

УДК 636:616.98:57.083.33

КОЗІЙ Р.В., мол. наук. співробітник

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

СКРИПНИК В.Г., д-р вет. наук

Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи

НАБІР ДЛЯ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ САПУ В РЕАКЦІЇ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ

Сап – небезпечне зооантропонозне захворювання, яке викликається грамнегативною бактерією *Burkholderia mallei*. Оскільки в Україні відсутні діагностикуми власного виробництва для виявлення сапу, метою наших досліджень було виготовити набір для діагностики сапу в РЗК, який складається з антигену та позитивної контрольної сироватки, визначити діагностичну чутливість і специфічність отриманого антигену та активність отриманої позитивної сироватки.

Було встановлено, що діагностична чутливість отриманого антигену склала 79,3 %, а специфічність – 98,97 %, що не поступається комерційним аналогам. Визначено, що отримана позитивна контрольна сапна сироватка має високу активність у РЗК і може бути використана як позитивний контроль.

Ключові слова: сап, коні, серологічна діагностика, реакція зв'язування комплексу.

Постановка проблеми. Сап – небезпечне зооантропонозне захворювання, яке викликається грамнегативною бактерією *Burkholderia mallei*. На сап хворіють в основному коні, віслюки і мули. Збудник сапу нестійкий у зовнішньому середовищі, тому основним джерелом та резервуаром збудника у природі є інфіковані тварини [1]. У зв'язку з цим виявлення та ізоляція хворих тварин має вирішальне значення для попередження занесення сапу на територію України.

Діагноз на сап можна поставити лише на основі комплексних досліджень, серед яких важливу роль посідає лабораторна діагностика [2]. Існує ряд методів лабораторної діагностики сапу, однак єдиним методом, визнаним МЕБ, є реакція зв'язування комплексу (РЗК) [3]. На жаль, в Україні відсутні діагностикуми власного виробництва для виявлення сапу.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. На початку ХХ століття сап був широко розповсюджений на території Європи, та зокрема в Україні. До 1960 рр. це захворювання було ліквідовано практично на всій території Європи, Північної Америки та колишнього СРСР [4]. Цьому сприяли наступні фактори: зменшення поголів'я коней внаслідок зниження їхнього економічного та військового значення, широке застосування малеїнізації та лабораторних методів діагностики (РЗК, РА), а також жорстке відділення та знищення хворих або підозрілих у захворюванні коней [5].

Незважаючи на успіхи у боротьбі з сапом, ця хвороба залишилась ендемічною в регіонах Азії, Африки та Південної Америки [6]. Більше того, в останні роки відмічається збільшення кількості спалахів сапу в ендемічних регіонах [3, 7–11]. Розвиток міжнародної торгівлі, завезення коней для змагань тощо підвищує ризик занесення сапу на вільні території. Так, у грудні 2014 року сап було діагностовано у Німеччині, хоча ця країна вважалася вільною від сапу з 1955 року [3].

Отже, профілактика та боротьба з сапом коней залишається актуальною проблемою ветеринарної медицини у світі. В основі програми з профілактики сапу в Україні лежить регулярне серологічне обстеження поголів'я коней з метою своєчасного виявлення та ізоляції серопозитивних тварин [2]. Основним методом серологічної діагностики сапу залишається РЗК [3]. У Європі існує ряд комерційних наборів для діагностики сапу в РЗК, в тому числі виробництва USDA (США), CIDC (Нідерланди), s.c.pro (Німеччина), Bioveta (Чехія), БІОК (Росія) [12]. Ці набори виготовляють з різних виробничих штамів та мають різну діагностичну чутливість і специфічність [12]. В Україні відсутні засоби діагностики сапу власного виробництва, внаслідок чого існує залежність від імпорту діагностикумів, в основному з Росії.

Мета дослідження – виготовити набір для діагностики сапу в РЗК, який складається з антигену та позитивної контрольної сироватки. Визначити діагностичну чутливість та специфічність отриманого антигену. Визначити активність отриманої позитивної сироватки.

Матеріал і методика досліджень. Виготовлення набору для діагностики сапу в РЗК проводили у два етапи. На першому етапі виготовляли антиген та визначали його діагностичну чутливість і специфічність, на другому – отримували контрольну позитивну сироватку.

