

развития болезни содержатся как в крови, так и в молоке инфицированных животных [2, 3]. Получение образцов сыворотки крови животных является более трудоемким и затратным, а при нарушении правил асептики и антисептики при массовом взятии крови может быть причиной перезаражения животных [2].

В литературных источниках есть предложения производству по использованию сборного молока в системе эпизоотического мониторинга энзоотического лейкоза крупного рогатого скота [3, 4], однако методическая база использования молока, как объекта иммунологической диагностики иммуноферментным методом, требует стандартизации и должна соответствовать международным требованиям МЭБ [5, 6].

Специализированные ИФА тест-системы для диагностики энзоотического лейкоза в сборных пробах молока (*ELISA BLV Milch-S, INSTITUT POURQUIER; Leukosis Milk Screening, IDEXX Montpellier SAS*), стандартизированные производителем, могут (способны) выявлять OIE стандартную сыворотку E05 (*International Standard Sera for Enzootic bovine leucosis*) в разведении 1/25000 (100 образцов молока в пуле). Высокая чувствительность современных тест-систем ИФА обусловлена способностью выявлять все классы антител против вируса лейкоза крупного рогатого скота, а использование ультрачистого лизата вирусного антигена, позволяет исследовать как индивидуальные образцы, так и сборные пробы молока (пулы) [7, 8].

Именно при использовании пулов молока для иммунологической диагностики энзоотического лейкоза крупного рогатого скота иммуноферментным методом важным аспектом является допустимая величина разведения отдельного образца молока в сборной пробе с учетом чувствительности тест-системы.

Актуальным является сравнительный анализ характеристик современных тест-систем ИФА путем использования внутрилабораторного контрольного материала с различным содержанием иммунологического маркера для диагностики лейкоза.

Цель работы: определить и сравнить аналитическую чувствительность тест-систем *ELISA* для диагностики энзоотического лейкоза крупного рогатого скота различных производителей, используя последовательные разведения положительного образца молока как вторичного внутрилабораторного эталонного образца.

Материалы и методы исследований. Материалом исследований было обезжиренное молоко. Контрольный образец был изготовлен непосредственно в научно-исследовательском отделе иммунологических исследований ГНИИЛДВСЭ с архивного образца положительного молока, полученного от больной энзоотическим лейкозом коровы, что было установлено исследованием сыворотки крови (РИД и ИФА). Контроль специфичности осуществляли, исследуя материал, не содержащий антител против вируса лейкоза крупного рогатого скота.

С целью определения чувствительности иммуноферментного анализа использовали контрольные образцы с различным содержанием целевого иммунологического маркера, полученные путем двукратных разведений положительного образца молока отрицательным (таблица 1). Для анализа чувствительности тест-системы ИФА использовали критическую оптическую плотность (*OD* крит.) Как критерий отграничения положительных результатов от отрицательных использовали коэффициент позитивности (КП - отношение *OD* образца к *OD* критической) [9].

Результаты исследований. Специализированные тест-системы для диагностики энзоотического лейкоза в сборных пробах молока (*ELISA Leukosis Milk Screening / BLV Milch-S, Institut Pourquier SAS и Leukosis Milk Screening, IDEXX Montpellier SAS*) основываются на использовании непрямого твердофазного иммуноферментного анализа [7, 8].

Образцы исследуемого молока разводят и инкубируют в лунках. Во время инкубации при наличии специфических антител формируется комплекс АГ-АТ. После отмывания компонентов, которые не связались, добавляется антивидовой *IgG*, конъюгированный с ферментом, который соединяется со специфическим иммунным комплексом. Свободный конъюгат отмывается и вносится субстрат (ТМВ). В присутствии фермента субстрат окисляется с образованием цветного продукта реакции синего цвета, который становится желтым после остановки реакции стоп-раствором. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию иммуноглобулинов против вируса лейкоза в опытном образце. Диагностическая значимость результата подтверждается путем сравнения значения оптической плотности (*OD*₄₅₀) образца с *OD*₄₅₀ положительного контроля.

Таблица 1 – Разведения контрольного образца молока

№	Разведение молока (log ₂)	Количество отрицательного молока (мл)	Количество положительное молока (мл)
1	1/2	1,0	1,0
2	1/4	1,0	1,0
3	1/8	1,0	1,0
4	1/16	1,0	1,0
5	1/32	1,0	1,0
6	1/64	1,0	1,0
7	1/128	1,0	1,0
8	1/256	1,0	1,0
9	1/512	1,0	1,0

Особое внимание необходимо уделять условиям хранения положительного и отрицательного контроля тест-систем ИФА. Разрешается размораживать и замораживать контроли не более 3 раз. Хранение контрольных материалов при температуре 2–8°C приводит к изменениям их качественных характеристик, что делает их непригодными.

