

УДК 616:619

ДИАГНОСТИКА ЛЕЙКОЗА МЕТОДОМ ИФА

*Королец Е.А., студент 4 курса факультета ветеринарной
медицины и биотехнологии, ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА
Научные руководители: Колбасова О.Л., доцент, кандидат
биологических наук, ГНУ ВНИИВВиМ;*

*Золотухин С.Н., профессор, доктор биологических наук;
Васильева Ю.Б., доцент, кандидат ветеринарных наук,
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА*

Ключевые слова: ИФА, лейкоз, антиген, антитело.

Работа посвящена диагностике лейкоза методом иммуноферментного анализа у коров.

Лейкоз крупного рогатого скота относится к злокачественным заболеваниям сельскохозяйственных животных и в настоящее время, является одной из наиболее острых общебиологических и социальных проблем. Лейкоз крупного рогатого скота в структуре инфекционной патологии животных в Российской Федерации в последние годы занимает первое место, имея форму энзоотий и опережая такие болезни, как туберкулез и бруцеллез по уровню инфицированности стад.

Ежегодно увеличивается количество неблагополучных пунктов, растет число выявленных инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом животных.

Многочисленные попытки найти способ лечения лейкоза КРС не дали никаких результатов. В настоящее время единственным способом борьбы с болезнью во всем мире является выбраковка больных и инфицированных животных на основании своевременной и точной диагностики.

В ряде регионов России, в том числе и в Ульяновской области, с учетом местных условий, разработаны и успешно реализуются территориальные программы борьбы с лейкозом. Больных животных определяют методом гематологического анализа, инфицированных по обнаружению антител в сыворотках крови с использованием, в основном, серологических тестов.

В Ульяновской области в течении последних лет вирусоносительство лейкозом постоянно росло: в 2005 году составляло 23,8%, 2006

году - 29 %, 2007 году - 34,4 %. Начиная с 2008 года, когда ветеринарная служба области начала конкретно и предметно проводить противолейкозные мероприятия, оно уже составило 20,4 %, в 2009г. сократилось до 12,8%. Аналогичная позиция по выделению гемобольных: в 2005г. процент выявления составлял 1,4%, в 2007 – 0,6%, в 2008г, 2009г. – 0,3%

Разработанная и широко применяемая в ветеринарных лабораториях страны реакция иммунодиффузии в геле агара (РИД) с использованием антигена вируса лейкоза КРС в настоящее время остается основным диагностическим методом, по результатам которого проводят оздоровительные и профилактические мероприятия в неблагополучных по лейкозу хозяйствах. Основными недостатками РИД являются невысокая чувствительность и длительность анализа. Как известно, время анализа этим методом, получившим в свое время в ветеринарной практике название метода Оухтерлони, занимает 2-3 суток, а результат регистрируется визуально по наличию полосы преципитации. Так же РИД можно использовать только на первом этапе мероприятий. В дальнейшем животное, отрицательно реагирующее в РИД необходимо исследовать в ИФА.

Поэтому, особого внимания заслуживает иммуноферментный анализ (ИФА). Он находит широкое применение, поскольку чувствительность метода выше, чем РИД, приблизительно в 100 раз, возможно исследование других биологических жидкостей, например, молока. Это очень важно, так как позволяет судить об эпизоотическом состоянии стада по сборной пробе молока. Более высокая чувствительность, быстрая постановка реакции позволяют считать ИФА современным методом исследования и широко использовать для выделения вирусоносителей на последних стадиях оздоровления стад. Метод ИФА позволяет автоматизировать процесс, то есть уйти от субъективной оценки результатов реакции по сравнению с РИД.

С целью разработки и внедрения средств и методов ветеринарной защиты животных от особо опасных и экзотических болезней, включая зооантропонозы, был создан первый в России специализированный научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии (ВНИИВВиМ).

На базе этого института мы проходили производственную практику.

