

УДК: 619-616.98:616.682-002

В. В. ГОНЧАРЕНКО-ПРОКОФ'ЄВА

Національний науковий центр «Інституту експериментальної та клінічної ветеринарної медицини», (м. Харків)

ВИЗНАЧЕННЯ КРИТЕРІЇВ ОЦІНКИ (CUT OFF) КОМПОНЕНТІВ НАБОРУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО *BRUCELLA OVIS* НЕПРЯМИМ МЕТОДОМ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

*Визначено критерії оцінки (Cut off) компонентів набору для виявлення антитіл до *Brucella ovnis* непрямим методом імуноферментного аналізу (н-ІФА). У результаті проведених досліджень позитивних та нормальних сироваток крові дрібної рогатої худоби н-ІФА встановлено, що специфічність компонентів набору склала 100 %, чутливість – 100 %, граничний рівень (Cut off) – 0,25.*

Ключові слова: імуноферментний аналіз, граничний рівень (Cut off), специфічність, чутливість, оптична екстинція, інфекційний епідидиміт баранів.

Інфекційний епідидиміт баранів (*Brucella ovnis* інфекція) небезпечна хронічна хвороба, яка спричиняє суттєві економічні збитки вівчарству багатьох країн. Захворювання супроводжується проліферативним запаленням і атрофією сім'яників та придатків у баранів, зниженням їх репродуктивної функції, а у вівцематок ембріональною смертністю та абортами, народженням мертвих або слаборозвинених ягнят. Збудник хвороби *Brucella ovnis* передається статевим шляхом в основному під час парувальної кампанії, від хворих до здорових баранів та вівцематок, а також від зараженої вівцематки баранам і через інфіковану сперму при штучному осіменінні. Новонароджені ягнята заражаються від хворих вівцематок через молоко [1, 2].

Одним із головних заходів нагляду і прогнозування епізоотичної ситуації з інфекційного епідидиміту баранів є серологічний моніторинг дрібної рогатої худоби, який здійснюється за допомоги скринінгових серологічних методів. За рекомендаціями МЕБ використовуються реакція зв'язування комплементу (РЗК), реакція імунодифузії (РІД) та непрямий імуноферментний метод (ІФА). За даними МЕБ РІД та ІФА є більш чутливішими за РЗК [5, 6].

В Україні чинними є РТЗК і РІД. Застосування ІФА, перш за все, зумовлено суттєвими перевагами перед іншими методами: забезпечення високої продуктивності праці, високої чутливості та специфічності виявлення антитіл; стабільність реагентів, автоматизацією постановки та обліку результатів реакції [7, 8, 9]. Ураховуючи відсутність в Україні вітчизняного набору ІФА для діагностики інфекційного епідидиміту баранів у ННЦ «ІЕКВМ» було досліджено експериментальні зразки компонентів набору для виявлення антитіл до *Brucella ovnis* у сироватці крові дрібної рогатої худоби непрямим методом імуноферментного аналізу.

Мета досліджень – визначення критеріїв оцінки (*Cut off*) компонентів набору для виявлення антитіл до *Brucella ovis* н-ІФА.

Матеріали та методи. Проведені комісійні міжлабораторні випробування експериментальних зразків компонентів набору для виявлення антитіл до *Brucella ovis* у сироватці крові дрібної рогатої худоби н-ІФА. Дослідження проводили згідно методики комісійних міжлабораторних випробувань, затвердженої методичною комісією, на базі лабораторії вивчення бруцельозу (ННЦ «ІЕКВМ»).

У дослідах використали експериментальні зразки компонентів набору ІФА: бруцелаовісний імуносорбент та антитіла кролика проти *IgG* вівці мічені пероксидазою хрому. Експериментальні розчини буферів, виготовлені у лабораторії вивчення бруцельозу рН, яких контролювали на рН-мілівольтметрі марки рН-150МА.

Досліджено:

1. стандартні позитивна і нормальна сироватки крові з «Набір для серологічної діагностики інфекційного епідидиміту баранів в РТЗК» ТУ У 46.15.247-97, робочий титр 1:5, серія №1, контроль №1, виробництва НДП «Ветеринарна медицина»;

2. позитиві та нормальні сироватки внутрішньовиробничої бруцелаовісної панелі (внутрішньо лабораторний стандарт, ННЦ «ІЕКВМ»), яка складається з 13 сироваток позитивні до *Brucella ovis* та 11 сироваток негативних до *Brucella ovis*.

Постановку н-ІФА проводили за стандартною методикою [3], з дотриманням контролів: контроль неспецифічної сорбції антигену, контроль субстрату, контроль неспецифічного зв'язування антитіл. За робочий титр антитіла кролика проти *IgG* вівці мічені пероксидазою хрому прийнято розведення 1:100, яке було отримано шляхом попереднього титрування, дане розведення забезпечило максимальне виявлення специфічних антитіл та не приводить до значних збільшень ($OE > 0,200$) фонових показників контролів (лунки без антигену з усіма компонентами реакції та лунки з усіма компонентами реакції, але без сироватки). Облік результатів реакції провели спектрофотометрично за довжиною хвилі 492 нм на аналізаторі імуноферментному «Sunrise» (Tecan), програма автоматичного комп'ютерного обліку «Magellan» у лабораторії вивчення бруцельозу.

