

УДК: 619:616.98:616.682-002

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ВІЗУАЛЬНОГО ТА ІНСТРУМЕНТАЛЬНОГО ОБЛІКУ ТИТРАЦІЇ ПОЗИТИВНОЇ ЛІСТЕРІОЗНОЇ СИРОВАТКИ В РЗК ТА М-РЗК З РІЗНИМИ ДОЗАМИ АНТИГЕНУ

Близнецов О. Г.

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

У статті наведено результати випробувань нової технології постановки і обліку мікрометоду РЗК для виявлення антитіл проти збудника лістеріозу тварин, яка відрізняється тим, що робочу дозу комплекменту у гемолітичній системі, зв'язування комплекменту у основному досліді та визначення ступеня затримки гемолізу в індикаторній системі проводять в об'ємі 100 мкл у мікротитрувальних полістиролових платах на шейкері-термостаті при 37 °С, 100 об./хв. впродовж 10 хвилин для кожного етапу реакції. Комп'ютерний цифровий облік результатів досліджень проведено на спектрофотометрі без попереднього осадження еритроцитів за показником оптичної екстинції затримки гемолізу. Спосіб обліку і інтерпретація результатів мікрометоду РЗК має аналогію з ELISA і рекомендується для скринінгових серологічних досліджень на інфекційні хвороби тварин.

Ключові слова: Listeriosis, мікрометод РЗК, чутливість і специфічність

Система епізоотологічного моніторингу небезпечних бактеріальних хвороб тварин (бруцельоз, інфекційний епідидиміт баранів, хламідіоз, лістеріоз) в Україні та інших державах забезпечується серологічними скринінговими дослідженнями тварин традиційними (РБП, РЗК, РА, РТЗК, РІД) і альтернативними (ІФА, ПЛР та інші) методами [1–8]. Лістеріоз є зооантропонозною інфекцією з природною стійкою вогнищевістю, що перебігає з ураженням практично всіх систем організму, має суттєвий вплив на нервову, імунну та ендокринну системи. У статті наведено результати випробування оригінальної технології постановки і комп'ютерного обліку мікрометоду РЗК для виявлення антитіл при лістеріозі тварин.

Матеріали та методи. Дослідження проведено згідно затвердженої методичною комісією ННЦ «ІЕКВМ» методики випробування способу постановки і комп'ютерного обліку мікрометоду РЗК для виявлення антитіл при бактеріальних хворобах тварин. Для дослідження були використані комерційні діагностикуми: «Лістеріозний антиген ІЕКВМ для реакції зв'язування комплекменту (РЗК)», робочий титр 1:200 та «Лістеріозна сироватка ІЕКВМ для реакції зв'язування комплекменту (РЗК)», робочий титр в РЗК 1:80, виробництва ТОВ НДП «Ветеринарна медицина».

Індикаторна гемолітична систем включала 2,5 %-ву суспензію відмитих розчинником еритроцитів барана, сенсibiliзованих гемолізином, комерційний набір «Сироватка крові кроля гемолітична (гемолізин) для реакції зв'язування комплекменту (РЗК)», робочий титр 1:500, ТОВ НДП «Ветеринарна медицина». У дослідженнях використали відтитровану дозу комплекменту (3 гемолітичні одиниці CH_{100}), комерційний набір «Комплемент сухий морської свинки», виробник ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина». Компоненти реакції розводили розчинником.

Сироватки крові у розведенні 1:10 інактивували на водяній бані при 57–60 °С впродовж 30 хвилин і досліджували у різних розведеннях (від 1:10 до 1:640) в об'ємі 20 мкл. У лунки з сироватками вносили відповідний антиген у робочих розведеннях та відтитровану дозу комплекменту (по 20 мкл). Для зв'язування комплекменту мікроплати з компонентами реакції розміщували у шейкері-термостаті, за режиму 100 об/хв., 37 °С упродовж 10 хвилин. Незв'язаний комплекс у кожній лунці визначали шляхом внесення індикаторної гемолітичної системи (по 40 мкл) і витримували в шейкері-термостаті упродовж 10 хвилин. Одночасно ставили контролю реакції: досліджувані сироватки і антигени на антикомплементарність, контроль активності комплекменту і контроль стабільності гемсистеми.

