**УДК : 619:616.981.55**

**І. В .ГАЛКА**
**С. А. НИЧИК**, доктор ветеринарних наук
*Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ*

# ВИЗНАЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНОСТІ ТА ЧУТЛИВОСТІ ІМУНОФЕРМЕНТНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ФУЗОБАКТЕРІОЗУ “ІФА-ФУЗОБАКТЕРІОЗ”

*Наведено результати досліджень з визначення специфічності та чутливості імуноферментної тест-системи для діагностики фузобактеріозу (некробактеріозу) “ІФА-фузобактеріоз”. Специфічність та чутливість розроблюваної тест-системи становить 95 % .*

*Ключові слова: Тест – система, фузобактеріоз, чутливість, специфічність.*

Проблема фузобактеріозу є актуальною не тільки для України, а й для інших країн світу, так як це захворювання має велике значення при експортно-імпортних операціях з тваринами, а також в зв′язку з тим, що воно причиняє великі економічні збитки сільському господарству, а головне будучи однією із зооантропонозних інфекцій, загрожує здоров′ю людей.

Наукові матеріали щодо фузобактеріозу великої рогатої худоби на території України малочисельні і відображені у працях небагатьох учених [1]. Дані останніх років висвітлюють різні сторони епізоотології, етіології, діагностики, патогенезу, лікування та специфічної профілактики цього захворювання [1].

Аналіз літератури свідчить про актуальність виявлення протифузобактеріозних антитіл у сироватках крові тварин з метою моніторингу фузобактеріозної інфекції та визначення напруги імунітету. Дослідження рівнів гуморального імунітету дозволяє контролювати ситуацію щодо фузобактеріозу та визначати ефективність специфічної профілактики [2-7]. Гостра потреба на практиці у швидких, економічних, специфічних та чутливих методах спонукає дослідників активно працювати над проблемою, що стосується не просто виявлення протифузобактеріозних антитіл, а визначення їх рівня, який захищає тварину від захворювання та загибелі [6-7].

Слід відмітити, що в успішній боротьбі з фузобактеріозом, як і з будь-яким інфекційним захворюванням, головний напрямок складає розробка специфічної профілактики, лікування і своєчасна та точна діагностика.

Визначення протифузобактеріозних антитіл за допомогою ІФА набуває широкого розповсюдження. Перспективність даного методу складається в експресності, високій чутливості і специфічності, в можливості автоматичного обліку отриманих результатів та в об′єктивності інтерпретації результатів аналізу, а також в можливості дослідження великої кількості дослідних зразків на наявність специфічних антитіл [4, 5].

Враховуючи те, що сигнал в ІФА обумовлений як специфічними так і не специфічними взаємодіями, паралельно з досліджуваною сироваткою обов’язково необхідно титрувати контрольну сироватку, яка не містить специфічних антитіл. У цьому випадку титр досліджуваної сироватки припадає на розведення, сигнал

якого статистично вірогідно вище сигналу негативної контрольної сироватки [4].

Таким чином, контроль рівню імунітету можна здійснити точним, швидким методом, який дозволяє одночасно аналізувати велику кількість зразків сироваток крові вакцинованих тварин (на одному 96-лунковому планшеті можна дослідити 80 зразків сироваток крові) за 3-4 години [4].

**Мета** наших досліджень – визначення специфічності та чутливості імуноферментної тест-системи для діагностики фузобактеріозу "ІФА-фузобактеріоз".

**Матеріали і методи.** В роботі використовували позитивні та негативні до *Fusobacterium necrophorum* зразки сироваток крові великої рогатої худоби, методи імуноферментного аналізу, експериментальний зразок тест-системи для діагностики фузобактеріозу "ІФА-фузобактеріоз".

Для визначення специфічності та чутливості тест-системи "ІФА-фузобактеріоз" було розроблено панель сироваток, до складу якої входило 20 позитивних та 20 негативних сироваток крові великої рогатої худоби, перевірених в РА та РГГА на титр протифузобактеріозних антитіл.

