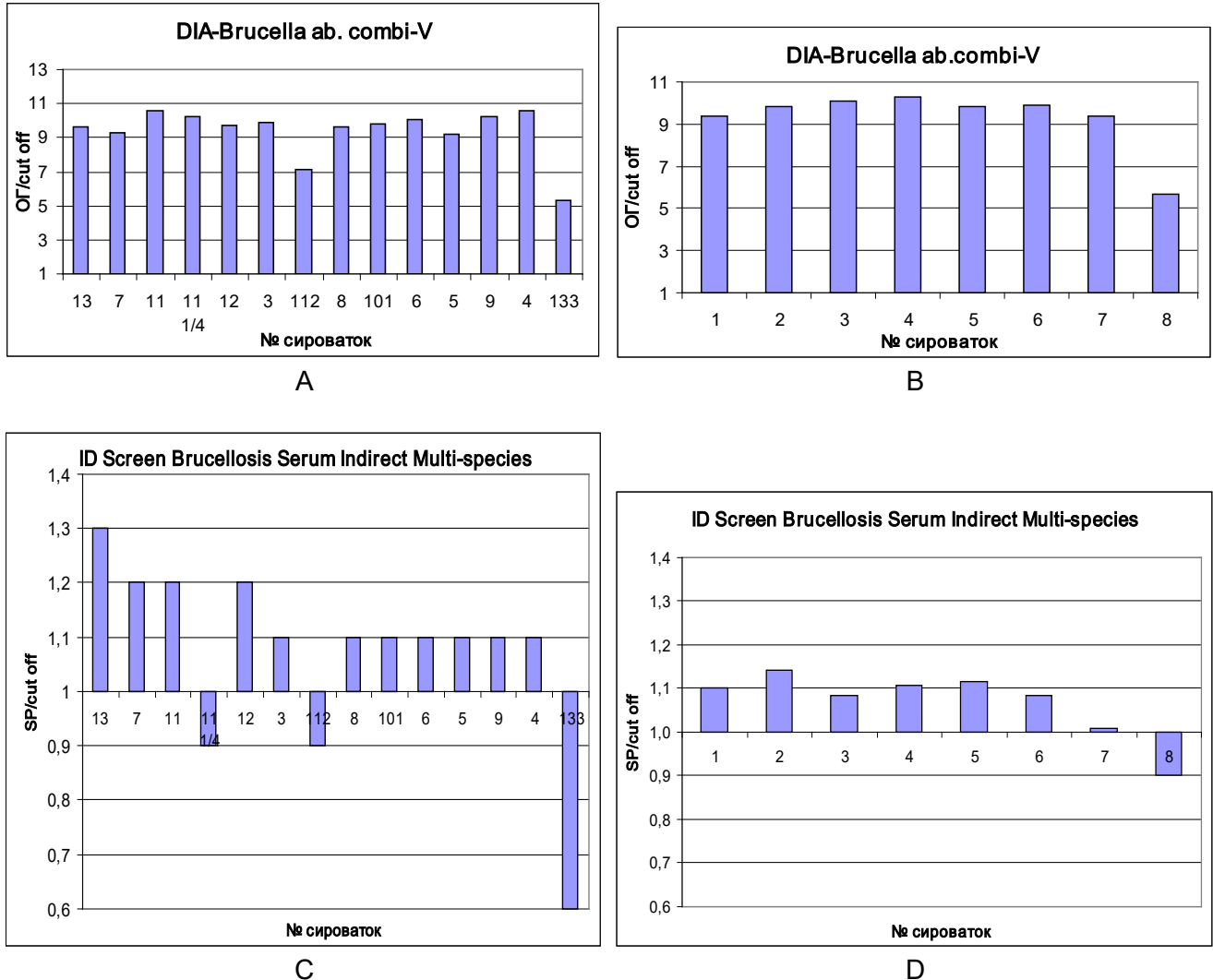


Рис. 1. Результати дослідження сироваток крові ВРХ, які містять антитіла до *B. abortus*, у різних тест-системах (А, С — зразки сироваток з НПК «Діапроф-Мед», В, D — зразки сироваток з ННЦ «ІЕКВМ»).