Експериментально визначено параметри оцінки результатів цифрового обліку затримки гемолізу за ОЕ при дослідженні мікрометодом РЗК: оптична екстинція менше 0,3 – «негативна реакція»; 0,3–0,4 – «сумнівна реакція»; 0,5 і більше – «позитивна реакція». У таблицях статті позитивна оцінка реакції в одиницях ОЕ виділена напівжирним шрифтом.

Результати роботи. Визначення гемолітичної активності комплекменту проводили у гемсистемі кожного разу перед основним дослідженням сироваток (табл. 1).

Таблиця 1 – Визначення гемолітичної активності комплекменту

Спосіб обліку РЗК	Облік результатів титрації комплекменту (1/20), дози, мкл									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Комп'ютерний, ОЕ	1,1	1,0	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Візуальний	ВГ ++++	ЧГ +++	ЧГ +	ПГ -	ПГ -	ПГ -	ПГ -	ПГ -	ПГ -	ПГ -

Примітка: ВГ (відсутність гемолізу, затримка гемолізу ++++), ЧГ (частковий гемоліз, затримка гемолізу +++), ПГ (повний гемоліз -)

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

Як свідчать дані таблиці 1, за візуальним обліком, мінімальна доза комплекменту у розведенні 1:20, що викликала повний гемоліз (ПГ) еритроцитів у індикаторній гемолітичній системі, становила 8 мкл (одна гемолітична одиниця). Цифрове визначення повного гемолізу еритроцитів на спектрофотометрі становило ОЕ 0,1. Три гемолітичних одиниці мали ОЕ 0,1, відповідно. Більші дози комплекменту від 14 до 20 мкл також спричиняли повний гемоліз ОЕ 0,1. У основному досліді застосували три гемолітичні одиниці, тобто 12 мкл комплекменту в розведенні 1:20.

У таблиці 2 представлені результати титрації лістеріозної та негативної сироваток крові мікрометодом РЗК у лістеріозній імунологічній системі з різними дозами антигену.

Таблиця 2 – Результати титрації лістеріозної та негативної сироваток крові мікрометодом РЗК у лістеріозній імунологічній системі з різними дозами антигену

Сироватка	Розведення сироваток, ОЕ							
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	Контроль 1:10 (без антигену)
1:100	1,2 ++++	1,1 ++++	1,0 ++++	0,9 +++	0,3 +	0,2 -	0,1 -	0,2 -
1:200	1,2 ++++	1,2 ++++	1,0 ++++	0,9 +++	0,8 +++	0,3 +	0,1 -	0,2 -
1:400	1,2 ++++	1,1 ++++	1,0 ++++	0,9 +++	0,7 ++	0,6 ++	0,4 +	0,2 -
1:800	1,1 ++++	0,9 +++	0,7 ++	0,6 ++	0,4 +	0,2 -	0,1 -	0,2 -
1:1600	0,9 +++	0,8 ++	0,7 ++	0,5 +	0,4 +	0,3 -	0,2 -	0,2 -
Негативна сироватка з антигеном 1:200	0,2 -	0,2 -	0,2 -	0,2 -	0,2 -	0,2 -	0,2 -	0,2 -
Контролі реакції								
Контроль А на антикомплементарність А+Розч. +К+ГС		Контроль А на гемотоксичність А+Розч.+Розч.+ГС			Контроль К на активність(ЗГО) Розч.+Розч.+К+ГС		Контроль ГС на стабільність Розч.+Розч.+Розч.+ГС	
ОЕ 0,2 -		ОЕ 1,2 ++++			ОЕ 0,1 -		ОЕ 1,1 ++++	

