the intestinal contents was analyzed. It has been found that the liquid component of the intestinal mass has much more intense movements including those in the oral direction of the intestinal tube. Theoretically, if there is a local inflammation, the accumulation of fluid may results in dissemination of the inflammation source throughout the gastrointestinal tract. The mixing processes and the rate of excretion of fluorescent labels in the lumen of the intestines (as a component of feces) and in the edge zone of the intestinal tube differ significantly, and the dyes remain in the mucosa of the small intestine after 4–5 hours after administration.

Keywords: the intestines, motility of the gastrointestinal tract, intestinal infections.

УДК 619: 578.828.11:616-079.4

Н.Г. ДВОЕГЛАЗОВ, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник,
В.В. ХРАМЦОВ, доктор ветеринарных наук, заведующий лабораторией,
Т.А. АГАРКОВА, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник,
Н.А. ОСИПОВА, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока
e-mail: lableucosis@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРИМЕНЕНИЯ ИФА И РИД ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Представлены результаты сравнительного анализа практического использования двух методов диагностики – реакции иммунодиффузной преципитации (РИД) и иммуноферментного анализа (ИФА) при проведении оздоровительных мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота. Диагностические исследования на инфекцию, вызванную вирусом лейкоза крупного рогатого скота, проводили на базе лаборатории лейкозов Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск). Сравнительный анализ осуществлен на большом поголовье крупного рогатого скота из хозяйств с разной степенью распространения инфекции. Установлено, что практически всегда при помощи ИФА дополнительно выявляются животные, не установленные в РИД. Показаны преимущества ИФА перед РИД. Более высокие показатели чувствительности ИФА позволяют дополнительно к результатам РИД выявлять до 15,3 % вирусоносителей. При использовании ИФА возможно использовать в качестве материала для исследования как индивидуальные, так и сборные пробы молока и сыворотки крови. Процедура проведения анализа и учета результатов может быть автоматизирована. Время получения результатов при проведении иммуноферментного анализа занимает несколько часов в отличие от нескольких дней, необходимых при постановке РИД. Сделано заключение о том, что методика иммуноферментного анализа более затратна в сравнении с реакцией иммунодиффузной преципитации, однако благодаря преимуществам ИФА происходит сокращение кратности исследований и сроков оздоровления стада от лейкоза.

Ключевые слова: лейкоз крупного рогатого скота, диагностические исследования, реакция иммунодиффузной преципитации, иммуноферментный анализ.

Лейкоз – самая распространенная инфекционная болезнь крупного рогатого скота в Российской Федерации. Для эффективной борьбы с ним необходимо осваивать и использовать в практике современные методы диагностики, к которым относится иммуноферментный анализ (ИФА). Возможность применения ИФА при диагностике лейкоза крупного рогатого скота отражена в нормативных документах, однако на практике основу диагностических серологических исследований в настоящее время, как и

20 лет назад, составляет реакция иммунодиффузной преципитации. При наличии определенных плюсов РИД все же во многом уступает более современной и технологичной методике ИФА.

Цель исследования – провести сравнительный анализ применения иммуноферментного анализа и реакции иммунодиффузной преципитации при диагностике лейкоза крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Диагностические исследования на инфекцию ВЛКРС проводили на базе лаборатории лейкозов Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск). В работе применяли следующие методы: реакцию иммуннодиффузии в геле агара (производство ФГУП «Курская биофабрика – фирма «Биок»», Россия) и иммуноферментный анализ (производство ООО «Ветбиохим», Россия и Idexx, США). В качестве материала для исследования использовали образцы молока от коров и сыворотку крови от крупного рогатого скота разных половозрастных групп.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оба метода – РИД и ИФА – служат для выявления специфических противовирусных антител в биологическом материале, полученном от животных. Для более наглядного представления различий этих методов данные распределены по разделам, каждый из которых отражает отдельный аспект исследования.

Материальные затраты на проведение диагностического исследования. По временным и трудовым затратам исследование проб в ИФА сопоставимо с таковыми при проведении РИД. Однако стоимость исследования одной пробы в ИФА в среднем в 5 раз дороже, чем в РИД, что обусловлено ценой наборов. Для проведения ИФА также требуется специализированное оборудование: термостат-шейкер, ридер и набор микродозаторов, что еще больше повышает стоимость диагностики [1].

