

УДК 636:616.98:578.824.11:616-036.22

**НИЧИК С.А.**, д-р вет. наук, e-mail: vet@ivm.kiev.ua,

**ПОЛУПАН І.М.**, канд. вет. наук, e-mail: vetmedic@ukr.net,

**МАЗУР Н.В.\***, e-mail: nata\_chalapchii@mail.ru,

**ХОМЕНКО Я.В.**, e-mail: yaroslavh@ukr.net

*Інститут ветеринарної медицини НААН*

**СПИРИДОНОВ В.Г.**, д-р с.-г. наук, e-mail: spyrydonov@ukr.net

*Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК*

## **ЧУТЛИВІСТЬ ТА СПЕЦИФІЧНІСТЬ АНТИРАБІЧНИХ ГЛОБУЛІНІВ, ОТРИМАНИХ НА ОСНОВІ Ig Y З ПЕРЕПЕЛИНИХ ЯЄЦЬ**

*У статті представлені матеріали щодо дослідження чутливості і специфічності антирабічних глобулінів, отриманих на основі Ig Y з перепелиних яєць. Показано, що антирабічний Ig Y з яєць перепелів, імунізованих антигеном вірусу сказу, штаму CVS-11, володіє високою віруснейтралізуючою активністю. Продемонстровано принципову можливість отримання антирабічних Ig Y з яєць перепелів і використання їх для розробки засобів лабораторної діагностики сказу.*

**Ключові слова:** сказ, штаму, антирабічні глобуліни, Ig Y, МФА, ФІТЦ.

**Вступ.** Сказ (гідрофобія) – захворювання, збудником якого є нейротропний вірус родини *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus*. Збудник патогенний для всіх видів теплокровних тварин і людини, а в разі прояву клінічних ознак хвороба закінчується летально.

На даний час діагностика сказу тварин проводиться на основі комплексу епізоотологічних, клінічних, патологоанатомічних і лабораторних досліджень. Але, враховуючи небезпечність хвороби, постановка остаточного діагнозу здійснюється тільки за результатами лабораторних досліджень [1, 2].

Не зважаючи на значні успіхи в багатьох галузях народного господарства, медицині й біотехнології, побороти сказ на сьогодні не вдається. Залишається багато невизначених питань, одне з яких – це лабораторна діагностика сказу в реакції прямої імунофлуоресценції (РПФ), в основі якої використано метод флуоресціюючих антитіл (МФА). Цей метод визнано ВООЗ як «золотий стандарт» в діагностиці сказу [3–5].

Реакція прямої імунофлуоресценції базується на мікроскопічному дослідженні під люмінесцентним мікроскопом мазків-відбитків мозкової тканини після інкубації з антирабічним поліклональним глобуліном або моноклональними антитілами, які кон'юговані з флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ). Запорукою достовірності встановленого діагнозу на сказ за допомогою МФА є високоактивний і специфічний антирабічний флуоресціюючий імуноглобулін, який концентрують з гіперімунних сироваток крові,

---

\* Аспірант, науковий керівник – канд. вет. наук **І.М. Полупан**

продуцентами яких можуть бути різні види тварин (морські свинки, білі миші, вівці, кролі, сирійські хом'яки, коні, віслюки, велика рогата худоба) [6–8].

На нашу думку, досягнути прогресу в цих питаннях можна при радикальній зміні підходу в отриманні специфічних антирабічних глобулінів.

Перспективним методом отримання специфічного імуноглобуліну є використання Ig Y, виділеного з яєць птахів, оскільки Ig Y є домінуючим класом антитіл у сироватці крові, який продукується після Ig M за первинної гуморальної відповіді, і є головним ізотипом за вторинної імунної відповіді, що визначає його функціональну схожість з Ig G ссавців.

З Ig Y курячих яєць розроблені препарати для профілактики кишкового колібактеріозу, карієсу зубів і ротавірусної інфекції у людей [9, 10]. Суттєвою перевагою Ig Y порівняно з отриманням антитіл від ссавців є те, що постійна фізіологічна продукція яєць забезпечує потокове отримання імуноглобуліну без травмування при взятті крові або ж тотального обезкровлення тварин-продуцентів [11].