Целью нашей исследовательской работы являлось проведение диагностики лейкоза крупного рогатого скота на основе метода иммуноферментного анализа (ИФА).

Имуноферментный анализ основан на иммунохимической реакции взаимодействия антиген-антитело и использовании в качестве инди-

катораэтой реакции маркированных ферментами антител или антигенов. Существует две модификации иммуноферментного анализа: непрямой и конкурентный.

Нашей задачей было диагностировать лейкоз у 4-х коров конкурентным иммуноферментным методом с помощью Test- системы для выявления антител – набор ELISA.

Этот набор включает: микропланшет, с адсорбированным в лунках очищенным антигеном вируса лейкоза, концентрат конъюгата (10x), положительный и отрицательный контроли, буферный раствор 2, концентрат промывочного раствора (20x), субстратный раствор, стоп-реагент (0,5 M).

Планшет из 96 лунок трижды обрабатывали промывающим раствором, полностью заполняя лунки и оставляя в них раствор на 1,5 - 2 мин., после тщательно удаляли раствор.

Испытуемым материалом были сыворотки крови крупного рогатого скота №1,2,3,4. Материал вносили по 0,05 мл в лунки E1,F1,G1,H1. Контрольные образцы вносились в двух повторностях.

Положительные контроли в лунки: A1 и B1. Отрицательные в C1 и D1. Затем во все лунки вносили по 0,15 мл раствора в разбавителе антигена, перемешивали содержимое лунок, слегка постукивая по краю планшета, закрывали его крышками и инкубировали во влажной камере 1,5 - 2 часа при температуре от 18°C до 37°C. Следует строго соблюдать указанный порядок внесения испытуемого материала и антигена в лунки. Планшет трижды надо промывать промывающим раствором.

В лунки внесли конъюгат (0,2 мл), закрыли крышкой и инкубировали при температуре от 18°C до 37°C в течение 1,5-2 часов во влажной камере. Планшет трижды промыли промывающим раствором. В каждую лунку внесли по 0,2 мл раствора субстрата ферментативной реакции, инкубировали 0,5-1 час при комнатной температуре.

В случае необходимости останавливали реакцию добавлением специального раствора (STOP-раствор).

После этого измеряли оптическую плотность в каждой лунке на фотометре при длине волны, характерной для данного субстрата. В данной реакции длина волны была поставлена 450 нм.

Исходные данные:

На приборе SUNRISE запрограммировано:

Длина волны 450 нм.

Режим измерения поставлен ОБЫЧНЫЙ.

Длительность встряхивания (Снаружи Обычный): 2 с.

A1	0.146
B1	0.158
C1	1.733
D1	1.713
E1	1.598
F1	1.281
G1	0.107
H1	0.116

Валидация. Результаты теста:

Высчитывали среднее значения ОП положительного и отрицательного контроля.

$$1) 0,146+0,158=0,304/2=0,152$$

$$2) 1,733+1,713=3,446/2=1,723$$

Отношение между этими средними значениями должно быть меньше 0,3.

$$0,152/1,723=0,088 < 0,3$$

2. Среднее значение ОП отрицательного контроля $> 0,7$

Вывод: тест валиден.

Далее провели интерпретацию результатов.

Для каждого образца рассчитали значение S/N.

По формуле: ОП (образца)/ОП(отрицательного контроля) X 100%

$$1. E1 = 1.598/1.723 * 100\% = 92\% (-)$$

$$2. F1 = 1.281/1.723 * 100\% = 74\% (-)$$

$$3. G1 = 0,107/1,723 * 100\% = 6\% (+)$$

$$4. H1 = 0,116/1,723 * 100\% = 6\% (+)$$

Таким образом, получили два положительных результата. Это означает, что антитела выработались у двух коров под номерами №3 и №4.

