

Національна Академія наук України
Технологічний парк ІМК
Науково-виробнича компанія “Діапроф-Мед”

ПРАКТИЧНИЙ ПОСІБНИК
по роботі з імуноферментними тест-системами
для визначення антитіл проти збудника бруцельозу
великої рогатої худоби *Brucella abortus*
у сироватках крові та молоці корів

Київ, 2003

Скорочення, використані в тексті посібника:

- АБТС – 2, 2'-азинобіс-3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота;
- АГ – антиген;
- АТ – антитіло;
- ВРХ – велика рогата худоба;
- ГЗ – гранична зона;
- ІФА – імуноферментний аналіз;
- К⁺ – позитивна контрольна проба;
- К⁻ – негативна контрольна проба;
- Кгз – контроль граничного значення;
- ЛПС – ліпополісахарид;
- м.о. – міжнародна одиниця;
- НПЗ – негативне прогнозоване значення (результатів тесту);
- ОГ – оптична густина;
- ОО – оптична одиниця;
- ОФД – ортофенілендіамін;
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;
- ППЗ – позитивне прогнозоване значення (результатів тесту);
- РБП – проба роз-бенгал;
- РНА – реакція нейтралізації антигену;
- РНГА – реакція непрямой гемаглютинації;
- РФК – реакція фіксації (зв'язування) комплементу;
- СрКгз – середній показник граничного значення;
- ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) – Центри контролю та попередження захворюваності в США;
- CV (coefficient of variation) – коефіцієнт варіації;
- ЕС (European Community) – Європейська спільнота;
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазний імуноферментний аналіз;

ISABS (International anti-*Brucella abortus* serum) – міжнародна стандартна сироватка проти *Brucella abortus*;

MRT (milk ring test) – молочний кільцевий тест;

OIE (Office Internationale d'Epizooties) – Міжнародне епізоотичне бюро;

Omp (outer membrane protein) – білок зовнішньої оболонки;

PCR-RFLP (polymerase chain reaction and restrictase fragments length polymorphism) – полімеразна ланцюгова реакція сукупно з вивченням поліморфізму за довжиною рестриктазних фрагментів;

USA FDA (USA Food and Drug Administration) – Державна агенція США з догляду за якістю харчових продуктів та ліків.

ВСТУП

Проблема захворюваності на бруцельоз не сходить з порядку денного в системі охорони здоров'я та ветеринарного нагляду [1]. Бруцельоз належить до зоонозів, тобто до хвороб, які передаються людині від тварин.

Захворювання викликають бруцели (за визначником Берджі, рід *Brucella* Meyer et Shaw, 1920) – нерухомі грам-негативні кокоподібні бацили чи короткі палички розмірами 0,5-0,7x0,6-1,5 мкм; вони не утворюють капсул та ендоспор. Бруцели переживають чи ростуть при температурах 20-40 °С та при значеннях рН 6,6-7,4. При температурі 60 °С бруцели гинуть протягом 10-15 хв. Вони чутливі до висушування та до дії асептичних речовин (5 % карболової кислоти, свіжого вапняного молока, 0,01 % сулеми, 0,5 % формаліну). Бруцели чутливі також до багатьох антибіотиків.

За патогенністю для людини та тварин найбільше значення мають: *B. melitensis*, яка, головним чином, вражає кіз та овець, *B. abortus* (*B. abortus bovis*), патогенна для великої рогатої худоби, а також для тварин багатьох інших видів, *B. suis* – збудник хвороби свиней, а також *B. ovis* – збудник епідидиміту баранів та *B. canis*. Останній вид, на відміну від інших патогенних бруцел, паразитує у собак в умовах міських квартир, викликаючи в людини бруцельоз собачого типу. Слід підкреслити, що бруцели, патогенні для якогось виду ссавців, здатні викликати захворювання також і у ссавців інших видів [2,3,4].

Зараження тварин відбувається при поїданні інфікованих кормів або ж через пошкоджену шкіру та слизові оболонки. Джерело зараження для людини – хворі тварини, а саме велика рогата худоба (ВРХ), свині, кози, вівці, собаки, від яких збудник передається з виділеннями при пологах та при викиднях, а також з сечею й фекаліями. Прояви хвороби у тварин та людей можуть носити сезонний характер, коли

можна виявити так званий максимальний епідеміологічний момент. Від ВРХ, свиней та домашніх собак хвороба передається людині рівномірно протягом цілого року [1].

Людина заражається не лише при контакті, але й через інфіковані м'ясні та молочні продукти. Бруцели проникають в організм зазвичай через слизові оболонки та шкіру. Менше значення має зараження через повітря, забруднене збудниками (аерогенне інфікування).

Отже, найнебезпечніша ця хвороба саме для осіб, що працюють в тваринництві та ветеринарній службі, на м'ясокомбінатах, зайнятих переробкою молока, субпродуктів, обробкою шкірсировини, щетини, вовни, кісток, вивезенням гною, виготовленням кіз'яків. Відомо, що люди, вражені бруцельозом, проживають на неблагополучних територіях, де трапляються випадки захворювань серед тварин, зокрема, серед ВРХ, овець та кіз, які мають найбільше епідеміологічне значення щодо поширення бруцельозу серед людей [1].

Найчастіше збудником бичачого бруцельозу виступає *B. abortus*, хоча під час спалахів бруцельозу у великої рогатої худоби, яка контактувала з вівцями та козами, виявляють також і *B. melitensis*. Вид *B. suis* дуже рідко спричиняє захворювання великої рогатої худоби на бруцельоз. Збудники бруцельозу надзвичайно рідко передається від людини до людини, хоча є окремі повідомлення про враження бруцельозом при переливанні інфікованої крові.

Бруцельоз – тяжка хвороба, яка викликає численні скарги на стан здоров'я, сильні болі, слабкість, часто супроводжується підвищеною температурою, нерідко призводить до порушення моторно-рухового апарату, функції печінки, до субпсихотичних та психічних розладів, інвалідності, передчасної втрати працездатності. Часто трапляються також випадки хронічного та латентного бруцельозу, що несприятливо позначаються на здоров'ї інфікованих осіб [4,5].

Через зоонозну природу хвороби оздоровлення тваринництва має першорядне значення з погляду профілактики бруцельозу та зниження небезпеки захворювання для людей, не згадуючи вже про економічний бік справи та про господарські збитки, спричинювані хворобою [6]. Ці збитки виникають як через зниження продуктивності тваринництва (наприклад, молочних корів), так і через численні спонтанні аборти та інші порушення репродуктивного циклу, викликані токсичним впливом збудника. Зрозуміло, що неможливо провести оздоровлення тваринницьких ферм без надійних та порівняно дешевих діагностичних підходів, які дозволяють своєчасно здійснювати масові обстеження та вилучати хворих тварин з поголів'я. Є випадки, коли через велике розмаїття клінічних форм хвороби без надійної серологічної діагностики важко діагностувати хворобу і у тварин, і у людини. Тому необхідність опрацювати надійні та інформативні тест-системи нового покоління для діагностики бруцельозу доказів не потребує [4,5]

Діагностика бруцельозу

Бактеріологічні методи

Достеменним методом діагностики бруцельозу вважається бактеріологічний, коли з патологічних матеріалів від хворої людини чи тварини (з крові, спинномозкової рідини, кісткового мозку, слини, сечі, синовіальної рідини, харкотиння, молока) вдається висіяти збудника, *Brucella sp.*, на живильному середовищі. Умови отримання проб дуже важливі для діагностики, бо трапляється, що бруцели знаходяться лише у невеликій частині якоїсь тканини або молока (наприклад, видоєного з однієї тільки дійки); важливо працювати з якомога більшою кількістю проб.