**Мета роботи.** Дослідження чутливості та специфічності антирабічного флуоресціюючого імуноглобуліну (Ig Y), виділеного з перепелиних яєць.

**Матеріали і методи досліджень.** Для імунізації використовували по дві 6 місячні перепілки породи фараон та манжурська, вагою по 300 г кожна, яких утримували в лабораторних умовах віварію IBM НААН. Корм та вода були доступні *ad libitum*.

**Імунізація перепілки антигеном вірусу сказу.** Для виготовлення препарату для імунізації перепілки використовували наступні антигени вірусу сказу:

Зразок 1 – штам G 52 Wistar (вакцина IndiRab, Bharat Biotech International Limited, Індія);

Зразок 2 – штам CVS-11 (отриманий у лабораторних умовах, титр вірусу  $6,23 \pm 0,11$  ТКІД<sub>50</sub>/0,05 см<sup>3</sup>).

Для першої імунізації відбирали препарати по 0,5 см<sup>3</sup>, додавали рівний об'єм повного ад'юванту Фрейнда (Thermo). Ретельно перемішували до утворення однорідної емульсії білого кольору. Препарати антигену вводили внутрішньом'язово, в грудну частину в декілька точок.

На 10 і 20 день імунізацію повторювали, антигени готували аналогічно, як і при першій імунізації, але з додаванням неповного ад'юванту Фрейнда.

З метою визначення титру імуноглобулінів, специфічних до вірусу сказу, в перепілок відбирали яйця з 45 доби після початку першої імунізації, виділяли жовткові антитіла та перевіряли у непрямому ІФА.

**Виділення специфічних на сказ Ig Y з перепелиних яєць.** З метою отримання перепелиних Ig Y обережно відділяли жовток від білку. Жовток розводили дистильованою водою у співвідношенні 1:7 та доводили значення рН до 5,0. Отриману емульсію ретельно перемішували та заморожували за температури мінус 20°C протягом ночі. Наступного дня жовтково-водну емульсію розморозували і фільтрували через паперовий фільтр. Додавали хлористий натрій до кінцевої концентрації 9,0%, після чого доводили рН до 4,0

та залишали на 2 години для преципітації Ig Y. Після чого суміш центрифугували при 3700 g протягом 20 хвилин. Осад глобулінів розчиняли у мінімальній кількості фосфатно-сольового буферу [12, 13].

**Перевірка виділених антирабічних Ig Y в ІФА.** Специфічні до вірусу сказу Ig Y перепелиних яєць перевіряли у непрямому варіанті ІФА. З цією метою лунки планшету сенсibiliзували антигенами вірусу сказу, які використовували для імунізації. Зразок 1 (G 52 Wistar) і зразок 2 (CVS-11) розводили 1:50 карбонатно-бікарбонатним буфером (pH 9,6). Крім цього, як контроль використовували рекомбінантний антиген вірусу сказу – химерний білок G:N, який складається з двох нейтралізуючих пептидних епітопів вірусу сказу, в концентрації 10 мкг/см<sup>3</sup>.

Жовткові антитіла розводили до концентрації 50 мкг/см<sup>3</sup> на фосфатно-сольовому буфері, що містив 0,5% казеїну і 2,5 М сечовини. Реципрокно вносили по 0,1 см<sup>3</sup> в сенсibiliзовані лунки планшету. Як негативний контроль використовували жовткові антитіла, специфічні щодо інших антигенів DS1802, в аналогічній концентрації. Інкубували планшет за температури 37°C протягом 60 хвилин. По закінченню інкубації видаляли вміст лунок та промивали чотири рази розчином для промивання планшету по 0,35 см<sup>3</sup>. Як кон'югат використовували препарат козячих антитіл проти курячих Ig G (Goat anti chicken Fc:HRP (AbD Serotec), мічених пероксидазою хрому, в робочому розведенні, який вносили по 0,1 см<sup>3</sup> в лунки планшету та інкубували за температури 37±0,5°C 30 хвилин. Після чого видаляли вміст лунок і промивали шість разів розчином для промивання планшету по 0,35 см<sup>3</sup>.

