

О. С. ГАЙДЕЙ, кандидат ветеринарних наук

В. О. ЗАГРЕБЕЛЬНИЙ, кандидат ветеринарних наук

Ю. М. НОВОЖИЦЬКА, кандидат ветеринарних наук

Н. В. УСАЧЕНКО, лікар ветеринарної медицини, аспірант

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

ВИЗНАЧЕННЯ ВИДОВОЇ ПРИНАЛЕЖНОСТІ (ФАЛЬСИФІКАЦІЇ) ПРОДУКТІВ ХАРЧУВАННЯ ТА КОМБІКОРМІВ ДЛЯ ТВАРИН ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛІР-РЧ

У статті наведена інформація щодо методів виявлення ДНК жуйних у комбікормах та визначення видової приналежності (фальсифікації) у продуктах харчування. Проведено аналіз результатів виявлення ДНК жуйних в комбікормах для тварин та фальсифікату у готових м'ясних продуктах за 2012 – 2013 роки.

Ключові слова: молекулярно-генетична діагностика, видова приналежність, фальсифікація, ПЛІР-РЧ.

Формування в Україні ринкових умов розвитку, різке збільшення об'єму приватного виробництва і вільної торгівлі продовольчими товарами, у тому числі м'ясною сировиною, напівфабрикатами та готовою м'ясною продукцією, визначають можливість різноманітної їх фальсифікації по структурі і видовій приналежності сировинних складників. Частіше всього фальсифікують малоцінну м'ясну сировину, продукцію другого і третього сортів, реалізуючи їх як продукцію високої якості.

В останні роки на ринках і торгових підприємствах нашої країни помітно збільшився збут фальсифікованих продовольчих, у тому числі м'ясних продуктів як вітчизняного, так і імпортного виробництва. При чому суворе дотримання певних вимог до сировини і продукції, ще не забезпечують повного виключення фальсифікації різноманітних продуктів [1, 3].

Важливе місце в оцінці якості м'ясних продуктів займає контроль за дотриманням науково-обґрунтованих рецептур і визначенні сировинного складу готових м'ясопродуктів. Відомо, що ДСТУ і ТУ визначають показники, норми і вимоги до якості сировини і готової продукції. В нормативній документації, яка розроблена і затверджена на кожен вид м'ясної продукції, прописується склад використаної сировини і його співвідношення [2, 4].

Сьогодні особливо гостро стоїть питання про необхідність більш достовірного виявлення, як видової приналежності блючої м'ясної сировини, так і складу м'ясних подрібнених продуктів. Це зумовлено тим, що через фальсифікацію м'ясної сировини не лише змінюються споживчі властивості готових виробів, але й виникає небезпека для здоров'я людини.

Найбільше занепокоєння у фахівців ветеринарної медицини викликають можливі підміни у продуктах м'ясної сировини м'ясом тварин, уражених пріонами чи вірусами, які створюють великий ризик в епізоотичному та епідемічному відношеннях (губчата енцефалопатія, африканська чума свиней, ящур та ін.), а також м'ясом, імпортом, якого в нашу країну з тих чи інших причин заборонений. З метою відмежування розповсюдження «пріонної інфекції» серед тварин з кормами, Європейська співдружність заборонила використання м'ясо-кісткового борошна від ВРХ у кормовиробництві. Крім того, фальсифікація видової приналежності м'ясної сировини в багатокомпонентних м'ясних продуктах може нанести великих моральних збитків тій категорії споживачів, національний чи релігійний світогляд яких не дозволяє споживати м'ясо окремих видів тварин та птиці [3, 5].

На сьогодні методи органолептичного, фізико-хімічного та мікробіологічного контролю дають можливість визначити свіжість і безпечність м'ясної сировини та готових м'ясних виробів. Але з їхньою допомогою не можливо встановити видовий склад м'яса в продуктах, особливо, якщо кількість видозміненої м'язової тканини незначне по відношенню до основної сировини. Гістологічний аналіз у ряді випадків дозволяє виявити використання субпродуктів, соєвих білкових та вуглеводних добавок. Та з допомогою даних методів неможливо вирішити не менш важливе завдання, яке виникає у практиці визначення якості м'ясної продукції – установа видої приналежності м'ясних та рослинних інгредієнтів [2, 3, 4].

Найбільш перспективним для визначення видової приналежності тканин тваринного походження у складі м'ясної сировини і продуктів, у тому числі тих, що були піддані термічній обробці, являються методи ДНК-діагностики і, особливо, метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛІР). Порівняно з традиційними методами видової детекції, встановлення видової приналежності м'яса за допомогою ПЛІР відрізняються універсальністю, більш глибоким рівнем видової диференціації, високою відтворюваністю і можливістю кількісного аналізу [5].

Метою нашої роботи було проаналізувати результати дослідження готової м'ясної продукції на предмет фальсифікації та комбікормів для тварин на виявлення ДНК жуйних, які проведені впродовж 2012-2013 років.

