influenza subtype H5N1 from donkeys. / Abdel-Moneim A.S., Abdel-Ghany A.E. & Shany A.S.S. // J. Biomed. Sci., doi., 10.1186/1423-0127. – 2010. – P. 17 – 25.

10. Jevtushenko V.A. Oderzhannja giperimunnyh syrovatok krovi do virusiv grypu konej / V.A. Jevtushenko // Buletin “Veterynarna biotehnologija”. – 2005. – №6. – S. 54–59.

11. Sergeev V.A. Struktura y byologyja vyrusov zhyvotnyh / V.A. Sergeev, Orljankyn B.G. – M.: Kolos, 1983 – 336 s.

12. Sjuryn V.N. Veterynarnaja vyrusologyja / Sjuryn V.N., Belousova R.V., Fomyna N.V. – M.: Agropromyzdat, 1991 – 432 s.

13. Zhdanov V.M. Obshhaja y chastnaja vyrusologyja: Rukovodstvo pod red. V.M. Zhdanova, S.J. Gajdamovych; AMN SSSR. – M.: Medycyna, 1982 – 520 s.

14. Sjuryn V.N. Diagnostyka vyrusnyh boleznej zhyvotnyh: Spravochnyk / N.V. Sjuryn, R.V. Belousova, N.F. Fomyna. – M. Agropromyzdat, 1991, — 528 s.

15. Transmission of equine influenza virus to dogs / Crawford P.C., Dubovi E.J., Castleman W.L. [et al.] // Science. 310. — 2005. — P. 482–485.

16. Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza virus from pigs in China. / Tu J., Zhou H., Jiang T. [et al.] // Arch. Virol., 154, — 2005 — P. 887–890.

УДК 619:579.257/.834.115-07

ПИСКУН А.В.
Інститут ветеринарної медицини НААН

ПІДБІР ОПТИМАЛЬНОГО КОН’ЮГАТУ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ НА ЛЕПТОСПІРОЗ

Дана стаття присвячена підбору оптимального кон’югату для постановки імуноферментної тест-системи на лептоспіроз. Наведено та проаналізовано результати досліджень проб сироваток крові вакцинованих кролів, а також хворих і здорових тварин дикої фауни (диких кабанів), собак, свиней та ВРХ, що досліджувались шляхом постановки твердофазного імуноферментного аналізу з використанням кон’югатів, спрямованих на Ig класів M та G.

При порівнянні результатів серологічних досліджень польових проб сироваток крові та проб від вакцинованих кролів, було встановлено, що оптичні показники за використання імуноферментного аналіза на Ig M були вірогідно вищими за такі при постановці його на Ig G.

Ключові слова: *лептоспіроз, імуноферментний аналіз, реакція мікроаглютинації, імуноглобуліни.*

Вступ. Для діагностики різних інфекційних захворювань, виявлення специфічних антигенів та антитіл у біологічних рідинах (плазма та сироватка крові, сеча, слина, молоко тощо) широко застосовують метод імуноферментного аналізу (ІФА), який став надійним помічником лікарів-лаборантів медичних та ветеринарних закладів. Найпоширенішим нині є твердофазний метод ІФА (ТІФА) завдяки ряду безперечних переваг. До них

відносять високу чутливість, специфічність та відтворюваність результатів, можливість використання мінімальних об’ємів досліджуваних зразків біологічних рідин та багато інших [1]. У всіх варіантах ТІФА невід’ємною складовою є кон’югат ферменту із специфічними або антивидовими антитілами чи антигенами та проявник (суміш субстрату з хромогеном), адже в результаті ферментативної реакції з субстратом за допомогою хромогену реакційна суміш забарвлюється, що дає змогу візуально або автоматично оцінювати наявність антигенів або антитіл в досліджуваному матеріалі [2].

Кон’югат – штучна молекула, що складається з двох хімічно об’єднаних компонентів, часто різного походження. Зазвичай використовуються кон’югати, які містять ферментну (чи іншу) мітку, пришиту до антигену (антигенів), антитіл чи рекомбінантних білків (білок *A Staphylococcus aureus*) [3].