Нашими попередніми дослідженнями було доведено більшу ефективність антигену, виготовленого з кількох штамів збудника сапу порівняно з моновалентним антигеном. Тому під час виготовлення експериментальної серії антигену ми використовували штами збудника сапу *B. mallei* Bogor, Mukteswar та Zagreb. Культури висівали на кров'яний агар з додаванням 3 % гліцерину (МПКАГ) та інкубували за температури 37 °С протягом 72 год. Потім кожен штам пересівали на Brucella-agar. Через 24 та 48 годин відмічали ніжний ріст чистих культур *B. mallei*. Через 72 години кожен культуру пересівали на 3 матраці площею 600 см², які містили Brucella-agar. Для цього 1 петлю бактеріальної маси ресуспендували у 3 см³ 0,9 % NaCl та наносили на матраці. Через 5 діб інкубації за температури 37 °С відмічали суцільний ріст *B. mallei* і проводили змив бактеріальної маси. Для цього в матраці додавали 10 см³ 0,9 % NaCl та обережно знімали ріст *B. mallei* за допомогою шпателя. Суспензію бактеріальної маси відбирали за допомогою піпетки та переносили у флакон. Змив повторювали додаванням до матраців 3 см³ 0,9 % NaCl, суспензію відбирали у той же флакон. Усі флакони з суспензією бактеріальної маси центрифугували за 1200 g протягом 10 хв за температури 4 °С (Biofuge Prime кутовий ротор 7588). Після цього надосадову рідину зливали, додавали 30 см³ 0,9 % NaCl, змішували на вортексі та центрифугували за 1200 g протягом 10 хв за температури 4 °С. Промивання повторювали двічі. Після останнього промивання визначали масу осаду бактеріальної маси та готували 2 % суспензію в 0,9 % NaCl з 0,5 % фенолу. Отриману суспензію розподіляли у пробірки по 20–25 см³ та інактивували протягом 3 годин при температурі 80 °С. Після інактивації проводили контроль стерильності отриманого антигену. Для цього 10 % об'єму отриманого антигену наносили на МПКАГ та інкубували в аеробних умовах за температури 37 °С. Наявність росту мікроорганізмів контролювали протягом 10 днів. За відсутності росту мікроорганізмів протягом цього періоду отриманий антиген вважали інактивованим та стерильним.

Для визначення робочої концентрації виготовленого антигену готували послідовні розведення антигену 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 та ставили РЗК з референтною позитивною сироваткою (с.с.рго, Німеччина) з відомим титром 1:160 (±1 розведення). Після визначення розведення, близького до робочого, готували більш близькі розведення антигену: 1:10, 1:15, 1:20 і т. д. до 1:45. За оптимальну робочу концентрацію брали ту концентрацію, яка відповідає титру референтної позитивної сироватки (с.с.рго, Німеччина), а також не викликає інгібування зв'язування комплементу у системі контролю за постановки РЗК.

Визначення діагностичної чутливості та специфічності проводили згідно з Martin et al. [13]. Панель негативних зразків сироватки складала n=400, панель позитивних зразків сироватки – n= 92.

Під час другого етапу проведення досліджень для отримання позитивної сапної сироватки проводили імунізацію кролів отриманим сапним антигеном за схемою, вказаною у таблиці 1 згідно з раніше описаною методикою [14].

Таблиця 1 – Схема отримання позитивної сироватки для РЗК для серологічної діагностики сапу

День	Місце введення	Доза, см ³
0	внутрішньошкірно	2 (у 10 точок по 0,2 см ³)
3	внутрішньошкірно	2 (у 10 точок по 0,2 см ³)
10	внутрішньовенно	0,5
17	внутрішньовенно	0,5
24	внутрішньовенно	0,5
31	внутрішньовенно	0,5
38	внутрішньовенно	0,5
45	внутрішньовенно	0,5
52	відбір крові	

Результати дослідження та їх обговорення. Результати визначення діагностичної чутливості та специфічності отриманого антигену вказані у таблиці 2.

Таблиця 2 – Результати визначення діагностичної чутливості та специфічності антигену сапного

Група	n	Антиген сапний експериментальний		
		АКА	поз.	нег.
Позитивна панель сироваток	92	10	65	17
Негативна панель сироваток	400	11	4	385

Примітка. АКА – антикомплемтарна активність; Поз. – позитивний результат; Нег. – негативний результат.

Зразки сироватки крові, які показали антикомплементарну активність, не враховували у розрахунку діагностичної чутливості і специфічності. За результатами, вказаними у таблиці 2, діагностична чутливість отриманого антигену склала 79,3 %, а діагностична специфічність – 98,97 %. За результатами наших попередніх досліджень та за літературними даними, чутливість та специфічність комерційних наборів для діагностики сапу в РЗК варіює [12, 15, 16]. Так, за нашими даними, антиген виробництва Курської біофабрики БИОК, Росія, який широко використовується в Україні для діагностики сапу, має діагностичну чутливість 78,4 %, а специфічність – 99,7 % [17]. Отже, виготовлений нами антиген не поступається комерційно доступним аналогам іноземного виробництва.