Чувствительность и специфичность. Из литературных источников известно, что чувствительность РИД не превышает 85–90 % при специфичности 85–99 %. Чувствительность ИФА зависит от фирмы-производителя и может достигать 100 %. Специфичность ИФА – от 97 до 100 % [2–4].

В международной практике распространена стандартизация серологических тест-систем по контрольной сыворотке Е4. Так, для всех наборов РИД нормой является выявление Е4 в разведении не менее 1 : 10. При сравнительных испытаниях различных вариантов ИФА получены следующие показатели: предел выявления для непрямого ИФА – разведение 1 : 800, для моноклонального – 1 : 1000 и для блокирующего – 1 : 2400 [5].

В таблице приведены в сопоставлении объединенные данные результатов РИД и ИФА на группах крупного рогатого скота из нескольких неблагополучных по лейкозу хозяйств.

Результаты исследований проб сыворотки крови в РИД и ИФА

Группа животных	Число животных	ИФА			
		(+)		(–)	
		Число	%	Число	%
РИД (+)	1351	1351	100	–	–
РИД (–)	14890	849	5,7	14041	94,3

При рассмотрении табличных данных можно увидеть, как преобразуется разница в пределах чувствительности РИД и ИФА. На обобщенных данных количество дополнительно к результатам РИД выявленных положительно реагирующих животных составило 5,7 %. Диапазон дополнительно выявленных при помощи ИФА инфицированных животных из числа отрицательных в РИД варьировал от 1,5 до 15,3 %. Анализ, выполненный на большом поголовье крупного рогатого скота из хозяйств с разной степенью распространения инфекции, свидетельствует о том, что практически всегда при помощи ИФА дополнительно выявляются животные, не установленные в РИД. Это связано с относительно низким пределом чувствительности РИД, недостаточным для регистрации иммунного ответа с невысоким уровнем антител.

Процедура постановки, учет реакции, возможность автоматизации этапов. Проведение диагностических исследований могут осуществлять как специалисты лабораторий с высшим специальным образованием, так и лаборанты, прошедшие специальную подготовку. Процедура постановки ИФА может несколько варьировать в зависимости от производителя тест-систем.

Результаты РИД учитывают через 48 ч, т.е. между поступлением материала (сыворотки) в лабораторию и получением результатов в среднем проходит 3 дня, в то время как в ИФА возможно узнать результат в день поступления материала, так как постановка анализа занимает примерно 4 ч. Данный аспект ИФА-диагностики является позитивным фактором при необходимости оперативно установить серологический статус животного.

Учет при проведении РИД проводят только визуально, поэтому при оценке характера линии преципитации исключительно важную роль играет опыт исследователя.

При проведении ИФА предусмотрен как визуальный, так и инструментальный учет реакции. При относительной простоте визуальной оценки реакции использование специального оборудования (ридера) позволяет получить максимально объективные данные, что наиболее актуально при дифференциации проб, сигнал которых находится близко к показателям «серой зоны», т.е. при интерпретации слабоположительных проб [6].

При проведении ИФА также существует возможность полностью автоматизировать всю процедуру проведения анализа [7].

Возможность использования в качестве материала для диагностики молока и молозива. Отдельного внимания заслуживает возможность использования в качестве материала для исследования в ИФА молока или молозива коров. Отбор проб при этом можно проводить совместно с про-

цедурой доения, что не требует дополнительных усилий по фиксации животных и манипуляций, необходимых при отборе проб крови. Также снимается фактор стресса дойных коров (который может негативно влиять на уровень удоев) от забора образца крови.

Результаты исследования проб молока в сопоставлении с результатами исследования проб сыворотки от одних и тех же животных полностью совпадают.

Возможность использования сборных проб. Высокая чувствительность ИФА в отличие от РИД позволяет эффективно исследовать пулы сывороток и молока, полученные от животных отдельного стада. С помощью ИФА можно выявлять стада, в которых уровень инфицированности не превышает 1–2,5 % [8, 9]. В связи с этим ИФА удобен для систематического контроля благополучных хозяйств, а также для оценки эпизоотической обстановки по ВЛКРС-инфекции.