Матеріали та методи. Дослідження проводились протягом 2012-2013 рр. за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу (ПЛІР-РЧ) на базі науково-дослідного відділу з визначення ГМО ДНДІЛДВСЕ. Для проведення досліджень були використані зареєстровані на території Європи діагностичні набори: SureFood PREP Animal X (R-Biopharm AG, Німеччина), First Cattle PCR Kit, First Pig PCR Kit, First Chicken PCR Kit, First Horse PCR Kit (GEN-IAL, Німеччина) та стандартні зразки ДНК свині, ВРХ, курей (R-Biopharm AG, Німеччина), ампліфікатор Rotor Gene 3000. Для визначення видової приналежності надходили наступні зразки: рибне борошно, комбікорми для свиней, ВРХ, птиці (табл. 2) та готові м'ясні вироби – лазанья м'ясна, ковбаса варена, ковбаса московська, ковбаса варено-копчена, шинка яловича, сардельки «Екстра», сосиски молочні, салами, ковбаса альпійська, старокіївська, баварська, лікарська (табл. 2).

Результати досліджень. Протягом 2012 – 2013 років на наявність ДНК жуйних було досліджено 100 зразків комбікормів для ВРХ, птиці та свиней згідно з Планом моніторингу кормів, кормових добавок та преміксів Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України (табл. 1). Крім того, протягом цього періоду було досліджено 49 зразків імпортованого рибного борошна та 37 зразків готової м'ясної продукції. Для дослідження зразків використовували діагностичні набори: First Cattle PCR Kit – для виявлення ДНК ВРХ; First Pig PCR Kit – для виявлення ДНК свиней; First Chicken PCR Kit – для виявлення ДНК курей; First Horse PCR Kit для виявлення ДНК коней (GEN-IAL, Німеччина).

Кількість зразків, які надійшли для дослідження протягом 2012-2013рр.

Надійшло на дослідження	Всього зразків	Кількість зразків, які надійшли на моніторингові дослідження для виявлення ДНК жуйних	Кількість зразків, які надійшли для виявлення видової приналежності
2012 рік	50	50	-
2013 рік	133	50	83

Із загальної кількості комбікормів для тварин, що надійшли протягом 2012-2013 рр. на моніторингові дослідження та готової м'ясної продукції у 13 % зразків було виявлено ДНК жуйних та фальсифікати, у 87 % – не виявлено (рис.1).

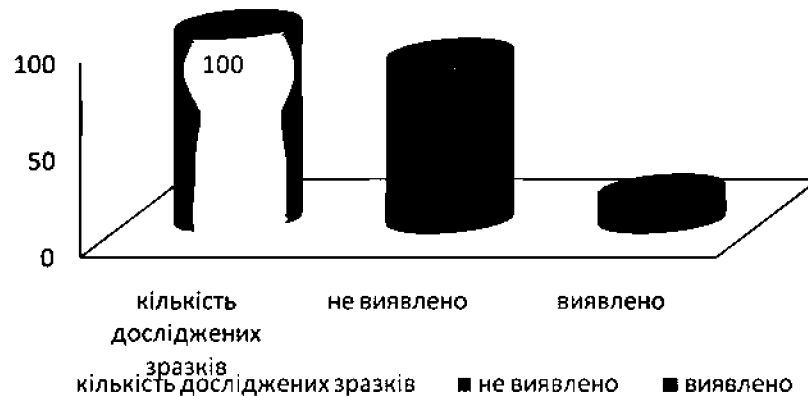


Рис. 1. Аналіз результатів визначення видової приналежності готової м'ясної продукції та ДНК жуйних у комбікормах для тварин за 2012 – 2013 рр.

Так, у зразках, які надходили на дослідження протягом 2012-2013 рр. було виявлено: 9 проб ДНК жуйних, серед готових м'ясних виробів у 4 зразках шинки яловичої виявлено ДНК курей, в одному зразку ковбаси московської виявлено ДНК свиней та курей.

Таблиця 2

Зразки, які досліджувались на наявність ДНК жуйних та виду приналежності

Зразки	Кількість зразків	Виявлено фальсифікат	Не виявлено
Лазанья м'ясна	2	-	2
Ковбаса варена	3	-	3
Ковбаса московська	3	1*	2
Ковбаса варено-копчена	2	-	2
Ковбаса альпійська	1	-	1
Ковбаса старокиївська	1	-	1
Ковбаса баварська	1	-	1
Ковбаса лікарська	3	-	3
Сардельки «Екстра»	2	-	2
Сосиски молочні	2	-	2
Шинка яловича	5	4**	1

*виявлено ДНК курей

** виявлено ДНК курей та свиней

Проаналізувавши результати досліджень за 2012 – 2013 роки, встановили, що деякі вітчизняні виробники додають у свою продукцію сировину, яка не зазначена у ТУ чи ДСТУ.

Висновки. Аналіз проведених досліджень свідчить про використання виробниками у своїй продукції сировини, яка не зазначена у ТУ чи ДСТУ (фальсифікації), для зниження собівартості продукту. Тому, проведення планового моніторингу готових м'ясних продуктів та комбікормів для тварин дасть змогу простежити ситуацію щодо фальсифікації готової м'ясної продукції та контролювати наявність ДНК жуйних в комбікормах для тварин в Україні з метою недопущення розповсюдження «пріонної інфекції» серед тварин з кормами.