Вносили в лунки планшету по 0,1 см<sup>3</sup> розчину хромогену (ТМБ) та інкубували планшет при 18–25°C в темному місці протягом 20 хвилин. Зупиняли кольорову реакцію внесенням у всі лунки по 0,05 см<sup>3</sup> розчину стоп-реагенту. Визначали оптичну густину (ОГ) розчину в лунках з використанням спектрофотометру для планшетів Humareader Plus (Human, Німеччина) при довжині хвилі світла 450/620 нм.

**Перевірка антирабічних Ig Y в реакції нейтралізації.** Дослідження віруснейтралізуючої активності концентрованих Ig Y проводили в реакції нейтралізації (РН) на безпородних білих мишах. Для цього до імуноглобулінів у різних розведеннях (від 1:200 до 1:1600) додавали робоче розведення вірусу сказу референс-штаму CVS (100 МЛД<sub>50</sub>/0,03 см<sup>3</sup>). Інкубацію для формування комплексів антиген–антитіло проводили в термостаті при 37±0,5°C упродовж 90 хвилин. Отриманий матеріал інокулювали лабораторним тваринам інтрацеребрально (і/ц) в дозі 0,03 см<sup>3</sup> і спостерігали за ними протягом 14 діб. Специфічну загибель відмічали, починаючи з 5-ої доби досліду. Статистичну обробку результатів проводили за формулою Spearman-Kärber. В якості стандарту імуноглобуліну використано The 2<sup>nd</sup> International Standard for anti-Rabies immunoglobulin human (30,0 МО/см<sup>3</sup>). Результати реакції виражали в міжнародних одиницях – МО/см<sup>3</sup>.

**Отримання, перевірка активності та специфічності ФІТЦ-глобулінів.** Діагностичні флуоресціюючі препарати готували відповідно

стандартній методиці із застосуванням флуоресцеїнізотіоціонату виробництва Sigma (США) [6].

Дослідження чутливості та специфічності дослідних зразків флуоресціюючого імуноглобуліну проводили в реакції прямої імунофлуоресценції (РПФ), паралельно визначали робоче розведення кон'югатів (1:2, 1:4, 1:8, 1:16). Для цього на попередньо підготовлених предметних скельцях робили мазки-відбитки патологічного матеріалу. Як позитивний контроль використовували мозок білої лабораторної миші, попередньо зараженої вірусом сказу (CVS), як негативний – мозок здорової безпородної білої миші, раніше не вакцинованої проти сказу. Як контроль застосовували флуоресціюючий антирабічний глобулін – ФАГ (м. Казань, Республіка Татарстан).

Зразки фіксували над полум'ям спиртівки, плавно провівши скельце над полум'ям декілька разів з обох сторін. На зафіксовані зразки наносили по 2–3 краплі контрольного глобуліну (робоче розведення 1:16) і дослідних в усіх розведеннях.

Інкубацію проводили у вологій камері в термостаті за температури  $37\pm 0,5^\circ\text{C}$  упродовж 30 хв. Для відмивання зразків від незв'язаного ФІПЦ готували 0,01 М фосфатно-буферний розчин (рН 7,2–7,4) та відмивали зразки тричі по 10 хв. Відмиті зразки поміщали в термостат до повного висихання.

Люмінесцентну мікроскопію проводили за допомогою мікроскопу ZEISS Ахіо Lab.A1 за збільшення 10–40 та 100 під імерсійною системою.

Облік результатів проводили в хрестах за оцінкою інтенсивності світіння:

++++ – яскраве жовто-зелене світіння;

+++ – чітко виражене, досить яскраве жовто-зелене світіння;

++ – неяскраве світіння жовто-зеленого кольору;

+ – слабе світіння, яке виявляється в крупних включеннях зелено-сірого кольору.

