



УДК 636.09:57.083.3:616.155.392:615.373:636.2

В.О. ЗАГРЕБЕЛЬНИЙ, канд. вет. наук, директор

О.С. ПЕТРЕНКО, канд. вет. наук, ст. наук. співробітник

Г.Б. АЛЕКСЕЄВА, зав. НДВ імунологічних досліджень

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

ОЦІНКА ЧУТЛИВОСТІ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЕНЗООТИЧНОГО ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Використання об'єднаних зразків (пулів) молока як об'єкта імунологічної діагностики ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби імуноферментним методом вимагає достовірної оцінки чутливості тест-системи ІФА, оскільки вихід за межі її аналітичних можливостей може становити загрозу епізоотичному благополуччю.

Робочі характеристики застосованої тест-системи було оцінено за допомогою міжнародної стандартної сироватки E05, що забезпечує якісну діагностику ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби навіть за істотних розведень окремого зразка у пулі молока.

Основою забезпечення благополуччя тваринництва щодо ензоотичного 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 (РІД) та імуноферментний аналіз (ІФА). Крім того, вона регламентує застосування в благополучних стадах ІФА для дослідження об'єднаної проби молока від групи тварин [3].

Використання збірних зразків молока для діагностики ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби шляхом імуноферментного аналізу має певні переваги. Молоко як досліджуваний об'єкт може забезпечити простий, точний спосіб скринінгу захворювання, оскільки антитіла проти вірусу лейкозу в продромальній стадії розвитку хвороби містяться як у крові, так і в молоці інфі-

кованих тварин [2, 4]. Отримання зразків їх сироватки крові є більш трудомістким і затратним, а порушення правил асептики й антисептики при масовому взятті крові може стати причиною перезараження тварин [2].

Відповідно до вимог МЕБ міжнародна стандартизація серологічної діагностики лейкозу потребує використання міжнародної стандартної сироватки E05 (International Standard Sera for Enzootic bovine leuco-

sis) як первинного еталона. Імуноферментна тест-система, використовувана для дослідження збірних проб молока (пулів), має давати позитивний результат при дослідженні стандартної сироватки ІОЕ E05, яка розведена негативним молоком у 250 разів більше, ніж кількість окремих зразків молока у пулі. Наприклад, для пулів зі 100 зразків молока позитивну ІОЕ стандартну сироватку E05 слід розбавити $1/250 \times 100 = 1/25\ 000$. Для індивідуальних зразків молока позитивна ІОЕ стандартна сироватка E05 у розведенні $1/250$ негативним молоком має бути позитивною [7, 8]. Висока чутливість сучасних тест-систем ІФА обумовлена здатністю виявляти всі типи антитіл



© В.О. Загребельний, О.С. Петренко, Г.Б. Алексеева, 2015

УВАГА! ТРИВАЄ ПЕРЕДПАТА НА ЖУРНАЛ НА 2015 РІКІ



вмістом цільового імунологічного маркера, отримані шляхом послідовних розведень міжнародної стандартної сироватки E05 негативним молоком.

проти вірусу лейкозу великої рогатої худоби завдяки використанню ультра-чистого лізату вірусного антигену й дозволяє досліджувати як індивідуальні зразки, так і збірні проби молока (пули) [5].

У фахових вітчизняних джерелах є пропозиції виробництву щодо використання збірного молока в системі епізоотичного моніторингу ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби [1, 2, 4], проте методична база використання молока як об'єкта імунологічної діагностики імуноферментним методом потребує стандартизації та має відповідати міжнародним вимогам.

При використанні пулів молока для імунологічної діагностики методом ІФА важливим аспектом є припущення величина розведення окремого зразка молока у збірній пробі з урахуванням чутливості тест-системи.

Для внутрішньолaboratorного контролю точності й визначення чутливості імуноферментного аналізу нами було використано контрольний матеріал із різним вмістом специфічних антигенів проти вірусу лейкозу великої рогатої худоби.