Крім випадків, коли збудника виділяють з крові, для культивування бруцел звичайно використовують тверді селективні живильні середовища з додаванням антибіотиків. Такий підхід дозволяє побачити колонії бруцел, попереджуючи забруднення культур збудника іншими мікроорганізмами, які ростуть швидше за бруцел. Деякі штами бруцел, зокрема *B. abortus* серовару 2, потребують для росту ще й сироватки¹ [7,8].

Відбір проб від тварин для виділення бруцел слід здійснювати, беручи до уваги патогенез бруцельозу у господарстві, де є підозрілі особини. Коли протікає гостра фаза хвороби, для дослідження беруть плацентарний котиледон, виділення з піхви, молоко та тканини плоду (печінку, легені), а також вміст сичуга, тоді як при хронічному перебігу захворювання у вбитих тварин беруть проби з органів лімфоретикулярної системи (селезінки, лімфатичних вузлів, мигдаликів), матку при вагітності чи незабаром після пологів, а також вим'я.

У 90 % дорослих корів, хворих на бруцельоз, культуру збудника можна виділити з лімфовузлів вимені, а також з лімфовузлів нижньої щелепи (mandibular lymph nodes), лімфовузлів клубової кишки (ileum)² та з сосочків матки (uterine caruncles), якщо вони там є; у цьому випадку частота виділення збудника зростає майже до 100 %. Якщо матеріал беруть від телиць у ранній інкубаційний період, то треба використати для культивування ще й інші тканини – глоточні (ретрофарингіальні), навколоушні, з поверхневого шару цервікального каналу, з лімфовузлів середньої кишки та з

¹ Набір референтних штамів, схвалений FAO/WHO, містить шість видів роду *Brucella* та штами їхніх біоварів. Всі вони знаходяться у типових колекціях мікроорганізмів Великобританії (National Collection of Type Cultures-Great Britain) та США (American Type Culture Collection). Ці референтні штами слід використовувати у ході типізації різних видів бруцел, щоб забезпечити надійну їх ідентифікацію.

² Рос. “подвздошная кишка”.

селезінки. У биків для аналізу беруть матеріали з яєчка, простати, придатку яєчка та з сім'яних пухирців, разом з лімфовузлами. Проби треба відразу ж охолодити; якщо йдеться про триваліше зберігання (понад 12 годин перед культивуванням), проби заморожують. Контейнери для проб мають бути такі, щоб назовні не проникав інфекційний матеріал та щоб запобігти забрудненню повітря [9].

Як правило, якщо у 1 г клітин враженого організму знаходиться менш як 1×10^6 клітин бруцел, то необхідно багато часу, щоб відшукати зрізи тканин, де видно бактерії. Бактеріологічні дослідження проводять у випадках, коли є аборти та інші ознаки, характерні для бруцельозу (орхіти, епідидиміти, бурсити, гігроми). Вони тривають до 1 місяця. Однак навіть при гострому бруцельозі бактеріологічний підхід поки що не став надійним, оскільки збудник дуже повільно росте на живильних середовищах (трапляється навіть, що колонії з'являються аж через 120-150 днів після посіву!). Ймовірність отримати колонії бруцел ще нижча при хронічному компенсованому бруцельозі, а при латентній формі захворювання бактерії висіяти взагалі неможливо. Часом вдаються до так званої біологічної діагностики – до зараження піддослідних тварин (мишей, мурчаків³) патологічними матеріалами від хворих людей та від сільськогосподарських тварин, після чого вдається виділити чисту культуру бруцел. Звичайно ж, цей підхід не скорочує часу дослідження [6,7,8,10].

Серологічні та алергологічні дослідження

В Україні основними методами виявлення тварин, хворих на бруцельоз, є проведення планових серологічних досліджень та постановка алергічних проб [6].

Серологічні дослідження на бруцельоз найчастіше проводять за допомогою пластинчатої реакції аглютинації з

³ Рос. - “морская свинка”.

так званим роз-бенгал антигеном⁴ (роз-бенгал проба – РБП) та в реакції зв'язування (фіксації) комплекменту (РФК) з єдиним бруцельозним антигеном [8].

В СРСР найпоширенішим методом діагностики бруцельозу була реакція Райта, тобто реакція аглютинації вбитих бруцел чи компонентів бактеріальної клітини сироватками хворих людей і тварин. Реакція Райта вважається за високо-специфічну. Ця реакція не рекомендована Міжнародним епізоотичним бюро (ОІЕ) та не вважається ним за альтернативну, але її специфіковано ветеринарним законодавством Євросоюзу [8]. Вона стає позитивною на 5-7-й день після зараження. Високі титри антитіл в реакції Райта (до 1:800) виявляють на 15-20-й день; вони продовжують наростати до другого місяця після зараження, а потім титри поступово знижуються. Діагностичними вважаються титри 1:100-1:200, тоді як титр 1:50 розцінюється як сумнівний. Негативна реакція Райта не дозволяє відкинути діагноз бруцельозу, бо у цій реакції позитивної відповіді не отримують у 11-12 % усіх випадків хвороби у людини. Неспецифічні позитивні результати при застосуванні реакції Райта можна отримати у осіб, хворих на черевний та на висипний тиф, туляремію, сифіліс, а також при вагітності. Крім того, позитивна реакція Райта може свідчити про імунітет після вакцинації та про раніше перенесене захворювання на бруцельоз [10].

Алергічна внутрішньошкірна проба (у людей – проба Бюрне), що протікає як алергічна реакція уповільненого типу, доводить сенсibiliзацію обстежуваних людей чи тварин до бруцельозного антигену. Вона стає позитивною на другому тижні після зараження і може не зникати протягом 10 років та більше. Проте при гострому бруцельозі алергічна проба негативна більш як у половини вражених людей і тварин, а при хронічній хворобі чи при декомпенсації проба Бюрне

⁴ Препарат антигену містить барвник бенгальський рожевий.

позитивна або різко-позитивна у 80 % досліджуваних хворих [11].

Суттєвою перевагою при тестуванні бруцельозу у ВРХ за допомогою сучасних варіантів алергічної шкірної проби (з бруцеліном) є її досить висока специфічність [2,3]. Проте ця реакція, на жаль, позитивна не в усіх заражених тварин, і є відомості, що від деяких тварин з негативною алергічною шкірною пробєю можна успішно виділити бруцели. Цей тест може, проте, принести користь, особливо як додатковий при тлумаченні серологічних результатів у тварин з тих господарств, де отримали сумнівні результати, коли не можна достеменно твердити, чи є там бруцельоз, чи ні. Чітко показано, що за допомогою шкірної проби можна достеменно відрізнити бруцельоз від інфекції, спричиненої *Yersinia enterocolitica* 09. Алергічний тест не годиться для роботи з тваринами, яким введено вакцини, що викликають тривалу сенсibiliзацію до бруцельозних антигенів.

Реакція непрямой гемаглютинації (РНГА) та реакція нейтралізації антигену (РНА) високочутливі, але ж і дуже копіткі та складні, вимагають наявності лабораторних тварин та високої кваліфікації персоналу [6].