Пробу вважали позитивною, якщо в декількох полях зору мікроскопу виявляли типові гранули з інтенсивністю світіння 3–4 хрести.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Після проведення виділення та концентрування IgY були отримані два зразки імуноглобулінів зразок 1 (G 52 Wistar) з концентрацією  $30,0 \text{ мг/см}^3$  та зразок 2 (CVS-11) з концентрацією  $19,5 \text{ мг/см}^3$ .

Специфічність виділених антитіл перевіряли у непрямому варіанті ІФА, використовуючи відповідні антигени для сенсibiliзації планшет (табл. 1). Простежується позитивна кореляція між антигеном, який використовували для імунізації, та рівнем антитіл, що свідчить про специфічність отриманих антирабічних антитіл. При цьому встановлено збільшення титру антитіл при використанні як антигену вірусу сказу штаму CVS-11. Крім того, саме антитіла проти лабораторного штаму CVS-11 реагували також із рекомбінантним химерним пептидом вірусу сказу, що містить віруснейтралізуючі епітопи протеїнів G та N вірусу сказу.

При дослідженні в РН на мишах віруснейтралізуючої активності концентрованих (Ig Y G 52 Wistar 30 мг/см<sup>3</sup> і Ig Y CVS-11 19,5 мг/см<sup>3</sup>) дослідних зразків антирабічних Ig Y отримано аналогічні результати. Так, зразок 1 володів специфічною активністю на рівні 26,25 МО/см<sup>3</sup>, а зразок 2 – 81,25 МО/см<sup>3</sup> порівняно зі стандартом імуноглобуліну.

Таблиця 1

**Специфічна активність антирабічних Ig Y в ІФА**

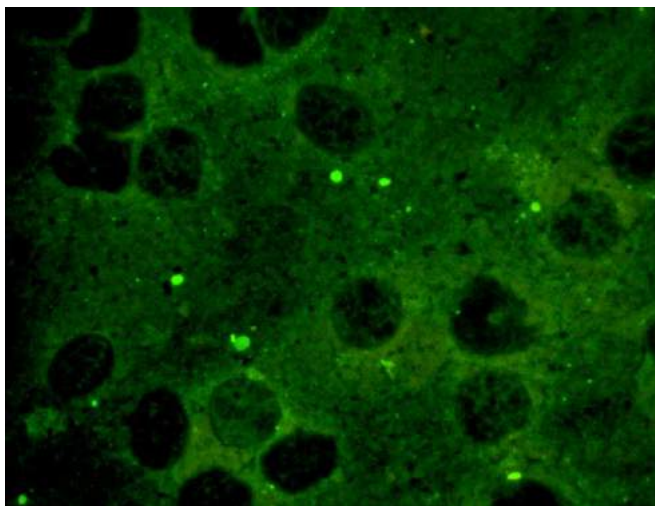
№ з/п	Жовткові антитіла, IgY	Антигени		
		G 52 Wistar	CVS-11	G:N
1	IgY G 52 Wistar (30,0 ОГ)	0,226	1,012	0,037
2	Ig Y CVS-11 (19,5 ОГ)	0,158	1,541	0,337
3	Ig Y DS1802	0,014	0,145	0,035

Наступним етапом досліджень було встановлення можливості використання антирабічних Ig Y у діагностиці сказу тварин. Для цього дослідні зразки антирабічного Ig Y після мічення ФІТЦ і очистки досліджували в РПФ. У фарбованих препаратах мозкова тканина світилася тусклим, сірувато-жовтим чи зеленуватим кольором. Антиген вірусу сказу виявляли в нейронах і за межами клітин у вигляді яскравих зелених гранул різної форми (округлої, овальної) і величини – від ледь помітних до 15–20 мкм в діаметрі.

