

Национальная академия наук Украины
Технологический парк Института монокристаллов
Научно-производственная компания “Диапроф-Мед”

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
по работе с иммуноферментными тест-системами
для определения антител против возбудителя
бруцеллёза крупного рогатого скота *Brucella abortus*
в сыворотках крови и в молоке коров

Киев, 2004

УДК
ПРАКТИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ по работе с
иммуноферментными тест-системами для определения
антител против возбудителя бруцеллёза крупного рогатого
скота *Brucella abortus* в сыворотках крови и в молоке коров

Под редакцией доктора биологических наук
профессора Спивака Н.Я.

Авторы: Ганова Л.А., Резуненко Е.В., Иванская Н.В.

Бруцеллез – одно из самых распространенных антропозоонозных заболеваний, вызываемых бактериями из рода бруцелл. Высокий уровень летальности при тяжелых генерализованных формах этой инфекции у человека и значительные экономические потери при заболевании животных требуют постоянного контроля эпизоотической ситуации. В последнее время для диагностики бруцеллеза успешно используют метод иммуноферментного анализа.

Для микробиологов, иммунологов, работников диагностических лабораторий, студентов и аспирантов высших учебных заведений и научно-исследовательских институтов медицинского и ветеринарного профиля.

Киев, «Диапроф-Мед»

Сокращения, использованные в тексте пособия:

- АБТС – 2, 2'-азинобис-3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота;
- АГ – антиген;
- АТ – антитело;
- ГЗ – граничная зона;
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- К⁻ – отрицательная контрольная проба;
- К⁺ – положительная контрольная проба;
- Кгз – контроль граничного значения;
- КРС – крупный рогатый скот;
- ЛПС – липополисахарид;
- м.е. – международная единица;
- МКА – моноклональные антитела;
- НПЗ – негативное прогнозируемое значение (результатов теста);
- о.е. – оптическая единица;
- ОП – оптическая плотность;
- ОФД – ортофенилендиамин (*o*-фенилендиамин);
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- ППЗ – положительное прогнозируемое значение (результатов теста);
- РБП – проба роз-бенгал;
- РНА – реакция нейтрализации антигена;
- РНГА – реакция непрямой гемагглютинации;
- РА – реакция агглютинации;
- РСК – реакция связывания комплемента;
- СрКгз – средний показатель граничного значения;
- ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) – Центры по контролю и предупреждению заболеваний ;
- CV (coefficient of variation) – коэффициент вариации;
- ЕС (European Community) – Европейское сообщество;

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазный иммуноферментный анализ;

ISABS (International anti-*Brucella abortus* serum) – международная стандартная сыворотка против *Brucella abortus*;

MRT (milk ring test) – молочный кольцевой тест;

OIE (Office Internationale d'Epizooties) – Международное эпизоотическое бюро;

Omp (outer membrane protein) – белок внешней оболочки (бруцеллы);

PCR-RFLP (polymerase chain reaction and restrictase fragments length polymorphism) – полимеразная цепная реакция, совмещенная с изучением полиморфизма по длине рестриктазных фрагментов;

USA FDA (USA Food and Drug Administration) – Государственное ведомство США по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарств.

ВСТУПЛЕНИЕ

Проблема заболеваемости бруцеллёзом не сходит с повестки дня в системе здравоохранения и ветеринарного надзора [1]. Бруцеллёз принадлежит к зоонозам, т.е. к заболеваниям, которые передаются человеку от животных.

Заболевание вызывают бруцеллы (по определителю Берджи, род *Brucella* Meyer et Shaw, 1920) – неподвижные грам-отрицательные коккоподобные бациллы или короткие палочки размерами 0,5-0,7х0,6-1,5 мкм. Они не образуют капсул и эндоспор. Бруцеллы переживают или растут при температурах 20-40 °С и при значениях рН 6,6-7,4. При температуре 60 °С бруцеллы гибнут в течение 10-15 мин. Они чувствительны к высушиванию и к воздействию антисептических веществ (5 % карболовой кислоты, свежего известкового молока, 0,01 % сулемы, 0,5 % формалина). Эти бактерии чувствительны также ко многим антибиотикам.

По патогенности для человека и животных наибольшее значение имеют: *B. melitensis*, поражающая главным образом, коз и овец, *B. abortus* (синоним *B. abortus bovis*), патогенная для крупного рогатого скота (КРС), а также для животных многих других видов, *B. suis* – возбудитель заболевания у свиней, а также *B. ovis* – причина эпидидимита у баранов и, наконец, *B. canis*. Последний вид, в отличие от прочих патогенных бруцелл, паразитирует у собак в условиях городских квартир, вызывая у человека бруцеллёз собачьего типа. Следует подчеркнуть, что бруцеллы, патогенные для какого-то вида млекопитающих, способны вызывать заболевание также и у млекопитающих других видов [2, 3, 4].

Заражение животных происходит при поедании зараженных кормов или же через повреждённую кожу и слизистые оболочки. Источник заражения для человека – больные животные, а именно КРС, свиньи, козы, овцы,

собаки, от которых возбудитель передаётся с выделениями при родах и выкидышах, а также с мочой и фекалиями. Проявления болезни у животных и людей могут носить сезонный характер, когда можно выявить так называемый максимальный эпидемиологический момент. От КРС, свиней и домашних животных болезнь передается человеку равномерно в течение целого года [1].

Человек заражается не только при контакте, но и через инфицированные мясо- и молокопродукты. Бруцеллы проникают в организм обычно через слизистые оболочки и кожу. Меньшее значение имеет заражение через воздух, загрязненный возбудителями (аэрогенное заражение).

Таким образом, это заболевание наиболее опасно именно для лиц, работающих в животноводстве и ветеринарной службе, на мясокомбинатах; для людей, занятых переработкой молока, субпродуктов, обработкой кожсырья, щетины, шерсти, костей, вывозом навоза, изготовлением кизяков. Известно, что люди, пораженные бруцеллезом, проживают на неблагополучных территориях, где бывают случаи заболевания среди животных, в частности, среди КРС, овец и коз, которым с эпидемиологической точки зрения наиболее важны с точки зрения передачи бруцеллеза человеку [1].

Чаще всего возбудителем бычьего бруцеллеза выступает *B. abortus*, хотя во время вспышек бруцеллеза у КРС, контактировавшего с овцами и козами, обнаруживают также и *B. melitensis*. Вид *B. suis* очень редко вызывает заболевание бруцеллезом у КРС. Возбудители бруцеллеза чрезвычайно редко передаются от человека к человеку, хотя есть отдельные сообщения о поражении этим заболеванием при переливании зараженной крови.

Бруцеллез – тяжелое заболевание, вызывающее многочисленные жалобы на состояние здоровья, сильные боли, слабость; он часто сопровождается повышенной

температурой, нередко приводит к нарушениям моторно-двигательного аппарата, работы печени, к субпсихотическим и психическим нарушениям, инвалидности, преждевременной утрате трудоспособности. Часто встречаются также случаи страпляются хронического и латентного бруцеллеза, что неблагоприятно сказывается на здоровье зараженных лиц [4, 5].