При визначенні специфічності тест-системи "ІФА-фузобактеріоз" досліджували 20 сироваток, що не містили антитіл до фузобактеріозу. Кожна сироватка досліджувалася в 4 повторах. Одержані результати піддавали статистичній обробці з визначенням середньоквадратичної похибки. Специфічність імуноферментної тест-системи визначали за формулою:

$$C = Nн/(Nн+Nхп)100\%,$$

де

С – специфічність системи,

Nн – кількість негативних результатів в даній системі,

Nхп – кількість хибно позитивних результатів.

Чутливість тест-системи "ІФА-фузобактеріоз" визначали шляхом порівняння результатів дослідження 20 сироваток, що містять антитіла до збудника фузобактеріозу. Кожна сироватка досліджувалась в 4 повторах.

Чутливість імуноферментної тест-системи визначали за формулою:

$$Ч=Nп/(Nп+Nхн)х100\%,$$

де

Ч – чутливість системи,

Nп – кількість позитивних результатів в даній системі,

Nхн – кількість хибно позитивних результатів.

**Результати досліджень та обговорення.**

При конструюванні тест-системи обов'язковим показником її інформативності є визначення граничного значення або порогового значення (ГЗ або cut off), згідно з якими одержаний результат дослідження сироватки слід вважати позитивним або ж негативним. В нашому випадку ГЗ розраховували як суму середнього значення ОГ негативних сироваток та трьох середньоквадратичних відхилень. При проведенні аналізу значення сироватки вважається позитивним, якщо її рівень ОГ починаючи з розведення 1:10 в 2 рази перевищує рівень оптичної густини контрольної негативної сироватки, але не нижче 0,2 ОО (ОГ контрольної сироватки не нижче 0,3 ОО). Сумнівними, невизначеними вважають ті зразки, де рівень

оптичної густини вище негативного контролю і становить 0, 170 – 0,199 ОО. Якщо значення ОГ досліджуваної сироватки потрапляє до вказаної сірої зони , то сироватка вважається сумнівною і необхідно провести її повторне тестування. Рівень ОГ нижче 0,170 свідчить про негативну реакцію.

У разі розрахунку ГЗ використовували створені нами панелі позитивних та негативних сироваток. Панелі представляють собою набір сироваток, одержаних від хворих на фузобактеріоз тварин, в яких визначені антитіла до фузобактеріозу в обумовлених титрах (позитивні сироватки), а також сироватки крові донорів, які не містять таких антитіл (негативні сироватки). Сироватки були попередньо тестовані з використанням РА та РГГА та розроблюваної тест-системи. Критерієм включення позитивної сироватки до стандартної панелі було співвідношення ОГ зразка до ГЗ (ОГ/ГЗ) > 1,0, а при включенні сироватки до негативної панелі ОГ/ГЗ < 1.

Для підсумкової оцінки інформативності розроблюваної тест-системи визначали її специфічність та чутливість.

Специфічність визначається стабільною відтворюваністю негативних результатів порівняльного дослідження негативних сироваток, що не містять антитіл до фузобактеріозу, в розроблюваній та порівняльній тест-системі. Для визначення специфічності тест-системи "ІФА-фузобактеріоз" ми чотириразово досліджували 20 сироваток, що не містили антитіл до фузобактеріозу. Одержані результати подані в таблиці 1.