Досить складна для роботи також поширена в Україні реакція фіксації комплементу (РФК). Вважають, що РФК дає менше сумнівних результатів, ніж реакція Райта, хоча за чутливістю своєю дещо їй поступається. Після припинення патологічного процесу РФК лишається позитивною довше за реакцію Райта. РФК досі служить для підтвердження діагнозу бруцельозу.

За останнім варіантом методики, вміщеної у настановах Міжнародного епізоотичного бюро (ОІЕ-2000), перед проведенням РФК досліджувані сироватки розводять у вероналовому буфері та неодмінно прогривають (для інактивації комплементу) протягом 50 хв при 58 °С. Встановивши спершу відсутність антикомплементації у

антигену та у сироватки, додають антиген до серійних розведень сироватки та інкубують суміш для утворення комплексу антиген-антитіло (АГ-АТ). Потім до проінкубованих проб додають комплемент – заздалегідь відтитровану сироватку мурчаків. У контрольних варіантах реакції є проби, де присутні лише розчинник, а також розчинник з комплементом та негативною сироваткою і розчинник з самим лише комплементом. Реакцію проводять протягом 30 хв при 37 °С чи 14-18 год при 4 °С. Індикаторною системою при проведенні РФК служать баранячі еритроцити (3 %-на суспензія). Комплекс АГ-АТ здатен зв'язувати комплемент та попереджати в такий спосіб розчинення (лізис) еритроцитів, спричинюваний комплементом. Як правило, самі по собі вільні антитіла та антиген, не приєднані до них, комплементу не зв'язують. Тому гальмування лізису баранячих еритроцитів доводить наявність у пробі комплексу АГ-АТ і, отже, наявність антитіл проти відповідного антигену [3,8].

Антигени бруцел, які важливі при постановці серологічних реакцій

Одна з найсуттєвіших проблем при постановці серологічних реакцій – проблема з отриманням достатньо очищених імунодомінантних антигенів [9]. На сьогодні відомо, що найголовніший з імунодомінантних антигенів бруцел – бактерійний ліпополісахарид (ЛПС) та антигенно споріднені з ним полісахариди NH, які входять до складу клітинної оболонки цих бактерій. Для ЛПС бруцел знайдено 11 антигенних детермінант (епітопів), причому чотири з них (А, М, С/У та С) виявлено у складі О-полісахаридного ланцюга. Епітопи С/У та С присутні в ЛПС усіх досі відомих гладеньких форм бруцел. А-епітоп знайдено у *B. abortus*, а М-епітоп – у *B. melitensis*. Проте є випадки знаходження у деяких штамів бруцел цих видів обох названих епітопів; те ж

стосується і деяких штамів виду *B. suis*. Два епітопи (R1 та R2) лежать у серцевині олігосахариду, три – у ліпіді А (LA1, LA2 та LA3), а ще два (LAOmp3-1 та LAOmp3-2) – у пептиді, пов'язаному з ліпідом А. Більшість сироваткових антитіл, які з'являються після введення бруцел, спрямовані проти епітопу C/Y, що знаходиться в О-антигені, та проти полісахариду NH. Рівні антитіл, синтезованих проти інших епітопів, значно нижчі.

Сучасні серологічні реакції значно підвищили свою чутливість та специфічність завдяки методології, за допомогою якої вдається отримувати та очищати потрібні антигени, зокрема, ЛПС.

Звичайно ЛПС отримують з референтних штамів *Brucella abortus* (1119-3 або S99), використовуючи досить складну технологію. ЛПС вилучають з клітин, вбитих нагріванням, за допомогою суміші гарячої води з фенолом.

Імуноферментний аналіз для виявлення антитіл

ЛПС використовують також і як антиген при визначенні антитіл проти бруцел методом імуноферментного аналізу (ІФА) [6,7,12,13]. Протягом останнього десятиліття ІФА вже став за кордоном основним методом при масових обстеженнях на бруцельоз у медицині й ветеринарії, особливо при проведенні масових епідеміологічних та епізоотичних досліджень. При конкурентному варіанті ІФА перед нанесенням на тверду фазу (звичайно на полістироловий планшет) високоочищений ліофілізований ЛПС⁵ розчиняють у карбонатному буфері (рН 9,6; 1:1.000). Планшети після сорбції антигену можна зберігати протягом року при мінус 20 °С та використовувати для проведення ІФА після інкубації

⁵ У більш сучасних конкурентних тест-системах на основі ІФА використовують не повний ЛПС-антиген, а саме ту його ділянку, яка припадає на О-ланцюг, оскільки деякі його епітопи мають дуже високу імуногенність.

при 37 °C протягом 30-45 хв. Потім у лунки планшета вносять досліджувані сироватки та моноклональні антитіла (часто М84), направлені проти ЛПС; моноклональні антитіла приєднуються до сорбованого антигену, якщо до нього не прикріпилися специфічні антитіла, наявні у сироватці. Відмивши незв'язані компоненти, у планшет вносять протимишачий пероксидазний кон'югат, а потім, відмивши рештки кон'югату, проводять ферментативну реакцію. Як хромогенний субстрат використовують 2,2'-азинобіс-3-етилбензтіазолін-6-сульфонову кислоту (АБТС). Для припинення реакції при використанні АБТС активність пероксидази блокують, додавши 1-4 %-ний додецилсульфат натрію чи 1 мМ азид натрію (розчини готують на дистильованій воді).

Крім конкурентного методу, часто користуються ще й багатьма різними непрямими варіантами ІФА. Діапазон ізотипів та субкласів імуноглобулінів, які виявляють цими методами, залежить від специфічності антитіл, що входять до складу кон'югату. При визначенні антитіл класу IgG1 проти бруцел можна отримати результати, близькі до тих, які одержують в РФК; такий тест на основі ІФА підходить для визначення антитіл як у сироватці, так і в молоці. Користуючись кон'югатами, специфічними для важких та для легких ланцюгів імуноглобулінів, можна підвищити чутливість порівняно з РФК. Як і в усіх інших випадках, при непрямому ІФА не можна відрізнити антитіл, синтезованих при вакцинації (ослабленим штамом 19) та при зараженні.

Користуючись непрямими варіантами ІФА як підтверджувальними тестами, беруть пероксидазні кон'югати вузької специфічності (наприклад, такі, що містять антитіла проти важких та легких ланцюгів бичачих IgG1) та більше їх розводять, добиваючись вищої діагностичної специфічності. В літературі є вказівки на те, що найважливішими показниками інфекції при бруцельозі бувають антитіла класів

IgG та IgA⁶, хоча більшість дослідників вважають, що ЛПС бруцел здатен викликати посилений синтез IgM та IgG. При активній інфекції титри IgG, як правило, високі; при цьому утворюються антитіла як проти ЛПС, так і проти багатьох інших специфічних білків бактерій.

Донедавна в Україні комерційних тест-систем для виявлення антитіл проти бруцел ВРХ не було. В АТЗТ НВК “Діапроф-Мед” у співробітництві з науковцями Інституту експериментальної та клінічної ветеринарії УААН (Харків) та Інституту ветеринарної медицини УААН (Київ) створено три набору для діагностики бруцельозу: тест-система діагностична імуноферментна для виявлення протибруцельозних антитіл у сироватках крові великої рогатої худоби “DIA-Brucella ab.-V” [15]; тест-система імуноферментна для виявлення антитіл до *Brucella abortus* в молоці корів “DIA-Brucella ab.-MILK” і комбінована тест-система імуноферментна для виявлення антитіл до *Brucella abortus* в сироватках крові великої рогатої худоби та молоці корів “DIA-Brucella ab. combi-V” [16]. Тест-системи базуються на застосуванні очищеного ЛПС *B. abortus*, анти-ВРХ моноклонального кон’югату, міченого пероксидазою, та проявника з хромогеном і перекисом водню для виявлення ферментативної реакції. Тест-систему призначено для скринінгових досліджень 196 проб, тривалість аналізу 1,5 год. Далі буде детально описано, як проводиться діагностичне дослідження із застосуванням тест-системи “DIA-Brucella ab. combi-V”.