Список використаної літератури:

1. Боровков М. Ф. Определение видовой принадлежности мяса животных / М. Ф. Боровков, О. М. Швец, А. К. Кириллов // Методическое пособие, М. – АМБАР, 1998. – 34 с.
2. Езерская Е. Я. Анализ видовой принадлежности мяса и мясopодуктов / Е. Я. Езерская // Ветеринария, № 6., М. – 2001. – С.45.
3. Кабанова Е. М. Определение видовой принадлежности мяса домашних и диких животных / Е. М. Кабанова // Автореф. дисс., Чебоксары – 1999. – 23 с.
4. Комаров А. А. [та ін.] Определение видовой принадлежности тканей жвачных животных / А. А. Комаров [та ін.]. // Ветеринария, № 3., М. – 2000. – С. 59-62.
5. Макаров М. Ю. Разработка тест-систем идентификации мяса и мясopодуктов на основе ДНК-диагностики / М. Ю. Макаров // Тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф. «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов», Щелково – 2000. С. 388-389.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ (ФАЛЬСИФИКАЦИИ) ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ И КОМБИКОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ С ПОМОЩЬЮ РТ-ПЦР / О. С. Гайдей, В. А. Загребельный, Ю. Н. Новожицкая, Н. В. Усаченко

В статье наведена інформація по методам определения ДНК жвачных у комбикормах и определение видовой принадлежности (фальсификации) продуктов питания. Проведен анализ результатов выявления ДНК жвачных в комбикормах для животных и фальсификатов в готовых мясных продуктах за 2012 – 2013 гг.

Ключевые слова: молекулярно-генетическая диагностика, видовая принадлежность, фальсификация, РТ-ПЦР.

DEFINITION SPECIES IDENTITY (FALSIFICATION) OF FOOD AND FEED FOR ANIMALS BY RT-PCR / O. S. Gaidei, V. O. Zahrebelniy, J. M. Novozhytka, N. V. Usachenko

The article presents information on methods for detection of DNA in ruminant compound feed and determination of species identity (falsification) in food. The analysis of DNA detection in feed for ruminant animals and adulteration of meat products ready for 2012 - 2013 years.

Today is particularly important question for more reliable detection of the species content of the raw meat and meat products and for the plant product. The importance of the question is because of falsification of raw meat the food products consumer properties changing and some kind of the risk to human health arise.

During 2012 - 2013 years was tested 100 samples of feed, feed additives and premixes for cattle, poultry and pigs for the presence of bovine DNA according to the Program of State Veterinary and Phytosanitary Service of Ukraine.

During this period, it was investigated 49 samples of imported fish meal and 37 samples of meat products. The samples was tested using diagnostic kits: First Cattle PCR Kit - for detection of bovine DNA; First Pig PCR Kit - for detection of DNA pigs; First Chicken PCR Kit - for detection of DNA hens; First Horse PCR Kit for detection of DNA of horses (GEN-IAL, Germany).

From the total amount of feed for the animals investigated during the 2012-2013 years in tests in 13% of samples of meat products it was found presence of non-ruminant DNA and presence of ruminant DNA, in 87% - was detected the presence of ruminant DNA only.

In the samples that were investigated during the observation period of 2012-2013 years it was detected : 9 DNA samples of ruminants in meat products, in 4 samples of beef ham was detected chicken DNA, in one sample of the Moscow sausage it was detected DNA of pigs and chickens (must be DNA of ruminants only).

The analysis of the data demonstrates the using of manufacturers of raw materials in their products, which is not mentioned in either ISO (contrafact), to reduce the cost of the product. Therefore, carrying out routine monitoring of meat products and feed for animals will help to trace the situation with the falsification of meat products in Ukraine and to prevent the dissemination of "prion" infection with contrafact feeds of animal origin.

Key words: molecular genetical diagnostic, species identity, falsification, RT-PCR.

Рецензент – кандидат ветеринарних наук Тарасов О. А.

Рукопис надійшов 08.09.2014 року.

А. В. ДІДУХ

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ІНТЕНСИВНОЇ ТЕРАПІЇ ЗА ПАРВОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ СОБАК ЗА ДИНАМІКОЮ ПОКАЗНИКІВ С-РЕАКТИВНОГО БІЛКА

У статті описана схема інтенсивного лікування за парвовірусної інфекції, яка поєднує комплексне застосування засобів етіотропної та патогенетичної терапії, а також представлені результати дослідження її ефективності за показником С-реактивного білка у сироватці крові собак.

Ключові слова: ефективність терапії, панкреатит, парвовірусна інфекція, собаки, С-реактивний білок