Мета роботи – визначити аналітичну чутливість тест-системи Leukosis Milk Screening, використовуючи як об'єкт досліджень зразки з різним

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для досліджень було знежирене молоко (центрифугування 2000 rpm 10 хв). Для визначення чутливості тест-системи імуноферментного аналізу використовували контрольні зразки з різним вмістом імунологічного маркера, отримані шляхом розведень міжнародної стандартної сироватки E05 (International Standard Sera for Enzootic bovine leucosis) у 250 разів більше, ніж кількість окремих зразків молока у пулі негативним молоком (див. таблицю). Стандартну міжнародну сироватку E05 ми отримали з референс-лабораторії ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби у Німеччині (University Leipzig, Institute of Virology). Вона є інтернаціональним пулом 24 сироваток природно інфікованої вірусом лейкозу великої рогатої худоби, що містить усі відомі субтипи антигенів. Проведені референс-лабораторіями МЕН Великої Британії і Польщі, 27 національними лабораторіями Німеччини й 3 виробниками діагностичних наборів міжлабораторні тести підтверджують, що за вмістом антигенів і реактивністю сироватка може використовуватись *in vitro* як позитивний контроль для серологічних методів виявлення специфічних антигенів проти вірусу лейкозу великої рогатої худоби.

Тест-система для діагностики ензоотичного лейкозу у збірних пробах молока Leukosis Milk Screening (IDEXX Montpellier SAS) ґрунтується на використанні непрямого твердофазного імуноферментного аналізу [5]. У лунках мікропланшета адсорбовано антиген вірусу лейкозу великої рогатої худоби (BLV). Досліджувані зразки молока розводять і інкубують у лунках. Під час інкубації за наявності специфічних антигенів формується комплекс антиген – антиген. Після відмивання компонентів, які не зв'язалися, додається антивидовий Ig G, кон'югований з ферментом, який з'єднується зі специфічним імунним комплексом. Вільний кон'югат видаляється промиванням і вноситься субстрат (ТМВ), який у присутності ферменту окиснюється, забарвлення його стає синім, а після зупинки реакції стоп-розчином – жовтим. Інтенсивність забарвлення безпосередньо пов'язана із вмістом антигенів проти вірусу лейкозу в досліджуваному зразку. Діагностична достовірність результату визначається шляхом порівняння значення оптичної щільності (D_{450}) зразка з D_{450} позитивного контролю.

Вимірювання оптичної щільності (D) дослідних і контрольних зразків дозволило визначити чутливість фотометричного методу й установити ступінь лінійності зв'язку між оптичним поглинанням (D) і концентрацією поглинальної речовини.

Критерії валідації. Значення D_{450} позитивного контролю розраховується як середнє арифметичне двох фактичних значень D_{450} позитивного контролю ($1,493+1,367=1,430$).

Тест вважався достовірним, оскільки D_{450} позитивного контролю $1,430>0,300$. Співвідношення між значенням D_{450} позитивного і негативного контролю $1,430/0,213=6,71>2,00$. Розрахунок процентного співвідношення зразок/позитивний контроль (S/P, %) обчислюють за формулою:



$$S/P (\%) = 100 \times \frac{D_{450} \text{ зразка} - D_{450} \text{ негативного контролю}}{D_{450} \text{ позитивного контролю} - D_{450} \text{ негативного контролю}} = \frac{D_{450} \text{ зразка} - 0,213}{1,430 - 0,213} \times 100.$$

Зразки із співвідношенням S/P (%):
 ≤ 60 % – негативні; $60 < S/P (\%) < 70$ – сумнівні; ≥ 70 % – позитивні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Використовуючи основне розведення міжнародної стандартної сироватки E05 – 1/100, відповідно до схеми

Для інтерпретації отриманих результатів досліджень, встановлення діагностичної чутливості було визначено критичну оптичну щільність (D_{450} крит.) як критерій розділення позитивних і негативних результатів.

Оскільки згідно з інструкцією співвідношення дослідного зразка до позитивного контролю S/P (%) у зразку з

ними ($S/P = 60,5 - 69,7$ %); $D_{450} < 0,948$ Б – негативними ($S/P < 60,4$ %).

Використовуючи значення D крит. (1,065), розраховували коефіцієнт позитивності як відношення D зразка до D критичної [6]. Коефіцієнт позитивності нативної позитивної сироватки E05 становив 3,61, а за розведень 1/100 та 1/250 – 3,57 і 3,46 відповідно. Мінімальні розведення контрольного матеріалу (1/100–1/5000) внаслідок високої концентрації імунологічного маркера та надмірної позитивності зразка (КП 3,57–3,06) не відображають граничних значень чутливості тест-системи ІФА (див. рисунок).

Значення оптичної щільності контрольного зразка має знаходитись у межах лінійної залежності D від концентрації імунологічного маркера ($\approx 0,5 - 1,5$ Б) [6]. Крім того, оптимальна точність виміру оптичної щільності імуоферментним аналізатором Sunrise (Tecan), використовуваного нами для обліку результатів, враховуючи технічні властивості приладу, досягається при значеннях D зразка, що не перевищують 2,5 Б. Істотне зменшення коефіцієнта позитивності до 2,15 відзначено лише за розведення 1/7500.