⁶ Щоб відрізнити активну інфекцію від уже минулої чи субклінічної, радять також проводити Вестерн-блотинг, відшуковуючи антитіла проти певних цитоплазматичних білків бруцел.

Контрольні сироватки при проведенні серологічних реакцій

При проведенні серологічних реакцій важливе значення мають контрольні сироватки. Як відомо практикам, вейбридзьку сироватку ("Weybridge serum") вважають за другу міжнародну сироватку проти *B. abortus* (2nd International anti-Brucella abortus serum, ISABS); це первинна стандартна сироватка, яку фахівці повинні використовувати для створення вторинних національних (державних) стандартів. Нині ця сироватка править за стандартну при постановці серологічних реакцій; це міжнародна стандартна сироватка (international reference standard serum) при постановці РБП, РФК та реакцій аглютинації. Нещодавно ОІЕ утвердило необхідність створення різко позитивних, слабо позитивних та негативних стандартів ОІЕ для постановки прямого та конкурентного ІФА. Такі сироватки виробляють у Великобританії (Veterinary Laboratories Agency = VLA, Weybridge, U.K.). Ці референтні сироватки можна буде також використовувати для стандартизації при опрацюванні нових методів. За вимогами ОІЕ, величина оптичної густини (ОГ) після проведення ІФА з різко-позитивною сироваткою має бути не нижча за 0,5-1,0 о.о. Слабо-позитивна сироватка має давати значення ОГ, що дорівнює 20-30 % від цього значення, а при розведенні в чотири рази давати негативну реакцію. Негативні сироватки мають давати значення ОГ, що не перевищують 10 % ОГ, отримуваних з різко-позитивними контрольними зразками [8]

Інші діагностичні методи

Крім бактеріологічних та серологічних методів, для діагностики бруцельозу запропоновано також методи полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та ДНК-зондів, що надають широкі додаткові діагностичні можливості. Класичні методи типізації бруцел дають винятково добрі результати,

якщо працювати правильно. Але ці методи вимагають точно відтитрованих реагентів та досвідчених співробітників, щоб добре зрозуміти результати досліджень та уникнути хибного їх тлумачення. Деякі методи молекулярної типізації, головним чином, вивчення різних генів та їхніх локусів і виявлення поліморфізму ДНК при застосуванні PCR-RFLP та Саузерн-блотингу, дають можливість провести молекулярну ідентифікацію та типізацію різних видів *Brucella* та їхніх біоварів. Саузерн-блотинг та зондування для виявлення інсерційної послідовності IS711 (IS6501) – це підхід плідний, хоча для ідентифікації різних видів *Brucella* потрібен час. Виявити поліморфізм методом PCR-RFLP легше, і таким чином можна проаналізувати багато проб. Найкраще працювати з білками зовнішньої оболонки (Omp) збудників, бо вони достатньо відрізняються та дозволяють диференціювати види бруцел та їхні біовари. Визначаючи гени omp2a та omp2b, можна розрізнити шість видів *Brucella* та деякі з її біоварів. Додавання праймерів для інших генів, таких як omp31 та dnaK, ще поліпшує можливість розрізнити окремі види та їхні біовари. Але значний ступінь гомології поміж генами окремих видів та біоварів заважає розвивати методи генетичної типізації, а тому вони поки що не досягли такого дискримінативного рівня, як класичні методи бактеріології. Дуже, однак, ймовірно, що становище поліпшиться завдяки розвиткові нових технологій та виявленню інших, більш поліморфних генів [8].

Визначення антитіл проти бруцел в злитих пробах

Окремо слід зупинитися на дослідженнях злитих проб (pools) сироваток та молока. За сучасними вимогами, проби з молочних цистерн вважаються за негативні, якщо вони дають менш як 50 %-ну реакцію порівняно з пробою негативного молока при додаванні сироватки з другого міжнародного бруцельозного стандарту, розведеної у 10.000 разів [14].

Щодо вимог до кільцевих тестів з молоком (milk ring test, MRT), то в директивних документах Європейської спільноти (ЕС 1997, А.1.13) зазначено, що при проведенні тестів з молоком, взятим з цистерн, кількість взятих проб має бути вдвічі більша, а інтервал поміж розведеннями – вдвічі менший. MRT – тест корисний, бо він дуже підходить для польових умов і не вимагає для проведення складної апаратури. Однак він не настільки точний, як ІФА, якому слід надати перевагу при тестуванні проб з молочних цистерн. За фоновий рівень (cutoff) при проведенні MRT вважають величину, що дорівнює 20 міжнародним одиницям (м.о.). Стандарт, що дає 20 м.о., можна виготовити при розведенні міжнародної контрольної стандартної сироватки ОІЕ для реакції аглютинації чи для РФК на негативному молоці. Але при визначенні збудника у молоці з цистерн можуть з'явитися труднощі через те, що корів з незначною позитивною реакцією на бруцельоз не буде виявлено, бо їхнє молоко злили разом з молоком здорових тварин. У минулому MRT часто застосовували при здійсненні програм викорінення бруцельозу, оскільки вважали, що при наявності на фермі кількох інфікованих тварин цей тест цілком доречний. Але тепер, коли багато господарств у країнах Європейської спільноти вільні від бруцельозу, ймовірно, що випадки бруцельозу трапляться через випадкове завезення на ферми нових тварин з неблагополучних місцевостей, а тому можуть знайтися окремі особини з позитивною пробою на цю хворобу [3,8].

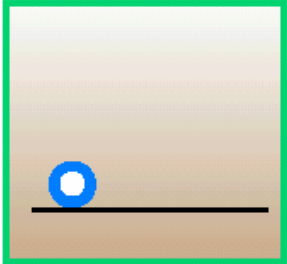
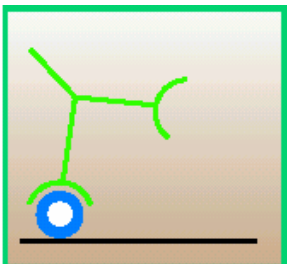
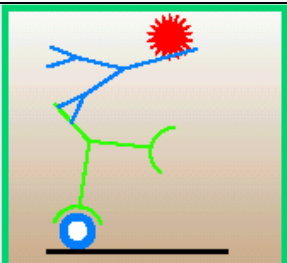
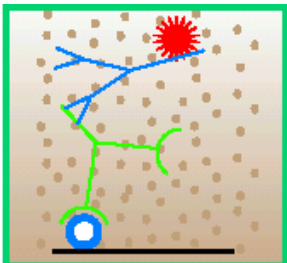
Отже, при дослідженні проб молока, взятих від декількох корів та злитого у одну посудину, треба так підібрати найбільшу кількість корів, молоко яких зливають разом, щоб можна було виявляти тварин, у молоці яких виявляється 20 м.о. Таку найвищу кількість корів встановлюють національні контрольні лабораторії в залежності від чутливості тесту. Ця кількість корів має бути

така, щоб при тестуванні можна було виявити тварину з титром 20 м.о., молоко якої злите з молоком здорових корів.