Критерии валидации. Тест считается достоверным, если OD_{450} положительного контроля $\geq 0,300$. Соотношение между значением OD_{450} положительного и отрицательного контролей должно быть $\geq 2,00$. Для расчета процентного соотношения – образец/позитивный контроль (S/P,%) использовали формулу:

$$S/P (\%) = 100 \times \frac{OD_{450} \text{ образца} - OD_{450} \text{ негативного контроля}}{OD_{450} \text{ позитивного контроля} - OD_{450} \text{ негативного контроля}}$$

Значение OD_{450} положительного контроля - это среднее арифметическое двух фактических значений OD_{450} положительного контроля.

Интерпретация результатов. Образцы с соотношением S/P (%): $\leq 60\%$ - отрицательные; больше, чем 60%, но меньше, чем 70% - сомнительные; $\geq 70\%$ - положительные.

При использовании тест-системы *BLV Milch-S (Institut Pourquier)* КП нативного положительного молока составил 5,8, а его оптическая плотность составляла 509% от значения положительного контрольного образца производителя тест-системы. Существенное уменьшение коэффициента позитивности начинается с разведения 1/32 (таблица 2).

Таблица 2 – Сравнительная характеристика чувствительности тест-систем ИФА для диагностики лейкоза при использовании положительного образца молока как внутрилабораторного контрольного материала

Тест-система		<i>ELISA BLV Milch-S, POURQUIER</i>			<i>Leukosis Milk Screening, IDEXX</i>			
№	Образец	OD, 450 нм	Результат		OD, 450 нм	Результат		
			%	КП		%	КП	
1	Нативное позитивное молоко	3,764	509	5,8	3,792	342	4,0	
2	Разведения позитивного молока	1/2	3,651	493	5,6	3,786	341	4,0
3		1/4	3,853	521	5,9	3,905	352	4,2
4		1/8	3,627	490	5,6	3,673	330	3,9
5		1/16	3,428	461	5,3	3,755	338	4,0
6		1/32	2,774	369	4,3	3,519	316	3,8
7		1/64	1,924	249	2,9	2,362	206	2,5
8		1/128	1,163	142	1,8	1,481	122	1,6
9		1/256	-	-	-	1,038	80	1,1
10		1/512	-	-	-	0,628	41	-
11		Негативный контроль	0,156			0,197		
12	Позитивный контроль	0,865			1,249			
	Оптическая плотность критическая	0,651 ↑	70 ↑	+	0,934 ↑	70 ↑	+	
	Сомнительно	0,585- 0,650	60,5- 69,7	+/-	0,835- 0,933	60,6- 69,9	+/-	
	Негативно	0,584↓	60,4	-	0,834↓	60,5	-	

Примечания: OD – оптическая плотность; КП – коэффициент позитивности; ↑ - числовые значения больше, ↓ - меньше критической OD.

Наибольшее разведение контрольного образца молока с положительным результатом составило 1/128 (коэффициент позитивности - 1,8), что, наверное, не является предельным значением чувствительности диагностикума. Разведение 1/256 и 1/512 контрольного образца молока не исследовалось, поэтому использованные нами первично контрольные образцы не позволили установить минимальную концентрацию иммунологического маркера в качестве меры позитивности образца, поскольку не охватили весь диапазон линейности примененной тест-системы ELISA. Для дальнейших исследований использовали контрольные образцы положительного молока с наибольшим разведением 1/512.

При работе с тест-системой *Leukosis Milk Screening (IDEXX Montpellier SAS)* оптическая плотность нативного положительного молока составляла 342% от значения положительного контрольного образца производителя тест-системы (таблица 2).

Минимальные разведения контрольного материала (1 / 2-1 / 32) вследствие высокой концентрации иммунологического маркера и чрезмерной положительности образца (КП 5,8-4,3) не отражают предельные значения чувствительности тест-системы ИФА. Значение оптической плотности контрольного образца должно находиться в пределах линейной зависимости оптической плотности D от концентрации C иммунологического маркера ($\approx 0,5-1,5$ Б) [6]. Кроме того, оптимальная точность измерения оптической плотности иммуноферментным анализатором *Sunrise (Tecan)*, который использовался для учета результатов, учитывая

технические характеристики прибора, достигается при значениях D образцу, не превышают 2,5 Б.