Из-за зоонозной природы бруцеллеза оздоровление животноводства имеет первостепенное значение с точки зрения профилактики бруцеллеза и снижения опасности для людей, не говоря уже об экономической стороне проблемы и убытках в животноводческих хозяйствах, вызванных болезнью [6]. Эти убытки обусловлены как падением продуктивности животноводства (например, молочных коров), так и многочисленными спонтанными абортами и прочими нарушениями репродуктивного цикла по причине токсического воздействия возбудителя. Понятно, что невозможно провести оздоровление животноводческих ферм без надежных и сравнительно дешевых диагностических подходов, позволяющих своевременно осуществлять массовые обследования и удалять больных животных из поголовья. Есть случаи, когда из-за большого разнообразия клинических форм болезни без надлежащей серологической диагностики трудно обнаружить заболевание и у людей, и у животных. Поэтому не нужно доказывать, сколь необходимо разработать надежные и высокоинформативные тест-системы нового поколения для диагностики бруцеллеза [4, 5]

Диагностика бруцеллеза

Бактериологические методы

Достоверным методом диагностики бруцеллеза считается бактериологический, когда из патологических материалов от больного человека или животного (из крови,

спинномозговой жидкости, костного мозга, слюны, мочи, синовиальной жидкости, мокроты, молока) удается высеять возбудителя, *Brucella sp.*, на питательной среде. Условия получения проб очень важны для диагностики, т.к. случается, что бруцеллы находятся только в небольшой части ккакой-то ткани или молока (например, выдоенного из одной только дойки); важно работать с как можно большим количеством проб.

Кроме случаев, когда возбудителя выделяют из крови, для культивирования бруцелл обычно используют твердые селективные питательные среды с добавлением антибиотиков. Такой подход позволяет увидеть колонии бруцелл, предупреждая загрязнение культур возбудителя другими микроорганизмами, которые растут быстрее, чем бруцеллы. Некоторые штаммы бруцелл, в частности, *B. abortus* серовара 2, требуют для роста еще и сыворотку¹ [7, 8].

Отбор проб от животных для выделения возбудителя следует проводить, принимая во внимание патогенез бруцеллеза в хозяйстве, где есть подозрительные особи. Когда протекает острая фаза болезни, для исследования берут плацентарный котиледон, выделения из влагалища, молоко и ткани плода (печень, легкие), а также содержимое сычуга, тогда как при хроническом течении недуга у убитых животных берут пробы из органов лимфоретикулярной системы (селезенки, лимфатических узлов, миндалин), матку при беременности или вскоре после родов, а также вымя.

У 90 % взрослых коров, больных бруцеллезом, культуру возбудителя можно выделить из лимфоузлов вымени, а также из лимфоузлов нижней челюсти (mandibular lymph nodes),

¹ Набор референтных штаммов, одобренный FAO/WHO, содержит шесть видов рода *Brucella* и штаммы их биоваров. Все они находятся в типовых коллекциях микроорганизмов Великобритании (National Collection of Type Cultures-Great Britain) и США (American Type Culture Collection). Эти референтные штаммы следует использовать в ходе типизации разных видов бруцелл, чтобы обеспечить их надежную идентификацию.

лимфоузлов подвздошной кишки (ileum) и из сосочков матки (uterine caruncles), если они там есть; в этом случае частота выделения возбудителя достигает почти 100 %. Если материал берут от телок в ранний инкубационный период, то надо использовать для культивирования еще и другие ткани – глоточные (ретрофарингиальные), околоушные, из поверхностного слоя цервикального канала, из лимфоузлов среднего кишечника и из селезенки. У быков для анализа берут материалы из яичка, простаты, придатка яичка и из семенных пузырьков вместе с лимфоузлами. Пробы следует сразу же охладить; если их предстоит длительно сохранять (свыше 12 ч перед культивированием), пробы замораживают. Контейнеры для проб должны быть такими, чтобы инфекционный материал не проникал из них наружу и чтобы не допустить заражения воздуха [9].

Как правило, если в 1 г ткани зараженного организма присутствует менее чем 1×10^6 клеток бруцелл, то приходится затратить много времени, чтобы отыскать такие срезы тканей, где видны бактерии. Бактериологические исследования проводят в тех случаях, когда есть аборты и другие признаки, характерные для бруцеллеза (орхиты, эпидидимиты, бурситы, гигромы). Они длятся до 1 месяца. Но даже при остром бруцеллезе бактериологический подход пока еще не стал надежным, т.к. возбудитель очень медленно растет на питательных средах (случается, что колонии появляются через 120-150 дней после посева!). Вероятность полусить колонии бруцелл еще ниже при хроническом компенсированном бруцеллезе, а при латентной форме недуга бактерии высеять вообще невозможно. Иногда прибегают к так называемой биологической диагностике – заражению подопытных животных (мышей, морских свинок) патологическими материалами от больных людей и сельскохозяйственных животных, после чего удается

выделить чистую культуру бруцелл. Конечно же, этот подход не сокращает времени исследования [6-10].

Серологические и аллергологические исследования

В Украине основной метод обнаружения животных, больных бруцеллезом – проведение плановых серологических исследований и постановка аллергических проб [6].

Серологические исследования на бруцеллез чаще всего проводят при помощи пластинчатой реакции агглютинации с так называемым роз-бенгал антигеном² (роз-бенгал пробы – РБП) и в реакции связывания комплемента (РСК) с одним и тем же бруцеллезным антигеном [8].

В СССР самым распространенным методом диагностики бруцеллеза была реакция Райта (РА), т.е. реакция агглютинации (РА) убитых бруцелл или компонентов бактериальных клеток сыворотками больных людей и животных. РА считается высокоспецифичной. Она не рекомендована Международным эпизоотическим бюро (ОIE), но специфицирована ветеринарным законодательством Евросоюза [8]. РА становится положительной на 5-7-й день после заражения. Высокие титры антител в РА (до 1:800) обнаруживают на 15-20-й день; они продолжают расти до второго месяца после заражения, а затем постепенно падают. Диагностическими считаются титры 1:100-1:200, тогда как титр 1:50 расценивается как сомнительный. Отрицательная РА не позволяет отвергать бруцеллез, т.к. в этой реакции не получают положительного ответа в 11-12 % достоверных случаев заболевания у человека. Ложноположительные результаты при использовании РА могут быть у лиц, больных брюшным и сыпным тифом, туляремией, сифилисом, а также при беременности. Кроме того, положительная РА может свидетельствовать об иммунитете

² Препарат антигена содержит краситель бенгальский розовый.

вследствие вакцинации и перенесенного ранее бруцеллеза [10].

Аллергическая внутрикожная проба (у людей – проба Бюрне), которая протекает как аллергическая реакция замедленного типа, доказывает сенсibilизацию обследованных людей или животных к бруцеллезному антигену. Она становится положительной на второй неделе после заражения и может не исчезать в течение 10 лет и более. Однако при остром бруцеллезе аллергическая проба не дает положительного ответа свыше чем у половины инфицированных людей и животных, а при декомпенсации проба Бюрне положительна или резко-положительна у 80 % исследованных животных [11].