Завдяки опрацюванню ІФА з’явилася можливість кількісно визначати антитіла у широкому діапазоні концентрацій. Даний метод дозволяє також легко розрізняти за активністю антитіла, що належать до різних класів імуноглобулінів. Об’єктивність якісних та кількісних оцінок забезпечується фотометрією, при якій інтенсивність реєстрованих сигналів безпосередньо корелює з рівнем визначених антитіл [1]. При наявності відповідного антигену та підборі оптимального кон’югату, спрямованого на певні класи Ig, з ферментною міткою, можна створювати тест-системи для діагностики багатьох інфекційних захворювань [2].

Так, наприклад, при розробці ТІФА для діагностики лептоспірозу, необхідно враховувати те, що провідна роль у гуморальному імунітеті при цьому захворюванні належить Ig класів *G* та *M* [4].

Антитіла класу Ig M належать до «ранніх». За лептоспірозної інфекції вони починають продукуватися на 5–7 день після зараження. Ці Ig мають високу авідність, активують комплемент класичним шляхом, не проходять крізь плаценту. На кожний «новий» для організму антиген, у тому числі і на патогенні лептоспіри, в організмі утворюються антитіла саме цього класу. Оскільки Ig M мало специфічні, вони можуть зв’язувати відразу п’ять молекул антигену [5, 6].

Антитіла класу Ig G є основними у вторинній імунній відповіді. За даними літературних джерел, при зараженні лептоспірозом вони починають формуватися з 14-го дня і досягають максимальної активності на 28–45 добу, потім поступово знижуються та зберігаються до 5–7 місяців [4]. Їх основною біологічною функцією є – захист організму від збудників інфекції і продуктів їх життєдіяльності за рахунок активації комплементу, опсонізації й активації фагоцитозу [5, 6].

За даними літературних джерел, за більшості інфекційних хвороб, Ig M активно формуються лише у перші дні після інфікування і вже через декілька тижнів вони заміщуються антитілами класу G, що циркулюють у кров’яному руслі протягом усього перебігу інфекції. Однак, у той же час, є повідомлення, що грамнегативні бактерії (зокрема збудники кишкових інфекцій) спричинюють продукування у більшій мірі антитіл Ig M протягом усього

патогенезу захворювання і, що даний імуноглобулін має вищу антитоксичну активність, ніж у інших класів антитіл [6].

Так як патогенні лептоспіри *L. interrogans* належать до грамнегативних бактерій та містять у своєму складі надзвичайно сильні ендотоксини (асоційовані з ліпідом А), що є складовою частиною ліпополісахариду [4, 7], і у зв’язку з цим, Ig M можуть мати вирішальне значення в імунітеті даного захворювання разом з Ig G, було прийнято рішення порівняти результати постановки ТІФА з використанням кон’югатів спрямованих на ці два класи антитіл.

Мета роботи підібрати оптимальний кон’югат для постановки ТІФА на лептоспіроз.

Матеріали і методи досліджень. Для виконання поставленої мети провели постановку ТІФА у двох модифікаціях:

1) непрямий варіант ТІФА з кон’югатом на основі рекомбінантних білка G *Streptococcus spp*. та білка А *Staphylococcus aureus*, які кон’югували з пероксидазою хрону (спрямований на Ig G);

2) «сандвіч-метод» з кон’югатом на основі антигену LipL 32, який кон’югували з пероксидазою хрону (спрямований на Ig M).

Реакцію ставили на мікропланшетах фірми *SARSTEDT*, США з сорбованим на них рекомбінантним білком LipL 32 у якості антигену. ІФА ставили із сироватками крові вакцинованих кролів (на 0, 7, 11, 14 та 20 дні після вакцинації) та польовими пробами сироваток хворих і здорових тварин дикої фауни (дикі кабани), а також собак, свиней та ВРХ.

Попередньо на базі лабораторії безпеки і якості продукції АПК НУБіП України була проведена внутрішньом’язова імунізація моновакциною до серовару *hardjo*, серогрупи *Sejroe* 4-х кролів у дозі по 0,5 мл. Через 7 днів проведена ревакцинація. На 0, 7, 11, 14 та 20 дні проводили дослідження проб сироваток крові у РМА на наявність титрів антитіл до данного збудника. Окремо була сформована контрольна група із двох кролів, яких не вакцинували.