З подібною ж ситуацією ми зустрічаємося при проведенні ІФА на суміші (пулі) сироваток чи проб молока, хоча мало досліджено, які отримуються результати при тестуванні суміші сироваток. Найвища кількість злитих до купи досліджуваних сироваток має бути така, щоб у суміші ще можна було визначити антитіла за допомогою слабкої стандартної контрольної сироватки ОІЕ, яку розводять негативною сироваткою чи негативним молоком.

Чинні директивні документи ОІЕ вказують, що ІФА можна застосовувати для роботи зі злитими пробами молока, якщо у даний момент доїться не менш як 30 % корів. Ця цифра базується на практичній можливості охопити всіх корів на фермі, якщо повторювати тестування щороку. При такому використанні ІФА можна встановити, чи є на фермі хвороба, чи ні, але про стан окремих тварин нічого довідатись не можна.

Схема проведення ІФА

<u>Процедура</u>	Формування Комплексу
Полістиролові стрипи, сенсibiliзовані ЛПС <i>B. abortus</i>	
Внесення в лунки стрипів розчину для розведення зразків, контролів та досліджуваних проб. Інкубація (формування комплексу АГ-АТ) Промивання лунок буферним розчином 4 рази	
Внесення в лунки розчину кон'югату Інкубація (формування комплексу з кон'югатом) Промивання лунок буферним розчином 6 разів	
Внесення в лунки розчину перекису водню і хромогену Інкубація 30 хв при кімнатній температурі (забарвлення) Зупинення реакції додаванням стоп-реагенту Реєстрація оптичної густини	

МЕТОДИКА
проведення ІФА на тест-системі
«DIA-Brucella ab.-combi-V»
набір Т12-стрип

Призначення набору

Набір призначений для аналізу сироватки крові великої рогатої худоби та молока корів на наявність антитіл до *B. abortus* методом імуноферментного аналізу.

Принцип аналізу

Головні компоненти набору – імуносорбент та імуноферментний кон'югат. Імуносорбент – полістироловий планшет, лунки якого сенсibiliзовані очищеними антигенами *B. abortus*. Кон'югат – моноклональні антитіла до імуноглобулінів класу IgG великої рогатої худоби, кон'юговані з пероксидазою хрому.

При внесенні в лунки планшета досліджуваних зразків специфічні антитіла до *B. abortus*, що містяться в зразках, зв'язуються з антигенами на твердій фазі, утворюючи комплекси АГ-АТ. Утворені комплекси виявляють за допомогою специфічного імуноферментного кон'югату. Після відмивання незв'язаних компонентів у лунки додають розчин проявника – субстрату пероксидази (перекис водню) та хромогену (3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ). Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент (0,5 М розчин сірчаної кислоти). Інтенсивність забарвлення в лунках із зразками сироваток або молока пропорційна концентрації специфічних антитіл до *B. abortus*. Облік результатів проводять відносно інтенсивності забарвлення у лунках із контролем граничного значення (Кгз) візуально або вимірюють оптичну густину (ОГ) суміші у лунках при довжині хвилі 450 нм.

Таблиця 1 - Склад набору

N	Назва компоненту	Кількість
1	Концентрат розчину № 1 для промивання планшету	3 фл. по 25 мл
2	Імуносорбент	2 планшети
3	Розчин № 3 для розведення сироваток або молока	1 фл., 20 мл
4	Розчин № 4 для розведення кон'югату	1 фл., 26 мл
5	Розчин № 5Т для приготування проявника	1 фл., 14 мл
6	Хромоген ТМБ	1 фл., 14 мл
7	Кон'югат імуноферментний (50X)	1 амп., 0,6 мл
8	Позитивний контроль (К+)	1 амп., 0,3 мл
9	Негативний контроль (К-)	1 амп., 0,3 мл
10	Контроль граничного значення (Кгз)	1 амп., 0,9 мл
11	Стоп-реагент	1 фл., 25 мл
12	Клейка плівка	6 шт.

Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- вода дистильована;
- перекис водню, 6 %;
- спирт етиловий, 70°;
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- піпетки одноканальні (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) та наконечники до них;
- піпетки 8-канальні (50-300 мкл) з наконечниками;
- мірна склянка або циліндр (1000 мл);
- ванночки для реагентів;
- флакони для реактивів, 20 мл;

- апарат для промивання планшетів (вошер);
- фотометр для вимірювання ОГ в планшеті;
- контейнер для збирання твердих відходів;
- контейнер для зливу відпрацьованих забруднених рідин.

Необхідні застереження

Заходи безпеки при застосуванні набору:

- роботу проводити в спеціально обладнаному приміщенні;
- працювати в гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- всі відпрацьовані стічні розчини обробляти 6 % розчином перекису водню при кімнатній температурі протягом 3 годин;
- всі тверді відходи збирати у спеціальний контейнер, автоклавувати протягом 1 години при температурі 120°C;
- інструменти, обладнання, а також робочі поверхні протирати 70° етиловим спиртом.

Правила роботи з тест-системою:

- не використовувати набір після закінчення терміну придатності, не змішувати компоненти наборів різних серій;
- ретельно перемішувати реагенти при підготовці та проведенні аналізу;
- використовувати для приготування реагентів посуд, вимитий та полоснутий дистильованою водою посуд;
- не допускати підсихання лунок на всіх етапах постановки ІФА;
- перевіряти точність дозування, слідкувати за робочим станом піпеток та іншого обладнання;
- уникати попадання прямого сонячного світла на робочу поверхню під час проведення аналізу.

Вимоги до промивання планшета:

- неякісне промивання планшета призводить до одержання некоректних результатів;
- для промивання планшета рекомендується використовувати автоматичний промивач - вошер; у випадку відсутності вошера чи його поганої роботи можна промивати лунки 8-канальною піпеткою;
- на всіх етапах промивання необхідно контролювати заповнення лунок і повну аспірацію (видалення) з них рідини; лунки повинні заповнюватись повністю (350 мкл в лунку), без переповнення та перетікання рідини з сусідніх лунок.

Підготовка зразків

Зразки сироваток зберігають при температурі 2-8 °С 72 години. Необхідно освітлювати зразки сироваток, які містять агрегати та осад, за допомогою центрифугування.

Зразки молока зберігають при температурі 2-8 °С 24 години. Необхідно знежирити зразки молока центрифугуванням при 1500 тис. об/хв. (15 хв) або відстоюванням з наступним охолодженням 30 хв. при 4 °С. Для дослідження відбирають знежирене молоко з товщі рідини під плівкою вершків.

Допускається заморожування зразків сироваток та молока (бажано до температури нижче мінус 20 °С) не більше двох разів.

Зразки з азидом натрію, гемолізом, гіперліпідемією або бактеріальним проростом не придатні для аналізу.

Проведення аналізу

1 Підготовка до аналізу (з розрахунку на 16 лунок)

Витримують компоненти набору при температурі 18-30 °С 30 хвилин.

1.1 Приготування розчину № 1 для промивання планшета

Вміст одного флакону з концентратом розчину № 1 інтенсивно потрушують. Відбирають 6 мл розчину і розводять в 270 мл дистильованої води, перемішують. Якщо концентрат розчину містить кристали, його прогрівають перед використанням при 35-37 °С до повного розчинення кристалів.

Розчин можна зберігати при температурі 2-8 °С не більше 5 діб.

