

3. ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 619:616.98-078:578.828.11.083.33:636.22/.28

DOI 10.36016/VM-2019-105-6

ПОРІВНЯЛЬНА ДІАГНОСТИКА ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ МЕТОДОМ ІФА В ТЕСТ-СИСТЕМАХ РІЗНИХ КОНСТРУКЦІЙ

**Стегній Б. Т., Завгородній А. І., Горбатенко С. К.,
Корнєйков О. М., Стегній М. Ю., Болотін В. І.**

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Горлов Ю. І., Ганова Л. О., Чумак О. М., Співак М. Я.

ПрАТ «Науково-виробнича компанія «Діапроф-Мед», Київ, Україна

У роботі наведені результати порівняльного дослідження в імуноферментних тест-системах різних конструкцій сироваток крові ВРХ, які містять антитіла до BLV у різних концентраціях, а також негативних зразків, що попередньо перевірено в РІД і тест-системі «Bovine leukemia virus antibody test kit» (IDEXX). У тест-системі «DIA®-BLV-Ab» реакція проводиться в форматі непрямого ІФА, а в тест-системі «ID Screen® BLV Competition» — у конкурентному. Отримані дані показали, що обидва діагностикуми мають досить високу діагностичну спроможність і виявляють антитіла до BLV у різних концентраціях в усіх позитивних сироватках. При аналізі 34 сироваток крові ВРХ, в яких відсутність специфічних антитіл підтверджено кількома тестами, тест-система «ID Screen® BLV Competition» визначила 5 зразків з хибнопозитивним результатом

Ключові слова: BLV, діагностика, імуноферментні тест-системи

Лейкоз великої рогатої худоби — інфекційне хронічне захворювання, яке спричиняється вірусом BLV (bovine leukaemia virus) із сімейства Retroviridae, який уражає В-лімфоцити і завдає значних економічних збитків тваринництву [1]. Вірусна частка довжиною 80–100 нм складається із одностанцюгової РНК, нуклеопротеїну р12, капсидного білка р24, трансмембранного глікопротеїну гр30, глікопротеїну оболонки гр51 і декількох ферментів, включаючи зворотну транскриптазу [2]. Послідовність нуклеотидів BLV багато в чому схожа з Т-лімфотропними вірусами людини 1 та 2 (HTLV-1 і HTLV-2). У зв'язку з цим, з огляду на можливість подолання збудником лейкозу міжвидових бар'єрів, м'ясо та молоко інфікованих тварин є неповноцінними продуктами харчування, оскільки можуть бути небезпечними для людини [3].

Захворювання найчастіше протікає в субклінічній формі, у 30 % інфікованих тварин старше трьох років розвивається лімфоцитоз, рідше (0,1–10 %) — лімфосаркома [4]. Неможливо спростувати також генетичну схильність тварин до персистуючого лімфоцитозу та розвитку пухлини. Велика рогата худоба з пухлинами майже завжди гине раптово або через кілька тижнів чи місяців після появи клінічних симптомів [5].

Зараження BLV відбувається від інфікованих тварин через кров, контаміновану збудником, молоко, загальні годівниці та поїлки, під час отелення, від матері до плоду. Найбільш уразливими органами є черевна порожнина, серце, селезінка, кишечник, печінка, нирки, яєчники, легені та матка [6].

Наявність лейкозу обмежує міжнародну торгівлю, оскільки країни, які вільні від BLV, не закуповують інфікованих тварин і вимагають їх регулярного тестування на лейкоз [3].

В Україні з 1953 по 1965 роки спорадичні випадки лейкозу великої рогатої худоби виявляли тільки в деяких областях — Кіровоградській, Дніпропетровській, Херсонській, Черкаській. З 1970 року була відзначена тенденція до різкого поширення даного захворювання і на сьогодні інфікованих вірусом лейкозу тварин виявляють майже в усіх областях України [5]. Тому проведення заходів, спрямованих на зниження поширення вище зазначеної інфекції, стало актуальним завданням. У комплексі заходів з оздоровлення господарств від лейкозу великої

рогатої худоби провідне місце відводиться своєчасній і точній діагностиці [3,4]. Реакція імунодифузії в гелі (РІД), яка широко застосовувалася раніше, в Європі і США не використовується. Цей метод замінений імуноферментним аналізом, як більш чутливим і специфічним [2].