Существенное уменьшение коэффициента позитивности до 2,5 установлено только при разведении положительного контрольного образца до 1/64. Наибольшее разведение контрольного образца молока, при котором результат оставался положительным, составило 1/256 (КП-1,1).

Продолжение Таблицы 2 – Сравнительная характеристика чувствительности тест-систем ИФА для диагностики лейкоза при использовании положительного образца молока как внутрилабораторного контрольного материала

№	Тест-система	INGEZIM BLV COMPAC 2.0, INGENASA		Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit, VMRD	
		OD, 450 нм	Результат КП	OD, 650 нм	Результат КП
1	Нативное позитивное молоко	0,157	4,3	0,574	1,1
2	Разведения позитивного молока	1/2	0,443	1,5	0,388
3		1/4	0,836	-	0,235
4		1/8	1,359	-	0,157
5		1/16	1,856	-	0,115
6		1/32	2,077	-	0,092
7		1/64	2,230	-	0,084
8		1/128	2,284	-	0,078
9		1/256	-	-	-
10		1/512	-	-	-
11		Негативный контроль	1,201		0,076
12	Позитивный контроль	0,160		0,512	
	Оптическая плотность критическая	0,681 ↓	+	0,512 ↑	+
	Сомнительно	0,680- 0,784	+/-	0,485- 0,511	+/-
	Негативно	0,785↑	-	0,484	-

Примечания: OD – оптическая плотность; КП – коэффициент позитивности; ↑ - числовые значения больше и ↓ - меньше критической OD.

Ingezim BLV COMPAC 2.0 - тест-система, основанная на использовании блокирующего твердофазного иммуоферментного анализа на основе двух моноклональных антител против вирусного гликопротеина *gp51* [10]. Инструкцией производителя (*INGENASA*) предусматривается возможность исследования как индивидуальных (сыворотка или молоко), так и сборных (до 10 образцов сыворотки) образцов.

Лунки микропланшетов покрыты антигеном *gp51 (BLV)*, который связан с планшетом благодаря двум специфическим моноклональным антителам. После добавления образца, содержащего специфические антитела против вируса лейкоза, они связываются с антигеном, адсорбированным на плате. Если образец не содержит специфических антител, иммунный комплекс не образуется. Специфический комплекс антиген-антитело обнаруживают с помощью специфического меченого моноклонального антитела против вирусного антигена (конъюгированного с пероксидазой). Если образец сыворотки содержит специфические антитела, они блокируют связывание меченого моноклонального антитела с антигеном. В том случае, когда сыворотка не содержит специфических антител, моноклональные антитела образуют комплекс с антигеном. После отмывания для удаления свободных компонентов определяется наличие или отсутствие меченых моноклональных антител добавлением субстрата (*TMB*). При наличии пероксидазы образуется окраска, которая измеряется колориметрически. Контроли тест-системы стабильны - 1 мес. при температуре 4°C, для длительного хранения их аликвоты замораживают (-20°C).

Критерии валидации. Значение OD_{450} отрицательного контроля должно быть больше, чем в 5 раз, чем OD_{450} положительного контроля. OD_{450} отрицательного контроля должно быть > 1 .

Результаты исследований. Негативный «cutt off» = OD_{450} отрицательного контроля - $[(OD_{450}$ негативного контроля - OD_{450} положительного контроля) · 0,4] = 1,201 - [(1,201-0,160) · 0,4] = 0,785. Положительный «cutt off» = OD_{450} отрицательного контроля - $[(OD_{450}$ негативного контроля - OD_{450} положительного контроля) · 0,5] = 1,201 - [(1,201-0,160) · 0,5] = 0,680.

Образцы с $OD_{450} \geq$ значению отрицательного «cutt off» - отрицательные. Образцы с $OD_{450} \leq$ значению положительного «cutt off» - положительные. Образцы со значением OD_{450} между отрицательным и положительным «cutt off» - сомнительны.

При работе с тест-системой Ingezim BLV COMPAC 2.0 с контрольным образцом молока положительные результаты были получены только с нативным молоком (КП 4,3) и его 1/2 разведением отрицательным (КП 1,5).

Использование этой тест-системы для исследования сборных образцов молока, предназначенной производителем исключительно для индивидуальных образцов молока, не допустимо.