Нами разработаны схемы рационального применения ИФА со сборными пробами сыворотки крови и молока. Комбинированное применение РИД и ИФА со сборными пробами позволяет, с одной стороны, снизить затраты на диагностику, проводимую с использованием ИФА, с другой – сохранить уровень чувствительности и все преимущества иммуноферментного анализа [1, 10].

ВЫВОДЫ

1. ИФА по отношению к РИД имеет ряд преимуществ: более высокую чувствительность и специфичность; быстрое получение результатов; возможность использования в качестве материала для исследования как индивидуальные, так и сборные пробы молока и сыворотки крови; возможность автоматизации и получения объективной оценки.

2. Из недостатков можно отметить более высокую стоимость исследования проб, связанную с ценой на набор, и необходимость специального оборудования.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. **Двоеглазов Н.Г.** Варианты диагностики ВЛКРС-инфекции с использованием ИФА со сборными пробами сыворотки крови // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2011. – № 1. – С. 93–98.
2. **Simard C., Richardson S., Dixon P. et al.** Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency // Can. J. Vet. Res. – 2000. – Vol. 64. – P. 101–106.
3. **Trono K.G., Perez-Filgueira D.M., Duffy S. et al.** Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods // Vet. Microbiol. – 2001. – Vol. 83. – P. 235–248.
4. **Choi K.Y., Liu R.B., Buehring G.C.** Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle // J. Virol. Methods. – 2002. – Vol. 104. – P. 33–39.
5. **Hoff-Jorgensen R.** An international comparison of different laboratory tests for the diagnosis of bovine leukosis: Suggestions for international standardization // J. Virol. Methods. – 2004. – Vol. 115, N 2. – P. 167–175.
6. **Двоеглазов Н.Г.** Проблема интерпретации сомнительных по результатам РИД проб в диагностике инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота // Адаптация, здоровье и продуктивность животных: сб. науч. тр. – Новосибирск, 2008. – С. 81–82.
7. **Иммуноферментный** анализ при диагностике инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота: метод. реком. – Новосибирск, 2008. – 48 с.

8. **Klintevall K., Nasland K. , Svedland G. et al.** Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum // J. Virol. Methods. – 1991. – Vol. 33. – P. 319–333.
9. **Gutierrez S.E., Dolcini G.L., Arroyo G.H. et al.** Development and evaluation of a highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle // Am. J. Vet. Res. – 2001. – Vol. 62. – P. 1571–1577.
10. **Рациональное** применение ИФА с использованием групповых проб сыворотки крови и молока крупного рогатого скота для контроля эпизоотического благополучия по лейкозу: метод. пособие. – Новосибирск, 2012. – 14 с.

Поступила в редакцию 04.02.2014

N.G. DVOEGLAZOV, Candidate of Science in Veterinary Medicine, Senior Researcher,
V.V. KHRAMTSOV, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Laboratory Head,
T.A. AGARKOVA, Candidate of Science in Veterinary Medicine, Senior Researcher,
N.A. OSIPOVA, Candidate of Science in Biology, Senior Researcher

Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East
e-mail: lableucosis@mail.ru

COMPARATIVE ANALYSIS OF APPLICATION OF ELISA AND AGID IN DIAGNOSING BOVINE LEUKOSIS

Results are given from a comparative analysis of the two methods for diagnosis – agar gel immunodiffusion (AGID) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) – used in carrying out sanitation measures against bovine leukosis. Diagnostic tests for BLV infections were conducted using the facilities of the Leukosis Laboratory at the Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Novosibirsk. The comparative analysis was carried out on large cattle population from livestock farms with various rates of the spread of bovine leukosis. It has been found that the ELISA test practically always reveals animals not detected by AGID. Advantages of ELISA over AGID are shown. The higher sensitivity rates in ELISA allow detecting up to 15.3% of virus carriers in addition to the AGID results. In ELISA, both individual and combined samples of milk and blood serum can be used as the research material. A procedure of carrying out the analysis and recording results can be automated. Results of ELISA tests can be obtained within a few hours unlike AGID tests, where it takes several days. It has been concluded that the ELISA technique is more expensive as compared with AGID but, thanks to its advantages, reduces rate of tests and terms of sanitation of cattle herds against leukosis.

Keywords: bovine leukosis, diagnostic tests, agar gel immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay.