

РОЗДІЛ 3. ВЕТЕРИНАРНА ВІРУСОЛОГІЯ ТА МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 619:616.98:579.873.21:616-078:57.083.337:616-097:636.2

ВИВЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ТА СПЕЦИФІЧНОСТІ ВИГОТОВЛЕНИХ З *M. AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS (MAP)* АНТИГЕНІВ ДЛЯ РЗК

Завгородній А.І., Позмогова С.А., Гірка М.О., Гончарова Н.В.

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

У статті наведені дані порівняльного вивчення активності і специфічності виготовлених різними способами антигенів з *M. avium subsp. paratuberculosis (MAP)* та комерційного паратуберкульозного антигену в реакції зв'язування комплементу. Встановлено, що порівняно з клітинними та екстрагованими антигенами найбільш активними та специфічними були антигени білкової фракції культурального фільтрату, які синтезуються у культуральному середовищі у процесі метаболізму MAP. Антиген, виготовлений із протеїну культурального фільтрату за модифікованою методикою, виявляє антитіла проти збудника паратуберкульозу та не дає перехресних реакцій з сироватками проти інших бактеріальних і вірусних збудників.

Ключові слова: паратуберкульоз, реакція зв'язування комплементу, антиген, активність, специфічність.

Паратуберкульоз жуйних (хвороба Йоне, JD) – це мікобактеріальне (*M. avium subsp. paratuberculosis (MAP)*) інфекційне захворювання, що характеризується хронічним дегенеративним гранулематозним ентеритом переважно дистальних відділів тонкої та товстої кишок, а також ураженням мезентеріальних лімфатичних вузлів.

Паратуберкульоз жуйних тварин широко поширений у всьому світі. У країнах з розвинутою молочною галуззю тваринництва, інфікованість ВРХ становить від 20 % до 50 %, а м'ясного поголів'я – до 8 %. В останні 30–40 років у господарствах України дослідження поголів'я ВРХ на паратуберкульоз не проводяться. У зв'язку з поширенням цього захворювання серед ВРХ інших країн (Німеччина, Польща, Франція, Угорщина) існує ймовірність занесення збудника інфекції на територію України із закупленою племінною худобою, а також з генетичним матеріалом. Тому питання проведення серологічних досліджень щодо даної хвороби є виправданими і актуальними. Одним із загальноприйнятих методів прижиттєвої діагностики паратуберкульозу є реакція зв'язування комплементу (РЗК). РЗК має високу чутливість і специфічність при дослідженні клінічно хворих тварин, але не достатньо ефективна при виявленні тварин у субклінічній стадії інфекції. Ця реакція є корисна як скринінговий тест для оцінки поширення паратуберкульозу у стаді, а також для моніторингу господарств, де паратуберкульоз був ліквідований, а господарства перебувають під наглядом [1]. Крім того, РЗК використовують при дослідженні завезених тварин або при експортуванні худоби. Для участі у виставках, тварин також обов'язково досліджують за допомогою РЗК. На цей час, в Україні немає вітчизняних діагностичних препаратів для проведення тестування тварин на паратуберкульоз. Тому для вивчення та контролю епізоотичної ситуації щодо цієї хвороби у господарствах, а також для дослідження завезених із-за кордону тварин, є необхідність у розробці специфічного антигену для прижиттєвої діагностики паратуберкульозу.

Для серодіагностики паратуберкульозу у світі були випробувані та оцінені кілька типів антигенних препаратів, виготовлених з MAP. Це неочищені екстракти мікобактерій, сонікати, або фракційовані препарати, що містять декілька антигенів. Неочищені екстракти MAP містять суміші білків з безліччю полісахаридних антигенів, що складаються переважно з arabinomannan і arabinogalactan, які є загальноновидовими для багатьох видів мікобактерій, у результаті чого тести «страждають» від перехресних реакцій. Yokomizo (1983) і Sugden (1987) розробили реакцію ІФА для JD із застосуванням протоплазматичного антигену (PPA) із дезінтегрованих ультразвуком мікобактеріальних клітин і антигену з ліпоглікану клітинної стінки – lipoarabinomannan (LAM) [2, 3]. Jark (1997) і Waters (2003) розробили комерційні діагностичні набори для JD з PPA і LAM [4, 5]. У цих антигенах також присутні загальноновидові антигенні детермінанти, що викликають перехресні реакції з сироватками, інфікованої *M. bovis* худоби. За даними Olsen I. та співавт. (2001), Lilienbaum W. та співавт. (2007), Sung Jae Shin та співавт. (2008) білки, що секретуються MAP розпізнаються імунною системою раніше, ніж цитоплазматичні білки, і, отже, їх застосування можливе в серологічних аналізах для виявлення ранніх стадій інфекції [6, 7, 8].

Матеріали та методи. Для отримання антигенів культуру збудника паратуберкульозу *Mycobacterium avium sp. paratuberculosis* штам «Деметра» вирощували на рідкому синтетичному середовищі Ватсона-Рейда впродовж 10 тижнів. Після інактивації (120 °C – 60 хв.) бактеріальну масу відділяли фільтруванням і використовували для виготовлення PPA, а культуральний фільтрат — для виготовлення АКФ. PPA отримували шляхом ультразвукової обробки бактеріальної маси, клітинний детрит видаляли центрифугуванням. Отриманий супернатант використовували в якості антигену. Із протеїнової

Розділ 3. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

фракції культурального фільтрату було виготовлено 2 варіанти антигенів: АКФ I – за методикою виготовлення антигену (PPDj) для γ-інтерферонового тесту, АКФ II – за модифікованою методикою. Активність антигенів визначали титруванням з контрольними сироватками: позитивною в розведеннях 1:5, 1:10 і 1:20 і негативною – 1:10. Робочим титром антигену вважали подвоєну його кількість, яка дала повну затримку гемолізу з позитивною контрольною сироваткою в розведенні 1:10, при наявності гемолізу з контрольною негативною сироваткою (1:10). Специфічність отриманих антигенів визначали з гомологічними і гетерологічними сироватками крові (n = 20) від різних видів тварин порівняно з комерційним антигеном (Росія). РСК, оцінену в «+++» (3 знака) і більше при повному гемолізі еритроцитів у контролі без антигену, вважали позитивною. Постановку РЗК проводили згідно з методичними рекомендаціями «Лабораторна діагностика паратуберкульозу», затверджених НМР ДВФС України 2013 р.

Результати досліджень. Представлені у таблиці 1 результати з визначення активності антигенів, свідчать про те, що, найбільш активними були антигени білкової фракції культурального фільтрату. Так кінцеве розведення АКФ I, при якому спостерігали повну затримку гемолізу еритроцитів (#) при розведенні позитивної сироватки 1:10, складало 1:2000, при розведенні 1:20–1:1400. АКФ II був менш чутливий. Так максимальне його розведення, при відсутності гемолізу з позитивною сироваткою (1:10), складало 1:1400, при розведенні сироватки 1:20–1:800. Стосовно РРА, то встановлено, що цей антиген мав граничний титр 1:800 при розведенні позитивної сироватки 1:10, при розведенні сироватки 1:20 його кінцевий титр становив 1:400.

Таблиця 1 – Результати вивчення активності антигенів

S	Розведення АКФ I							S ⁺ без АКФ
	1:400	1:600	1:800	1:1400	1:1800	1:2000	1:2200	
1:5	#	#	#	#	#	#	#	-
1:10	#	#	#	#	#	#	+++	-
1:20	#	#	#	#	++	++	++	-
АКФ без S	-	-	-	-	-	-	-	-
S ⁻ + АКФ	-	-	-	-	-	-	-	-
Розведення АКФ II								
1:5	#	#	#	#	#	#	#	-
1:10	#	#	#	#	+++	++	++	-
1:20	#	#	+++	++	++	+	-	-
АКФ без S	-	-	-	-	-	-	-	-
S ⁻ + АКФ	-	-	-	-	-	-	-	-
Розведення РРА								
1:5	#	#	#	#	#	#	#	-
1:10	#	#	#	++	+	+	-	-
1:20	#	+++	++	+	-	-	-	-
АКФ без S	-	-	-	-	-	-	-	-
S ⁻ + АКФ	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітки: АКФ – антиген з культурального фільтрату; S⁻ – контрольна негативна сироватка крові; S⁺ – контрольна позитивна сироватка; # – відсутність гемолізу, прозора надосадова рідина; +++ – 25% гемолізу еритроцитів; ++ – 50 % гемолізу еритроцитів; "+" – 75 % гемолізу еритроцитів; "-" – повний гемоліз, відсутність осаду еритроцитів, рідина забарвлена гемоглобіном.