РЗК для визначення активності одержаної сироватки ставили згідно з Методичними вказівками з діагностики сапу, затверджених Наказом Державного комітету ветеринарної медицини України № 214 від 11.06.2010. За результатами РЗК встановили, що активність отриманої сироватки склала +++ у розведенні 1:320. На нашу думку, ця сироватка може бути використана як позитивний контроль під час проведення серологічних досліджень для діагностики сапу коней в Україні.

Висновки та перспективи подальших досліджень. 1. Розроблено набір для діагностики сапу в РЗК, який складається з тривалентного антигену та позитивної контрольної сироватки.

2. Встановлено, що діагностична чутливість отриманого антигену склала 79,3 %, а специфічність – 98,97 %, що не поступається комерційним аналогам.

3. Визначено, що отримана позитивна контрольна сапна сироватка має високу активність у РЗК і може бути використана як позитивний контроль.

Вважаємо, що важливим напрямом подальших досліджень є отримання та дослідження ефективності моноклональних антитіл, специфічних до окремих антигенів ліпополісахариду збудника сапу *B. mallei*. Ідентифікація нових білкових антигенів, а також вивчення специфічних епітопів ліпополісахариду та капсульного полісахариду дозволить значно підвищити чутливість та специфічність серологічних методів діагностики сапу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Al-Ani F.K. Glanders in horses: a review of literature / F.K. Al-Ani, J. Robertson // Veterinarski Arhiv, 2007. – Vol. 77 (3). – P. 203–218.
2. Інструкція щодо профілактики та боротьби з сапом тварин, затверджена Наказом Державного комітету ветеринарної медицини України №449 від 21.10.2010.
3. OIE Terrestrial Manual 7th Edition, Chapter 2.5.11. Glanders, 2013. Available at: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online>, 12.03.15.
4. Gregory B.C. Chapter 6 Glanders / B.C. Gregory, D.M. Waag // Medical Aspects of Biological Warfare. – 2006. – P. 95–106.
5. Derbyshire J.B. Eradication of glanders in Canada / J.B. Derbyshire // Can. Vet. Journal, 2002. – Vol. 43. – P. 723–726.
6. Dvorak G.D. Glanders / G.D. Dvorak, A.R. Spickler // JAVMA, 2008. – Vol. 233 (4). – P. 570–577.
7. Glanders – a reemerging zoonotic disease: a review / A.K. Verma, M. Saminathan, R. Tiwari et al. // Journal of biological sciences, 2014. – Vol. 14(1). – P. 38–51.
8. Natural *Burkholderia mallei* Infection in Dromedary, Bahrain / U. Wernery, R. Wernery, M. Joseph et al. // Emerging Infectious Diseases, 2011. – Vol. 17 (7). – P. 1277–1279.
9. Glanders outbreak at Tehran Zoo, Iran / P. Khaki, N. Mosavari, S. Khajeh Nasiri et al. // Iranian Journal of Microbiology, 2012. – Vol. 4 (1). – P. 3–7.
10. Equine glanders in Turkey / H. Arun, A. Neubauer, G. Gurel et al. // Veterinary Record, 1999. – Vol. 144. – P. 255–258.
11. Ein im Jahr 2006 nach Deutschland importierter Rotz-Fall zeigt, dass diese Erkrankung eine allgegenwärtige Gefahr ist / M. Elschner, E. Liebler-Tenorio, P. Wohlsein et al. // FLI Jahresbericht, 2006. – Vol. 12. – P. 67–71.
12. Glanders in animals: a review of epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures / I. Khan, L.H. Wieler, F. Melzer et al. // Transboundary and Emerging Diseases, 2013. – Vol. 60 (3). – P. 204–221.
13. Martin S.W. The Evaluation of Tests / S.W. Martin // Can. J. comp. med., 1977. – Vol. 41. – P. 19–25.
14. Elschner M.C. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders BMC / M.C. Elschner, H.C. Scholz, F. Melzer // Veterinary Research, 2011. – Vol. 7 (4). – P. 134–140.
15. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders / A. Naureen, M. Saqib, G. Muhammad et al. // J. Vet. Diagn. Invest., 2007. – Vol. 19. – P. 362–367.
16. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses / L.D. Sprague, R. Zachariah, H. Neubauer et al. // Veterinary Research, 2009. – Vol. 5 (3). – P. 221–226.
17. Koziy R. Evaluation of several complement fixation test antigens and a Rose-Bengal test antigen for serological diagnosis of glanders / R. Koziy, M.C. Elschner, F. Melzer // 16th International symposium of the world association of veterinary laboratory diagnosticians (WAVLD), 2013. – P. 1.