Bovine leukemia virus antibody test kit (VMRD) - твердофазный иммуноферментный анализ для выявления антител к гликопротеину gp 51 (BLV) в сыворотке крупного рогатого скота. При наличии специфических антител в сыворотке крови они связывают молекулы gp 51, адсорбированные на пластиковых лунках микропланшета. Связывание этих сывороточных антител выявляется реакцией с пероксидазой хрена, мечеными афинноочищенными козьими антителами к иммуноглобулинам крупного рогатого скота. Связанные меченые пероксидазой хрена антитела обнаруживают добавлением субстрата и образованием продукта реакции синей окраски. Контроли хранятся при температуре 2–7°C и не замораживаются [11].

Критерии валидации. Значение положительный контроля должно находиться: $0,250 \leq OD_{650} < 2,000$. Отрицательный контроль $OD_{650} < 0,200$.

Интерпретация. Образцы с $OD \geq OD_{650}$ положительного контроля – положительные. Оптическая плотность (OD_{650}) негативных образцов по содержанию антител (BLV) меньше, чем значение OD_{650} положительного контроля.

Bovine leukemia virus antibody test kit (VMRD) характеризовалась наименьшей чувствительностью по сравнению с другими тест-системами ИФА. Положительный результат был получен только при использовании нативного положительного молока (КП 1,1). Поэтому использование не по назначению производителя (VMRD) тест-системы Bovine leukemia virus antibody test kit для исследования объединенных образцов молока на наличие антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота нецелесообразно.

Слабоположительный эталонный образец является критическим фактором, обеспечивающим гарантии диагностической чувствительности исследования. Только при его использовании можно гарантировать, что используемый иммунологический метод может применяться для детекции определенного уровня специфических антител [9].

Наибольшее разведение контрольного образца при работе с тест-системой Leukosis Milk Screening (IDEXX) с положительным результатом составляет 1/256 (коэффициент позитивности - 1,1), однако объединение большого количества образцов в пул молока (> 75) может обусловить получение ложноотрицательных результатов, вследствие несоответствия коэффициента позитивности исследуемого материала аналитической чувствительности применяемого иммунологического диагностикума [12].

Заключение. 1. Использование сборных проб молока (пулов) в качестве объекта иммунологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота является экономически эффективным в благополучных хозяйствах.

2. Специализированные тест-системы **BLV Milch-S (Institut Pourquier SAS)** и **Leukosis Milk Screening (IDEXX Montpellier SAS)** характеризуются высокой чувствительностью и могут быть использованы как средство качественной диагностики лейкоза, даже при значительном разведении отдельного образца в сборной пробе молока (материал от 75-100 коров и более).

3. Использование сборных проб молока с тест-системами **Ingezim BLV COMPAC 2.0 (INGENASA)** и **Bovine leukemia virus antibody test kit (VMRD)** недопустимо, поскольку они не обладают достаточной аналитической чувствительностью, а их применение может вызвать получение ложноотрицательных результатов.

Перспективой дальнейших исследований является разработка вторичных эталонных образцов, путем сравнительных исследований с международной стандартной сывороткой E05 (*International Standard Sera for Enzootic bovine leucosis*). А также внедрение стандартизированных слабоположительных образцов с целью постоянного мониторинга аналитических характеристик иммунологических методов исследований (РИД, ИФА) лейкоза крупного рогатого скота в соответствии с требованиями ISO / IEC 17025: 2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» в практику государственных региональных и районных ветеринарных лабораторий.

Литература. 1. Інструкція з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу / Затверджено наказом Державного комітету ветеринарної медицини України 21.12.2007 р. № 21. Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 11.01.2008 р. за № 12/14703. 2. Лейкоз великої рогатої худоби / О. Б. Домбровський, Л. Є. Корнієнко, Б. М. Ярчук та ін.; За ред. О. Б. Домбровського. – Біла Церква, 2003. – С. 105–121. 3. Методичні рекомендації щодо пулування сироваток крові великої рогатої худоби і молока при дослідженні на лейкоз (BLV) методом імуноферментного аналізу (ІФА) / Абрамов А. В., Меженський А. О., Резуненко Є. В., Алексєєва Г. Б. – К., 2009. – 26 с. 4. Данько, І. О. Епізоотологічний моніторинг лейкозу великої рогатої худоби та удосконалення оздоровчих протилейкозних заходів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук : спец. 16.00.03 – «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби» / І. О. Данько. – К., 2013. – 20 с. 5. Enzootic bovine leucosis / Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. – Terrestrial Manual 7th edition, 2012. – P. 729–738. 6. Council Directive 88/406/EEC amending Directive 64/432/EEC on animal health problems affecting intra-community trade in bovine and swine as regards enzootic bovine leucosis. 7. Руководство по применению тест-набора ELISA Leukosis Milk Screening /BLV Milch-S (P02210-10) Institut Pourquier SAS, Франция. 8.