Для визначення критеріїв оцінки дослідження сироваток крові овець на наявність антитіл до *Brucella ovis* в н-ІФА проводили розрахунки діапазонів оптичної екстинції (OE), за загально прийнятою методикою оцінки якості тест-систем [4].

Значення середньоквадратичного відхилення (σ) обчислювали за формулою (1):

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{(n-1)}}, \quad d = X_i - X_{cp}, \quad (1)$$

де d – різниця між окремими показниками OE і середньою арифметичною величиною ($X_i - X_{cp}$); n – кількість досліджуваних сироваток; X_i – значення OE окремої сироватки; X_{cp} – середнє арифметичне значення OE усіх досліджуваних сироваток.

Розрахунок граничного рівня (*Cut off*) – показник ОЕ, згідно з яким результат вважається позитивним або негативним, розраховували за формулою (2):

$$Co = OE_{cp} + 3\sigma, \quad (2)$$

де Co – *Cut off*, OE_{cp} – середнє значення ОЕ негативних сироваток крові овець, σ – середньоквадратичне відхилення.

Чутливість компонентів набору для виявлення антитіл до *Brucella ovis* н-ІФА визначали у відсотках за співвідношенням позитивно реагуючих до дійсно позитивних сироваток, склала 100% та розраховували за формулою (3):

$$Ч = \frac{Nip}{Nip + Nxn} \times 100\%, \quad (3)$$

де $Ч$ – чутливість набору %;

Nip – кількість істинно-позитивних значень;

Nxn – кількість хибно-негативних значень.

Специфічність, яку визначали у відсотках за співвідношенням негативно реагуючих сироваток до дійсно негативних сироваток, склала 100% і розраховували за формулою (4):

$$C = \frac{Nin}{Nin + Nxp} \times 100\%, \quad (4)$$

де C – специфічність системи у %;

Nin – кількість істинно-негативних значень;

Nxp – кількість хибно-позитивних.

Результати досліджень. Результати отримані при постановці ІФА наведені у таблиці, де показано, що з 13 позитивних сироваток внутрішньовиробничої бруцелаовісної панелі ННЦ «ІЕКВМ» 13 реагувало позитивно; з 11 нормальних сироваток внутрішньовиробничої бруцелаовісної панелі ННЦ «ІЕКВМ» 11 реагувало негативно. Базуючись на отриманих результатах, встановлено, що чутливість компонентів набору, визначена у відсотках за співвідношенням позитивно реагуючих до дійсно позитивних сироваток, склала 100 % та розраховували за формулою 3. Специфічність, яку визначали у відсотках за співвідношенням негативно реагуючих сироваток до дійсно негативних сироваток, склала 100 % і розраховували за формулою 4.

Згідно проведених математичних розрахунків ОЕ реакції, отриманих при спектрофотометричному обліку результатів реакції, визначено діапазони критеріїв оцінки дослідження сироваток крові овець на наявність антитіл до *Brucella ovis* в н-ІФА, за формулами 1; 2. За титр сироватки приймали те її найвище розведення, при якому рівність ОЕ перевищувала критичну величину (*Cut off*) – 0,25 нижче якої результати вважали як негативні, всі інші результати, що мають ОЕ вищу зазначеного рівня вважаються позитивними.

**Порівняльний аналіз результатів дослідження сироваток
внутрішньовиробничої бруцеляовісної панелі у РТЗК та ІФА**

№ сироватки	Внутрішньо лабораторний стандарт позитивні та нормальні сироватки			
	Результат у РТЗК		Результат в ІФА, розведення сироваток 1:200 <i>Cut off 0,25</i>	
	Титр сироваток	Висновок	Оптична Екстинція (ОЕ)	Висновок
1	1:40 #	Позитивна	0,528	Позитивна
2	1:40 #	Позитивна	0,446	Позитивна
3	1:20 #	Позитивна	0,408	Позитивна
4	1:40 #	Позитивна	0,441	Позитивна
5	1:40 #	Позитивна	0,433	Позитивна
6	1:10 #	Позитивна	0,359	Позитивна
7	1:20 #	Позитивна	0,376	Позитивна
8	1:5 #	Позитивна	0,346	Позитивна
9	1:20 #	Позитивна	0,435	Позитивна
10	1:40 #	Позитивна	0,465	Позитивна
11	1:5 #	Позитивна	0,355	Позитивна
12	1:20 #	Позитивна	0,434	Позитивна
13	1:5 #	Позитивна	0,377	Позитивна
14	1:5 -	Негативна	0,153	Негативна
15	1:5 -	Негативна	0,129	Негативна
16	1:5 -	Негативна	0,122	Негативна
17	1:5 -	Негативна	0,126	Негативна
18	1:5 -	Негативна	0,107	Негативна
19	1:5 -	Негативна	0,113	Негативна
20	1:5 -	Негативна	0,1	Негативна
21	1:5 -	Негативна	0,146	Негативна
22	1:5 -	Негативна	0,126	Негативна
23	1:5 -	Негативна	0,136	Негативна
24	1:5 -	Негативна	0,113	Негативна
Контроль позитивна сироватка	1:40 #	Позитивна	0,519	Позитивна
Контроль нормальна сироватка	1:5 -	Негативна	0,147	Негативна

Висновки: 1. При постановці реакцій з завідомо позитивними та нормальними сироватками в обох варіантах результати були аналогічними: із 13 позитивних сироваток внутрішньовиробничої бруцеляовісної панелі ННЦ «ІЕКВМ» 13 реагувало позитивно, із 11 нормальних сироваток внутрішньовиробничої бруцеляовісної панелі ННЦ «ІЕКВМ» 11 реагувало негативно.