1.2 Приготування розчину кон'югату

В чистий флакон відбирають 2 мл розчину № 4 для розведення кон'югату та додають 40 мкл кон'югату (50-кратного концентрату). Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

1.3 Приготування розчину проявника

В чистий флакон відбирають 1 мл хромогену ТМБ і додають 1 мл розчину № 5Т для приготування проявника, суміш інтенсивно потрушують.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин проявника необхідно застерігати від попадання світла та контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин проявника повинен бути безбарвним.

2 Проведення імуноферментної реакції

- Перед проведенням аналізу виймають з упаковки необхідну кількість стрипів, вставляють їх у рамку. Стрипи, які не використовуються в даній постановці, зберігають у щільно закритому пакеті при температурі 2-8 °С до 1 місяця.
- Готують розчин № 1 згідно з п. 1.1.
- У кожен лунку стрипів вносять по 80 мкл розчину № 3 для розведення досліджуваних зразків сироваток або молока.
- В лунки стрипів вносять по 20 мкл досліджуваних зразків, залишаючи вільними 5 лунок першого ряду (лунки для контролів).
- В лунку А1 вносять 20 мкл позитивного контролю (K^+), в лунку В1 - 20 мкл негативного контролю (K^-) та в лунки С1, D1, Е1 – по 20 мкл контролю граничного значення ($K_{гз}$). *При внесенні контрольних та досліджуваних зразків необхідно обережно піпетувати суміш.*
- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при кімнатній температурі (18-30°С) 20 хвилин.
- Після закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином № 1, а потім позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- Готують розчин кон'югату згідно з п. 1.2.
- В лунки стрипів вносять по 100 мкл розчину кон'югату.

- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при кімнатній температурі (18–30 °С) 20 хвилин.
- Після закінченні інкубації видаляють розчин кон'югату з лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки шість разів розчином № 1, а потім позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- Готують розчин проявника згідно з п. 1.3.
- Вносять в лунки стрипів по 100 мкл розчину проявника.
- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при кімнатній температурі (18-30 °С) в темному місці 30 хвилин.
- Зупиняють кольорову реакцію внесенням до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту.
- Не пізніше як через 1 хвилину після зупинення кольорової реакції проводять облік результатів візуально відносно інтенсивності забарвлення у лунках з контролем граничного значення (Кгз) або визначаючи оптичну густину за допомогою ридера у однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм чи у двоххвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм відносно 620 нм, що забезпечує більш точні результати аналізу.

Облік результатів аналізу

Візуальній облік результатів

- Кладуть планшет на білий аркуш паперу у добре освітленому місці та візуально порівнюють інтенсивність забарвлення розчину в лунках досліджуваних зразків з інтенсивністю забарвлення контролю граничного значення

(Кгз). Якщо інтенсивність забарвлення в одній з лунок із контролем граничного значення сильно відрізняється від інтенсивностей у двох інших лунках, то її не беруть до уваги.

- Результат аналізу вважається **негативним**, якщо інтенсивність забарвлення у лунці з досліджуваним зразком менша, ніж у лунках із контролем граничного значення.

- Результат аналізу вважається **позитивним**, якщо інтенсивність забарвлення у лунці з досліджуваним зразком дорівнює або перевищує інтенсивність забарвлення у лунках із контролем граничного значення.

Автоматичний облік результатів на ридері:

- Значення оптичної густини (ОГ) K^- має бути не вище за 0,1 оптичної одиниці (ОО), K^+ - не нижче як 0,6 ОО, Кгз – не нижче за 0,2 ОО

- Граничне значення ОГ (ГЗ) розраховують як середню ОГ Кгз у трьох лунках (срКгз). Якщо оптична густина в одній з лунок більш ніж у два рази відрізняється від величини срКгз, то її не беруть до уваги.

- Результати аналізу вважаються **негативними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка менше ОГ срКгз.

- Результати аналізу вважаються **позитивними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка дорівнює або більше срКгз.

Наприклад, значення трьох лунок з контролем граничного значення:

ОГ проб в лунках С1= 0,258; D1= 0,272; E1 = 0,266

- $ОГ_{сер\ Кгз} = 0,264$

- Якщо досліджувана сироватка, має значення ОГ менше за 0,264, її слід вважати негативною.

- Якщо досліджувана сироватка має значення ОГ 0,264 та вище, така сироватка вважається позитивною.

У випадку ранньої інфекції результат ІФА може бути негативний. При наявності клінічних проявів рекомендують провести повторне тестування через 14-21 день.

Серологічний тест не можна використати для постановки остаточного діагнозу. Необхідно взяти до уваги клінічну картину і інші лабораторні дані.

Оцінка якості імуноферментної тест-системи

Основними показниками якості імуноферментної тест-системи, її надійності є чутливість, специфічність та відтворюваність отримуваних результатів.

Чутливістю називають показник, який виражає долю позитивних відповідей при наявності даної патології, тобто кількість вражених осіб або тварин, які можуть бути виявлені при використанні даної тест-системи:

$$\text{Чутливість} = \frac{П}{П + ХН} \times 100\%,$$

де П - кількість позитивних результатів ІФА, ХН – кількість хибно-негативних результатів ІФА.

Хибно-негативні результати тестування обумовлені багатьма причинами: можливе носійство збудника без клінічних проявів хвороби та продукції антитіл, не виключається негативний результат дослідження при взятті крові в періоді сероконверсійного "вікна", коли в організмі ще немає специфічних антитіл, тощо.

Специфічністю називають показник, що характеризує здатність тест-системи визначати лише той компонент, який вона має визначати, тобто, негативність тесту за умов відсутності патології:

$$\text{Специфічність} = \frac{Н}{Н + ХП} \times 100\%,$$

де N – кількість негативних результатів ІФА, $XП$ – кількість хибно-позитивних результатів ІФА.

Поняття про “чутливість” та “специфічність” тісно пов’язані з поняттями про “хибно-позитивний результат” та “хибно-негативний результат”.

Хибно-негативний результат – це негативний результат, отриманий у даній тест-системі для проби, яка насправді позитивна.

Хибно-позитивний результат – це позитивний результат, одержаний у даній тест-системі для проби, яка в дійсності негативна.

Таким чином, більш чутливою буде та тест-система, що дає меншу кількість хибно-негативних результатів, а більш специфічною – та, що дає меншу кількість хибно-позитивних результатів.

Метод ІФА цінний насамперед через його високу чутливість (окремі його модифікації дозволяють визначати до 10^{-18} моль/л антигену) та високу специфічність (близько 100 %).

Визначення чутливості й специфічності тест-систем, відповідно до рекомендацій ВООЗ, CDC (Centers for Disease Control and Prevention), FDA (USA Food and Drug Administration), здійснюється шляхом оцінки здатності діагностикумів виявляти позитивні або негативні сироватки стандартних контрольних панелей. При цьому зразки сироваток позитивних контрольних панелей повинні бути представлені в усьому діапазоні імунореактивності до збудника – від сироваток з ранньою сероконверсією до сироваток осіб з клінічною картиною хвороби. Показник специфічності тест-систем визначають при дослідженні рандомізованої вибірки сироваток донорів крові (random blood donors), осіб, які належать до груп високого ризику інфікування збудником, пацієнтів з іншими патологіями. При цьому беруться до уваги показники первинної (IR - initial

reactive) і повторної (RR - repeat reactive) реактивності позитивних зразків, отриманих на цій тест-системі, з наступною верифікацією результатів.

Оцінюючи специфічність імуноферментних тест-систем, слід брати до уваги їхню високу чутливість. Якщо при тестуванні проб, що входять до “негативної вибірки”, для якоїсь проби отримано позитивний результат, то перш ніж вважати його за хибно-позитивний, слід провести додаткові дослідження.

Досить часто при використанні стандартних охарактеризованих панелей сироваток чутливість і специфічність імунодіагностикумів наближаються або дорівнюють 100 %, але досягти таких показників в умовах повсякденної лабораторної роботи практично неможливо. Взаємозв'язок між чутливістю і специфічністю такий, що поліпшення одного показника супроводжується погіршенням іншого. Таким чином, не існує діагностикумів, які гарантують абсолютну чутливість і специфічність при проведенні масових обстежень.

Кількість хибно-позитивних результатів при виявленні антитіл до деяких збудників може коливатися в межах від 0,02-0,5 % до 2-40 % усіх позитивних результатів обстежень. Так, за зведеними даними, існує біля 70 хвороб або інших чинників, які призводять до отримання хибно-позитивних результатів при дослідженні серологічними методами (не обов'язково ІФА). Це можуть бути перехресні реакції з аутоантитілами, антитілами до ревматоїдного фактору, вірусу Епштейна-Барр, короткочасна сероконверсія (після вакцинації, введення імуноглобулінових препаратів), наявність інфекційної патології, пухлин, імунодефіцитних станів, тощо.

Характеристика показників якості тест-системи “DIA-Brucella ab.combi-V”

Чутливість

Визначення чутливості проводили на панелях охарактеризованих сироваток крові великої рогатої худоби та молока корів. Використано панелі виробництва Українського державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) та внутрішньовиробнича панель, що розроблена компанією “Діапроф-Мед” згідно з рекомендаціями Дирекції Європейської комісії з питань охорони здоров’я та захисту споживача. В таблиці 2 приведено дані порівняльного аналізу чутливості тест-системи “DIA-Brucella ab.combi-V” з РБП та РЗК.

Таблиця 2 Порівняльний аналіз тест-системи
DIA-Brucella ab.combi-V” з РБП та РЗК.

Панель виробництва	Кількість зразків сироваток	Кількість позитивних результатів			Кількість зразків молока	Кількість позитивних результатів	
		РБП	РЗК	ІФА		кільцева р-ція	ІФА
ДНКІБШМ	10	10	10	10	9	9	9
Діапроф-Мед	26	26	26	26	16	16	16

Всі позитивні зразки обох панелей тест-системою “DIA-Brucella ab.combi-V” були визнані як позитивні.

Специфічність

Визначення специфічності тест-системи “DIA-Brucella ab.combi-V” проводили на зразках сироваток крові ВРХ та

молока корів з благополучних щодо бруцельозу господарств різних областей України; пробах сироваток крові та молока від глибокотільних корів та корів після отелення, корів з діагнозом маститу, ендометриту та з частими абортами. Усі сироватки крові були попередньо охарактеризовані в РА, РБП і РЗК, а проби молока – в кільцевій реакції преципітації. Сироватки крові ВРХ, що містять антитіла до *Yersinia enterocolitica* серотипу 09 та *Campylobacter fetus*, були отримані з Інституту клінічної та експериментальної ветеринарної медицини. Ці сироватки попередньо були тестовані в серологічних реакціях зі специфічними антигенами. В таблиці 3 подано результати дослідження специфічності тест-системи “DIA-Brucella ab.combi-V”.

Таблиця 3 Порівняння результатів дослідження специфічності тест-системи “DIA-Brucella ab.combi-V” з РА, РБП та РЗК.

Досліджувані зразки	Кількість проб	Кількість результатів негативних/позитивних				
		РА	РБП	РЗК	кільцева р-ція	ІФА
з благополучних щодо бруцельозу господарств	Сироватки крові ВРХ					
	643	643/0	643/0	643/0	-	643/0
	зразки молока від корів					
	523	-	-	-	523/0	523/0
сироватки крові корів з антитілами до <i>Yersinia enterocolitica</i>	17	0/17	0/17	17/0	-	17/0
сироватки крові корів з антитілами до <i>Campylobacter fetus</i>	1	0/1	0/1	1/0	-	1/0

сироватки крові корів з частими абортами	53	53/0	53/0	53/0	-	53/0
сироватки крові корів з діагнозом “мастит”	33	33/0	33/0	33/0	-	33/0
з діагнозом “мастит”, “ендометрит” частими абортами	Сироватки крові ВРХ					
	121	108/13	108/13	121/0	-	121/0
	Зразки молока від корів					
	115	-	-	-	115/0	115/0

Порівняльна оцінка тест-системи “DIA-Brucella ab.combi-V” з загальноприйнятими методами серологічної діагностики бруцельозу показала її здатність виявляти антитіла до Brucella abortus з більш високою чутливістю та специфічністю і діагностувати бруцельоз на ранніх етапах розвитку патологічного процесу. Висока чутливість і специфічність тест-системи дозволяють проводити імуноферментну реакцію при кімнатній температурі та здійснювати облік результатів не тільки в автоматичному режимі, але й візуально; це дає змогу використовувати її в польових умовах. Розроблена імуноферментна тест-система рекомендована як скринінгова при проведенні масового обстеження великої рогатої худоби на бруцельоз.

Форми випуску набору

- набір Ф2-моноліт – монолітний планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система розрахована на проведення двох постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);
- набір Ф6-стрип – стриповий планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система розрахована на 6 постановок

імуноферментного аналізу: 1 постановка – 2 стрипи (32 лунки);

- **набір T2-моноліт** - монолітний планшет, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на проведення двох постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);

- **набір T12-стрип** – стриповий планшет, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на 12 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 стрип (16 лунок).

Набір розраховано на проведення 192 аналізів (включаючи контролю).

Умови зберігання та транспортування

Набір зберігають і транспортують при температурі 2–8 °С.

Заморожувати набір не дозволяється.

Термін зберігання набору - 1 рік.

Основні особливості та переваги тест-системи

- Висока чутливість та специфічність.
- Використання високоспецифічних антигенів у складі імуносорбенту.
- Відсутність хибно-позитивних результатів при наявності у сироватці крові антитіл до *Yersinia enterocolitica* серотипу 09 та *Campylobacter fetus*.
- Можливість одночасного дослідження сироваток крові та молока корів однією тест-системою.
- Тривалість аналізу -1 година.
- Проведення реакції при кімнатній температурі.
- Оцінка результатів аналізу візуально або в автоматичному режимі.
- Можливість використання тест-системи в польових умовах.

- Різні варіанти комплектації наборів за вибором споживача: стриповий чи монолітний планшет.
- Один набір розрахований на 192 аналізів.
- Термін придатності 12 місяців.

**ПРОБЛЕМИ, ЩО МОЖУТЬ ВИНΙΚАТИ
ПРИ ПРОВЕДЕННІ ІФА**

Проблеми, що виникають	Можливі причини	Засоби усунення проблем
1. Високий фон (забарвлення) в лунках всього планшету.	1.1. Низька якість дистильованої води.	1.1.1. Промити дистильатор 10 % розчином соляної кислоти, а потім 5 разів дистильованою водою. 1.1.2. Прокип'ятити дистильовану воду у відкритій посудині протягом 10-15 хв, вистояти перед використанням. 1.1.3. Використовувати бідистильовану воду.
	1.2. Бактеріальне забруднення води.	1.2.1. Зберігати дистильовану воду в закритому посуді. 1.2.2. Дистильовану воду використовувати протягом дня.
	1.3. Забруднений промивач (вошер).	1.3.1 Почистити голівку промивача за допомогою голки та промити її 30 % розчином етилового спирту, а потім кілька разів дистильованою водою.