Найбільше розведення контрольного матеріалу (1/18 750), за якого з високим ступенем імовірності можна отримати позитивний результат, із урахуванням чутливості застосованої тест-системи, відповідає оптимальному розміру пулу, що може містити 75 зразків молока.

Слабо позитивний стандарт є критичним фактором, який забезпечує діагностичну чутливість дослідження. Лише за його використання можна гарантувати, що застосований метод визначення антитіл придатний до детекції певного рівня специфічних імуноглобулінів [9].

Більш високі розведення контрольного матеріалу (1/20 000–1/21 250) характеризуються наявністю сумнівних результатів і чергуванням слабо позитивних результатів (1/22 500; 1/25 000) із негативними (1/23 750; 1/27 500).

Хоча найбільше розведення контрольного зразка з позитивним резуль-

Таблиця – Схема приготування та результати досліджень контрольного матеріалу

Кількість зразків у пулі	Розведення матеріалу	Основне розведення сироватки E05 1/100, мл	Негативне молоко, мл	D_{450} , Б	S/P, %
1	1/250	0,2	0,48	3,685	285,3
10	1/2500	0,020	0,48	3,738	289,6
20	1/5000	0,020	0,98	3,259	250,3
30	1/7500	0,020	1,48	2,287	170,4
40	1/10 000	0,020	1,98	2,280	169,8
50	1/12 500	0,020	2,48	1,611	114,9
55	1/13 750	0,020	2,73	1,525	107,8
60	1/15 000	0,020	2,98	1,650	118,1
65	1/16 250	0,020	3,23	1,291	88,6
70	1/17 500	0,020	3,48	1,295	88,9
75	1/18 750	0,020	3,73	1,209	81,8
80	1/20 000	0,010	1,99	1,061	69,7
85	1/21 250	0,010	2,115	0,956	61,1
90	1/22 500	0,010	2,24	1,093	72,3
95	1/23 750	0,010	2,365	0,929	58,8
100	1/25 000	0,010	2,49	1,079	71,2
110	1/27 500	0,010	2,74	0,931	59,0
120	1/30 000	0,010	2,99	0,893	55,9
130	1/32 500	0,010	3,24	0,701	40,1
140	1/35 000	0,010	3,49	0,690	39,2
150	1/37 500	0,010	3,74	0,773	46,0
160	1/40 000	0,010	3,99	0,668	37,4
170	1/42 500	0,010	4,24	0,666	37,2
180	1/45 000	0,010	4,49	0,737	43,1
200	1/50 000	0,010	4,99	0,626	33,9

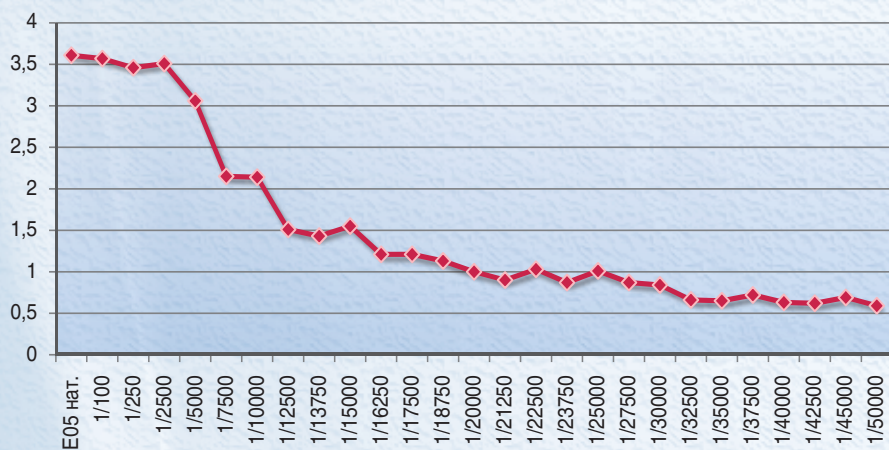
Примітка: ■ – позитивні; ■ – негативні; ■ – сумнівні зразки.

приготування контрольного матеріалу були виготовлені послідовні розведення у діапазоні 1/250 – 1/50 000, що відображають реактивність, очікувану в цільовій популяції тварин (див. таблицю). Послідовні розведення контрольного матеріалу негативним молоком у 250 разів більше, ніж кількість окремих зразків молока у пулі, здійснені відповідно до вимог Директиви ЄС 88/406/ЄЕС та OIE (Word Organization for Animal Health).