*Таблиця 1*

**Визначення специфічності імуноферментної тест-системи "ІФА-фузобактеріоз"**

| № п/п сироваток | Середнє значення ОГ (ОО)* | Значення похибки (±) | ОГ/ГЗ** |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,123 | 0,0293 | 0,615 |
| 2 | 0,068 | 0,0145 | 0,34 |
| 3 | 0,085 | 0,0089 | 0,425 |
| 4 | 0,100 | 0,0032 | 0,5 |
| 5 | 0,103 | 0,0137 | 0,515 |
| 6 | 0,115 | 0,0086 | 0,575 |
| 7 | 0,082 | 0,0075 | 0,41 |
| 8 | 0,083 | 0,0094 | 0,415 |
| 9 | 0,079 | 0,0032 | 0,395 |
| 10 | 0,107 | 0,0146 | 0,535 |
| 11 | 0,175 | 0,0138 | 0,875 |
| 12 | 0,097 | 0,0097 | 0,485 |
| 13 | 0,116 | 0,0127 | 0,58 |
| 14 | 0,060 | 0,0065 | 0,3 |
| 15 | 0,117 | 0,0046 | 0,585 |
| 16 | 0,115 | 0,0089 | 0,575 |
| 17 | 0,106 | 0,0136 | 0,53 |
| 18 | 0,121 | 0,0098 | 0,605 |
| 19 | 0,063 | 0,0078 | 0,315 |
| 20 | 0,079 | 0,0097 | 0,395 |

Позитивний результат >0,20 ОО або ОГ/ГЗ > 1,0

* ОО – оптичні одиниці

** ОГ/ГЗ – співвідношення оптичної густини зразка до граничного значення

Як свідчать наведені матеріали, в одному випадку дослідження негативних сироваток в тест-системі "ІФА-фузобактеріоз" зареєстровано значення ОГ, яке свідчило про сумнівний результат (сироватка № 11). Отже, специфічність розроблюваної тест-системи становить 95 % .

Чутливість тест-системи – це стабільність відтворення позитивних результатів при дослідженні позитивних сироваток.

Чутливість тест-системи "ІФА-фузобактеріоз" визначали шляхом порівняння результатів чотириразового дослідження 20 сироваток, що містять антитіла до збудника фузобактеріозу. Отримані результати наведені в таблиці 2. Відмічена розбіжність у випадку сироватки № 8, тобто чутливість тест-системи "ІФА-фузобактеріоз" становить 95 %.

*Таблиця 2*

**Визначення чутливості імуноферментної тест-системи "ІФА-фузобактеріоз".**

| № п/п сироваток | Середнє значення ОГ (ОО)* | Значення похибки (±) | ОГ/ГЗ** |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,603 | 0,0096 | 3,015 |
| 2 | 0,512 | 0,0245 | 2,56 |
| 3 | 0,255 | 0,0142 | 1,275 |
| 4 | 0,631 | 0,0134 | 3,155 |
| 5 | 0,603 | 0,0032 | 3,015 |
| 6 | 0,745 | 0,0142 | 3,725 |
| 7 | 0,27 | 0,021 | 1,35 |
| 8 | 0,20 | 0,0128 | 1,0 |
| 9 | 0,500 | 0,0075 | 2,5 |
| 10 | 0,22 | 0,005 | 1,1 |
| 11 | 0,671 | 0,0124 | 3,355 |
| 12 | 0,497 | 0,0043 | 2,485 |
| 13 | 0,711 | 0,0046 | 3,555 |
| 14 | 0,567 | 0,0206 | 2,835 |
| 15 | 0,440 | 0,0079 | 2,2 |
| 16 | 0,605 | 0,0141 | 3,025 |
| 17 | 0,555 | 0,0055 | 2,775 |
| 18 | 0,517 | 0,0153 | 2,585 |
| 19 | 0,290 | 0,0170 | 1,45 |
| 20 | 0,31 | 0,0128 | 1,55 |

Позитивний результат >0,2 ОО або ОГ/ГЗ > 1,0

* ОО – оптичні одиниці;

** ОГ/ГЗ – співвідношення оптичної густини зразка до граничного значення

Таким чином, створено лабораторний зразок вітчизняної імуноферментної тест-системи для виявлення антитіл до *F. necrophorum*, який дістав назву "ІФА-фузобактеріоз" та оптимізовано умови проведення всіх етапів аналізу. Тест-система має високі показники специфічності та чутливості.

Нами були виготовлені експериментальні імуноферментні діагностичні набори, які були апробовані в експериментальних і практичних умовах.