Білки гострої фази запалення (БГФЗ), такі як гаптоглобін, сировотковий амілоїд А (САА) і С-реактивний білок (С-РБ) є білками плазми, концентрація яких збільшується у багато разів під час розвитку інфекції, запалення або травми [1]. Концентрація негативних БГФЗ може знижуватись – альбумін або трансферин, а позитивних БГФЗ – підвищуватись – С-РБ, сировотковий амілоїд А, гаптоглобін, серулоплазмін, альфа-1- ацидоглобін [2]. Синтез перших розпочинається під дією інтерлейкінів, через декілька годин після ушкодження. Найбільш важливими білками гострої фази є СРБ, сировотковий амілоїд А (САА) і сировотковий амілоїд Р (САР). У собак, як і у людини, мавп, свиней, крликів основним білком гострої фази є С-РБ. По причині відсутності комерційних діагностичних наборів для визначення САА у тварин, використовують тести для вимірювання С-РБ, проте у ветеринарній практиці, даний показник використовується порівняно рідко, а література містить обмежену інформацію про використання С-РБ у ветеринарії. Головним чином даний показник використовується для виявлення гострої запальної реакції, з метою післяопераційного контролю тощо. Даний білок значно підвищується при легтоспірозі, артритях. Існують дані про підвищення показників С-РБ під час перебігу чуми собак, бактеріального і геморагічного ентериту, легтоспірозу, діареї поросят, при трихінельозі, променеві хворобі, бабезіозі, лейшманіозі, парвовірусній інфекції [3, 4]. С-РБ приймає участь у процесі активації комплементу, яка починається при появі різних антигенів, пов'язаних із запальним процесом в організмі внаслідок інфекційних, травматичних, паразитарних і імунологічних чинників) [5]. Основа функція С-РБ полягає у регуляції запалення. У медичній практиці показники СРБ використовують для контролю вірусних інфекцій, в'яло протікаючих запальних процесів, деяких ревматичних захворювань, а також для диференціації вірусних інфекцій від бактеріальних, де під час вірусних інфекцій С-РБ не перевищує 10-30 мг/л, а при бактеріальних – рівень С-РБ підвищується до 40-100 мг/л. Існують повідомлення, що при гострому панкреатиті у собак спостерігають значне підвищення С-РБ, включно із експериментально індукованим панкреатитом [6, 7, 8]. При ефективній антибактеріальній терапії С-РБ повинен знижуватись протягом 3-4 днів. При генералізованих інфекціях, сепсисі – С-РБ підвищується до 300 мг/л. У медицині застосовують високочутливі тести на СРБ, які дають змогу враховувати значення С-РБ до 0,5 мг/л, а також тести на основі латекс-аглоїнації, які визначають С-РБ на рівні не вище 6 мг/л.

Існують повідомлення, що внаслідок того, що концентрація С-РБ підвищується через 4-6 годин після запалення або ушкодження тканин, концентрація останнього може служити важливим показником для моніторингу динаміки запального процесу. Р. D. Eckersall (2000) вказує, що кількісний аналіз концентрації БГФЗ у плазмі або сировотці крові може давати цінну інформацію для діагностики, прогнозу та контролю хвороби. Одночасно (Parr MD., 2005) виявив позитивну кореляцію між СРБ, що містився у сировотці крові та слині собак [9]. Концентрація С-РБ у крові корелює із важкістю захворювання та його стадією і служить для моніторингу розвитку хвороби та ефективності терапії, проте не дає змоги диференціювати хвороби кишківника [10].

Мета роботи: дослідити показники С-РБ для визначення ефективності комплексної схеми інтенсивної терапії собак за парвовірусної інфекції у собак.

Матеріали та методи. Матеріалом для досліджень слугувала сироватка крові собак двох дослідних і контрольної груп. Для визначення С-РБ використали медичний комерційний набір «Humatec CRP», за допомогою якого можна отримати достовірний результат при визначенні С-РБ у собак [11].

Кров від тварин відбирали до лікування та через 3 і 4 доби лікування.

Результати та обговорення

Схемою лікування передбачено комплексне застосування засобів етіотропної та патогенетичної терапії.

В якості етіотропної терапії ми застосовували полівалентну сироватку крові «Гіскан-5 – сироватка полівалентна проти чуми м'ясоїдних, парво-вірусного, коронавірусного ентеритів і аденовірусних інфекцій собак», ви-робництва «Ветбіохім», РФ згідно листівки-вкладки (РП № ВА-00158-02-09/1).

Перорально призначали адсорбент - ентеросгель 60,0 г х 3 рази на день, перорально та в якості адаптогена екстракт родіоли рожевої (золотого кореня) *Rhodiola rosea L.*, 0,01 г х 1 раз день перорально.

Знаючи, що ПВС викликає у цуценят ураження серця та печінки нами було обрано як лікувальний засіб тіопротектин, діючою речовиною, якого є тіатриазолін, оскільки за даними різних авторів, його застосування має великий ефект, у дозі по 2 мл 2,5 % розчину один раз на день внутрішньом'язово.

З метою попередження ускладнень викликаних умовно-патогенною мікрофлорою, ми обрали для лікування β-лактамний антибіотик широкого спектру дії – цефазолін, який пригнічує синтез мікробної стінки як грам позитивних так і грам негативних бактерій у дозі 1,0 г х 2 рази на день внутрішньом'язово.

Для відновлення водно-електролітного балансу ми застосовували регідратаційний розчин Рінгера-лактат та 10 % розчин аскорбінової кислоти. Розчин Рінгер-лактат вводили внутрішньовенно із розрахунку 60 мл/кг маси тіла один раз на добу. Розчин аскорбінової кислоти - 0,6 г х 2 рази день, підшкірно.

З метою зупинки постійного блювання та спазмів кишківника ми застосовували церукал та спазмолітин «но-шпа». Церукал вводили із розрахунку (0,5-0,7) мг на 10 кг маси тіла двічі на день внутрішньом'язово. Но-шпу застосовували у вигляді розчину 0,009г х 2 рази на день, внутрішньом'язово.

Для покращення обміну речовин та стимуляції гемопоєзу ми застосовували катозал внутрішньовенно по 3 мл один раз на добу.

Встановлено, що фізіологічні рівні С-РБ у сировотці крові клінічно здорових собак, віком 1-2 роки, за нормальних умов утримання - суттєво не змінювались і перебували у межах від 0,8 до 22,6 мг/мл (середнє 3,65 ± 1,40).

Результати дослідження наведені у таблиці один та схематично зображені на рисунку 1.