позитивним результатом має бути ≥ 70 %, тоді D_{450} крит. становить:

$$\frac{(1,430 - 0,213) \times 70}{100} + 0,213 = 1,065.$$

Критична оптична щільність як критерій відмежування позитивних результатів від негативних не включала невизначену або підозрілу зону. Якщо оптична щільність зразків $D_{450} = 0,949 - 1,061$ Б, їх вважали сумнів-



Коефіцієнт позитивності контрольного матеріалу

татом – 1/25 000 (КП 1,01), використання пулів молока, які містять більше 75 окремих зразків, може зумовити отримання хибно негативних результатів унаслідок невідповідності коефіцієнта позитивності дослідного матеріалу чутливості тест-системи ІФА.

ВИСНОВКИ

1. При використанні об'єднаних зразків (пулів) молока як об'єкта імунологічної діагностики ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби імуноферментним методом ключовим аспектом є достовірна оцінка чутливості тест-системи ІФА, оскільки вихід за межі її аналітичних можливостей може становити загрозу епізоотичному благополуччю.

2. Встановлено, що робочі характеристики тест-системи Leukosis Milk

Screening, оцінені за допомогою міжнародної стандартної сироватки E05, можуть забезпечити якісну діагностику ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби відповідно до вимог МЄБ, навіть за істотних розведень окремого зразка у пулі молока (75 зразків молока в об'єднаній пробі).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Данько І.О.** Епізоотологічний моніторинг лейкозу великої рогатої худоби та удосконалення оздоровчих протилейкозних заходів: автореф. дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби» / І.О. Данько. – К., 2013. – 20 с.
2. **Домбровський О.Б.** Лейкоз великої рогатої худоби / О.Б. Домбровський, Л.Є. Корнієнко, Б.М. Ярчук, Л.М. Корнієнко, Ю.О. Домбровська; за ред. О.Б. Домбровського. – Біла Церква, 2003. – С. 105–121.
3. **Інструкція з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу** / Затверджено наказом Держ. комітету вет. медицини України 21 грудня 2007 р. №21; зареєстровано в Мін'юсті 11 січня 2008 р. за № 12/14703.
4. **Методичні рекомендації щодо пулування сироваток крові великої рогатої худоби і молока при дослідженні на лейкоз (BLV) методом імуноферментного аналізу (ІФА)** / А.В. Абрамов, А.О. Меженський, Є.В. Резуненко, Г.Б. Алексєєва. – К., 2009. – 26 с.
5. **Настанова із застосування тест-набору Leukosis Milk Screening.** – REF: P02210-5, IDEXX Montpellier SAS, Франція.

6. **Нетесова И.Г.** Внутривлабораторный контроль качества неколичественных методов ИФА: Информац.-метод. пособие / И.Г. Нетесова, М.Р. Бобкова. – Новосибирск: Вектор-Бест, 2011. – 20 с.
7. **Council Directive 88/406/EEC amending Directive 64/432/EEC on animal health problems affecting intra-community trade in bovine and swine as regards enzootic bovine leukosis.**
8. **Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals / Enzootic bovine leukosis.** – 7th ed. – Paris: OIE, 2012. – P. 729–738.
9. **OIE Quality Standard & Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases.** – 2nd ed. – Paris: Office International des Epizooties, 2008. – 70 p.

Одержано 19.12.2014

Оценка чувствительности ИФА для диагностики энзоотического лейкоза крупного рогатого скота. В.А. Загребельный, А.С. Петренко, Г.Б. Алексеева

Использование объединенных образцов (пулов) молока как объекта иммунологической диагностики энзоотического лейкоза крупного рогатого скота иммуноферментным методом требует достоверной оценки чувствительности тест-системы ИФА, так как выход за пределы ее аналитических возможностей может представлять угрозу эпизоотическому благополучию.

Рабочие характеристики примененной тест-системы были оценены с помощью международной стандартной сыворотки E05, что обеспечивает качественную диагностику энзоотического лейкоза крупного рогатого скота, даже при существенном разведении отдельного образца в пуле молока.

Assess the sensitivity of ELISA for diagnosis enzootic bovine leukosis. V. Zahrebelniy, A. Petrenko, G. Alekseeva

Using the combined samples (pools) milk as the object of immunological diagnosis enzootic bovine leukosis ELISA requires accurate assessment of the sensitivity of the ELISA test system as going beyond its analytical capabilities, can be dangerous epizootic welfare.

The performance of the test system applied ELISA were evaluated using the International Standard Serum E05, which guarantees the quality of diagnosis of enzootic bovine leukosis, even with a significant dilution of the sample in a separate pool of milk. ○