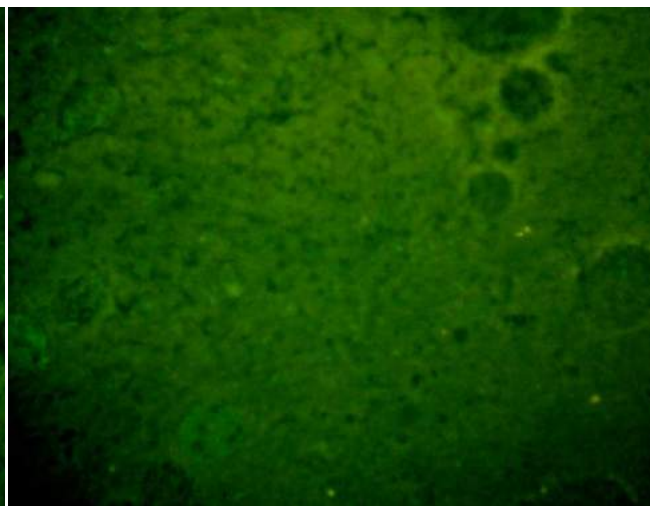
Дослідження мазків-відбитків головного мозку білих мишей, попередньо інфікованих вірусом сказу (штам CVS), зафарбованих контрольним препаратом – ФАГ, показало яскраве жовто-зелене світіння достатньої кількості гранул округлої форми в різних полях зору мікроскопу, що дало змогу оцінити проби в чотири хрести. Негативний контроль – мазок-відбиток з мозку здорової білої лабораторної миші, раніше не вакцинованої проти сказу – при люмінесцентній мікроскопії включень подібного світіння не мав. Сама ж мозкова тканина світилася зеленуватим кольором.

Дослідний зразок Ig Y CVS-11 в розведенні 1:2 при люмінесцентній мікроскопії позитивного на сказ матеріалу мав виражені включення характерного розміру та форми в клітинах та за їх межами з яскравим жовто-зеленим світінням в чотири хрести (рис. 1). Негативний на сказ патологічний матеріал, пофарбований флуоресціюючим імуноглобуліном, не мав ознак світіння характерних для антигену вірусу сказу (рис. 2).

При дослідженні під люмінесцентним мікроскопом позитивного матеріалу на сказ, пофарбованого флуоресціюючим Ig Y CVS-11 в розведенні 1:4, виявляли поодинокі яскраві жовто-зелені світіння. В подальших двократних розведеннях (1:8 і 1:16) не було виявлено включень з характерним світінням, на підставі чого можна зробити висновок, що Ig Y CVS-11 має робоче розведення лише 1:2. Флуоресціюючий імуноглобулін Ig Y G 52 Wistar в усіх розведеннях був неактивним.



**Рис. 1. Позитивний на сказ пат. матеріал (мазок пофарбований ФІТЦ-Ig Y CVS-11, робоче розведення 1:2).**



**Рис. 2. Негативний на сказ пат. матеріал (мазок пофарбований ФІТЦ-Ig Y CVS-11, робоче розведення 1:2).**

Отже, дослідження в РПФ зразків антирабічних Ig Y, мічених ФІТЦ, показали специфічність Ig Y, отриманого на антиген вірусу сказу штаму CVS-11 із активністю робочого розведення 1:2.

**Висновки та перспективи подальших досліджень:**

1. Отримано антирабічний Ig Y з яєць перепелів, імунізованих антигеном вірусу сказу штаму CVS-11, який після концентрування володів віруснейтралізуючою активністю на рівні 81,25 МО/см<sup>3</sup>.
2. Встановлено специфічну активність ФІТЦ-кон'югованих препаратів Ig Y при люмінесцентній мікроскопії мазків-відбитків позитивного на сказ матеріалу.
3. Представлені результати демонструють принципову можливість отримання антирабічних Ig Y з яєць перепелів, використання яких є перспективним при конструюванні засобів лабораторної діагностики сказу.