Результати визначення специфічності антигенів у робочому титрі представлені в таблиці 2.

Таблиця 2 – Порівняльна специфічність антигенів

S	РРА (1:400)			АКФ 1 (1:1000)			АКФ 2 (1:700)			Комерційний Аг (1:100, с.2, к.2)		
	1:5	1:10	1:20	1:5	1:10	1:20	1:5	1:10	1:20	1:5	1:10	1:20
1	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
2	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
3	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
4	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
5	#	#	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++
6	#	#	#	#	#	#	+++	+	-	#	#	#
7	#	#	+++	#	+++	++	++	-	-	#	+++	+++
8	#	+++	++	#	++	++	-	-	-	#	+++	+++

9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	#	+++
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	#	+++	-	#	+++	-	-	-	-	#	+++	+++
14	#	++	++	#	#	++	++	-	-	#	#	++
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Контролі

S з Ag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S без Ag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S ⁺ з Ag	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
S ⁺ без Ag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ag без S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Без S, без Ag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітки: S - сироватка негативна; S⁺ – сироватка позитивна; Ag – антиген; # – відсутність гемолізу, прозора надосадова рідина; "+++" – 25 % гемолізу еритроцитів; "++" – 50 % гемолізу еритроцитів; "+" – 75 % гемолізу еритроцитів; "-" – повний гемоліз, відсутність осаду еритроцитів, рідина забарвлена гемоглобіном.

Сироватки: 1. Від кролика інфікованого реф. штамом MAP

2. Від кролика імунізованого реф. штамом MAP

3. Від кролика імунізованого епізоотичною культурою MAP №5809

4. Від кролика інфікованого епізоотичною культурою MAP № 6651

5. Від барана імунізованого реф. штамом MAP

6. Від ВРХ № 9849 інфікованої *M. bovis*

7. Від ВРХ № 9850 інфікованої *M. bovis*

8. Від ВРХ № 9210 інфікованої *M. bovis*

9. Від ВРХ (*M. intracellulare*)

10. Від ВРХ (*M. kansasii*)

11. Від ВРХ (*M. fortuitum*)

12. Від ВРХ (BCG)

13. Від кролика інфікованого *M. scrofulaceum*

14. Від кролика імунізованого BCG

15. Від курки інфікованої *M. avium*

16. Від курки імунізованої *M. avium*

17. Від барана інфікованого *M. avium*

18. Бруцельозна с. 1, к. 1

19. Монорецепторна О-аглютинуюча сальмонельозна ФГУП «Краснодарская биофабрика» с. 295, к. 295

20. РІД позитивна на лейкоз ВРХ

За даними таблиці 2 при порівняльному визначенні специфічності антигенів (у робочих титрах) з різними сироватками крові, встановлено, що тільки АКФ II був специфічним, а саме: виявляв антитіла в сироватках MAP-інфікованих та MAP-імунізованих тварин і не реагував з сироватками крові тварин, сенсibilізованих атипovими мікобактеріями (*M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. fortuitum*) та інфікованих *M. bovis*, а також з сироватками крові від РІД-позитивних на лейкоз тварин і референтними сальмонельозною та бруцельозною сироватками. АКФ I, отриманий за методикою виготовлення йоніну для гама-інтерферонового тесту, РРА та комерційний паратуберкульозний антиген реагували з сироватками хворої на туберкульоз худоби та давали хибно-позитивні реакції з сироватками крові від сенсibilізованих *M. scrofulaceum*, BCG кролів і з сироваткою крові імунізованою *M. intracellulare* ВРХ.

Таким чином, встановлено, що протеїни, які утворюються у синтетичному середовищі у процесі метаболізму та лізису MAP більш специфічні в порівнянні з клітинними та екстрагованими антигенними препаратами.

Висновки. 1. Антиген, виготовлений із протеїну культурального фільтрату за модифікованою методикою, є активним і специфічним діагностичним препаратом, що дозволяє виявляти антитіла проти збудника паратуберкульозу, і не дає перехресних реакцій з сироватками проти інших бактеріальних і вірусних збудників. 2. АКФ є перспективним діагностичним препаратом.