Показники С-реактивного білка (С-РБ) у крові собак за гастроентериту парвовірусної етіології

Кличка собаки	Вік, місяців	Рівні С-РБ у сироватці крові хворих собак		
		До лікування мг/л	3 день лікування мг/л	4 день лікування мг/л
Іртиш	6	48,0	48,0	24,0
Дельфін	12	48,0	48,0	24,0
Зіко	6,5	24,0	24,0	12,0
Амур	6	48,0	48,0	24,0
Лорд	6	24,0	24,0	12,0
Білі	6	48,0	24,0	24,0
Боня	6	96,0	48,0	24,0
Мося	6	96,0	96,0	48,0
Дік	10	24,0	24,0	12,0
Арчі	6	48,0	48,0	24,0

Динаміка С-РБ за парвовірусного ентериту у собак (мг/мл)

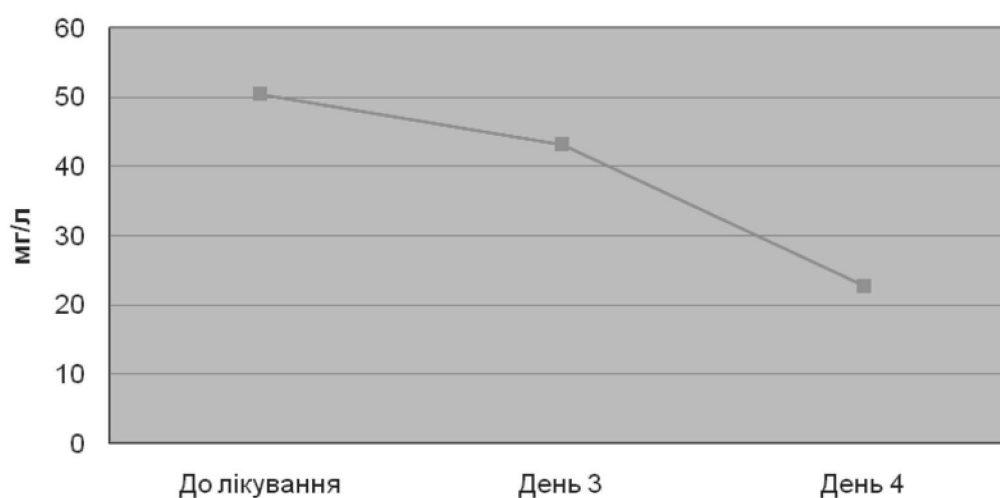


Рис. 1. Динаміка вмісту С-РБ у сироватці крові собак

Нашими дослідженнями встановлено, що у групі собак, яким застосовували описану у роботі схему інтенсивної терапії за парвовірусного ентериту, рівень С-РБ мав тенденцію до зниження не зважаючи на важкість перебігу захворювання. Верхня межа показників у 2-х тварин віком протягом курсу лікування може свідчити про хронічний перебіг захворювань опорно рухового апарату, що підтверджено анамнестичними даними і клінічним оглядом, або про втягнення у процес підшлункової залози, що було підтверджено ультразвуковим дослідженням. Нажаль, на даний час, відсутні єдині критерії рівня С-РБ, які можна було б використовувати для визначення панкреатиту у собак, в тому числі і при парвовірусному ентериті. Існують дані, що С-РБ здатний зв'язувати широкий спектр лігандів-компонентів мікроорганізмів, токсинів, частинок ушкоджених тканин, перешкоджаючи їх розповсюдженню. Крім цього, продукти такої взаємодії активують комплемент, стимулюючи процеси фагоцитозу та елімінації шкідливих продуктів. С-РБ з Т-лімфоцитами, фагоцитами і тромбоцитами, регулюючи їх функції в умовах запалення.

Визначені нами показники С-РБ дають змогу припускати про існування слабкої кореляції між концентрацією С-РБ та кількістю лейкоцитів у крові, а також про відсутність кореляції між С-РБ та рівнем білка у сироватці крові дослідних груп.

Висновки та перспективи подальших досліджень

1. Показники С-РБ за парвовірусного ентериту були нижчі перед початком лікування від аналогічних показників неінфекційної етіології, за винятком двох собак із останньої дослідної групи, де у патологічний процес була втягнена підшлункова залоза і відмічали хронічні проблеми опорно-рухового апарату.

2. С-РБ може бути корисним діагностичним знаряддям за парвовірусного ентериту і контролем ефективності інтенсивної терапії протягом перших чотирьох днів лікування цієї хвороби.

3. Швидке зниження показників С-РБ у групі собак за гострого гастроентериту парвовірусної етіології можна пояснити зменшенням запалення внаслідок дії розчину ентеросгелю та цефтріаксону на патологічну мікрофлору ПШКТ і виведення токсинів.

4. Використання 10 % розчину аскорбінової кислоти та адаптогенів під час інтенсивної терапії гострого гастроентериту парвовірусної та неінфекційної етіології могло додатково сприяти зниженню С-РБ у крові собак.

5. Під час використання С-РБ для контролю ефективності інтенсивних терапевтичних заходів при гострих гастроентеритах, необхідно зважати й супутні хронічні або гострі запальні стани інфекційної і неінфекційної етіології, включаючи період після хірургічного втручання, травми, які можуть завищувати показники С-РБ у ході терапії.

6. Низька собівартість і простота виконання тесту на визначення С-РБ відкриває можливості широкого застосування останнього у діагностиці і моніторингу ефективності лікування у ветеринарній медицині.

7. Для успішного лікування собак за парвовірусної інфекції перспективним є якомога більше вивчати патогенез та одужання при цій хворобі на біохімічному рівні.