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Mazur N. The role of FAT in laboratory diagnosis of rabies / N. Mazur, V. Nedosekov, I. Polupan. // Ветеринарна біотехнологія. – 2015. – № 26. – С. 232 – 236.
2. Expert Consultation on Rabies. Technical Report Series 982 / World Health Organization. – 2013. – 139 p.
3. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Електронний ресурс] // ОІЕ. – 2013. – Режим доступу до ресурсу: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.13\\_RABIES.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.13_RABIES.pdf).
4. Robardet E. International interlaboratory trials on rabies diagnosis: An overview of results and variation in reference diagnosis techniques (fluorescent antibody test, rabies tissue culture infection test, mouse inoculation test) and molecular biology techniques / E. Robardet, E. Picard-Meyer, S. Andrieu et al. // Journal of Virological Methods. – 2011. – №177. – P. 15–25.
5. Груздев К.Н. Бешенство животных / К.Н. Груздев, В.В. Недосеков – М.: «Аквариум ЛТД». – 2001. – 304 с.
6. Dean D.J. The fluorescent antibody test / D.J. Dean, M.K. Abelseh, P. Atanasiu // Laboratory techniques in rabies. Fourth edition. – WHO. – 1996. – P.88-95.
7. Пат. 48158 Україна, МПК А61К 39/205. Спосіб одержання антирабічної гіперімунної сироватки / В.В. Недосеков, І.М. Полупан, М.Ю. Іванов. – №200909138 ; заявл. 4.09.2009 ; опубл. 10.03.2010, Бюл. № 5, 2010 р.

8. Пат. 19403 Україна, МПК А61К 39/205. Спосіб отримання антирабічної гіперімунної сироватки / М.В. Бабкін, Б.Т. Стегній, С.А. Ничик та ін. – № 200606787 ; заявл. 19.06.2006; опубл. 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.
9. Shafiqul A. Sarker. Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of Hyperimmunized Chicken Egg Yolk Immunoglobulin in Children With Rotavirus Diarrhea / Shafiqul A. Sarker, Thomas H. Casswall, Lekh R. Juneja et al. // Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. – 2001. – Vol. 32. – P. 19–25.
10. Журавлева М.С. Количественная характеристика показателей иммунного ответа у кур на различные типы антигенов: дисс. ... канд. вет. наук : 06.02.02 / Журавлева Мария Спартаковна. – М., 2015. – 174 с.
11. Anton M. Bioactive egg components and their potential uses / M. Anton, F. Nau, Y. Nys // World's Poultry Science Journal. – 2006. – Vol. 62. – P. 237–244.
12. Li-Min Yang. A Novel Double-Antigen Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of Antibodies against Rabies Virus / Li-Min Yang, Liang-Zhen Zhao, Rong-Liang Hu et al. // Clinical And Vaccine Immunology. – 2006. Vol. 13. – No. 8. – P. 966–968.
13. Hodek P. Optimized Protocol of Chicken Antibody (IgY) Purification Providing Electrophoretically Homogenous Preparations / Petr Hodek, Pavel Trefil, Jiri Simunek et al. // Int. J. Electrochem. Sci. – 2013. – Vol. 8. – P. 113-124.

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНТИРАБИЧЕСКИХ ГЛОБУЛИНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ IГ Y С ПЕРЕПЕЛИНЫХ ЯИЦ / Нычик С.А., Полупан И.Н., Мазур Н.В., Хоменко Я.В., Спиридонов В.Г.**

*В статье представлены материалы относительно исследования чувствительности и специфичности антирабических глобулинов, полученных на основе Iг Y из перепелиных яиц. Показано, что антирабический Iг Y из яиц перепелов, иммунизированных антигеном вируса бешенства, штамм CVS-11, обладает вируснейтрализующей активностью. Продемонстрировано принципиальную возможность получения антирабических Iг Y из яиц перепелов и использование их для разработки средств лабораторной диагностики бешенства.*

**Ключевые слова:** бешенство, штамм, антирабические глобулины, Iг Y, ИФА, ФИТЦ.

**SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULINS OBTAINES FROM QUAIL EGGS YOLK ANTIBODY (Iг Y) / Nychyk S.A., Polupan I.M., Mazur N.V., Homenko Ja.V., Spyrndonov V.G.**

**Introduction.** *Despite significant advances in medicine and biotechnology, rabies is a problem in many countries. One of the rabies issues is application of FAT (fluorescent antibody test) in laboratory diagnosis, which is considered to be the gold standard test.*

*Prospective method of obtaining specific immunoglobulin for rabies diagnosis is isolating Iг Y from the bird's eggs. The method of producing Iг Y antibody has some advantages over the production of antibodies from mammals because there is no need to bleed the animals, it is easy to purify a large amount of antibodies, and it is feasible to produce specific antibody to a small amount of antigen that is poorly immunogenic in mammalian hosts.*