Мета роботи. Провести порівняльний аналіз позитивних і негативних на лейкоз сироваток крові великої рогатої худоби в імуноферментних тест-системах різних конструкцій.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводилось на базі Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (м. Харків).

Для визначення антитіл до BLV використовували дві імуноферментні тест-системи.

Діагностикум «DIA®-BLV-Ab», виробництва ПрАТ «НВК Діапроф-Мед» (Україна), сконструйований у форматі твердофазного непрямого ІФА. При внесенні в лунки планшета досліджуваних зразків сироваток специфічні антитіла зв'язуються з рекомбінантними антигенами р24 і гр51, які входять до складу імуносорбенту, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Імунні комплекси виявляються на другому етапі реакції пероксидазним кон'югатом на основі рекомбінантного білка G Streptococcus.

Тест-система «ID Screen® BLV Competition», виробництва IDvet (Франція) призначена тільки для виявлення антитіл гр51 до вірусу лейкозу ВРХ методом конкурентного твердофазного імуноферментного аналізу. Лунки планшета адсорбовані очищеним глікопротеїном гр51. При внесенні в лунки планшета досліджуваних сироваток крові, які містять антитіла до антигену гр51 BLV, утворюється комплекс антиген-антитіло, що маскує епітопи гр51. На другому етапі реакції після промивки імуносорбенту в лунки додають пероксидазний кон'югат на основі антитіл анти-гр51, який при відсутності в досліджуваному зразку специфічних антитіл зв'язується з антигеном гр51 у складі імуносорбенту.

В обох тест-системах в якості проявника використовують однокомпонентний ТМБ. Реакцію зупиняють розчином 0,5 М сірчаної кислоти і визначають оптичну густину (ОГ) у лунках у тест-системі «DIA®-BLV-Ab» при 450 нм/620 нм, у тест-системі «ID Screen® BLV Competition» при 450 нм.

У тест-системі «DIA®-BLV-Ab» для розрахунку граничного значення (ГЗ) до середньої величини трьох значень негативного контролю додають константний коефіцієнт 0,2. Результат аналізу вважається позитивним, якщо ОГ досліджуваного зразку більше ГЗ і негативним при ОГ менше ГЗ.

У тест-системі «ID Screen® BLV Competition» розраховують співвідношення ОГ досліджуваного зразка до середнього значення негативного контролю, яке помножують на 100 % (значення S/N%). Якщо значення $S/N \leq 50$ %, то результат аналізу вважається позитивним, якщо значення $S/N \geq 60$ % — негативним, якщо $50 \% < S/N < 60$ % — сумнівним.

Для аналізу використовували:

- 15 сироваток крові ВРХ, які містять антитіла до BLV, що підтверджено в РІД та дослідженням у тест-системі «Bovine leukemia virus antibody test kit» (IDEXX);
- 10 сироваток крові ВРХ, які позитивні за результатами РІД;
- 10 сироваток крові ВРХ, які слабопозитивні в РІД;
- 10 сироваток крові ВРХ, які зі слабкою смужкою в РІД;
- 24 зразків сироваток крові ВРХ, які не містять антитіл до BLV за результатами РІД і в тест-системі «Bovine leukemia virus antibody test kit» (IDEXX);
- 10 сироваток крові ВРХ, які негативні на BLV за результатами РІД.

Результати досліджень. Дослідження показали, що при тестуванні 25 сироваток крові ВРХ, які позитивні в РІД, а 15 зразків підтверджені також на наявність антитіл до BLV в ІФА, у тест-системах «DIA®-BLV-Ab» і «ID Screen® BLV Competition», усі зразки визначені позитивними (табл. 1). У той же час при аналізі в обох тест-системах сироваток крові, які слабопозитивні в РІД та зі слабкою смужкою в даному тесті, результати не співпадали (табл. 2).