Примітка: А- антиген, К- комплекмент. ГС- гемсистема, ГО- гемолітична одиниця, ступінь затримки гемолізу (++++, ++, +)

Як свідчать дані таблиці 2, при дослідженні позитивної лістеріозної сироватки у розведеннях від 1:10 до 1:640 з лістеріозним антигеном у різних розведеннях (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600) виявлено різні граничні титри антитіл за показником специфічної затримки гемолізу (2+, 3+, 4+) та показником оптичної екстинції.

Проведені дослідження стандартних позитивної і негативної лістеріозних сироваток мікрометодом РЗК свідчать, що позитивна сироватка з антигеном збудника лістеріозу (1:100) реагувала з оцінкою «позитивно» у розведеннях від 1:10 +++++ до 1:80 +++ і «сумнівно» 1:160 + та за показником ОЕ від 1,2 до 0,9 та 0,3 відповідно. У контролі позитивна сироватка 1:10 без антигену мала повний гемоліз і показник ОЕ становив 0,2; з антигеном 1:200 сироватка реагувала з оцінкою «позитивно» у розведеннях від 1:10 +++++ до 1:160 +++ і «сумнівно», 1:3200 + та за показником ОЕ складала від 1,2 до 0,8 та 0,3, відповідно. У контролі позитивна сироватка 1:10 без антигену мала повний гемоліз і ОЕ=0,2; з антигеном 1:400 сироватка реагувала з оцінкою «позитивно» у розведеннях від 1:10 +++++ до 1:80 ++, 1:160 ++, 1:320++ та «сумнівно», 1:640 + та за показником ОЕ - від 1,2 до 0,9, 0,7, 0,6 та 0,4, відповідно. У контролі позитивна сироватка 1:10 без антигену мала повний гемоліз і ОЕ дорівнювала 0,2; з антигеном 1:800 сироватка реагувала з оцінкою «позитивно» у розведеннях від 1:10 +++++ до 1:80 ++ і «сумнівно» 1:160 + та за показником

ОЕ – від 1,2 до 0,6 та 0,4, відповідно. У контролі позитивна сироватка 1:10 без антигену мала повний гемоліз і ОЕ=0,2; з антигеном 1:1600 сироватка реагувала з оцінкою «позитивно» у розведеннях від 1:10 +++ до 1:40 ++ і «сумнівно», 1:80 + та за показником ОЕ – від 0,9 до 0,7 та 0,5, відповідно. У контролі позитивна сироватка 1:10 без антигену мала повний гемоліз і ОЕ=0,2.

У лунках з негативною сироваткою у розведенні від 1:10 до 1:640 з антигеном і без антигену спостерігали повний гемоліз, ОЕ становила від 0,1–0,2. У контролі сироватки на антикомплементарність у розведенні 1:10 спостерігали ОЕ менше 0,2. Позитивна контрольна сироватка у розведенні 1:10 без антигену мала оцінку «-» та ОЕ 0,2, тобто відповідала параметрам оцінки «негативно». Контролі комплекменту на активність і антигену на антикомплементарність мали ОЕ 0,1 і 0,2 і відповідали параметрам постановки реакції. Контроль гемолітичної системи на стабільність еритроцитів і контроль антигену на гемотоксичність мали ОЕ 1,1 та 1,2 і свідчили про відповідність вимогам стабільності гемсистеми і відсутності гемотоксичності антигену для еритроцитів.