При дослідженні 14 зразків з НПК Діапроф-Мед і восьми сироваток з ННЦ «ІЕКВМ» тест-система «DIA®-Brucella ab. combi-V» виявила специфічні антитіла в усіх зразках. При цьому результати аналізу зразків перевищували значення cut off в 5,3–10,6 разів. Діагностикум «ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species» визначив 18 сироваток позитивними з найбільшим значенням 1,3 вище величини cut off. При дослідженні трьох зразків результат аналізу був сумнівний, а однієї сироватки — негативний.

При дослідженні чотирьох сироваток крові від різних тварин, які містять антитіла до збудників бруцельозу, тест-система «DIA®-Brucella ab. combi-V» визначила позитивними всі зразки, результат аналізу котрих перевищував рівень cut off в 8,1–9,4 рази (рис. 2А).

У тест-системі «ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species» специфічні антитіла виявлені у трьох сироватках — у зразках від свиней та верблюда. При дослідженні сироватки від кози отримано сумнівний результат аналізу.

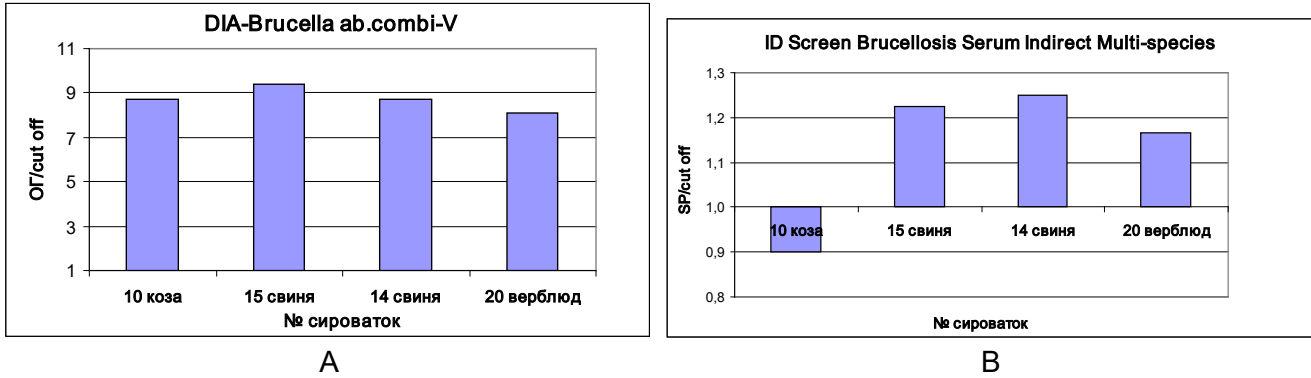


Рис. 2. Результати порівняльних досліджень сироваток крові різних тварин у тест-системах А — «DIA-Brucella ab. combi-V», В — «ID Screen Brucellosis Indirect Multi-species».

На рис. 3 представлено результати аналізу зразків молока корів, які містять антитіла до *B. abortus* у різних концентраціях, в обох тест-системах.