При дослідженні 10 зразків, які слабопозитивні в РІД, у тест-системі «DIA®-BLV-Ab» 8 сироваток визначені позитивними, а 2 зразки — негативними. Тест-система «DIA®-BLV-Ab» виявила антитіла до BLV у всіх сироватках. При аналізі 14 сироваток зі слабкою смужкою в РІД тест-система «DIA®-BLV-Ab» визначила 9 зразків позитивними, а 5 — негативними. У тест-системі «ID Screen® BLV Competition» специфічні антитіла виявлені в більшій кількості сироваток — в 11 зразках. При дослідженні 3 сироваток результат аналізу був негативним в обох тест-системах.

Таблиця 1 — Результати порівняльного дослідження сироваток крові ВРХ, які містять антитіла до BLV, у різних імуноферментних тест-системах

№ зразка	Тест-система					
	DIA-BLV-Ab (непрямий ІФА)			ID Screen BLV Competition (конкурентний ІФА)		
	Результати ІФА					
	ОГ	ОГ/ГЗ*	оцінка результату	ОГ	SN%**	оцінка результату
Сироватки крові ВРХ, які містять антитіла до BLV, позитивні в РІД і тест-системі «Bovine leukemia virus antibody test kit»						
107	2,486	9,1	позитивний	0,060	7,2	позитивний
108	3,452	12,7	позитивний	0,059	7,0	позитивний
109	1,736	6,4	позитивний	0,063	7,5	позитивний
111	3,125	11,5	позитивний	0,059	7,0	позитивний
114	2,758	10,1	позитивний	0,053	6,3	позитивний
115	2,363	8,7	позитивний	0,059	7,0	позитивний
117	2,200	8,1	позитивний	0,069	8,2	позитивний
133	1,838	6,8	позитивний	0,111	13,2	позитивний
145	3,298	12,1	позитивний	0,065	7,7	позитивний
144	3,204	11,8	позитивний	0,063	7,5	позитивний
143	3,419	12,6	позитивний	0,048	5,7	позитивний
141	3,484	12,8	позитивний	0,055	6,6	позитивний
140	3,248	11,9	позитивний	0,052	6,2	позитивний
126	1,739	6,4	позитивний	0,063	7,5	позитивний
123	2,303	8,5	позитивний	0,066	7,9	позитивний
Сироватки крові ВРХ, які містять антитіла до BLV, позитивні в РІД						
1	0,916	3,4	позитивний	0,078	9,3	позитивний
2	0,987	3,6	позитивний	0,082	9,8	позитивний
3	1,479	5,4	позитивний	0,059	7,0	позитивний
4	1,454	5,3	позитивний	0,054	6,4	позитивний
5	1,961	7,2	позитивний	0,061	7,3	позитивний
6	0,342	1,3	позитивний	0,071	8,5	позитивний
7	0,504	1,9	позитивний	0,083	9,9	позитивний
8	2,903	10,7	позитивний	0,074	8,8	позитивний
9	2,294	8,4	позитивний	0,063	7,5	позитивний
10	0,685	2,5	позитивний	0,052	6,2	позитивний

Примітки: * — результат аналізу в тест-системі більше 1,0 — позитивний, менше 1,0 — негативний; ** — результат аналізу в тест-системі менше 50 % — позитивний, більше 60 % — негативний, у межах 50 % — 60 % — сумнівний.

У табл. 3 наведені результати досліджень 34 сироваток крові ВРХ, які не містять антитіл до BLV. Усі 34 зразка негативні в РІД, а у 24 сироватках відсутність специфічних антитіл підтверджена також методом ІФА. При аналізі в тест-системі «DIA®-BLV-Ab» усі зразки визначені негативними. При дослідженні в тест-системі «ID Screen® BLV Competition» 19 зразків визначені негативними, а в 5 сироватках виявлені антитіла до BLV (хибнопозитивний результат).