Тест-система "ІФА-фузобактеріоз" пройшла випробування на базі лабораторії анаеробних інфекцій ІВМ НААН. Розроблені технічні умови ТУУ 24.4-05510830-002:2010, листівка-вкладка, інструкція з виготовлення.

При виготовленні імуноферментних наборів для виявлення протифузобактеріозних антитіл ми застосовували непрямий варіант ІФА, яким раніше користувалися ряд авторів для виготовлення аналогічних наборів для діагностики інших хвороб [4-5].

При дотриманні всіх правил розробки наборів ІФА і оптимізації параметрів виробничих та методичних процесів, розроблена нами схема ІФА виявилась надійним методом діагностики фузобактеріозу тварин.

**Висновки**

1. Розроблено імуноферментну тест-система "ІФА-фузобактеріоз" для виявлення антитіл до *F. necrophorum* та оптимізовано умови проведення всіх етапів аналізу.

2. Специфічність розроблюваної імуноферментної тест-системи "ІФА-фузобактеріоз" становить 95 %.

3. Чутливість розроблюваної імуноферментної тест-системи "ІФА-фузобактеріоз" становить 95 %.

**Список використаної літератури**

1. *Риженко В. П.* Актуальні питання профілактики некробактеріозу // Ветеринарна медицина України.-1998., № 11-12.-С. 15.

2. *Пилипенко А. А., Борисова Л. Н.* Иммунологическое изучение комплексного антигена *B. necrophorum* //Диагностика, профилактика и терапия болезней животных на Крайнем Севере .–Новосибирск –1983.–С.15–40.

3. *Kameyama Y.* Enzyme-linked immunosorbent assey for detection of *F. necrophorum* antibody in bovine sera / Microbiols./ Y Kameyama – 1992. – V.70. – №282. – P.23 – 30.

4. Подбор и испытание компонентов ИФА для экзотоксина некробактериоза // Состояние, пробл. и перспективы развития вет. науки России.– М.–1999.– Т.1.–С.303–305.

5. Теория и практика иммуноферментного анализа. / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова – М.: Высш. шк., 1991.-288 с.

6. Сравнительная оценка методов выявления антител при некробактериозе/ Е. К. Акимов, Х. Н. Макаев, Д. А. Хузин, Н. А. Хисмату-лина, В. Г. Гумеров, А. К. Галиуллин, В. В. Сабурова / Ветеринария. – 2005., №1.- С.28 – 29.

7. *Самоловов А. А.* Испытание иммунофлуорисцентного метода для диагностики некробактериоза крупного рогатого скота /Диагностика и профилактика инфекционных болезней животных./ А.А. Самоловов – Новосибирск.: 1989. – С. 21 – 24.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ФУЗОБАКТЕРИОЗА “ИФА – ФУЗОБАКТЕРИОЗ”/** Галка И. В., Нычик С. А.

*Отображено результаты исследований с определения специфичности и чувствительности иммуноферментной тест-системы для диагностики фузобактериоза (некробактериоза) «ИФА – фузобактериоз». Специфичность и чувствительность разработанной тест-системы составляет 95 %.*

*Ключевые слова: Тест – система, фузобактериоз, чутвительность, специфичногсть.*

**THE DETERMINATION OF SPECIFFIC AND SENSITIVITY OF ELISA TEST-SYSTEM “ELISA-FUSOBACTERIOSIS” FOR FUSOBACTERIOSIS DIAGNOSTICS /** *I. V. Galka, S. A. Nychyk*

*The results of investigation of determination of specificity and sensitivity of ELISA test system for fusobacteriosis diagnostics “ELISA-fusobacteriosis” shown it the article. The specificity and sensitivity of the developed test-system is 95 %.*

*Keywords: test-system fuzobakterioz, chutvitelnost, spetsifichnogst.*

**Рецензент** – доктор ветеринарніх наук. **В. Л. Коваленко**