2. Встановлено, що чутливість компонентів набору, визначена у відсотках за співвідношенням позитивно реагуючих до дійсно позитивних сироваток, склала 100 %.

3. Специфічність, яку визначали у відсотках за співвідношенням негативно реагуючих сироваток до дійсно негативних сироваток, склала 100 %.

4. Визначення критеріїв оцінки *Cut off* для дослідження позитивних та нормальних сироваток крові овець на наявність антитіл до *Brucella ovis* у н-ІФА показало, що позитивним результатом вважаються ОЕ від 0,25 і більше; негативним є ОЕ до 0,249.

Список використаної літератури

1. Бабкін А. Ф. Дослідження імуносорбції термостабільних та термолабільних антигенів штамів *B. ovis* 67/Б, 76/982, 156/7807 та специфічного бруцеллаовісного пероксидазного кон'югату в ІФА [Текст] / А. Ф. Бабкін. [та ін.]. // *Вет.мед.: Міжвід. темат. наук. зб.* – Вип. 95. – С. – 80-82.

2. Бусол В. А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных [Текст] / В.А.Бусол, А. Ф.Бабкин, П. Н. Жованик– К.: Урожай, 1991. – 176 с.

3. Стегній Б. Т. Визначення специфічності, чутливості та відтворюваності тест-системи «Набір компонентів для визначення антитіл до вірусу інфекційного бронхіту курей імуноферментним методом» [Текст] / Б. Т. Стегній [та ін.] // *Вет. мед.: Міжвід. темат. наук. зб.* – Вип.89. – С. – 350–354.

4. Теория и практика иммуноферментного анализа [Текст] / А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев, Е. М. Гаврилова. – М.: Высшая школа, 1991. – С. 93-95.

5. Chapter 2.4.1 OIE. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals (mammal, birds and bees) / [Text].- 5th ed. – Paris, 2004. – Vol. 1.- P. 245-250.

6. Chapter 2.4.1 OIE. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals (mammal, birds and bees) / [Text]. – 6th ed. – Paris, 2004. – Vol. 1.- P. 257-263.

7. Marin C. M. Comparison of polyclonal, monoclonal and protein G peroxidasa conjugates an enzyme-linked immunosorbend assay for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. / C. M. Marin., Alonso-Urmeneta B., Morlion J., Perez S.L., Blasco J.M. // *Vet. Rec.* – 1998. – V. 143. – P. 390-394.

8. Marin C. M. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. / C. M. Marin, Jimenes Z de Bagues U.P., J.M.Blasco, C. Yamazo., J. Moriyon and Diaz R. // *Vet. Rec.* – 1989. – V. 125, – P. 504-508.

9. Ris D. R. Comparison of an enzyme linked immunospecific assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. / D.R. Ris, K. L.Hamel and D. J. Long // *Vet. J.* – 1984, V. – 32, P. 18-20.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРИТЕРИЕВ ОЦЕНКИ (CUT OFF) КОМПОНЕНТОВ НАБОРА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К *BRUCELLA OVIS* НЕПРЯМЫМ МЕТОДОМ ИМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА / В.В. Гончаренко-Прокофьева

Определены критерии оценки (Cut off) компонентов набора для выявления антител к Brucella ovis непрямым методом иммуноферментного анализа (н-ИФА). В результате проведенных исследований позитивных и нормальных сывороток крови мелкого рогатого скота н-ИФА установлено, что специфичность компонентов набора равна 100%, чувствительность – 100%, предельный уровень (Cut off) – 0,25.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, предельный уровень (Cut off), специфичность, чувствительность, оптическая экстинция, инфекционный эпидимит баранов.

DETERMINATION OF ESTIMATION CRITERIA (CUT OFF) OF DETECTION OF ANTIBODIES KITS COMPONENTS TO BRUCELLA OVIS BY INDIRECT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY / V. V. Goncharenko-Prokof'eva

The estimation criteria (Cut off) of kits components are certain for the exposure of antibodies to Brucella ovis by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-ELISA). As a result of the conducted researches of positive and normal serums of blood of sheep and goats by I-ELISA it is set, that specificity of kits components is 100 %, sensitiveness – 100 %, maximum level (Cut off) – 0,25.

Key words: enzyme-linked immunosorbent of assay, maximum level (Cut off), specificity, sensitiveness, optical density, infectious epididymitis of rams.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук М. П. Ситюк.