**The goal of the work.** *The study of sensitivity and specificity of fluorescent rabies immunoglobulin (Iг Y) isolated from quail eggs.*

**Materials and methods.** *We used 4 six months old quails (m= 300 g) for immunization. 2 antigen samples: 52 G Wistar strain (vaccine IndiRab, India) and strain CVS-11 (obtained in the laboratory, the virus titer was 6.23±0.11 TCID<sub>50</sub> / 0.05 ml) strains for immunization.*

*For the first immunization we used 0.5 ml of each sample and added equal volume of complete Freund's adjuvant (Thermo). Antigen preparations were injected intramuscularly. We*

repeated immunizations on the 10th and 20th day. Antigens were prepared similarly as for the first immunization, but adding an incomplete Freund's adjuvant.

For the determination of rabies virus specific antibodies titer we collected quail eggs (from 45 days after the first immunization), isolated yolk antibodies, which were tested in indirect ELISA. Virus neutralization activity was tested in mouse neutralization test (MNT).

Sensitivity and specificity samples were performed in FAT. Simultaneously, we determined a working dilution of conjugates (1:2, 1:4, 1:8, 1:16).

**Results of research and discussion.** After the separation, purification and concentration two samples of Ig Y were obtained: sample #1 from G 52 Wistar strain in 30 mg/ml concentration, sample #2 from CVS-11 strain in 19.5 mg/ml concentration.

We observed a positive correlation in ELISA between used antigen and antibody levels indicating specificity of antibodies to rabies virus. At the same time established the increase of antibody titer when used CVS-11 strain. We obtained similar results studying virus neutralization activity of these samples in MNT. Thus, sample 1 had specific potency at the level 26.25 IU/ml, and sample 2 – 81.25 2 IU/ml compared to standard of rabies immunoglobulin.

Study in FAT of samples FITC-labeled Ig Y showed specificity of Ig Y antigen to rabies virus strain CVS-11 (working dilution of 1:2).

**Conclusions and prospects for further research.** Obtained two samples of Ig Y were obtained: sample #1 from G 52 Wistar strain in 30 mg/ml concentration, sample #2 from CVS-11 strain in 19.5 mg/ml concentration. In MNT and ELISA we observed a positive correlation between used antigen and antibody levels indicating the specificity of antibodies to rabies virus.

Study of FITC-labeled Ig Y samples in FAT showed specificity of Ig Y antigen to rabies virus strain CVS-11 (working dilution of 1:2).

**Keywords:** rabies, strain, rabies globulin, Ig Y, ELISA, FITC.

#### REFERENCES

1. Mazur, N., Nedosekov, V. & Polupan, I. (2015). The role of FAT in laboratory diagnosis of rabies. *Veterynarna biotekhnologija – Veterinary biotechnology*, 26, 232-236.
2. WHO Expert Consultation on Rabies (2013). *Technical Report Series 982*. Geneva: World Health Organization.
3. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2013). *oie.int*. Retrieved from [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.13\\_RABIES.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.13_RABIES.pdf).
4. Robardet, E., Picard-Meyer, E., Andrieu, S., Servat, A., & Cliquet, F. (2011). International interlaboratory trials on rabies diagnosis: An overview of results and variation in reference diagnosis techniques (fluorescent antibody test, rabies tissue culture infection test, mouse inoculation test) and molecular biology techniques. *Journal of Virological Methods*, 177, 15–25.
5. Hruzdyev, K.N. & Nedosekov, V.V. (2001). Beshenstvo zhivotnyih [Rabies of animals]. Moskva: Akvarium LTD [in Russian].
6. Dean, D.J., Abelseth, M.K., & Atanasiu, P. (1996). *Laboratory techniques in rabies (The fluorescent antibody test)*. Geneva, (4d ed.), 88-95.
7. Nedosjekov, V.V., Polupan, I.M., & Ivanov, M.Ju. e.a. Sposib oderzhannja antyrabichnoi' giperimunnoi' syrovatky [A method of producing hyperimmune rabies serum]. Patent 48158 of Ukraine, MPK A61K 39/205 (10.03.2010) [in Ukrainian].
8. Babkin, M.V., Stegnij, B.T., & Nychyk, S.A. e.a. Sposib otrymannja antyrabichnoi' giperimunnoi' syrovatky [A method of producing hyperimmune rabies serum]. Patent 19403 of Ukraine, MPK A61K 39/205 (15.12.2006) [in Ukrainian].
9. Shafiqul, A. Sarker, Thomas, H. Casswall, Lekh, R. Juneja, Enamul, Hoq, Iqbal, Hossain, & George, J. Fuchs et al. (2001). Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of Hyperimmunized Chicken Egg Yolk Immunoglobulin in Children With Rotavirus Diarrhea. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 32, 19–25.
10. Zhuravleva, M.S. (2015). Kolichestvennaya harakteristika pokazateley immunnogo otveta u kur na razlichnyie typyi antigenov [Quantitative characterization of immune response in chickens to the different types of antigens]. *Candidate's thesis*. Moskva [in Russian].



