

Матеріали і методи. Був проведений аналіз літературних джерел висвітлених на інформаційному порталі <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> та матеріалів лекції ветеринарного лікаря-кардіолога, учасниці конференції ECVIM та ACVIM Марії Назарової.

Результати і висновки. Закупорення судини за артеріальної тромбоемболії супроводжується важкими наслідками через гостре порушення руху крові в зоні тромбованої судини. Дефіцит кисню призводить до вмикання анаеробних шляхів синтезу АТФ, гліколізу. Через це в тканинах накопичується молочна кислота, виникає ацидоз, порушується робота іонного насосу і, як наслідок, транспорт речовин через мембрану. Іони K^+ виходять з клітин в судинне русло, їх місце займають Ca^{2+} та Na^+ . Через перерозподіл і підвищений онкотичний тиск клітини набрякають, порушується їх цілісність.

Гіршим може бути лише, як не парадоксально, відновлення руху крові після тривалої ішемії, адже відновлення доставки кисню призводить до реперфузійних пошкоджень. Виникнення синдрому ішемії-реперфузії має серйозні наслідки для всього організму. До кровотоку потрапляють продукти анаеробного метаболізму, вільний міоглобін, біологічно активні речовини та медіатори запалення. Особливо небезпечними для організму є вільні форми кисню.

Дуже вразливим місцем у тварин за застійної серцевої недостатності є нирки. Патологічна взаємодія між системами цих органів отримала назву «кардіоренальний синдром». В результаті розвитку артеріальної тромбоемболії (біль, стрес та загострення серцевої недостатності, вивільнення великої кількості токсичних для нирок речовин) можуть загостритись проблеми з нирками. Крім того артеріальна тромбоемболія може призвести до розвитку інфаркту нирки.

Отже, діагностичні дослідження свійського kota за артеріальної тромбоемболії мають включати моніторинг рівня рН крові та Калію двічі на добу упродовж 5-14 днів. Біохімічний аналіз крові (вміст креатиніну, альбуміну, глюкози, білірубіну, сечовини, Калію, Фосфору, Кальцію), загальний аналіз крові та загальний аналіз сечі під час надходження в клініку, після стабілізації стану та через 2 тижні після випадку артеріальної тромбоемболії.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ СКРИНИНГА СЕРОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА Е У ЖИВОТНЫХ

Полюян О.С.*, Смирский В.В.*, Костюк С.А.*, Красочко П.А.***, Жаворонок С.В.***

*Унитарное предприятие «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

** Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», Витебск, Республика Беларусь

*** Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Актуальность. Вирусный гепатит Е (ВГЕ) признан зоонозной инфекцией с резервуарами у домашних свиней, диких кабанов и других видов животных. Помимо очевидных последствий

повсеместное наличие ВГЕ у животных, имеющих отношение к производству пищевых продуктов, также вызывает озабоченность со стороны здравоохранения прямое контактирование человека с инфицированными животными, а также загрязнение окружающей среды, в частности, поверхностных вод фекалиями животных, а также рекреационных и профессиональных рисков в сельской местности. После того, как была установлена зоонозная возможность передачи ВГЕ, стало очевидно, что чем выше уровень распространенности ВГЕ у животных, тем больше риск передачи инфекции человеку, что представляет серьезные причины для беспокойства по поводу здоровья населения.

Цель. Разработать экспериментальный вариант диагностической тест-системы для мониторинга выявления IgG-антител к ВГЕ методом иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотке крови животных.

Материалы и методы. В качестве биологического материала использовали сыворотки крови больных вирусным гепатитом Е свиней ($n=30$), положительных в отношении РНК ВГЕ, подтвержденного методом обратнo-транскрипционной ПЦР (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени с использованием диагностических тест-систем RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 (Altona, Германия); во всех исследуемых образцах методом ИФА с использованием диагностических тест-систем «IgG anti-HEV ELISA kit» (Genelabs Diagnostics, Сингапур) были выявлены антитела класса G к ВГЕ. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки крови 30 здоровых свиней; при этом в данных образцах биологического материала РНК ВГЕ и IgG-антитела к ВГЕ выявлены не были.

Результаты и выводы. Для изготовления тест-системы использовали генно-инженерные полипептиды с антигенной последовательностью ВГЕ 1, конъюгированные с бета-галактозидазой («НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН», РФ).