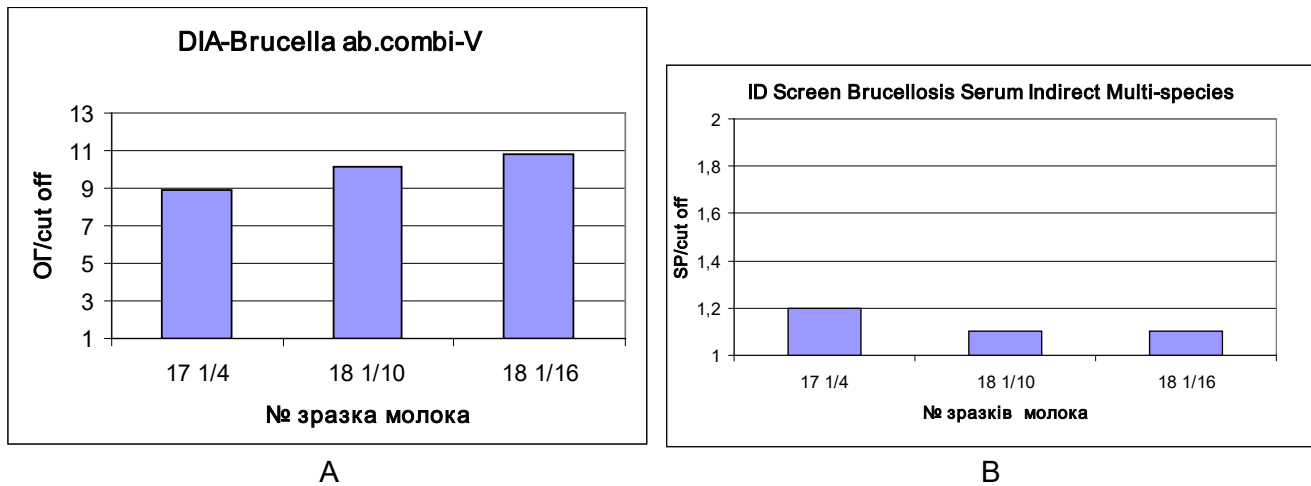


Рис. 3. Результати порівняльних досліджень зразків молока корів у тест-системах А — «DIA-Brucella ab. combi-V», В — «ID Screen Brucellosis Indirect Multi-species».

При дослідженні трьох зразків молока корів в обох тест-системах отримано позитивний результат на бруцельоз. Однак, здатність тест-системи «DIA-Brucella ab. combi-V» виявляти специфічні антитіла була дещо вищою, ніж у тест-системи порівняння. У цій тест-системі результат аналізу зразків був більший за cut off в 8,9–10,8 разів (рис. 3А), а в тест-системі «ID Screen Brucellosis Indirect Multi-species» — тільки в 1,1–1,2 рази (рис. 3В).

Результати дослідження здатності тест-систем коректно визначати зразки сироваток і молока корів, які негативні на бруцельоз, представлено в таблиці.

При аналізі 32 сироваток крові від різних тварин і двох зразків молока, які не містять антитіл до збудників бруцельозу, в обох тест-системах отримано негативний результат аналізу (специфічність 100 %).

При дослідженні сироваток крові ВРХ, які містять антитіла, що можуть привести до хибнопозитивного результату аналізу, в обох тест-системах при тестуванні зразку з антитілами до *Francisella tularensis* та однієї сироватки з антитілами до *Yersinia enterocolitica* O3 отримано негативний результат. При аналізі зразку сироватки з антитілами до *Yersinia enterocolitica* O9 результат аналізу був хибнопозитивний.

Таблиця — Порівняльні результати дослідження в різних імуноферментних тест-системах зразків сироваток і молока, які не містять антитіл до збудників бруцельозу

Тварини	Кількість зразків	Тест-системи					
		DIA-Brucella ab. combi-V			ID Screen Brucellosis Serum Indirect Multi-species		
		кількість результатів		специфічність	кількість результатів		специфічність
позитивних	негативних	позитивних	негативних				
сироватки крові							
ВРХ	23	0	23	100 %	0	23	100 %
вівця	6	0	6		0	6	
свиня	2	0	2		0	2	
коза	1	0	1		0	1	
зразки молока корів							
ВРХ	2	0	2	100 %	0	2	100 %
Всього:	34	0	34		0	34	