Руководство по применению тест-набора *Leukosis Milk Screening* (REF: P02210-5) IDEXX Montpellier SAS, Франция. 9. Нетесова, И. Г. Внутривлабораторный контроль качества неколичественных методов ИФА: информационно-методическое пособие / И. Г. Нетесова, М. Р. Бобкова. – Новосибирск : Вектор-Бест, 2011. – 20 с. 10. Руководство по применению тест-набора *Ingezim BLV Compas 2.0* (REF: 1.2.BLV.K.3) INGENASA, Испания. 11. Руководство по применению тест-набора *Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit (VMRD)*, США. 12. Загребельний, В. О. Оцінка чутливості імуноферментного аналізу для діагностики ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби / В. О. Загребельний, О. С. Петренко, Г. Б. Алексеева // Ветеринарна медицина України. – 2015. – № 3. – С. 9–12.

Статья передана в печать 30.12.2016 г.

УДК 636.2.053:591.43.54-14

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ СОРБЕНТОВ ПРИ РАСТРОЙСТВАХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА У ТЕЛЯТ

Прус В.Н., Гончаренко В.В., Шеремет С.И.

Житомирский национальный агроэкологический университет, г. Житомир, Украина

Анализ работ, посвященных диспепсии телят, показал, что данное заболевание чаще всего встречается в крупных животноводческих хозяйствах с высокой степенью интенсификации производства, с охватом в стойловый период до 100% новорожденного молодняка. Разработка и совершенствование методов диагностики, лечения и профилактики болезней животных в системе «мать - плод - приплод» на основе фундаментального изучения этиологии и патогенеза заболеваний является необходимым условием для успешного решения проблемы заболеваемости молодняка в неонатальный период.

The analysis of works devoted to the dyspepsia of calves showed that the disease is most common in large livestock farms with a high degree of intensification of production, with coverage in the stall period of up to 100% of newborn calves. Development and improvement of methods of diagnosis, treatment and prevention of animal diseases in the system "mother - fetus - litter" on the basis of a fundamental study of the etiology and pathogenesis of diseases is a prerequisite for a successful solution to the problem of young morbidity in the neonatal period.

Ключевые слова: диспепсия, телята, лечение, сорбент, корова.

Keywords: dyspepsia, calves, treatment, sorbent, cow.

Введение. Увеличение производства мяса и других продуктов животноводства является первоочередной задачей животноводства. Успешное решение ее может быть обеспечено, прежде всего, благодаря кормовой базе, повышению эффективности использования кормов, увеличению продуктивности животных и максимальному использованию маточного поголовья. Незаразные болезни занимают особое место в патологии молодняка сельскохозяйственных животных. Среди заболеваний, распространенных в животноводческих хозяйствах Украины, одно из первых мест занимают болезни желудочно-кишечного тракта новорожденных телят, которые приводят к большим экономическим потерям за счет заболеваемости до 70-100% (гибель молодняка составляет около 30%), снижению приростов и расходов на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий [6, 7]. Одно из ведущих мест среди всей незаразной патологии у телят принадлежит острым расстройствам пищеварения [1]. В последнее время большое внимание уделяется изучению прямой зависимости между состоянием обмена веществ у беременной самки и качеством приплода: здоровый приплод с высокой жизнеспособностью можно получить только от здоровых матерей. Поэтому на данный момент проблема неонатальной патологии стоит чрезвычайно остро перед скотоводческими хозяйствами Украины. Несмотря на то, что уже много лет ученые всего мира, начиная с Луи Пастера и И.И. Мечникова, изучают природу заболеваний желудочно-кишечного тракта людей и животных. Анализ работ, посвященных диспепсии телят, показал, что данное заболевание чаще всего встречается в крупных животноводческих хозяйствах с высокой степенью интенсификации производства, с охватом в стойловый период до 100% новорожденного молодняка [2, 4].

Материалы и методы исследований. Работа выполнялась в 2015-2016 гг. в условиях ООО «ДОЛИНОВСКИЙ» с. Долиновка Брусиловского района Житомирской области. В работе применяли общеклинические, гематологические исследования. Статистическую обработку полученного цифрового материала проводили с использованием программного пакета Microsoft Excel XP. Исследования были проведены в два этапа. На первом этапе мы проанализировали условия содержания и кормления сухостойных коров, а также изучали связь «мать - плод - приплод». Для этого мы определили ряд антенатальных и постнатальных факторов, результатом негативного воздействия которых на приплод является пагубное влияние на