Список використаної літератури:

1. Eckersall PD (2000) Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Rev. Med. Vet.* 151: 577-584.
2. Ceron JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol.* 2005 Jun;34(2):85-99
3. Hurter K, Spreng D, Rytz U, Schawalder P, Ott-Knüseler F, Schmökel H. Measurements of C-reactive protein in serum and lactate dehydrogenase in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Vet J.* 2005 Mar;169(2):281-5.
4. Martínez-Subiela S, Tekles F, Eckersall PD, Ceron JJ. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec* 2002; 150 (8), 241-244.
5. Yamamoto S, Shida T, Miyaji S, Santsuka H, Fujise H, Mukawa K, Furukawa E, Nagae T, Naiki M. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Vet Res Commun.* 1993;17(2):85-93
6. Liu Q, Djuricin G, Nathan C, et al. The effect of interleukin-6 on bacterial translocation in acute canine pancreatitis. *Int J Pancreatol* 2000; **27** (2): 157-165.
7. Dervenis C, Johnson CD, Bassi C, et al. Consensus document: diagnosis, objective assessment of severity, and management of acute pancreatitis: Santorini Consensus Conference. *Int J Pancreatol* 1999; **25**: 195-210.
8. Shimada T, Ishida Y, Shimizu M, et al. Monitoring C-reactive protein in Beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. *Vet Res Commun* 2002; **26**: 171-177.
9. Parra MD, Tecles F, Martínez-Subiela S, Cerón JJ. C-reactive protein measurement in canine saliva. *J Vet Diagn Invest.* 2005 Mar;17(2): 139-44.
10. Gaschen F. Chronic diarrhea in dogs – diagnostic approach. Proceedings 2006 World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA – Prague 2006. p.339 ISBN 978-80-902595-4-6
11. Kjelgaard-Hansen M, Jensen AL, Kristensen AT. Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Vet Clin Pathol.* 2003;32(2):81-7

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СОБАК ПО ДИНАМИКЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА / Дидух А. В.

В статье описана схема интенсивного лечения по парвовирусной инфекции, которая сочетает комплексное применение средств этиотропной и патогенетической терапии, а также представлены результаты исследования ее эффективности по показателю С-реактивного белка в сыворотке крови собак.

Ключевые слова: эффективность терапии, панкреатит, парвовирусная инфекция, собаки, С-реактивный белок

EVALUATION OF INTENSIVE CARE FOR DOGS FOR PARVOVIRUS INFECTION BY DYNAMICS OF INDICATORS OF C-REACTIVE PROTEIN/ Didukh A.V.

The paper describes a scheme of intensive treatment for parvovirus infection, which combines integrated application tools causal and pathogenetic therapy, as well as provides results of a study of its effectiveness in terms of C-reactive protein in the blood serum of dogs.

Keywords: effectiveness of therapy, pancreatitis, parvovirus infection, dogs, C-reactive protein

Рецензент – кандидат ветеринарных наук **О. С. Войта**.

Рукопись надійшов 16.09.2014 року.

Ж. М. ДРОЖЖЕ

Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

ВАЛІДАЦІЯ ТЕСТ-СИСТЕМИ *BIO PRO RABIES ELISA AB KIT*

У статті подано результати валідації тест-системи для визначення поствакцинальних антитіл до вірусу сказу методом ІФА *Bio Pro Rabies ELISA Ab Kit*

Ключові слова: тест-система, поствакцинальні антитіла, антирабічна вакцинація, ELISA

Надзвичайно велика небезпека і відсутність засобів лікування при сказі визначають особливе місце цього захворювання серед заразних хвороб.

В Україні, починаючи з 1994 року, кількість випадків захворювання на сказ щороку збільшувалася. Особливо напружена і небезпечна ситуація склалася у 2007 році, коли було зареєстровано 2929 випадків сказу, що є найбільшим за останні 50 років. Сказ реєструється у широкого й різноманітного кола тварин, в ланцюг циркуляції вірусу втягнуті не тільки дикі та домашні м'ясоїди, а й сільськогосподарські тварини. Проте головним джерелом збудника сказу залишається лисиця.

Складна епізоотична ситуація щодо сказу в Україні вимагає радикальних заходів, серед яких є пероральна імунізація диких м'ясоїдних, ефективність якої доведена як в експериментальних, так і в польових умовах.

Вперше на початку 70-х років можливість пероральної імунізації лисиць за допомогою атенуованих вакцин показали *Baer* (1971) [1], *Debbie* із співавторами (1972) [2] із Центру по боротьбі і профілактиці хвороб тварин в Атланти – США. В наступний період в цьому напрямку проводилися інтенсивні експериментальні дослідження в США, Канаді, Франції, Німеччині, Швейцарії.

У 1978 році Швейцарія стала першою країною, що розпочала пероральну вакцинацію лисиць в Європі. Вже в 80-ті роки минулого століття таким шляхом слідом за Швейцарією пішла більшість країн Західної Європи, а в 90-ті роки – східноєвропейські країни. Пероральна імунізація стала найважливішим заходом в програмах з ерадикації сказу серед диких тварин [1, 2].

Останні кілька років в Україні щорічно проводяться планові пероральні антирабічні вакцинації диких м'ясоїдних тварин в ряді областей: Сумська, Харківська, Донецька, Полтавська, Луганська, Дніпропетровська області [3, 4].