REFERENCES

1. Al-Ani F.K. Glanders in horses: a review of literature / F.K. Al-Ani, J. Robertson // *Veterinarski Arhiv.* – 2007. – Vol. 77 (3). – P. 203–218.
2. Instrukcija shhodo profilaktyky ta borot'by z sapom tvaryn, zatverdzhena Nakazom Derzhavnogo komitetu veterynamoi' medycyny Ukraïny № 449 vid 21.10.2010.
3. OIE Terrestrial Manual 7th Edition, Chapter 2.5.11. Glanders, 2013. Available at: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online>, 12.03.15.
4. Gregory B.C. Chepter 6 Glanders / B.C. Gregory, D.M. Waag // *Medical Aspects of Biological Warfare.* – 2006. – P. 95–106.
5. Derbyshire J.B. Eradication of glanders in Canada / J.B. Derbyshire // *Can. Vet. Journal.* – 2002. – Vol. 43. – P. 723–726.
6. Dvorak G.D. Glanders / G.D. Dvorak, A.R. Spickler // *JAVMA.* – 2008. – Vol. 233 (4). – P. 570–577.
7. Glanders – a reemerging zoonotic disease: a review / A.K. Verma, M. Saminathan, R. Tiwari [et al.] // *Journal of biological sciences.* – 2014. – Vol. 14 (1). – P. 38–51.
8. Natural *Burkholderia mallei* Infection in Dromedary, Bahrain / U. Wernery, R. Wernery, M. Joseph [et al.] // *Emerging Infectious Diseases.* – 2011. – Vol. 17 (7). – P. 1277–1279.
9. Glanders outbreak at Tehran Zoo, Iran / P. Khaki, N. Mosavari, S. Khajeh Nasiri [et al.] // *Iranian Journal of Microbiology.* – 2012. – Vol. 4 (1). – P. 3–7.
10. Equine glanders in Turkey / H. Arun, A. Neubauer, G. Gurel [et al.] // *Veterinary Record.* – 1999. – Vol. 144. – P. 255–258.
11. Ein im Jahr 2006 nach Deutschland importierter Rotz-Fall zeigt, dass diese Erkrankung eine allgegenwärtige Gefahr ist / M. Elschner, E. Liebler-Tenorio, P. Wohlsein [et al.] // *FLI Jahresbericht.* – 2006. – Vol. 12. – P. 67–71.
12. Glanders in animals: a review of epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures / I. Khan, L.H. Wieler, F. Melzer [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases.* – 2013. – Vol. 60 (3). – P. 204–221.
13. Martin S.W. The Evaluation of Tests / S.W. Martin // *Can. J. comp. med.* – 1977. – Vol. 41. – P. 19–25.
14. Elschner M.C. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders BMC / M.C. Elschner, H.C. Scholz, F. Melzer // *Veterinary Research.* – 2011. – Vol. 7 (4). – P. 134–140.
15. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders / A. Naureen, M. Saqib, G. Muhammad [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2007. – Vol. 19. – P. 362–367.
16. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses / L.D. Sprague, R. Zachariah, H. Neubauer [et al.] // *Veterinary Research.* – 2009. – Vol. 5 (3). – P. 221–226.
17. Koziy R. Evaluation of several complement fixation test antigens and a Rose-Bengal test antigen for serological diagnosis of glanders / R. Koziy, M.C. Elschner, F. Melzer // 16th International symposium of the world association of veterinary laboratory diagnosticians (WAVLD). – 2013. – P. 1.

Набор для серологической диагностики сапа в реакции связывания комплемента

Р.В. Козий, В.Г. Скрипник

Сап – это опасное зооантропонозное заболевание, вызываемое грамотрицательной бактерией *Burkholderia mallei*. Поскольку в Украине отсутствуют диагностикумы собственного производства для выявления сапа, целью наших исследований было изготовить набор для диагностики сапа в РСК, который состоит из антигена и положительной контрольной сыворотки, определить диагностическую чувствительность и специфичность полученного антигена и активность полученной положительной сыворотки.

Было установлено, что диагностическая чувствительность полученного антигена составила 79,3 %, а специфичность – 98,97 %, что не уступает коммерческим аналогам. Установлено, что полученная положительная контрольная сапная сыворотка обладает высокой активностью в РСК и может быть использована в качестве положительного контроля.

Ключевые слова: сап, кони, серологическая диагностика, реакция связывания комплемента.

Надійшла 10.04.2015 р.