Сироватки крові диких кабанів та сільськогосподарських тварин, що надходили до лабораторії лептоспірозу с.-г. тварин з музеєм мікроорганізмів ІВМ НААН, були досліджені методом РМА з використанням антигенів 8 серологічних груп лептоспір, рекомендованих для дослідження в державних лабораторіях ветеринарної медицини України: *Sejroe (*серовар *polonica), Hebdomadis (*серовар *kabura), Tarassovi (*серовар *tarassovi), Pomona (*серовар *pomona), Grippotyphosa (*серовар *grippotyphosa), Canicola (*серовар *canicola), Icterohaemorrhagiae (*серовар *copenhageni), Australis (*серовар *bratislava).*

Результати досліджень та їх обговорення. У таблицях 1 та 2 наведено результати досліджень сироваток крові кролів у РМА та у ТІФА спрямованому на Ig M та Ig G у різні дні експерименту.

Таблиця 1

Результати серологічних досліджень імунізованих кролів

Дні експерименту		№ з/п кролів			
		1	2	3	4
		Серологічні показники			
0	РМА	–	–	–	–
	ІФА *Ig G*	0,073	0,081	0,069	0,093
	ІФА *Ig M*	0,106	0,100	0,092	0,105
7	РМА	–	–	–	–
	ІФА *Ig G*	0,091	0,088	0,092	0,101
	ІФА *Ig M*	0,117	0,109	0,107	0,112
11	РМА	++1:50	–	++ 1:50	–
	ІФА *Ig G*	0,102	0,095	0,110	0,111
	ІФА *Ig M*	0,151	0,260	0,172	0,145
14	РМА	++ 1:200	++ 1:100	++ 1:200	++ 1:100
	ІФА *Ig G*	0,311	0,115	0,203	0,118
	ІФА *Ig M*	0,696	0,341	0,423	0,308
20	РМА	++ 1:400	++ 1:400	++ 1:400	++ 1:200
	ІФА *Ig G*	0,331	0,244	0,224	0,218
	ІФА *Ig M*	1,290	1,116	1,431	0,475

Таблиця 2

Результати серологічних досліджень контрольної групи кролів

Дні експерименту		№ з/п кролів	
		1	2
		Серологічні показники	
7	РМА	–	–
	ІФА *Ig G*	0,081	0,096
	ІФА *Ig M*	0,108	0,101
11	РМА	–	–
	ІФА *Ig G*	0,076	0,087
	ІФА *Ig M*	0,112	0,094
14	РМА	–	–
	ІФА *Ig G*	0,089	0,108
	ІФА *Ig M*	0,114	0,115
20	РМА	–	–
	ІФА *Ig G*	0,097	0,099
	ІФА *Ig M*	0,117	0,112

Аналізуючи отримані дані бачимо, що на 0 (день вакцинації) та на 7 дні досліду всі три серологічні методи дають результат, що корелює з таким у контрольної групи тварин і є негативним. Титри антитіл у РМА з’явилися у 2-х імунізованих кролів на 11 день досліду, тоді як ІФА Ig M є позитивним, а ІФА Ig G – негативним у всіх 4-х щеплених кролів (табл. 1, 2).

На 14 та 20 дні досліду три серологічні методи дають позитивні реакції у всіх імунізованих тварин, однак оптичні показники за використання ІФА Ig M є більшими за такі при ІФА Ig G (рис. 1).