Существенное преимущество при тестировании на бруцеллез у КРС при помощи современных вариантов аллергической кожной пробы (з бруцеллином) – довольно высокая ее специфичность [2, 3]. Однако эта реакция, к сожалению, положительна не у всех зараженных животных, и есть данные, что от некоторых животных с отрицательной кожной аллергической пробой можно успешно выделить бруцеллы. Вместе с тем этот тест может и принести пользу, особенно как добавочный при истолковании серологических показателей у животных из тех хозяйств, где получили сомнительные результаты и когда нельзя с уверенностью утверждать, есть там бруцеллез или нет. Четко показано, что при помощи кожной пробы можно достоверно отличать бруцеллез от инфекции, вызванной *Yersinia enterocolitica* 09. Аллергический тест не пригоден для работы с животными, которым ввели вакцину, вызывающую продолжительную сенсibilизацию против бруцеллезных антигенов.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) и реакция нейтрализации антигена (РНА) высокочувствительны, но и очень сложны и трудоемки, требуют наличия лабораторных животных и высокой квалификации персонала [6].

Довольно трудна для работы также и распространенная в Украине РСК. Считают, что РСК дает меньше сомнительных результатов, чем РА, хотя по своей чувствительности несколько ей уступает. После прекращения патологического процесса РСК остается положительной дольше, чем РА, и до сих пор служит для подтверждения диагноза бруцеллеза.

По последнему варианту методики, помещенной в наставлениях Международного эпизоотического бюро (ОИЕ-2000), перед проведением РСК исследуемые сыворотки разводят в вероналовом буфере и обязательно прогревают (для инактивации комплемента) в течение 50 мин при 58 °С. Установив сначала отсутствие антикомплемментарности у антигена и сыворотки, добавляют антиген к серийным разведениям сыворотки и инкубируют смесь для образования комплекса антиген-антитело (АГ-АТ). Затем к проинкубированным пробам добавляют комплемент – заранее оттированную сыворотку морской свинки. В контрольных вариантах реакции есть пробы, куда вносят только растворитель, а также растворитель с комплементом и отрицательной сывороткой и растворитель с одним только комплементом. Реакцию проводят в течение 30 мин при 37 °С или 14-18 ч при 4 °С. Индикаторной системой при проведении РСК служат бараньи эритроциты (3 %-ная суспензия). Комплекс АГ-АТ способен связывать комплемент и предупреждать таким образом растворение (лизис) эритроцитов, вызываемый комплементом. Как правило, сами по себе свободные антитела и антиген, не присоединенный к ним, комплемент не связывают. Поэтому торможение лизиса бараньих эритроцитов доказывает присутствие в пробе комплекса АГ-АТ и, следовательно, наличие антител против соответствующего антигена [3, 8].

Антигены бруцелл, важные при постановке
серологических реакций

Одна из самых существенных проблем при постановке серологических реакций – проблема с получением достаточно очищенных имунодоминантных антигенов [9]. На сегодня известно, что главнейший из них у бруцелл – это бактериальный липополисахарид (ЛПС) и антигенно родственные ему полисахариды NH, входящие в состав клеточной оболочки этих бактерий. Для ЛПС бруцелл найдено 11 антигенных детерминант (эпитопов), причём четыре из них (А, М, С/У и С) найдены в составе О-полисахаридной цепи. Эпитопы С/У и С присутствуют в ЛПС всех до сих пор известных гладких форм бруцелл. А-эпитоп найден у *B. abortus*, а М-эпитоп – у *B. melitensis*. Есть, однако, случаи обнаружения у некоторых штаммов бруцелл этих видов обоих названных эпитопов; то же касается и некоторых штаммов вида *B. suis*. Два эпитопа (R1 и R2) лежат в сердцевине олигосахарида, три (LA1, LA2 и LA3) – в липиде А, а еще два (LAOmp3-1 и LAOmp3-2) – в пептиде, связанном с липидом А. Большинство сывороточных антител, появляющихся после введения бруцелл, направлены против эпитопа С/У, который находится в О-антигене, и против полисахарида NH. Уровни антител, синтезованных против других эпитопов, бывают значительно ниже.

Современные серологические реакции существенно повысили свою чувствительность и специфичность благодаря методологии, при помощи которой удается получать и очищать нужные антигены, в частности, ЛПС.

Обычно ЛПС получают из *референтных штаммов* *Brucella abortus* (1119-3 або S99), используя довольно сложную технологию. ЛПС извлекают из клеток, убитых нагреванием, при помощи смеси горячей воды с фенолом.

Иммуноферментный анализ для обнаружения антител

ЛПС используют как антиген также и при определении антител против бруцелл методом иммуноферментного анализа (ИФА) [6-7,12-13]. В течение последнего десятилетия ИФА стал в большинстве стран основным методом при массовых обследованиях на бруцеллез в медицине и ветеринарии, особенно при проведении эпидемиологических и эпизоотических исследований.

При конкурентном варианте ИФА перед нанесением на твердую фазу (обычно на полистироловый планшет) высокоочищенный лиофилизированный ЛПС³ растворяют в карбонатном буфере (рН 9,6; 1:1.000). Планшеты после сорбции антигена можно сохранять в течение одного года при температуре минус 20 °С и использовать для проведения ИФА после инкубации при 37 °С в течение 30-45 мин. Затем в лунки планшета вносят исследуемые сыворотки и моноклональные антитела (МКА), направленные против ЛПС (часто это МКА М84). МКА присоединяются к сорбированному антигену, если к ним не прикрепилась специфические антитела, присутствовавшие в сыворотке. Тщательно отмыв несвязавшиеся компоненты, в планшет вносят затем противомышиный пероксидазный конъюгат, после чего, отмыв остатки конъюгата, проводят ферментативную реакцию. Как хромогенный субстрат используют ортофенилендиамин (ОФД) или тетраметилбензидин (ТМБ). Для прекращения реакции используют серную или соляную кислоту.

Кроме конкурентного метода, часто пользуются еще и многими другими непрямими вариантами ИФА. Диапазон изотипов и субклассов иммуноглобулинов, обнаруживаемых

³ В более современных конкурентных тест-системах на основе ИФА используют не полный ЛПС-антиген, а именно тот его участок, который приходится на О-цепь, т.к. некоторые его эпитопы обладают очень высокой иммуногенностью.

этими методами, зависит от специфичности антител, которые входят в состав конъюгата. При определении антител класса IgG1 против бруцелл можно получить результаты, близкие к данным, получаемым в РСК; такой тест на основе ИФА подходит для определения антител как в сыворотке, так и в молоке. Пользуясь конъюгатами, специфичными для легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов, можно повысить чувствительность по сравнению с РСК. Как и во всех иных случаях, при непрямом ИФА нельзя отличить антител, синтезированных после вакцинации (ослабленным штаммом 19) и после заражения.

Пользуясь непрямыми вариантами ИФА как подтверждающими тестами, берут пероксидазные конъюгаты узкой специфичности (такие, например, которые содержат антитела против тяжелых и легких цепей бычьих IgG1) и больше их разводят, добиваясь более высокой диагностической специфичности. В литературе есть указания на то, что важнейшими показателями инфекции при бруцеллезе бывают антитела классов IgG та IgA⁴, хотя большинство исследователей считают, что ЛПС бруцелл способен вызывать усиленный синтез IgM и IgG. При активной инфекции титры IgG, как правило, высокие; при этом образуются антитела как против ЛПС, так и против многих других специфических белков бактерий.