З метою захисту території Євросоюзу та для створення 70-кілометрової буферної зони з 2012 року кампанії оральної імунізації проводяться ще в 3-х областях, що межують з Республікою Польща: Волинській, Львівській, Закарпатській. Загальна площа обробки складає 26400 км².

Одним із головних елементів оцінки ефективності проведення кампаній пероральної імунізації диких м'ясоїдних та антирабічних щеплень домашніх м'ясоїдних є виявлення та визначення титру антирабічних антитіл [4, 5].

Міжнародними стандартами для визначення рівня антирабічних антитіл у сироватці крові диких м'ясоїдних рекомендований метод ELISA. Він є оптимальним для проведення масових досліджень сироваток крові м'ясоїдних на наявність антитіл до вірусу сказу завдяки його стандартності, швидкості, легкості постановки [5, 6].

З початку 2000-х років широко використовуються кілька комерційних тест-систем для визначення рівня антирабічних антитіл різних виробників: *Symbiotics* (Франція), *Bio-Rad* (США-Франція) та *Bio Pro* (Чехія), які характеризуються високою специфічністю та чутливістю. Для валідації цих тест-систем референс-лабораторія ЄС та МЄБ зі сказу *ANSES* (м. Нансі, Франція) в 2008 та 2012 рр. проводила кругові порівняльні міжлабораторні професійні тестування [7, 8].

З 2007 року в Україні для виявлення та визначення рівня антирабічних поствакцинальних антитіл у сироватках крові диких м'ясоїдів використовуються зареєстровані тест-системи ELISA *Platelia Rabies II* виробництва *Bio-Rad*.

У Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи була проведена валідація тест-системи *Platelia Rabies Kit II*. В якості референтного методу використовували реакцію нейтралізації в культурі клітин – *FAVN* (fluorescent antibody virus neutralisation), що рекомендована ВООЗ та МЄБ [9].

Мета дослідження: валідація тест-системи *Bio Pro Rabies ELISA Ab Kit* для визначення поствакцинальних антитіл до вірусу сказу з тест-системою *Platelia Rabies Kit II* виробництва *Bio-Rad*.

Матеріали та методи: 178 сироваток крові м'ясоїдних тварин: стандартні позитивні собачі сироватки з титрами 4 та 0,5 МО/мл, стандартна негативна собача сироватка, надіслані в ДНДЛДВСЕ зразки сироваток крові для визначення поствакцинальних антирабічних антитіл від 108 лисиць та 57 собак. Тест-системи *Platelia Rabies Kit II* виробництва *Bio-Rad* та *Rabies ELISA Ab Kit* виробництва *Bio Pro*. Обладнання для проведення імуноферментного аналізу. Постановку ІФА проводили непрямим та блокуючим методами згідно з рекомендаціями виробників тест-систем.

Результати досліджень.

Перед початком проведення інструментальних досліджень нами були порівняні загальні показники тест-систем, а саме: терміни проведення дослідження, максимальна кількість проведення досліджень однією тест-системою, принцип детекції антитіл, придатність для дослідження різних зразків матеріалу, вираження результатів дослідження та граничні значення дослідження, чутливість та специфічність тест-систем.

Порівняльна характеристика основних параметрів вищезгаданих тест-систем різних виробників наведена в таблиці 1.

Основні характеристики тест-систем *Platelia Rabies Kit II* та *Bio Pro Rabies ELISA Ab Kit* для дослідження антирабічних антитіл

№ п/п	Показник	Назва тест-системи	
		<i>Platelia Rabies Kit II</i>	<i>Bio Pro Rabies ELISA Ab Kit</i>
1	Час проведення дослідження, годин	4	22-28
2	Максимальна кількість досліджень однією тест-системою	160	178
3	Принцип детекції антитіл в ІФА	Непрямий ІФА	Блокуючий ІФА
4	Матеріал для досліджень	Сироватка, плазма крові	Сироватка, плазма крові, цільна кров або згустки (додаткова підготовка зразків)
5	Вираження результату дослідження зразку	Кількісний	Якісний
6	Мінімальний титр антитіл, який здатна виявити тест-система	0,125 МО/см ³	-
7	Чутливість тест-системи (за даними виробника), %	92-98	≥ 95
8	Специфічність (за даними виробника), %	89-97	100

На другому етапі було проведено паралельні порівняльні дослідження сироваток крові від собак та лисиць методом ELISA двома різними тест-системами (табл. 2). За результатами досліджень з використанням тест-системи *Platelia Rabies Kit II* отримано 81 позитивний результат з титром, що дорівнює або вище 0,5 МО/см³ і 97 негативних результатів. Дослідженням проведеним тест-системою *Bio Pro Rabies ELISA Ab Kit* встановлено 77 позитивних та 101 негативний результат (табл.2).

Діагностичну чутливість та специфічність тест-системи *Bio Pro Rabies ELISA Ab Kit* визначали за формулами:

$$\text{Діагностична чутливість} = \frac{III}{III + XH} \cdot 100\% \quad (1)$$

$$\text{Діагностична специфічність} = \frac{IH}{IH + XI} \cdot 100\% \quad (2), \text{ де}$$

III – істинно позитивні результати;

IH – істинно негативні результати;

XH – хибно негативні результати;

XI – хибно позитивні результати

Таблиця 2

Результати дослідження сироваток крові тварин методами ELISA тест системами різних виробників

Назва тест-системи	Титр антитіл	
	≥ 0,5 МО/см ³	негативно
Bio Rad <i>Platelia Rabies Kit II</i>	81	-
Bio Pro <i>Rabies ELISA Ab Kit</i>	77	4

Діагностична специфічність тест-системи *Bio Pro Rabies ELISA Ab Kit* порівняно з тест-системою *Bio Rad Platelia Rabies Kit II* становить 100 %.