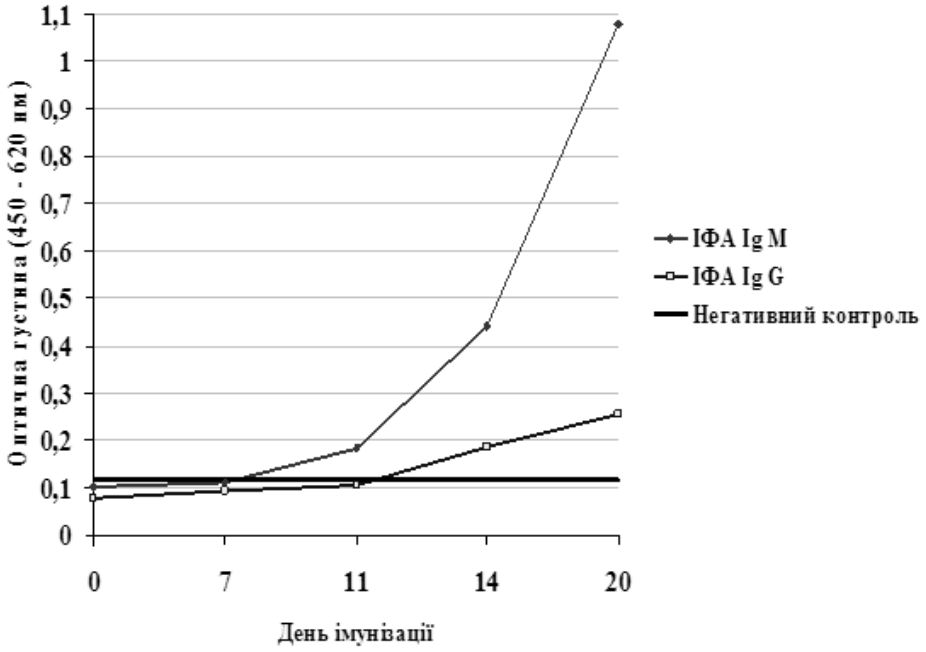

Рис. 1. Порівняння оптичних показників ІФА на різних кон’югатах

Отримані результати корелюють із даними літератури, що свідчать про кількісну перевагу Ig M у перші кілька тижнів після зараження над Ig G. Однак, аналізуючи отримані дані по результатам досліджень польових сироваток хворих та здорових тварин, бачимо схожу ситуацію.

Проведено обидва варіанти ТІФА 50 проб сироваток крові диких кабанів. Дані сироватки були підібрані для досліду, адже вони мали широкий спектр діагностичних лептоспірозних титрів (++1:50 – ++1:2500).

Сироватки у кількості п’яти проб, що прореагували у РМА як негативні на лептоспіроз, були такими ж і за обох ІФА. Вісім проб, у яких була виявлена монореакція за РМА в титрах ++1:50 – ++1:100, що є діагностичними, у ІФА Ig G інтерпретувалися як негативні і були в межах 0,053–0,093 (0,069±0,0043). У ІФА Ig M оптичне значення було високо вірогідно вищим ($p < 0,001$) і вказувало на позитивну реакцію.

Сироваток крові, у яких би прореагував один штам у титрах ++1:500 – ++1:2500 діагностовано не було. За змішаної реакції у РМА як у високих, так і у низьких титрах оптичні показники ІФА Ig M були вищими (відповідно, $p < 0,05$ та $p < 0,001$) (табл. 3).

Подібні результати були отримані і при дослідженні 47 проб позитивних та негативних сироваток крові собак, свиней та ВРХ.

Негативні проби за РМА були такими ж і за обох варіантів ТІФА. Оптичні показники Ig M за використання ІФА високо вірогідно перевищують такі у ІФА Ig G за монореакцій у титрах ++1:50 – ++1:100 ($p < 0,001$). У

інших випадках результати цього варіанту ТІФА також корелюють з РМА та є вірогідно вищими (табл. 4).

Таблиця 3

Результати порівняння серологічних досліджень проб сироваток крові диких кабанів, M ± m

Виявлені титри антитіл в РМА	Кількість сироваток крові	Оптичний показник	
		ІФА Ig G	ІФА Ig M
Негативні проби	5	0,048±0,0034	0,108±0,0035 **
Монореакція у титрі ++1:50 – ++1:100	8	0,069±0,0043	0,196±0,012 **
Поліреакція у титрах ++1:50 – ++1:100	5	0,238±0,043	0,451±0,059 *
Монореакція у титрі ++1:500 – ++1:2500	–	–	–
Поліреакція у титрах ++1:100 – ++1:2500	32	0,751±0,064	1,63±0,14 **

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Встановлено, що у вакцинованих лептоспірозним сероваром *hardjo*, серогрупи *Sejroe* кролів антитіла класу М залишаються на вищому рівні у сироватці крові, ніж Ig G до 20 дня після імунізації.