До недавних пор в Украине не было коммерческих тест-систем для обнаружения антител против бруцелл у КРС. В АОЗТ НПК “Диапроф-Мед” в сотрудничестве с исследователями Украинской академии аграрных наук из Института экспериментальной и клинической ветеринарии (Харьков) и Института ветеринарной медицины (Киев) создано три вида наборов для диагностики бруцеллеза: тест-

⁴ Чтобы отличать активную инфекцию от уже прошедшей или субклинической, советуют также проводить Вестерн-блоттинг, отыскивая антитела против определенных цитоплазматических белков бруцелл.

система диагностическая иммуноферментная для обнаружения противобруцеллезных антител в сыворотках крови КРС “DIA-Brucella ab.-V” [15]; тест-система иммуноферментная для обнаружения антител против *Brucella abortus* в молоке коров” DIA-Brucella ab.-MILK” и комбинированная тест-система иммуноферментная для выявления антител против *Brucella abortus* в сыворотках крови КРС и молоке “DIA-Brucella ab. combi-V” [16]. Тест-системы основаны на использовании очищенного ЛПС *B. abortus*, конъюгата, содержащего пероксидазу и МКА против иммуноглобулинов ВРС, и проявителя (смеси субстрата пероксидазы – перекиси водорода – и хромогена) для обнаружения продукта ферментативной реакции. Тест-системы предназначены для скрининговых обследований 196 проб, длительность анализа – 1,5 ч. Ниже детально описано, как проводят диагностическое исследование с применением тест-системы “DIA-Brucella ab. combi-V”.

Контрольные сыворотки

при проведении серологических реакций

При проведении серологических реакций важное значение имеют контрольные сыворотки. Как известно практикам, вейбриджскую сыворотку (“Weybridge serum”) считают второй международной сывороткой против *B. abortus* (2nd International anti-Brucella abortus serum, ISABS); это первичная стандартная сыворотка, которую специалисты должны использовать для создания вторичных национальных (государственных) стандартов. Ныне эта сыворотка используется как стандартная при постановке серологических реакций; это международная стандартная сыворотка (international reference standard serum) при постановці РБП, РСК и реакции агглютинации. Неавно ОІЕ утвердило необходимость создания резко-положительных, слабо-положительных и отрицательных стандартов ОІЕ для

постановки прямого и конкурентного ИФА. Такие сыворотки производят в Великобритании (Veterinary Laboratories Agency = VLA, Weybridge, U.K.). Эти референтные сыворотки можно использовать также для стандартизации при разработке новых методов. Согласно требованиям ОIE, величина оптической плотности (ОП) после проведения ИФА с резко-положительной сывороткой должна быть не ниже, чем 0,5-1,0 о.е. Слабо-положительная сыворотка должна давать значение ОП, равное 20-30 % от этого значения, а при разведении в четыре раза давать отрицательную реакцию. Отрицательные сыворотки должны давать значение ОП, не превышающие 10 % от значений, получаемых с резко-отрицательными контрольными образцами [8].

Другие серологические реакции для диагностики бруцеллеза

Кроме бактериологических и серологических методов, для диагностики бруцеллеза предложены также методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ДНК-зондов, которые предоставляют большие дополнительные диагностические возможности. Классические методы типизации бруцелл дают исключительно хорошие результаты, если работать правильно. Но эти методы требуют точно оттированных реагентов и опытных сотрудников, чтобы правильно понять результаты исследований и избежать ложного их истолкования. Некоторые методы молекулярной типизации, главным образом, изучение разных генов и их локусов и обнаружение полиморфизма ДНК при применении PCR-RFLP и Саузерн-блотинга дают возможность провести молекулярную идентификацию и типизацию разных видов *Brucella* и их биоваров. Саузерн-блотинг и зондирование для выявления инсерционной последовательности IS711 (IS6501) – это подход плодотворный, хотя для идентификации разных видов *Brucella* требуется время. Обнаружить полиморфизм

методом PCR-RFLP легче, и таким образом можно проанализировать много проб. Лучше всего работать с белками внешней оболочки (Omp) возбудителя, т.к. они достаточно отличаются и дают возможность отличать виды бруцелл и их биовары. Определяя гены *omp2a* и *omp2b*, можно отличить шесть видов *Brucella* и некоторые их биовары. Добавление праймеров для других генов, таких как *omp31* и *dnaK*, далее улучшает возможность отличать отдельные виды и их биовары. Но значительная степень гомологии между генами отдельных видов и биоварами мешает развивать методы генетической типизации, а потому они пока еще не достигли такого дискриминативного уровня, как классические методы бактериологии. Однако весьма вероятно, что положение улучшится благодаря развитию новых технологий и обнаружению других, более полиморфных генов [8].

Определение антител против бруцелл в слитых пробах

Особо следует остановиться на исследованиях слитых проб (pools) сывороток и молока. По современным требованиям, пробы из молочных цистерн считаются отрицательными, если они дают менее чем 50 %-ную реакцию по сравнению с пробой отрицательного молока при добавлении сыворотки из второго международного бруцеллезного стандарта, разведенной в 10.000 раз [14].

Что же касается требований к кольцевым тестам с молоком (milk ring test, MRT), то в директивных документах Евросоюза (ЕС 1997, А.1.13) подчеркивается, что при проведении тестов с молоком, взятым из цистерн, количество взятых проб должно быть вдвое большим, а интервал между разведениями – вдвое меньшим. MRT – тест полезный, т.к. он очень пригоден для полевых условий и не требует для проведения сложной аппаратуры. Однако он не настолько точен, как ИФА, который следует предпочитать при

проверке проб из молочных цистерн. Фоновым уровнем (cutoff) при проведении MRT считают величину, равную 20 международным единицам (м.е.). Стандарт, дающий 20 м.е., можно приготовить при разведении международной контрольной стандартной сыворотки ОIE для реакции агглютинации или для РСК на отрицательном молоке. Однако при определении возбудителя в молоке из цистерн могут возникнуть трудности из-за того, что коров с незначительной положительной реакцией на бруцеллез не обнаружат, т.к. их молоко смешано с молоком здоровых животных. В прошлом к MRT часто прибегали при осуществлении программ искоренения бруцеллеза, т.к. считали, что при наличии на ферме нескольких зараженных животных этот тест вполне подходит. Но теперь, когда многие хозяйства стран ЕС свободны от бруцеллеза, вполне возможны случаи этого заболевания из-за случайного завоза на фермы новых животных из неблагополучных местностей, а потому могут найтись отдельные особи с положительной пробой на эту инфекцию [3, 8].