Проведен подбор концентраций и буфера для сорбции полипептидов открытой рамки считывания (ОРФ) 2 и 3 ВГЕ на полистироловые планшеты после предварительная обработка его ультрафиолетовым излучением с целью повышения адгезивности для сорбции рекомбинантного антигена. Установлена оптимальная концентрация полипептидов для сорбции ОРФ-2 и ОРФ-3 на полистироловые планшеты — 8 мкг/мл в 0,005 М карбонатном буфере Ph 9,5. Подобрано оптимальное разведение универсального конъюгата — белка А стафилококка с пероксидазой хрена для проявления тестируемых сывороток.

Интерпретацию результатов, основанную на расчете коэффициента связывания антител ($K_{св}$), проводили по формуле:

$$K_{св} = (A_{450}ОП_{ср} - A_{450}K_{ср}^-) / (A_{450}K_{ср}^+ + A_{450}K_{ср}^-) \times 100\%, \text{ где}$$

$A_{450}ОП_{ср}$ — оптическая плотность пробы сыворотки крови

$A_{450}K_{ср}^+$ — средняя оптическая плотность положительного контроля

$A_{450}K_{ср}^-$ — средняя оптическая плотность отрицательного контроля

Результат считался положительным при получении значения коэффициента $\geq 20\%$.

Отдельное внимание нами было уделено подбору оптимальной концентрации конъюгата для оптимизации критериев «положительности» образцов (исключение ложноположительных результатов)

при пограничних значеннях $K_{св}$. Для цього були протестировані наступні концентрації: 0,01 мкг/мл, 0,1 мкг/мл і 0,3 мкг/мл.

В ході проведених досліджень було показано, що збільшення концентрації кон'югата (0,3 мкг/мл) приводило до значущого підвищення оптичної щільності отрицательного контролю, т.е. до зниження діагностичної чутливості тест-системи, при якій слабо позитивні проби ($n=5$, $(16,67 \pm 3,98\%)$) були детектовані як отрицательні. Діагностична чутливість розроблюваної тест-системи з вказаною концентрацією кон'югата становила 83,33%.

Зниження концентрації кон'югата до 0,01 мкг/мл приводило до суттєвого зниження чутливості розроблюваної тест-системи: 8 ($26,67 \pm 4,95\%$) із початково позитивних зразків (з використанням комерційної тест-системи) з низьким вмістом антитіл були детектовані як отрицательні. Діагностична чутливість розроблюваної тест-системи з даною концентрацією кон'югата становила 73,33%.

При використанні концентрації кон'югата 0,1 мкг/мл було встановлено практично повне узгодження результатів (збіг результатів становив $90,00 \pm 8,11\%$), отриманих з використанням розроблюваної тест-системи (IgG-серопозитивними були визначені 27 зразків), порівняно з комерційною. Таким чином, діагностична чутливість становила 90,00%.

Висока діагностична чутливість тест-систем є головним критерієм при їх використанні для скринингових досліджень, зокрема при пулюванні зразків. На цю можливість впливає афінність антитіл кон'югата — чим більш афінні антитіла в кон'югаті, тим менша концентрація їх потрібна для отримання належного рівня оптичної щільності, перевищуючого фоновий рівень. Такий підхід дозволяє скоротити час і матеріальні ресурси для скринингу великої кількості зразків, при цьому за своєю чутливістю практично не поступає індивідуальному дослідженню сироваток крові. В зв'язі з цим фактом, нами була перевірена можливість виявлення антитіл свиней в пулі з використанням кон'югата в концентрації 0,1 мкг/мл. Для цього використовували позитивні сироватки з різним вмістом антитіл і об'єднували їх з отрицательними. Використовували 2 варіанти об'єднання: 1 позитивна і 4 отрицательних, і 1 позитивна і 9 отрицательних. Кількість пулюваних зразків становило 60 (по 30 для кожного варіанта об'єднання).

При пулюванні 1 позитивної і 4 отрицательних проб кількість серопозитивних зразків становило 28 ($93,33 \pm 8,20\%$), тоді як при другому варіанті (пулювання 1 позитивної і 9 отрицательних проб) кількість серопозитивних зразків становило 21 ($70,00 \pm 7,44\%$), що суттєво знижує якість діагностичних заходів, направлених на виявлення IgG-антитіл в сироватці крові свиней.

Таким чином, розроблена діагностична тест-система з використанням кон'югата в концентрації 0,1 мкг/мл, яка має високими показателями діагностичної чутливості (90,00%) і специфічності (100%) може бути використана при проведенні скринингових досліджень по виявленню серопозитивності поголов'я свиней, зокрема і при пулюванні зразків біологічного матеріалу, без втрати ефективності.