2. При порівнянні результатів серологічних досліджень проб сироваток крові диких кабанів та сільськогосподарських тварин було встановлено, що оптичні показники за використання ІФА Ig M були вірогідно вищими за такі при постановці ІФА Ig G.

Таблиця 4

Результати порівняння серологічних досліджень проб сироваток крові собак, свиней та ВРХ, M ± m

Виявлені титри антитіл в РМА	Кількість сироваток крові	Оптичний показник	
		ІФА Ig G	ІФА Ig M
Негативні проби	11	0,078±0,0022	0,098±0,0019 ***
Монореакція у титрі ++1:50 – ++1:100	19	0,088±0,0017	0,207±0,011 ***
Поліреакція у титрах ++1:50 – ++1:100	3	0,14±0,024	0,372±0,068 *
Монореакція у титрі ++1:500 – ++1:2500	4	0,134±0,019	0,57±0,054 ***
Поліреакція у титрах ++1:100 – ++1:2500	10	1,19±0,179	2,28±0,198 **

Примітка: * $p < 0,05$; **$p < 0,01$, ***$p < 0,001$

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Уховський В.В. Порівняльна характеристика сучасних методів лабораторної діагностики лептоспірозу с/г тварин та перспектива розробки дот-ІФА з метою її

удосконалення / В. В. Уховський [та ін.] // Бюллетень «Ветеринарна біотехнологія». – 2013. – № 23. – С. 259 – 260.

2. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.]. – Москва: Высшая школа, 1991. – 288 с.

3. Чумак Р.М. Імуноферментний аналіз і рекомбінантні антигени / Р.М. Чумак // Лабораторна діагностика. – 1999. – № 3. – С. 3 – 6.

4. Недосєков В.В. Лептоспіроз сільськогосподарських тварин / В.В. Недосєков [та ін.]. – Київ, 2011. – 139 с.

5. Вершигора А.Ю. Ветеринарна Імунологія / А.Ю. Вершигора [та ін.] – Київ: Вища школа, 2005. – 599 с.

6. Клінічна імунологія та алергологія: Підручник / Г.М. Драннік [та ін.]. – Київ: Здоров’я, 2006. – 888 с.

7. Хронічні інфекційні хвороби тварин / Л.Є. Корнієнко [та ін.]. – Біла Церква, 2009. – 291 с.

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОГО КОНЬЮГАТА ДЛЯ ПОСТАНОВКИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ЛЕПТОСПИРОЗА / Пискун А. В.

Данная статья посвящена подбору оптимального коньюгата для постановки иммуноферментной тест-системы на лептоспироз. В ней приведены и проанализированы результаты исследований проб сывороток крови вакцинированных кролей, а также больных и здоровых животных дикой фауны (диких кабанов), собак, свиней и КРС, исследованные путём постановки твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коньюгатов, направленных на Ig классов M и G.

При сравнении результатов серологических исследований полевых проб сывороток крови и проб от вакцинированных кролей, было установлено, что оптические показатели Ig M при использовании ИФА были достоверно выше таких при постановке ИФА Ig G.

Ключевые слова: *лептоспироз, иммуноферментный анализ, реакция микроагглютинации, иммуноглобулины.*

SELECTION OF OPTIMAL CONJUGATE FOR THE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY AGAINST LEPTOSPIROSIS / Pyskun A.V.

Introduction. *Currently, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the most common method of immunosorbent assays because of the number of undeniable advantages. These are high sensitivity, specificity and reproducibility, the use of minimal amounts of samples of biological fluids and many others. The enzyme conjugate with as specific so antispecies antibodies or antigens and developer (mixture of substrate with chromogen) is an integral part in all variants of ELISA because the enzymatic reaction of a substrate with chromogen enables estimate visually or automatically presence of antigens or antibodies in the test material.*

The goal of the work *was to select optimal conjugate for the ELISA against leptospirosis.*

Materials and methods of research. *To perform this reseach we used two variants of ELISA.*

1) indirect ELISA with conjugate based on recombinant protein G of Streptococcus spp. and protein A of the Staphylococcus aureus conjugated with horseradish peroxidase (target Ig G);

2) "Sandwich method" with conjugate based on antigen LipL 32 conjugated with horseradish peroxidase (target Ig M).