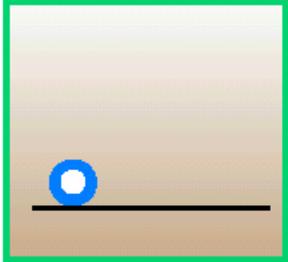
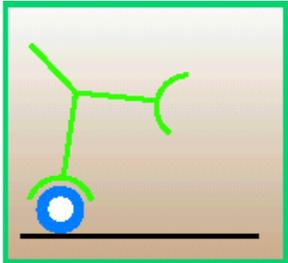
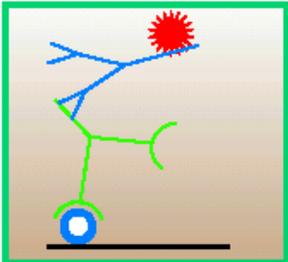
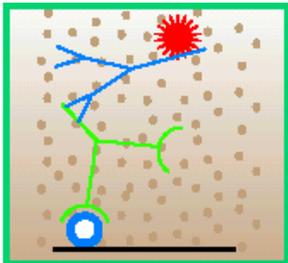
Таким образом, при исследовании проб молока, взятых от нескольких коров и слитого в один сосуд, надо так подобрать наибольшее количество коров, молоко которых сливают вместе, чтобы можно было выявить животных, в молоке которых непременно обнаружат 20 м.е. Такое наибольшее количество коров устанавливают национальные контрольные лаборатории, учитывая чувствительность теста. Это количество коров должно быть таким, чтобы при тестировании можно было обнаружить животное с титром 20 м.е., молоко которого слито с молоком здоровых коров.

С подобным же положением мы сталкиваемся и при проведении ИФА на смеси (пуле) проб сывороток или молока, хотя мало исследовано, какие получают результаты при проверке смеси сывороток. Наибольшее количество слитых вместе исследуемых сывороток должно быть таким,

чтобы в смеси еще можно было определить антитела при помощи слабой стандартной контрольной сыворотки ОІЕ, которую разводят отрицательной сывороткой или молоком с отрицательным тестом на бруцеллез.

Действующие директивные документы ОІЕ указывают, что ИФА можно применять для работы со слитыми пробами молока, если в данный момент доится не менее 30 % коров. Эта цифра основана на практической возможности охватить всех коров на ферме, если повторять проверку ежегодно. При таком использовании ИФА можно установить, есть ли на ферме заболевание или нет, но о состоянии отдельных животных ничего узнать нельзя.

Схема проведения ИФА

Процедура	Формирование комплекса
<ul style="list-style-type: none"> • Полистироловые стрипы сенсibilизированы ЛПС <i>V. abortus</i> 	
<ul style="list-style-type: none"> • Внесение в лунки стрипов раствора для разведения образцов, контролей и исследуемых проб • Инкубация (образование комплекса АГ-АТ) • Промывание лунок буферным раствором 4 раза 	
<ul style="list-style-type: none"> • Внесение в лунки раствора конъюгата • Инкубация (образование комплекса с конъюгатом) • Промывание лунок буферным раствором 6 раз 	
<ul style="list-style-type: none"> • Внесение в лунки раствора перекиси водорода и хромогена • Инкубация 30 мин при комнатной температуре (окрашивание) • Остановка реакции добавлением стоп-реактента • Регистрация оптической плотности 	

МЕТОДИКА
проведения ИФА на тест-системе
«DIA-Brucella ab.-combi-V»
набор T12-стрип

Назначение набора

Набор предназначен для анализа сыворотки крови КРС и коровьего молока на присутствие антител против *B. abortus* методом ИФА.

Принцип анализа

Главные компоненты набора – иммуносорбент и иммуноферментный конъюгат. Иммуносорбент – полистироловый планшет, лунки которого сенсibilизированы очищенными антигенами *B. abortus*. Конъюгат – МКА против бычьих иммуноглобулинов класса IgG, пришитые к пероксидазе хрена.

При внесении в лунки планшета исследуемых образцов специфические антитела к *B. abortus*, содержащиеся в образцах, связываются с антигенами на твердой фазе, образуя комплексы АГ-АТ. Полученные комплексы обнаруживают при помощи специфического иммуноферментного конъюгата. После отмывания несвязанных компонентов в лунки вносят раствор проявителя, который содержит субстрат пероксидазы (перекись водорода) и хромоген (3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ). Ферментативную реакцию останавливают, добавив стоп-реагент (0,5 М раствор серной кислоты). Интенсивность окрашивания в лунках с образцами сывороток или молока пропорциональна концентрации специфических антител к *B. abortus*. Учет результатов проводят визуально, сравнивая интенсивность окрашивания в лунках с проверяемыми сыворотками с интенсивностью окрашивания в контроле граничного

значения (Кгз) или измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках при длине волны 450 нм.

Таблица 1. Состав набора

N	Название компонента	Количество
1	Концентрат раствора № 1 для промывания планшета	3 фл. по 25 мл
2	Иммуносорбент	2 планшета
3	Раствор № 3 для разведения сывороток или молока	1 фл., 20 мл
4	Раствор № 4 для разведения конъюгата	1 фл., 26 мл
5	Раствор № 5Т для приготовления проявителя	1 фл., 14 мл
6	Хромоген ТМБ	1 фл., 14 мл
7	Конъюгат иммуноферментный, 50х	1 амп., 0,6 мл
8	Положительный контроль (К ⁺)	1 амп., 0,3 мл
9	Отрицательный контроль (К ⁻)	1 амп., 0,3 мл
10	Контроль граничного значения (Кгз)	1 амп., 0,9 мл
11	Стоп-реагент	1 фл., 25 мл
12	Клейкая пленка	6 шт.

Оборудование и аппаратура, необходимые для работы с тест-системами на основе ИФА

Лаборатории, где проводят ИФА, должны быть укомплектованы таким оборудованием:

- термостатом, поддерживающим температуру 37 °С;
- холодильником с морозильной камерой;

- дистиллятором лабораторным для получения дистиллированной воды;
- промывателем для планшетов (вошером);
- спектрофотометром многоканальным (ридером);
- центрифугой для приготовления образцов;
- набором автоматических пипеток (микродозаторов), в который входят одноканальные пипетки переменного объема, рассчитанные на дозирование 5-40, 40-200 и 200-1000 мкл жидкости, а также 8-канальные пипетки переменного объема на 5-50 та 50-200 мкл и наконечниками для дозаторов;

Добавочные реактивы, материалы и оборудование

- вода дистиллированная;
- перекись водорода, 6 %;
- спирт этиловый, 70°;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага;
- мерная склянка или цилиндр (1000 мл);
- ванночки для реагентов;
- флаконы для реактивов (20 мл);
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей.

Необходимые предостережения

Меры безопасности при использовании набора:

- работу проводить в специально оборудованном помещении;
- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворов ртом;
- все использованные растворы обрабатывать 6 % раствором перекиси водорода при комнатной температуре в течение 3 ч;
- все твердые отходы собирать в специальный контейнер, стерилизовать его в автоклаве в течение 1 ч при температуре 120 °С;

- инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности протирать 70° этиловым спиртом.

Правила работы с иммуноферментными тест-системами:

- не использовать набор после окончания срока годности, не смешивать компоненты наборов разных серий;
- тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа;
- использовать для приготовления реагентов чисто вымытую посуду, ополоснутую дистиллированной водой;
- не допускать подсыхания лунок на всех этапах постановки ИФА;
- проверять точность дозирования, следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;
- избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность во время проведения анализа.

Требования к промыванию планшетов:

- некачественное промывание планшета приводит к некорректным результатам;
- для промывания планшета рекомендуют использовать автоматическую промывалку – вошер; при отсутствии или плохой работе вошера лунки можно промывать при помощи 8-канальной пипетки;
- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение лунок и полное удаление жидкости из них: лунки должны заполняться доверху (350 мкл промывной жидкости на лунку), без переполнения лунок и перетекания жидкости из соседних лунок.