	1.4. Використання того ж самого посуду для різних реагентів.	1.4.1. Використовувати для розчину кожного реагенту окремий посуд.
	1.5. Наявність і використання на робочому місці дезрозчинів, що містять хлор.	1.5.1. Не використовувати і не зберігати дезрозчини, що містять хлор, в приміщеннях, де проводяться дослідження методом ІФА.
	1.6. Повторне використання наконечників.	1.6.1. Наконечники використовувати одноразово.
	1.7. Контакт хромогену з металами (пінцет, скальпель тощо).	1.7.1. Усунути контакт хромогену з металами.
	1.8. Зменшено кількість промивок планшету..	1.8.1. Промивати планшет згідно з вимогами "Інструкції".
	1.9. Закінчився термін придатності тест-системи.	1.9.1. Заборонити використання тест-системи.
	1.10. Забруднений посуд.	1.10.1. Мити посуд, дезінфікувати його відповідно до "Інструкції."

	1.11.Підвищено температуру або продовжено термін інкубації.	1.11.1.Дотримуватися режиму інкубації.
2.Високий фон в окремих лунках.	2.1.Переливання промивного розчину з лунок планшету вошером.	Відрегулювати вошер, виключити можливі порушення.
	2.2.Використання для дослідження гемолізованих зразків.	2.2.1. Повторно взяти кров.
	2.3.Використання нефракціонованої крові.	2.3.1.Отримати сироватку, повторно взявши пробу крові.
	2.4.Бактеріальне забруднення сироваток.	2.4.1.Повторно взяти кров.
	2.5.Використання того самого наконечника для декількох сироваток.	2.5.1. Використовувати окремі наконечники для кожної сироватки.
3.Високий фон в окремих рядах.	3.1.Повторне внесення проявника.	3.1.1.Розчин проявника вносити одноразово.
	3.2.Переливання рідини з одного ряду в другий під час промивання.	3.2.1.Відрегулювати подачу промивного розчину.

	3.3.Забруднення конусу автоматичної піпетки розчином кон'югату.	3.3.1.Для внесення кон'югату та проявника мати <u>окремі</u> мікропіпетки. При відсутності достатньої кількості мікропіпеток слід після внесення кон'югату і зняття наконечників видалити з піпетки можливі залишки кон'югату та протерти її фільтрувальним папером.
4. Після внесення проявника та закінчення інкубації немає забарвлення в лунках всього планшету.	4.1.Не внесено один з реагентів – кон'югат або проявник.	4.1.1. Переставити аналіз. Внести відповідно до "Інструкції" необхідні реагенти.
Немає забарвлення в окремих лунках планшету (рядів).	4.2.Не внесено один із реагентів – сироватку, кон'югат або проявник.	4.2.1.Переставити ці проби. Внести відповідно до "Інструкції" необхідні реагенти.

<p>5. Слабке забарвлення всього планшета. Значення ОГ контрольних зразків не відповідають вимогам "Інструкції"</p>	<p>5.1. Зменшено час інкубації.</p>	<p>5.1.1. Інкубацію проводити згідно з "Інструкцією".</p>
	<p>5.2. Термін придатності тест-системи закінчився.</p>	<p>5.2.1. Перевірити результати на тест-системі з належним терміном придатності.</p>

Література

1. Corbel M. Brucellosis: an overview. 1st international Conference on Emerging Diseases, 2002, <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol13no2/corbel.htm>
2. Garin-Bastuji B. Ovine epididymitis (Brucella ovis). – In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Office International des Epizooties, Paris, 4th Edition, 2000, 467-474.
3. Garin-Bastuji B. Caprine and ovine brucellosis (excluding Brucella ovis infection). – In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Office International des Epizooties, Paris, 2000, 4th Edition, 475-489.
4. MacMillan A.P., Stack J. Bovine brucellosis. – In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Office International des Epizooties, Paris, 2000, 4th Edition, 328-345.
5. Лейман В.Н. Бруцеллез: клиника, диагностика, лечение (методические разработки для интернов). – Куйбышев, 1979, 35 с.
6. Анонім. Настанова по діагностиці бруцельозу тварин. - Державний департамент ветеринарної медицини, Київ, 1998, 59 с.
7. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M.: Techniques for the Brucellosis Laboratory, INRA, Paris 1988.
8. Anonymous. The modifications of Technical Annexes of Council Directive 64/432/EEC to take account of Scientific Developments regarding tuberculosis, brucellosis and enzootic bovine leucosis. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Sanco/B3/R10/1999; European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General/ Directorate B – Scientific Health Opinions/ Unit B3 – Management of scientific committees II.
9. Stack J.A., MacMillan A.P.. Brucella Serology. - FAO/WHO. New Haw, UK, 2000, 1-3.

10. Кайтмазова Е.И., Чернышева М.И. Лабораторная диагностика бруцеллеза. – В кн.: Бруцеллез (ред. П.А.Вершилова). – М.: 1969, «Медицина», 198-241.

11. Splitter G. The immune response to Brucella. - Vet. Immunol. Immunopath. 54:309, 1996

12. Nielsen K.H., Wright P.F., Kelly W.A., Cherwonogrodzky J.H.: A review of enzyme immunoassay for detection of antibody to Brucella abortus in cattle. Vet. Immunol. Immunopath. 18, 331-347 (1988).

13. Wright P.F., Nielsen K.H.: Current and future serological methods, pp. 305-320. In Adams L.G. (Ed): Advances in Brucellosis Research, Texas A&M University Press, College Station, Texas 1990.

14. Boraker D.K., BrucELISA: an ELISA for detection of Brucella abortus antibodies in milk: correlation with the Brucella ring test and with the shedding of viable organisms. J. Clin. Microbiol. 14, 396-403 (1981).

15. Патент UA № 48811 А, Заявка № 2001128687 //Тест-система діагностична імуноферментна для визначення протибруцельозних антитіл в сироватках крові людини або великої рогатої худоби (ВРХ) 27.05.2002.

16. Заявка на винахід № 200354598 //Тест-система діагностична імуноферментна для визначення антитіл класу IgG до *Brucella abortus* у сироватках крові та в молоці великої рогатої худоби («DIA-Brucella ab.-combi-V»). Позитивне рішення від 10.11.2003 р.

Зміст

Скорочення, використані в тексті посібника	
Вступ	
Діагностика бруцельозу	
Бактеріологічні методи	
Серологічні та алергологічні дослідження	
Антигени бруцел, які важливі при постановці серологічних реакцій	
Імуноферментний аналіз для виявлення антитіл	
Контрольні сироватки при проведенні	
Інші діагностичні методи серологічних реакцій	
Визначення антитіл проти бруцел в злитих пробах	
Схема проведення ІФА	
Методика проведення ІФА на тест-системі «DIA-Brucella ab.-combi-V»	
Облік результатів аналізу	
Оцінка якості імуноферментної тест-системи	
Характеристика показників якості тест-системи “DIA-Brucella ab.combi-V”	
Форми випуску набору	
Основні особливості та переваги тест-системи	
Проблеми, що можуть виникати при проведенні ІФА	