Діагностична чутливість тест-системи *Bio Pro Rabies ELISA Ab Kit* порівняно з тест-системою *Bio Rad Platelia Rabies Kit II* становить 95 %.

Висновки:

1. Тест-система *Bio Pro Rabies ELISA Ab Kit* придатна для досліджень не тільки сироваток та плазми крові тварин, але і цільної крові та згустків, що потребує додаткових реагентів та часу для підготовки зразків для дослідження.

2. Визначено високий рівень діагностичної чутливості та специфічності тест-системи порівняно з тест-системою *Platelia Rabies Kit II*, що склали 100 % та 95 % відповідно.

3. Тест-система *Bio Pro Rabies ELISA Ab Kit* дає можливість проведення на 10 % більше досліджень, проте це займає набагато більший термін часу для дослідження.

Список використаної літератури

1. Cliquet F. Elimination of Terrestrial Rabies in Western European Countries / F. Cliquet M. Aubert // Dev Biol (Basel). – 2004. – Vol. 119. – P. 185–204.
2. The oral vaccination of foxes against rabies / Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, European Commission. – 2002. – 55 p.
3. Романенко О. А. Оцінка ефективності пероральної вакцинації проти сказу диких м'ясоїдних в Україні / О. А. Романенко, Ж. М. Дрожже // Ветеринарна біотехнологія. – 2008. – № 1. – С. 346–352.
4. Троценко З. Р. Пероральна вакцинація диких тварин проти сказу в Україні: аналіз даних серологічного контролю імунологічного стану лисиць /З. Р. Троценко, Ж. М. Дрожже// Ветеринарна медицина: міжвідомчий тематичний науковий збірник. – 2008. – Вип.89. – С.369–374.
5. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines [Електронний ресурс]. – 2012. – Режим доступу: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.13_RABIES.pdf (25.07.2013). – Rabies.
6. Servat A. A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores /A. Servat, M. Feysaguet, J. L.Morize, J. L.Schreffler, F. Boue, F. Cliquet //J. Immun Methods. –2007. – No. 318. – P.1-10.

7. Wasniewski M. Evaluation of ELISA for detection of rabies antibodies in domestic carnivores / M.Wasniewski, F.Cliquet // J Virol Methods. –2012. – No. 179(1). – P. 166-175.

8. Wasniewski M. Evaluation of an ELISA to detect rabies antibodies in orally vaccinated foxes and raccoon dogs sampled in the field / M.Wasniewski, AL. Guiot, JL. Schereffer, L. Tribout, K. Mähar, F. Cliquet // J Virol Methods. – 2013. – No. 187(2). – P.264-270.

9. Дрожже Ж. М. Валідація методу ELISA для визначення віруснейтралізуючих антитіл до вірусу сказу / Ж. М. Дрожже// Ветеринарна медицина: міжвідомчий тематичний науковий збірник. – 2011. – Вип.95. – С.150 – 152.

ВАЛИЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ BIO PRO RABIES ELISA AB KIT / Дрожже Ж. Н.

В статье представлены результаты валидации тест-системы для определения поствакцинальных антител к вирусу бешенства методом ИФА

Ключевые слова: тест-система, поствакцинальные антитела, антирабическая вакцинация, ELISA

VALIDATION OF BIO PRO RABIES ELISA AB KIT TEST SYST/ Zh. Drozhzhe

Introduction.Sophisticated epizootic situation of rabies in Ukraine requires radical measures, which include oral immunization of wild carnivores, whose effectiveness is proved in the experimental and in the field.

One of the key elements for evaluating the effectiveness of oral immunization campaigns wild carnivores and rabies vaccination of domestic carnivores is to identify and determine the titer of rabies antibodies.

Since 2007 Ukraine to identify and determine the level of post-rabies antibodies in the blood serum of wild meat eaters registered used test kits ELISA Platelia Rabies II production of Bio-Rad.

We have conducted validation test system Platelia Rabies Kit II using 178 blood serum carnivores.

Methods of research.Originally were compared overall performance test systems, namely, the timing of the study, the maximum number of research one test system, the principle of detection of antibodies to study the suitability of different samples of material expression of the survey results and thresholds study, the sensitivity and specificity of the test systems.

The second phase was conducted parallel comparative study of blood serum from dogs and foxes by ELISA in two different test systems. Based on the results of studies using test kits Platelia Rabies Kit II received 81 positive with a titer equal to or higher than 0.5 IU / cm³ and 97 negative results. The study was conducted test system Bio Pro Rabies ELISA Ab Kit installed 77 positive and 101 negative

Results.In Results, the test system Bio Pro Rabies ELISA Ab Kit is suitable for the production of Czech research not only serum and plasma of animals but also of whole blood and clots that require additional reagents and time to prepare samples for research.

In addition defined high diagnostic sensitivity and specificity of the test system in comparison with the test system Platelia Rabies Kit II, which was 100% and 95% respectively.

Keywords: test system, post-vaccination antibody, rabies vaccination, ELISA

Рецензент – кандидат ветеринарних наук Романенко О.А.

Рукопис надійшов 21.07.2014 року.