Висновки. Таким чином, при порівняльному дослідженні в тест-системах зразків сироваток, які містять різні концентрації специфічних антитіл, зокрема, їх низький рівень, а також негативних зразків, встановлено, що обидва діагностикуми, незважаючи на різну конструкцію та принцип реакції, мають досить високу діагностичну спроможність. В усіх сироватках, що підтверджені позитивними в декількох тестах, в обох тест-системах виявлено антитіла до вірусу лейкозу. При цьому не можна не враховувати, що імуносорбент у тест-системі «ID Screen® BLV Competition» сенсibilізований тільки одним антигеном gp51 (оболонковим), а в тест-системі «DIA®-BLV-Ab» двома — gp51 і p24 (оболонковим і капсидним), використання якого на думку деяких авторів [7] необхідно при створенні ELISA тест-систем для діагностики BLV.

Розділ 3. Епізоотологія та інфекційні хвороби

Таблиця 2 — Результати порівняльного дослідження сироваток крові ВРХ, які за результатами РІД слабопозитивні та зі слабкою смужкою, у різних імуноферментних тест-системах

№ зразку	Тест-система					
	DIA-BLV-Ab (непрямий ІФА)			ID Screen BLV Competition (конкурентний ІФА)		
	Результати ІФА					
	ОГ	ОГ/ГЗ	оцінка результату	ОГ	SN%	оцінка результату
сироватки крові ВРХ, які слабопозитивні в РІД						
21	0,233	0,9	негативний	0,060	7,2	позитивний
22	0,683	2,5	позитивний	0,058	6,9	позитивний
23	0,485	1,8	позитивний	0,083	9,9	позитивний
24	0,852	3,1	позитивний	0,055	6,6	позитивний
25	0,290	1,1	позитивний	0,056	6,7	позитивний
26	0,813	3,0	позитивний	0,078	9,3	позитивний
27	0,150	0,6	негативний	0,077	9,2	позитивний
28	0,498	1,8	позитивний	0,052	6,2	позитивний
29	0,329	1,2	позитивний	0,057	6,8	позитивний
30	1,897	7,0	позитивний	0,057	6,8	позитивний
сироватки крові ВРХ, які зі слабкою смужкою в РІД						
31	0,207	0,8	негативний	0,064	7,6	позитивний
32	1,336	4,9	позитивний	0,075	8,9	позитивний
33	3,076	11,3	позитивний	0,060	7,2	позитивний
34	0,850	3,1	позитивний	0,062	7,4	позитивний
35	1,166	4,3	позитивний	0,073	8,7	позитивний
36	0,342	1,3	позитивний	0,076	9,1	позитивний
37	3,466	12,7	позитивний	0,066	7,9	позитивний
38	0,840	3,1	позитивний	0,071	8,5	позитивний
39	0,109	0,4	негативний	0,760	90,6	негативний
40	0,354	1,3	позитивний	0,071	8,5	позитивний
41	1,015	3,7	позитивний	0,095	11,3	позитивний
42	0,170	0,6	негативний	0,668	79,6	негативний
43	0,087	0,3	негативний	0,765	91,2	негативний
44	0,226	0,8	негативний	0,066	7,9	позитивний

Примітки: * — результат аналізу в тест-системі більше 1,0 — позитивний, менше 1,0 — негативний;
 ** — результат аналізу в тест-системі менше 50 % — позитивний, більше 60 % — негативний, у межах 50 % — 60 % — сумнівний.

Таблиця 3 — Результати дослідження сироваток крові ВРХ, які не містять антитіл до BLV, у різних імуноферментних тест-системах

Сироватки крові ВРХ	Кількість зразків	Тест-системи			
		DIA-BLV-Ab (непрямий ІФА)		ID Screen BLV Competition (конкурентний ІФА)	
		кількість негативних результатів	кількість позитивних результатів	кількість негативних результатів	кількість позитивних результатів
Негативні в РІД і в тест-системі «Bovine leukemia virus antibody test kit»	24	24	0	19	5
Негативні в РІД	10	10	0	10	0
Усього:	34	34	0	29	5

Отримані дані показали, що тест-система «ID Screen® BLV Competition» при аналізі 34 сироваток, в яких відсутність специфічних антитіл підтверджено кількома тестами, визначила 5 зразків з хибнопозитивним результатом.