Список літератури

1. Shin, J.S.; Yoo, H.S.; McDonough, S.P.; Chang, Y. Comparative antibody response of 5 recombinant antigens in related to bacterial shedding levels and development of serological diagnosis based on 35KDa antigen for Map // *J. Vet. Sci.* - 2004. - № 5. - P. 111-117.
2. Yokomizo, Y., Merkal, R.S. and Lyle, P.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis* // *American Journal of Veterinary Research.* - 1983. - № 44. - P. 2205-2207.
3. Sugden, E.A., Samagh, B.S., Bundle, D.R. and Duncan, J.R. Lipoarabinomannan and lipid-free arabinomannan antigens of *Mycobacterium paratuberculosis* // *Infection and Immunity.* - 1987. - № 55. - P. 762-770.
4. Jark, U., Ringena, I., Franz, B., Gerlach, G.F., Beyerbach, M. and Franz, B. Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis // *Veterinary Microbiology.* - 1997. - № 57. - P. 189-198.
5. Waters, W.R., Miller, J.M., Palmer, M.V., Stabel, J.R., Jones, D.E., Koistinen, K.A., Steadham, E.M., Hamilton, M.J., Davis, W.C. and Bannantine, J.P. Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection of calves // *Infection and Immunity.* - 2003. - № 71. - P. 5130-5138.
6. Olsen, I.; Reitan, L.J.; Holstad, G.; Wilker, H.G. Alkyl Hydroperoxide Reductases C and D are major antigens constitutively expressed by *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* // *Infect. Immun.* - 2001. - № 68. - P. 801-808.
7. Sung Jae Shin, Donghee Cho, and Michael T. Collins Diagnosis of Bovine Paratuberculosis by a Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Early Secreted Antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* // *Clin Vaccine Immunol.* - Aug 2008. - № 15(8). - P. 1277-1281.
8. Lilenbaum W., Marassi C.D., Oelemann W.M.R. Paratuberculosis: an update // *Braz. J. Microbiol.* - 2007. - vol.38. - no.4

STUDY OF ACTIVITY AND SPECIFICITY OF ANTIGEN PRODUCED OF *M. AVIUM* SUBSP. PARATUBERCULOSIS (MAP) FOR THE COMPLEMENT FIXATION TEST (CFT)

Zavgorodniy A.I., Pozmogova S.A., Girka M.A., Goncharova N.V.

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

Study the activity and specificity of produced antigens in comparison with the commercial paratuberculous antigen for CFT (Russia).

*Materials and methods. The strain «Demetra» of pathogen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* was growing in a liquid synthetic medium Watson-Reid for 10 weeks with the aim of further obtaining antigens. After inactivation (120 °C – 60 min.) the bacterial mass was separated by filtration and used to obtain PPA and cultural filtrate – for obtaining ACF. PPA was obtained by ultrasonic impact on the bacterial mass, ACF I – according to the method of obtaining of antigen (PPDj) for γ -interferon test and ACF II – according to the modified method. Antigen's activity was determined by titration with control sera: positive serum at dilutions of 1:5, 1:10 and 1:20 and negative serum – 1:10. Antigen's specificity was determined with homologous and heterologous sera ($n = 20$) of different species of animals in the comparison to the commercial antigen (Russia).*

*The Results. The final dilution of ACF I with the total delay of erythrocyte's hemolysis (#) with positive serum 1:10 was 1:2000, 1:20 – 1:1400. ACF II was not sensitive enough, so the result in # with positive serum 1:10 was 1:1400, 1:20 – 1:800. PPA reacted in # with positive serum 1:10 – 1:800, 1:20 – 1:400. Among all the antigens only ACF II was 100 % specific to all studied sera. ACF I, PPA and paratuberculous antigen (Russia) gave fail-positive results with serum from cattle infected *M. bovis* and with rabbit's sera who was sensitized by *M. scrofulaceum* and BCG as well as with serum from cattle immunized by *M. intracellulare*.*

Conclusions. The antigen produced by the modified method is an active and specific diagnostic agent.

Keywords: paratuberculosis, complement fixation test, antigen, activity and specificity.