Подготовка образцов

Образцы сывороток сохраняют температуре 2-8 °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже 20 °С) не более чем дважды. Образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлить при помощи центрифугирования.

Образцы, где заметны гемолиз, гиперлипидемия или бактериальное загрязнение (проросты), а также образцы, куда добавлен как консервант азид натрия, не годятся для анализа.

Проведение анализа

1 Подготовка к анализу (из расчета 16 лунок)

Выдерживают компоненты набора при температуре 18-30 °С в течение 30 мин.

1.1 Приготовление раствора № 1 для промывания планшета

Содержимое одного флакона с концентратом раствора № 1 энергично встряхивают. Отбирают 6 мл раствора и разводят в 270 мл дистиллированной воды, перемешивают. Если концентрат раствора содержит кристаллы, его прогревают перед использованием при 35-37 °С до полного растворения кристаллов.

Раствор можно сохранять при температуре 2-8 °С не более 5 суток.

1.2 Приготовление раствора конъюгата

В чистый флакон отбирают 2 мл раствора № 4 для розведения конъюгата и добавляют 40 мкл конъюгата (50-кратного концентрата). Содержимое флакона тщательно перемешивают, не допуская пенообразования.

Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

1.3 Приготовление раствора проявителя

В чистый флакон отбирают 1 мл раствора хромогена ТМБ и добавляют 1 мл раствора № 5Т для приготовления проявителя, смесь энергично встряхивают..

Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

Раствор проявителя необходимо оберегать от света и от контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветен.

2 Проведение иммуноферментной реакции

- Перед проведением анализа вынимают из упаковки нужное количество стрипов, вставляют их в рамку. Стрипы, не используемые в данной постановке, сохраняют в плотно закрытом пакете при температуре 2-8 °С до 1 месяца.

- Готовят раствор № 1 согласно п. 1.1.

- В каждую лунку стрипов вносят по 80 мкл раствора № 3 для разведения исследуемых образцов сывороток или молока.

- В лунки стрипов вносят по 20 мкл исследуемых образцов, оставив свободными 5 лунок первого ряда (лунки для контролей).

- В лунку А1 вносят 20 мкл положительного контроля (K^+), в лунку В1 – 20 мкл отрицательного контроля (K^-), а в лунки С1, D1, Е1 – по 20 мкл контроля граничного значения (КГЗ). *При внесении контрольных и исследуемых образцов необходимо осторожно пипетировать смесь.*

- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при комнатной температуре (18-30 °С) 20 мин.

- После инкубации удаляют содержимое лунок при помощи промывалки или 8-канальной пипетки и промывают лунки четыре раза раствором № 1, а затем избавляются от излишней влаги (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).

- Готовят раствор конъюгата согласно п. 1.2.

- В лунки стрипов вносят по 100 мкл раствора конъюгата.

- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при комнатной температуре (18–30 °С) в течение 20 мин.
- Закончив инкубацию, удаляют раствор конъюгата из лунок при помощи промывалки или 8-канальной пипетки и промывают лунки шесть раз раствором № 1, а затем избавляются от излишней влаги (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).
- Готовят раствор проявителя согласно п. 1.3.
- Вносят в лунки стрипов по 100 мкл раствора проявителя.
- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при комнатной температуре (18-30 °С) в темноте в течение 30 мин.
- Останавливают цветную реакцию, внося вл все лунки по 100 мкл стоп-реагента.
- Не позже чем через 1 мин. после остановки реакции проводят учет результатов визуально относительно интенсивности окрашивания в лунках с контролем граничного значения (Кгз) или определяя оптическую плотность при помощи ридера в одноволновом режиме при длине волны 450 нм или в двухволновом режиме при длине волны 450 нм относительно 620 нм, что обеспечивает более точныи результаты анализа.

Учет результатов анализа

Визуальный учет результатов

- Кладут планшет на листок белой бумаги в хорошо освещенном месте и на глаз сравнивают интенсивность окрашивания раствора в лунках исследуемых образцов с интенсивностью окрашивания контроля граничного значения

(Кгз). Если интенсивность окрашивания в одной из лунок с контролем граничного значения сильно отличается от интенсивностей в двух других лунках, то ее не принимают во внимание.

- Результат анализа считается **отрицательным**, если интенсивность окрашивания в лунке с исследуемым образцом ниже, чем в лунках с контролем граничного значения.

- Результат анализа считается **положительным**, если интенсивность окрашивания в лунке с исследуемым образцом равна или превышает интенсивность окрашивания в лунках с контролем граничного значения.

Автоматический учет результатов на ридере:

- Значение оптической плотности (ОП) K^- должно быть не выше, чем 0,1 оптическая единица (ОЕ), K^+ – не ниже чем 0,6 ОЕ, Кгз – не ниже чем 0,2 ОЕ.

- Граничное значение ОП (ГЗ) рассчитывают как среднюю ОП Кгз в трех лунках (срКгз). Если оптическая плотность в одной из лунок более чем вдвое отличается от величины срКгз, то ее не принимают во внимание.

- Результат анализа считается **отрицательным**, если значение ОП исследуемого образца ниже, чем меньше ОП срКгз.

- Результат анализа считается **положительным**, если значение ОП исследуемого образца равно срКгз или его превышает.

Например, значения ОП
трех лунок с контролем граничного значения:

ОП проб в лунках C1= 0,258; D1= 0,272; E1 = 0,266

- $ОП_{ср} Кгз = 0,264$

- Если значение ОП исследуемой сыворотки ниже, чем 0,264, ее следует считать отрицательной.
- Если ОП исследуемой сыворотки достигает значения 0,264 и выше, такая сыворотка считается положительной.

В случае ранней инфекции результат ИФА может быть отрицательным. При наличии клинических проявлений рекомендуют провести повторное тестирование животных через 14-21 день.

Серологический тест нельзя использовать для постановки окончательного диагноза. Необходимо принять во внимание клиническую картину и другие лабораторные данные.

Оценка качества иммуноферментной тест-системы

Основные показатели качества иммуноферментной тест-системы, ее надежности – это чувствительность, специфичность и воспроизводимость получаемых результатов.

Чувствительностью называют показатель, который выражает долю положительных ответов при наличии данной патологии, т.е. долю пораженных лиц или особей, которые могут быть обнаружены при использовании данной тест-системы:

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

где П – количество положительных результатов проверки, ЛО – количество ложноотрицательных результатов анализа.

Ложноотрицательные результаты тестирования могут быть обусловлены многими причинами: возможным носительством возбудителя без клинических проявлений

болезни и без синтеза антител; нельзя также исключить отрицательный результат при взятии крови в период сероконверсионного "окна", когда в организме еще нет специфических.

Специфичностью называют показатель, который характеризует способность тест-системы определять только тот компонент, который она должна определять, т.е. отрицательный ответ в тесте при условии отсутствия патологии:

$$\text{Специфичность} = \frac{H}{H + ХП} \times 100\%^5,$$

где О – количество отрицательных результатов анализа, ЛП – количество ложноположительных результатов тестирования .

Понятия о “чувствительности” и “специфичности” тесно связаны с понятиями о “ложноположительном результате” и “ложноотрицательном результате”.