Список літератури

1. Косовский Г. Ю., Глазко В. И., Андрейченко И. А., Ковальчук С. Н., Глазко Т. Т. Инфекционная опасность носителей вируса бычьего лейкоза и её оценка в связи с лейкоцитозом. *Сельскохозяйственная биология*. 2016. Т. 51, № 4. С. 475–482.
2. Зубова Т. В., Плешков В. А., Миронов А. Н. Современные методы и опыт борьбы с лейкозом крупного рогатого скота. *В мире научных открытий*. 2018. Т. 10, № 5. С. 119–124.
3. Явников Н. В. Стратегия оздоровительных мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота в современных условиях. *Проблемы и перспективы инновационного развития агротехнологий : материалы XX международной научно-практической конференции (г. Белгород, 23–25 мая, 2016 г.)*. Белгород, 2016. С. 172–174.
4. Гулюкин М. Н. Победить лейкоз можно. *Животноводство России*. 2016. № 2. С. 29–31.
5. Стегний Б. Т., Шаповалова О. В., Горбатенко С. К., Корнейков А. Н., Горжеев В. М. Современные аспекты лейкоза крупного рогатого скота. *Ветеринарна медицина : міжвід. темат. наук. зб.* 2013. Вип. 95. С. 242–255.
6. Россельхознадзор. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации. 2015 год [Электронный ресурс]. Режим доступа : <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2015/files/iac2015.pdf>.
7. Bai L., Yokoyama K., Watanuki S., Ishizaki H., Takeshima S. N., Aida Y. Development of a new recombinant p24 ELISA system for diagnosis of bovine leukemia virus in serum and milk. *Archives of Virology*. 2019. Vol. 164, No. 1. P. 201–211. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4058-5>.

COMPARATIVE DIAGNOSTICS OF CATTLE LEUKEMIA BY ELISA METHOD IN TEST KITS OF VARIOUS CONSTRUCTIONS

Stegniy B. T., Zavgorodnyy A. I., Gorbatenko S. K., Kornieikov O. M., Stegnyy M. Yu., Bolotin V. I.
National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Gorlov Yu. I., Ganova L. O., Chumak O. M., Spivak M. Ya.
PJSC «Scientific and Production Company "Diaproph-Med", Kyiv, Ukraine

The purpose of the work was to carry out comparative analysis of the positive and negative on leukemia cattle blood sera in ELISA kits of different constructions. Research was carried out using "DIA®-BLV-Ab" kit, in which the reaction had been performed in the indirect ELISA, and "ID Screen® BLV Competition" kit in a competitive format. There were used 15 cattle blood sera for testing, in which antibodies to BLV were confirmed in the ID and the ELISA "Bovine leukemia virus antibody test kit" (IDEXX), as well as 10 positive cattle blood sera confirmed in ID, 10 weak positive sera tested in ID and 10 sera with a weak line of precipitate in ID, 34 negative for leukemia blood sera tested in ID, from which 24 were also tested in the ELISA "Bovine leukemia virus antibody test kit". The "DIA®-BLV-Ab" kit and "ID Screen® BLV Competition" kit determined positive 25 blood sera with antibodies to BLV, which were positive in ID, and 15 samples were also confirmed in IDEXX test kit. When analyzing 10 sera, that were weak positive in ID, the "DIA®-BLV-Ab" kit determined 8 sera as positive and 2 samples as negative. The "ID Screen® BLV Competition" kit detected specific antibodies to all sera. When analyzing 14 sera with a weak precipitate line in ID, the "DIA®-BLV-Ab" kit determined 9 samples as positive and 5 as negative. The "ID Screen® BLV Competition" determined specific antibodies in 11 samples. When analyzing 3 sera, the test result was negative in both ELISA kits. The "DIA®-BLV-Ab" kit determined as negative all 34 sera, which were negative in ID, 24 samples from them were negative in IDEXX test kit. In the "ID Screen® BLV Competition" kit 5 false positive results were received. Studies have shown that both test kits have a high diagnostic capacity and detect antibodies to BLV at different concentrations in all positive sera. The "DIA®-BLV-Ab" kit determined 34 sera as negative, in which specific antibodies were absent, and the "ID Screen® BLV Competition" kit identified 5 samples with a false positive result

Keywords: BLV, diagnostics, ELISA kits