The reaction was performed on microplates produced by SARSTEDT, USA with sorbed recombinant protein LipL 32 as antigen. ELISA was carried out with blood sera from vaccinated rabbits (0, 7, 11, 14 and 20 days after vaccination) and field samples sera from sick and healthy wild animals (wild boars), dogs, pigs and cattle as well.

Sera of immunized rabbits, wild boars, dogs, pigs and cattle were investigated by MAT, using antigens of eight serological groups of leptospira, that are recommended for research in the State veterinary laboratories of Ukraine: Sejroe (serovar polonica), Hebdomadis (serovar kabura), Tarassovi (serovar tarassovi), Pomona (serovar pomona), Grippotyphosa (serovar grippotyphosa), Canicola (serovar canicola), Icterohaemorrhagiae (serovar copenhageni), Australis (serovar bratislava).

Results of research and discussion. *Analyzing the obtained data it was set, that on 0 (day of vaccination) and on 7 days of the experiment all three serological methods gave results that correlate with that in the control group of animals and are negative. Antibody titers in MAT appeared in 2 immunized rabbits on 11 day of the experiment, whereas Ig M ELISA is positive, and ELISA Ig G – negative in all 4 vaccinated rabbits.*

On 14 and 20 days of studies three serological methods provide positive response in all immunized animals, but optical performance by using ELISA Ig M are higher than those in ELISA Ig G.

The both variants of ELISA 50 samples of blood sera from wild boars were done. These sera were chosen for the research because they have a wide range of diagnostic leptospirosis titers (++ 50 – ++ 1: 2500).

Sera in quantities of five samples that reacted in MAT as negative for leptospirosis, were the same in both ELISA. Eight samples, that have been detected monoreaction by MAT in titers ++ 1:50 – ++ 1:100, in ELISA Ig G were interpreted as negative and were within 0,053–0,093 (0,069±0,0043). In ELISA Ig M optical values were highly significantly bigger ($p < 0,001$) and indicated as a positive reaction.

Similar results were obtained in the study of 46 samples positive and negative blood sera from dogs, pigs and cattle. Optical performance of ELISA Ig M were higher in mono- and polireactions in MAT in the high and at low titers ($p < 0,05$, $p < 0,001$).

Keywords: *leptospirosis, enzyme-linked immunosorbent assay, microscopic agglutination test, immunoglobulins.*

References

1. Uhovs'kij V. V. Porivnjal'na harakteristika suchasnih metodiv laboratornoï diagnostiki leptospirozu s/g tvarin ta perspektiva rozrobki dot-IFA z metoju ïï udoskonalennja / V. V. Uhovs'kij [ta in.] // Veterinarna biotehnologija. – 2013. – № 23. – S. 259 – 260.

2. Teorija i praktika immunofermentnogo analiza / A. M. Egorov [i dr.] . – M.: Vysshaja shkola, 1991. – 288 s.

3. Chumak R. M. Imunofermentnij analiz i rekombinantni antigeni / R. M. Chumak // Laboratorna diagnostika. – 1999. – № 3. – S. 3 – 6.

4. Nedosєkov V. V. Leptospiroz sil's'kogospodars'kih tvarin / V. V. Nedosєkov [ta in.]. – K., 2011. – 139 s.

5. Vershigora A. Ju. Veterinarna Imunologija / A. Ju. Vershigora [ta in.] – K.: Vishha shkola, 2005. – 599 s.

6. Klinichna imunologija ta alergologija: Pidruchnik / G. M. Drannik [ta in.]. – K.:Zdorov’ja, 2006. – 888 s.

7. Hronichni infekcijni hvorobi tvarin / L.Є. Kornієnko [ta in.]. – Bila Cerkva, 2009. – 291 s.