Ложноотрицательный результат – это отрицательный результат, полученный в данной тест-системе для пробы, которая в действительности положительна.

Ложноположительный результат – это положительный результат, полученный в данной тест-системе для пробы, которая в действительности отрицательна.

Таким образом, более чувствительной будет та тест-система, которая дает меньшее количество ложноотрицательных результатов, а более специфичной – та, в которой получают меньшее количество ложноотрицательных результатов.

Метод ИФА ценен прежде всего из-за его высокой чувствительности (отдельные его модификации позволяют определить до 10^{-18} моль/л антигена) и высокой специфичности (около 100 %).

⁵ Надо изменить Н та О, а ХП – на ЛП.

Определение чувствительности и специфичности тест-систем, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, CDC (Centers for Disease Control and Prevention), FDA (USA Food and Drug Administration), осуществляется при оценке способности диагностикумов обнаруживать положительные или отрицательные сыворотки стандартных контрольных наборов (панелей). При этом образцы сывороток положительных контрольных наборов должны быть представлены в полном диапазоне иммунореактивности к возбудителю – от сывороток с ранней сероконверсией до сывороток лиц или особей с клинической картиной заболевания. Показатель специфичности тест-систем определяют при исследовании рандомизированной выборки донорских сывороток (random blood donors), проб, взятых у лиц из группы высокого риска заражения, а также у пациентов с другими патологиями. При этом принимаются во внимание показатели первичной (IR - initial reactive) и повторной (RR - repeat reactive) реактивности положительных образцов, полученных на этой тест-системе, с последующей верификацией результатов.

Оценивая специфичность иммуноферментных тест-систем, следует учитывать их высокую чувствительность. Если при тестировании проб, входящих в “отрицательную выборку”, для какой-то пробы получен положительный результат, то прежде чем считать его ложноположительным, следует провести дополнительные исследования.

Достаточно часто при использовании стандартных охарактеризованных панелей сывороток чувствительность и специфичность иммунодиагностикумов приближаются или равны 100 %, но достичь таких показателей в условиях повседневной лабораторной работы практически невозможно. Взаимосвязь между чувствительностью и специфичностью такова, что улучшение одного показателя сопровождается ухудшением другого. Таким образом, не существует диагностикумов, которые гарантируют абсолютную

чувствительность и специфичность при проведении массовых обследований.

Количество ложноположительных результатов при обнаружении антител к некоторым возбудителям может колебаться в пределах от 0,02-0,5 % до 2-40 % всех положительных результатов обследования. Так, по сводным данным, существует около 70 болезней или других факторов, которые приводят к получению ложноположительных результатов при серологических исследованиях вообще (не обязательно только при проведении ИФА). Это могут быть перекрестные реакции с аутоантителами, антителами к ревматоидному фактору, вирусу Эпштейна-БарА, кратковременная сероконверсия (после вакцинации, введения иммуноглобулиновых препаратов), наличие инфекционной патологии, опухолей, иммунодефицитных состояний и т.д.

Характеристика показателей качества тест-системы “DIA-Brucella ab.combi-V”

Чувствительность

Определение чувствительности проводили на панелях охарактеризованных сывороток крови КРС и коровьего молока. Использовали панели производства Украинского государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов (УГНКИБШМ), а также внутрипроизводственная панель, разработанная НПК “Диапроф-Мед” в соответствии с рекомендациями Дирекции Европейской комиссии по вопросам здравоохранения и защиты потребителя. В таблице 2 приведены данные сравнительного анализа чувствительности тест-системы “DIA-Brucella ab.combi-V” с РБП и РСК.

Таблица 2. Сравнительный анализ тест-системы
DIA-Brucella ab.combi-V” с РБП, РСК и кольцевой
пробой

Панель производ- ства	Коли- чество образ- цов сыво- роток	Количество положительных результатов			Ко- ли- чест- во проб моло- -ка	Количество положитель- ных результатов	
		РБП	РСК	ИФА		коль- цевая проба	ИФА
УГНКИБШМ	10	10	10	10	9	9	9
Диапроф- Мед	26	26	26	26	16	16	16

Все положительные образцы обеих панелей были признаны положительными в тест-системе “DIA-Brucella ab.combi-V”.

Специфичность

Определение специфичности тест-системы “DIA-Brucella ab.combi-V” проводили на образцах сывороток крови КРС и коровьего молока из благополучных по бруцеллезу хозяйств разных областей Украины, пробах сывороток и молока от глубококостельных коров и корорв после отела, коров с диагнозом мастита, эндометрита и с частыми абортами. Все сыворотки крови были предварительно охарактеризованы в РА, РБП и РСК, а пробы молока – в кольцевой реакции преципитации. Сыворотки крови КРС, содержащие антитела к *Yersinia enterocolitica* серотипа 09 та *Campylobacter fetus*, были получены из Института клинической и экспериментальной ветеринарной медицины (Харьков). Эти сыворотки были предварительно протестированы в серологических реакциях со специфическими антигенами. В

таблице 3 поданы результаты исследования специфичности тест-системы “DIA-Brucella ab.combi-V”.

Таблица 3. Сравнение результатов исследования тест-системы “DIA-Brucella ab.combi-V” с РА, РБП и РЗК

Исследуемые пробы:	Количество проб	Количество результатов отрицательных/положительных				
		РА	РБП	РЗК	кольцевая проба	ИФА
из хозяйств, благополучных по бруцеллезу	Сыворотки крови КРС					
	643	643/0	643/0	643/0	-	643/0
	Пробы коровьего молока					
	523	-	-	-	523/0	523/0
сыворотки крови коров с антителами к <i>Yersinia enterocolitica</i>	17	0/17	0/17	17/0	-	17/0
сыворотки крови коров с антителами к <i>Campylobacter fetus</i>	1	0/1	0/1	1/0	-	1/0
сыворотки крови коров с частыми абортами	53	53/0	53/0	53/0	-	53/0
сыворотки крови коров с диагнозом “мастит”	33	33/0	33/0	33/0	-	33/0
с диагнозом “мастит”, “эндометрит” частыми абортами	Сыворотки крови КРС					
	121	108/13	108/13	121/0	-	121/0
	Пробы коровьего молока					
	115	-	-	-	115/0	115/0

Оценка тест-системы “DIA-Brucella ab.combi-V” по сравнению с общеизвестными методами серологической диагностики бруцеллеза показала ее способность обнаруживать антитела к *Brucella abortus* с более высокой чувствительностью и специфичностью и диагностировать бруцеллез на ранних этапах развития патологического процесса. Высокая чувствительность и специфичность тест-системы позволяют проводить иммуноферментную реакцию при комнатной температуре и осуществлять учет результатов не только в автоматическом режиме, но и визуально; поэтому ее можно использовать в полевых условиях. Разработанную иммуноферментную тест-систему рекомендуют как скрининговую при проведении массовых обследований КРС на бруцеллез.

Формы выпуска набора

- набор Ф2-монолит – монолитный планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система рассчитана на проведение двух постановок ИФА: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);
- набор Ф6-стрип – стриповый планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система рассчитана на 6 постановок ИФА: 1 постановка – 2 стрипа (32 лунки);
- набор Т2-монолит – монолитный планшет, хромоген – раствор ТМБ; тест-система рассчитана на проведение двух постановок ИФА: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);
- набор Т12-стрип – стриповый планшет, хромоген – раствор ТМБ; тест-система рассчитана на 12 постановок ИФА: 1 постановка – 1 стрип (16 лунок).