Библиографический список

1. Гулюкин М.И. Эпизоотологический мониторинг лейкоза крупного рогатого скота / М.И. Гулюкин, Н.В. Замараева, Г.Ф. Коромыслов // Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с лейкозами сельскохозяйственных животных и птиц: тез. докл. Всерос. конф. к 65-летию Свердловской НиВс. Екатеринбург, 2000. С. 44-45.
2. Симонян Г.А. Динамика распространения лейкоза крупного рогатого скота в России / Г.А. Симонян, Ш.А. Магомедов, С.А. Коломиец // Российский ветеринарный журнал. 2007. № 4. С. 26-27.

3. Васильева Ю.Б. Интерактивные формы обучения студентов / Ю.Б. Васильева, И.И. Богданов, С.Н. Золотухин, О.Н. Марьина / Инновационные технологии в высшем профессиональном образовании. Материалы научно-методической конференции профессорско-преподавательского состава академии . - 2013. - С. 39-42.
4. Васильева Ю.Б. Эпизоотология и инфекционные болезни животных / Ю.Б. Васильева, И.И. Богданов / Для студентов по специальности «Ветеринария» / Ульяновск, 2015.
5. Васильева Ю.Б. Биопрепараты для детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова / Инфекция и иммунитет. - 2014. - № 5. - С.70-71.
6. Мухин Е.Б. Разработка препарата на основе бактериофагов / Е.Б. Мухин, Ю.Б. Васильева, А.Г. Семанин, А.В. Загуменнов, Е.И. Суркова / Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны. - 2015. - С. 147-148.
7. Найденова В.А. Инфекции: неизбежность или безответственность? / В.А. Найденова, Ю.Б. Васильева / Студенческий научный форум - 2015. - VII Международная студенческая электронная научная конференция, электронное издание. 2015.
8. Нафеев А.А. Зоонозные инфекции, с природной очаговостью, с позиции эпидемиологического и эпизоотологического диагнозов / А.А. Нафеев, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Ю.Б. Васильева Ю.Б. / Актуальные вопросы ветеринарной науки. Материалы Международной научно-практической конференции. - 2015. - С. 50-53.
9. Нафеев А.А. Оптимизация эпидемиологического надзора с применением современных технологий / А.А. Нафеев / Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2009. - № 2. - С. 57-58.
10. Пирюшова А.Н. Анализ эпизоотической ситуации по карантинным инфекциям / А.Н. Пирюшова, Ю.Б. Васильева / Студенческий научный форум -2014. - VI Международная студенческая электронная научная конференция: Электронное издание. 2014.
11. Пирюшова А.Н. Особо опасные инфекции из-за рубежа / А.Н. Пирюшова, Ю.А. Журавкова, Ю.Б. Васильева / Студенческий научный форум - 2015. VII Международная студенческая электронная научная конференция, электронное издание. 2015.
12. Пульчеровская Л.П. Организация самостоятельной работы студентов при изучении клинических дисциплин кафедры МВЭ и ВСЭ / Л.П. Пульчеровская, Н.И. Молофеева, Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев / Инновационные технологии в высшем профессиональном образо-

- вании. Материалы научно-методической конференции профессорско-преподавательского состава академии. - 2015. - С. 144-146.
13. Семанин А.Г. Комплексный биопрепарат на основе фагов / А.Г. Семанин, Е.И. Суркова, А.С. Скорик, Ю.Б. Васильева / Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии. материалы I международной научно-практической конференции. - 2014. - С.79-82.
14. Семанин А.Г. Разработка селективной добавки для выделения возбудителя респираторной инфекции / А.Г. Семанин, Ю.Б. Васильева, А.В. Загуменнов, Е.Б. Мухин / Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны. - 2015. - С.196-197.

DIAGNOSIS OF A LEUKOSIS BY IFA METHOD

Korolets E.A.

Keywords: IFA, leukosis, antigen.

Work is devoted to diagnosis of a leukosis by method of the immunofluorescent analysis at cows.