Висновки. Таким чином, при дослідженні у двох діагностичних імуноферментних тест-системах сироваток крові, з яких 22 зразки від ВРХ та 4 — від різних тварин (свиня, вівця, коза, верблюд), а також 3 зразків молока корів, які містять різні концентрації антитіл до збудників бруцельозу, зокрема, їх низький рівень, встановлено, що вітчизняна тест-система «DIA®-Brucella ab. combi-V» має досить високу діагностичну здатність, яка не поступається закордонному аналогу. Діагностиком визначив специфічні антитіла в усіх позитивних зразках з результатом, що перевищує рівень cut off, який відсікає позитивні зразки від негативних у 5,3–10,8 разів. Тест-система «ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species» виявила антитіла до збудників бруцельозу тільки у 24 зразках із 29 досліджених з найбільшим значенням лише 1,3 вище величини cut off. При дослідженні в даному тесті чотирьох сироваток крові, з яких три зразки від ВРХ та один — від кози, результат аналізу був сумнівний, тобто невизначений («сіра зона»), при аналізі 1 сироватки крові ВРХ отримано негативний результат.

Здатність тест-систем коректно визначати негативні зразки була співставною. При аналізі 32 сироваток крові від різних тварин і двох зразків молока корів, які не містять антитіл до збудників бруцельозу, в обох тест-системах отримано негативний результат аналізу. Із трьох негативних сироваток крові ВРХ, при аналізі яких на бруцельоз результат може бути некоректним (присутність антитіл до *Yersinia enterocolitica* O3, *Yersinia enterocolitica* O9, *Francisella tularensis*), в обох тест-системах при дослідженні 1 зразка з антитілами до *Yersinia enterocolitica* O9 отримано хибнопозитивний результат.

Список літератури

1. Banai M., Corbel M. Taxonomy of *Brucella*. *The Open Veterinary Science Journal*. 2010. Vol. 4. P. 85–101.
2. Оракбай Л. Ж., Черепанова Л. Ю., Денисова Т. Г. Современные аспекты эпидемического процесса бруцеллёза [Электронный ресурс]. *Современные проблемы науки и образования*. 2015. № 6. С. 12. Режим доступа : <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=25389589>.
3. Охупкина В. Ю., Пяткова Н. В., Павлов Д. Л., Суслопаров А. А. Эпидемическая опасность бруцеллёза в современных условиях. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016. Т. 88, № 3. С. 15–22.
4. Рымаренко Н. В., Дедюра Е. Н., Мазинова Э. Р., Ивановский С. В., Джемилева Х. Ш. Бруцеллёз — редкое, но все ещё существующее заболевание (клинический случай). *Современная педиатрия*. 2014. Т. 58, № 2. С. 116–118.
5. Фазылов В. Х., Гилмуллина Ф. С., Загидуллина А. И., Хамидуллина З. Л. Диагностика и лечение хронического бруцеллёза в реальной практике. *Инфекционные болезни. Антимикробная терапия*. 2014. Т. 83, № 7. С. 75–81.
6. Фазылов В. Х., Гилмуллина Ф. С., Хамидуллина З. Л., Галина Г. В. Клинико-эпидемиологическая характеристика хронического бруцеллёза. *Казанский медицинский журнал*. 2018. Т. 99, № 6. С. 924–928.
7. Искандеров М., Фёдоров А., Альбертян М. Диагностика бруцеллёза. *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. 2011. № 4. С. 28–31.
8. Нурпейсова А. Х., Софонов А. Д., Рудаков Н. В., Березкина Г. В., Томилова Л. А. Сравнительный анализ рутинных методов определения общей активности антител и ИФА в диагностике хронического бруцеллёза. *Эпидемиология, специфическая диагностика, экология, профилактика*. 2009. № 2. С. 137–138.