Один набор рассчитан на проведение 192 анализов (включая контроли).

Условия сохранения и транспортирования

Набор сохраняют и перевозят при температуре 2–8 °С.

Замораживать набор не разрешается.

Срок хранения набора – 1 год.

Основные особенности и преимущества тест-системы

- Высокая чувствительность и специфичность;
- Использование в составе иммуносорбента высокоспецифических антигенов;
- Отсутствие ложноположительных результатов при наличии в сыворотках крови антител против *Yersinia enterocolitica* серотипа 09 и *Campylobacter fetus*;
- Возможность одновременного исследования сывороток крови и молока при помощи одной тест-системы;
- Длительность анализа – 1ч;
- Проведение реакции при комнатной температуре;
- Оценка результатов анализа визуально или в автоматическом режиме;
- Возможность использования тест-системы в полевых условиях;
- Различные варианты комплектации наборов по выбору потребителя: стриповый или монолитный планшет;
- Один набор рассчитан на 192 анализа;
- Срок годности 12 мес.

**ПРОБЛЕМЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКАТЬ ПРИ
ПРОВЕДЕНИИ ИФА**

Возникающие проблемы	Возможные причины	Способы устранения проблем
1. Высокий фон в лунках всего планшета.	1.1. Низкое качество дистиллированной воды	1.1.1. Промыть дистиллятор 10 %-ным раствором соляной кислоты, а потом 5 раз дистиллированной водой 1.1.2. Прокипятить дистиллированную воду в открытом сосуде в течение 10-15 мин, остудить перед использованием. 1.1.3. Использовать бидистиллированную воду
	1.2. Бактериальное загрязнение воды	1.2.1. Хранить дистиллированную воду в закрытой посуде. 1.2.2. Дистиллированную воду использовать в течение дня.
	1.3. Загрязненный промыватель (вошер).	1.3.1 Почистить головку промывателя с помощью иголки и промыть его 30 %-ным этиловым спиртом, а потом 5 раз дистиллированной водой
	1.4. Использование одной и той же посуды для	1.4.1. Использовать для каждого реагента отдельную посуду.

	разных реагентов.	
	1.5.Наличие и использование на рабочем месте дезрастворов с хлором.	1.5.1.Не использовать и не хранить дезрастворы с хлором в помещениях, где проводятся исследования методом ИФА.
	1.6.Повторное использование наконечников.	1.6.1.Наконечники использовать однократно.
	1.7.Контакт хромогена с металлами (пинцет, скальпель и др.)	1.7.1.Избегать контакта хромогена с металлами.
	1.8.Уменьшено количество циклов промывок планшета.	1.8.1.Промывать планшет согласно требованиям "Инструкции".
	1.9.Закончился срок хранения (пригодности) тест-системы.	1.9.1.Запретить использование тест-системы.
	1.10.Грязная посуда.	1.10.1.Мыть посуду согласно инструкции
	1.11.Увеличена температура или время инкубации	1.11.1.Придерживаться режима инкубации.
2. Высокий фон в отдельных лунках	2.1.Переливание промывочного раствора из лунок планшета при промывании на автоматическом промывателе (вошере).	Отрегулировать вошер, исключить возможные нарушения.
		2.2.1. Повторно взять

	2.2.Использование для анализа гемолизованных образцов.	кровь.
	2.3.Использование цельной крови.	2.3.1. Получить сыворотку. Повторно взять пробу крови.
	2.4.Бактериальное загрязнение пробы.	2.4.1. Повторно взять кровь.
	2.5.Использование одного и того же наконечника для нескольких проб.	2.5.1. Использовать отдельные наконечники для каждой сыворотки.
3. Высокий фон в отдельных рядах	3.1.Повторное внесение проявителя.	3.1.1. Раствор проявителя вносить один раз.
	3.2.Повторное использование наконечников.	3.2.1. Наконечники использовать <u>однократно</u> .
	3.3.Переливание жидкости из одного ряда во второй во время промывания.	3.3.1. Отрегулировать подачу промывочного раствора.
	3.4.Загрязнение конуса автоматической пипетки раствором конъюгата.	3.4.1. Для внесения конъюгата и проявителя иметь <u>отдельные</u> микропипетки. При отсутствии достаточного количества микропипеток нужно после внесения

		конъюгата и снятия наконечников, освободить пипетку от возможных остатков конъюгата и протереть ее фильтровальной бумагой.
4. После внесения проявителя и окончания срока инкубации нет окрашивания в лунках всего планшета	4.1. Не внесен один из реагентов – конъюгат или проявитель.	4.1.1. Переставить анализ. Внести, в соответствии с Инструкцией, необходимые реагенты.
Нет окрашивания в отдельных лунках планшета (рядов).	4.2. Не внесен один из реагентов – сыворотка, конъюгат или проявитель.	4.2.1. Переставить эти пробы. Внести, соответственно "Инструкции", необходимые реагенты.
5. Слабое окрашивание всего планшета. Значение ОП контрольных образцов не отвечают требованиям инструкции к тест-набору	5.1. Уменьшено время инкубации.	5.1.1. Инкубацию проводить согласно "Инструкции".
	5.2. Срок пригодности тест-системы закончился	5.2.1. Проверить результаты на тест-системе с надлежащим сроком годности.

Литература

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. – P. 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. – P.475-489.
4. MacMillan A.P., Stack J. Bovine brucellosis. – In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Office International des Epizooties. – Paris, 4th Edition. – 2000. – P. 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. – P. 1-3.
10. Кайтмазова Е.И., Чернышева М.И. Лабораторная диагностика бруцеллеза. – В кн.: Бруцеллез (ред. П.А.Вершилова). – М.: «Медицина». – 1969. – С.198-241.
11. Splitter G. The immune response to *Brucella*. - *Vet. Immunol. Immunopath.* – 1996. – V 54. –309.
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.* – 1988. – V. 18. – P.331-347.
13. Wright P.F., Nielsen K.H. Current and future serological methods. In Adams L.G. (Ed): *Advances in Brucellosis Research*, Texas A&M University Press, College Station, Texas. – 1990. – P305-320.
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.* – 1981. V.14. – P396-403.
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.

Содержание

Сокращения, использованные в тексте пособия	
Вступление	
Диагностика бруцеллеза	
Бактериологические методы	
Серологические и аллергологические исследования	
Антигены бруцелл, важные при постановке серологических реакций	
Иммуноферментный анализ для обнаружения антител	
Контрольные сыворотки при проведении серологических реакций	
Другие серологические реакции для диагностики бруцеллеза	
Определение антител против бруцелл в слитых пробах	
Схема проведения ИФА	
Методика проведения ИФА на тест-системе «DIA-Brucella ab.-combi-V»	
Учет результатов анализа	
Оценка качества иммуноферментной тест-системы	
Характеристика показателей качества тест-системы «DIA-Brucella ab.combi-V»	
Формы выпуска набора	
Основные особенности и преимущества тест-системы	
Проблемы, которые могут возникнуть при проведении ИФА	