11. Anton, M., Nau, F., & Nys, Y. (2006). Bioactive egg components and their potential uses. *World's Poultry Science Journal*, 62, 237-244.

12. Li-Min, Y., Liang-Zhen, Zh., Rong-Liang, Hu, Zhen-Sheng, Shi, & Wen-Jun, Liu (2006). A Novel Double-Antigen Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of Antibodies against Rabies Virus. *Clinical And Vaccine Immunology*, 13, 966-968.

13. Hodek, P., Trefil, P., Simunek, J., Hudecek, J., & Stiborova, M. (2013). Optimized Protocol of Chicken Antibody (IgY) Purification Providing Electrophoretically Homogenous Preparations. *Int. J. Electrochem. Sci*, 8, 113-124.

**УДК 636.09:57.083.3:616.155.392:615.373:636.2**

**ПЕТРЕНКО О.С.**, канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: alexvet2007@ukr.net,

**АЛЄКСЄЄВА Г.Б.**, канд. вет. наук, e-mail: serolog@i.ua,

**ПРИСКОКА В.А.**, д-р вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: priskokaviktor@ukr.net

*Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи*

**ГОЛОВАХА В.І.**, д-р вет. наук, проф., e-mail: naukafutbol@i.ua

*Білоцерківський національний аграрний університет*

**КІЇВСЬКА Г.В.**, канд. вет. наук, e-mail: vcheny.secretar@gmail.com

*Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи*

## **ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЧУТЛИВОСТІ ТЕСТ-СИСТЕМ ІФА РІЗНИХ ВИРОБНИКІВ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ**

*Використання об'єднаних зразків молока як об'єкта імунологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби імуноферментним методом вимагає достовірної оцінки чутливості тест-систем ІФА, оскільки недостовірна діагностика становить загрозу епізоотичному благополуччю.*

*Робочі характеристики використаних діагностикумів були враховані за допомогою внутрішньолaboratorного контрольного матеріалу, що гарантує зменшення собівартості досліджень (за рахунок використання вторинного еталону замість міжнародної стандартної сироватки E05) та якісну діагностику лейкозу великої рогатої худоби, навіть за істотних розведень окремого зразка.*

***Ключові слова:** лейкоз, велика рогата худоба, ІФА, молоко, імунологічні дослідження, валідація, методологія, характеристика, аналіз, зразок, якість.*

**Вступ.** Основою забезпечення благополуччя тваринництва щодо лейкозу великої рогатої худоби є якісна діагностика захворювання. Відповідно до вимог чинної «Інструкції з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу», основними методами прижиттєвої діагностики лейкозу є реакція імунодифузії та імуноферментний аналіз. Крім того, вона рекомендує застосування ІФА у благополучних стадах для дослідження об'єднаної проби молока від групи тварин [1].

Молоко як досліджуваний об'єкт може забезпечити простий, точний спосіб скринінгу захворювання, оскільки антитіла проти вірусу лейкозу в