Таким чином, проведені випробування постановки макро- та мікрометоду РЗК у лістеріозній імунологічній системі свідчать про специфічність і чутливість запропонованого способу виявлення антитіл. Як відомо, чутливість РЗК знаходиться в межах 0,05–0,1 мкг азоту антитіл [9]. Випробуваний мікрометод РЗК зберігає основні принципи постановки і обліку реакції зв'язування комплекменту, які використовують у макрометоді, але відрізняється меншим об'ємом застосованих компонентів реакції в 10 раз, визначенням робочої дози комплекменту тільки у гемсистемі, а також вдвічі меншим терміном постановки і обліку основного досліду реакції (10+10 хвилин). Облік результатів мікрометоду РЗК проводять без попереднього осадження еритроцитів, одразу після виймання мікроплат із шейкера- термостату. Ступінь затримки гемолізу визначають у цифрових показниках за інтенсивністю оптичної екстинції (ОЕ) на спектрофотометрі з подальшим друком електронних результатів і визначенням діагностичної оцінки «позитивно», «сумнівно», «негативно».

Висновки. 1. Проведені випробування оригінальної технології постановки та інструментального обліку результатів дослідження мікрометодом РЗК у лістеріозній імунологічній тест-системі свідчать про чутливість і специфічність розробленого способу і мають практичне значення у сучасній автоматизації серологічних скринінгових досліджень тварин щодо інфекційних хвороб.

2. Запропонований спосіб уніфікує цифрову оцінку та інтерпретацію результатів серологічних досліджень у РЗК.

Список літератури

1. Основные пути ликвидации листериоза с.-х. животных на фермах Украины [Текст] І.В. Коровін // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2012. – Вип. 96. – С. 215–216.
2. Лабораторна діагностика лістеріозу тварин [методичні рекомендації] /Т.О. Бондар (Гаркавенко), А. В. Абрамов, В. М. Івченко, В. П. Риженко – К., 2007. – 32 с.
3. Шляхи удосконалення специфічної профілактики лістеріозу / Т. О. Бондар (Гаркавенко), С. А. Дементьєва, В. О. Андріяшук // Науковий вісник Львівської Національної академії ветеринарної медицини ім. Гжицького.– 2006. – Т 8, № 4 (31). – Ч.2. – С. 11–14.
4. Epidemiological Studies on listeriosis in Sheep [Клинико-эпизоотологические исследования и диагностика листериоза у овец. (Египет. Кения)] М.А. Beskawy; E.E. Younis; E.A. Soumaya; A.A. Sawalhy // Bull. anim. Health Product. in Africa, 2010; Vol.58, N 3. - P. 262-271.
5. Chapter 2.9.7. — *Listeria monocytogenes* [Text] // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals .-5th, ed.-Paris 2014.-Vol.2.- Section 2.9.
6. Chapter 2.3.1 Bovine brucellosis [Text] // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals .-5th, ed.-Paris 2004.-Vol.1.-P 409-424.
7. Chapter 2.4.1 Ovine epididimitis [Text] // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals .-5th, ed.-Paris 2004.-Vol.1.-P 245-250.
8. Chapter 2.4.7 Ovine chlamydiosis [Text] // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals .-5th, ed.-Paris 2004.-Vol.1.-P 635-641.
9. Фрімель Х., Брок Й. Основи імунології, М.,-1988.-254с.

COMPARISON OF VISUAL AND INSTRUMENTAL TYTRATSIYI LISTERIOZIS SERUM IN CFT AND m- CFT WITH DIFFERENT DOSES OF ANTIGEN

Bliznetsov A. G.

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

The purpose of the work. The original technology was try setting and computer accounting micromethod CFT for the detection of antibodies against Listeriosis of animals.

Results and conclusions. Tests original technology tool setting and accounting research results micromethod CFT listeriosis in immunological test system were demonstrate the sensitivity and specificity of the developed method and practical importance in modern automation serological screening studies on animal infectious diseases. The potential of CFT-reliably detect animals with low antibody titers listeriosis confirms the prospects of using this method in research in the field. The proposed method unifies digital evaluation and interpretation of serological findings in CFT and ELISA.

Keywords: *Listeriosis, micromethod CFT, sensitivity and specificity*