COMPARATIVE RESEARCH OF DIAGNOSTIC EFFICIENCY OF ELISA TEST SYSTEMS
OF DOMESTIC AND FOREIGN PRODUCTION FOR ANIMAL BRUCELLOSIS DIAGNOSTICS

**Stegniy B. T., Drahut S. S., Kutsenko V. A., Ramazanova T. P.,
Marchenko N. V., Obuchovska O. V., Bolotin V. I.**

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Gorlov Yu. I., Ganova L. O., Chumak O. M., Gorlov A. Yu., Spivak M. Ya.
PJSC "Scientific and Production Company "Diaproph-Med", Kyiv, Ukraine

The purpose of the work. Comparison the diagnostic ability of the ELISA test kits «DIA®-Brucella ab. combi-V» and «ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species» for the detection of antibodies to brucellosis pathogens in various farm animals. Materials and methods. For the analysis there were used 29 positive samples to brucellosis with specific antibodies in different concentrations, 26 of which are serums (22 — from cattle, 2 — from pigs, 1 — from goat, 1 — from camel) and 3 — milk samples from cows. There were used 32 serums (23 — from cattle, 6 — from sheep, 2 — from pigs, 1 — from goat), and 2 milk samples from cows that don't contain antibodies to brucellosis pathogens for determining the ability of test kits to detect correctly negative samples. There were also used serums from cattle containing antibodies that can lead to false positive results, 1 sample with antibodies to Francisella tularensis, 1 — to Yersinia O3 and 1 — to Yersinia O9. To compare the results in the two test kits, comparative ratios were used that allowed to determine how many times the result obtained in both test kits was higher or less than cut off, that differentiated positive samples from negative. Results of the work. When analyzing 22 cattle serums containing antibodies to B. abortus, the "DIA®-Brucella ab. combi-V" kit determined all samples positive with a results 5.3–10.6 times higher than cut off. The "ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species" test kit identified only 18 positive serums with a maximum value of 1.3 above the cut off. The result of the analysis of 3 samples was doubtful and 1 serum was negative. When analyzing 4 sera from different animals containing antibodies to brucellosis pathogens, the "DIA®-Brucella ab. combi-V" test kit identified all positive samples with the results 8.1–9.4 times higher than cut off. The "ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species" test kit detected specific antibodies in only 3 serums — from pigs and camel. When the goat serum was tested, a doubtful (uncertain) result of the analysis was obtained. When analyzing 3 milk samples from cows containing antibodies to B. abortus in different concentrations there was received a positive result to brucellosis in both test kits. However, ability of the "DIA®-Brucella ab. combi-V" test kit to detect specific antibodies was significantly higher than in comparison test kit. When investigating 32 serums from different animals and 2 milk samples that didn't contain antibodies to the brucellosis pathogens, a negative result of the analysis was obtained in both test kits. When analyzing cattle serums containing antibodies that can lead to false positive results, both test kits identified 1 sample with antibodies to Francisella tularensis and 1 serum with antibodies to Yersinia O3 with negative result. When analyzing 1 serum with antibodies to Yersinia O9 the result of the analysis was false positive. Conclusions. Studies have shown that the "DIA®-Brucella ab. combi-V" test kit has a high diagnostic capacity. When analyzing 29 blood serums, including samples from different animals, and milk samples from cows containing antibodies to brucellosis pathogens, the test kit identified all samples as positive with results 5.3–10.8 times above the cut off. The "ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species" test kit detected antibodies to brucellosis pathogens only in 24 samples with a maximum value 1.3 times higher than cut off. When investigating 4 serums, 3 samples of which are from cattle and 1 — from goat, the result of the analysis was doubtful (uncertain), 1 cattle serum was identified as negative. The ability of test kits to detect correctly negative samples was comparable. When analyzing 32 serums from different animals and 2 milk samples from cows that do not contain antibodies to brucellosis pathogens, in both test kits, a negative result of the analysis was obtained. For the 3 negative cattle serums, the analysis of which on brucellosis may be incorrect (the presence of antibodies to Yersinia O3, Yersinia O9, Francisella tularensis), in both test kits, for 1 sample with antibodies to Yersinia O9 a false positive result was obtained

Keywords: brucellosis, diagnostics, ELISA kits