

ДП «Науково-технічний центр імунобіотехнологій»
НТК „Інститут монокристалів” НАН України
Науково-виробнича компанія “Діапроф-Мед”

ПРАКТИЧНИЙ ПОСІБНИК

**для роботи з імуноферментною тест-системою
для визначення антитіл
проти вірусу лейкозу великої рогатої худоби
(„DIA-BLV-Ab”)**

Київ - 2005

УДК 578.76:616.155.392

Практичний посібник для роботи з імуноферментною тест-системою для визначення антитіл проти вірусу лейкозу великої рогатої худоби "DIA-BLV-Ab".

Під редакцією професора Співака М.Я.

Автори: Ганова Л.О., Раєвська Г.Є., Іванська Н.В., Резуненко Є.В. Зоценко В.Н.

Для ветеринарів, лікарів-лаборантів ветеринарного профілю, епідеміологів, вірусологів, біологів, студентів вищих навчальних закладів та аспірантів.

Київ, "Діапроф-Мед", 2005

Скорочення, використані в тексті посібника:

АГ – антиген;
 АТ – антитіло;
 ВЕЛ ВРХ – вірус ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби;
 ВОЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;
 ВРХ – велика рогата худоба;
 ГЗ – граничне значення (оптичної густини);
 ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;
 ЕЛ ВРХ – ензоотичний лейкоз великої рогатої худоби;
 ІФА – імуноферментний аналіз;
 кДа – кілодальтон;
 кДНК – комплементарна ДНК; ДНК – 3 послідовність, комплементарною до (віріонної) РНК;
 ЛПС – ліпополісахарид;
 МЕБ – Міжнародне епізоотичне бюро;
 МКА – моноклональні антитіла;
 ММ – молекулярна маса;
 МОЗ – Міністерство охорони здоров'я;
 НДІ – науково-дослідний інститут;
 ОГ – оптична густина;
 ОГ_{сер} К⁻ – середнє значення оптичної густини для проб негативного контролю;
 ОГ_{сер} IgG К⁺ та ОГ_{сер} IgA К⁺ – середні значення оптичної густини для проб позитивного контролю;
 ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;
 о.о. – оптична одиниця;
 РІДА – реакція імунодифузії в агарі;
 РІФ – реакція імунофлуоресценції;
 РНІФ – реакція непрямой імунофлуоресценції;
 РНК – рибонуклеїнова кислота;

РПФ – реакція прямої імунофлуоресценції;
 РФК – реакція фіксації комплекента;
 ТІФА – твердофазний імуноферментний аналіз;
 ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
 BLV (bovine enzootic leucosis virus) – вірус ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби (ВЕЛі ВРХ);
 CDC (U.S.A. Centers for Disease Control and Prevention) – Центри США з проблем контролю та попередження захворювань;
 CV – коефіцієнт варіації;
 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазний імуноферментний аналіз (ТІФА);
 FDA (USA Food and Drug Administration) – Агенція (державне управління) США з питань продовольства та медикаментів;
 HTLV-1 and HTLV-2 (human T-lymphotropic virus 1, -2) – Т-лімфотропні віруси людини 1 та 2.;
 IgA, IgG, IgM – імуноглобуліни класів А, G та M, відповідно;
 Office Internationale des Epizooties – Міжнародне епізоотичне бюро (МЕБ).

– Ветеринарна медицина (міжвідомчий тематичний науковий збірник). – Харків. – 2004. – Т. 84. – с.126-129

4. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьёв Б.В., Фомина Н.В. Лейкоз крупного рогатого скота. – В кн.: «Вирусные болезни животных». – М.: ВНИТИБП. – 1998. – с. 383-406.
11. Уразаев Н.А. Биогеоценоз и болезни животных. – М.: «Колос». – 1978. – 208 с.
5. Anonymous. The modifications of Technical Annexes of Council Directive 64/432/EEC to take account of Scientific Developments regarding tuberculosis, brucellosis and enzootic bovine leucosis. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Sanco/B3/R10/1999; European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General/ Directorate B – Scientific Health Opinions/ Unit B3 – Management of scientific committees II.
6. Klasse P.J. and Sattentau Occurance and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses, *Journal of General Virology*, V.83, 2002, p.2091-2108.
7. Lucas M.H.. Enzootic bovine leucosis. In the: “OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines”. France, Paris. – 1996. – p.p.276-280.
- Ollis G.W. Enzootic bovine leucosis. – <http://www.agric.gov.ab.ca/agdex/600/63-07.html> – 22.09.2000.
8. Renström L. Enzootic bovine leucosis. In the: “OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines”. France, Paris. – 2000 – p.p.371-380.
10. Szczołka M., Rulka J. Alteration in lymphocyte subpopulations in bovine leukemia virus infected cattle. – Ветеринарна медицина (міжвідомчий тематичний науковий збірник). – Харків. – 2004. – Т. 84. – с.123-126.
11. Szczołka M., Kawaiaк M., Winnicka A., Rulka J. Determination of lymphocyte subsets, PCNA activity and BCL-2 in experimental infection with bovine leukemia virus (BLV).

Вступ

За даними Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ, Office Internationale des Epizooties, OIE), ензоотичний лейкоз великої рогатої худоби (ЕЛ ВРХ) належить до істотних та досі остаточно не вирішених проблем сільського господарства та ветеринарії у багатьох країнах світу, де розвивається промислове тваринництво. У відносно благополучних господарствах України лейкозом уражено біля 30-36 % поголів'я ВРХ (Павленко и др., 2002). Те саме можна сказати й щодо частоти розповсюдження лейкозу ВРХ в інших країнах (Klasse & Sattentau, 2002). Недуга перебігає як ензоотичне захворювання та охоплює в першу чергу корів з високими надоями, імунна система яких досить ослаблена. Якщо хвороба проходить без яскраво виражених ознак, інфіковане молоко передається на молокозаводи. При пастеризації збудник у молоці знезаражується, але там лишаються певні канцерогенні речовини (Klasse & Sattentau, 2002). Отже, споживання продукції від корів, уражених вірусом ензоотичного лейкозу ВРХ (ВЕЛ ВРХ), може мати певний небажаний вплив на здоров'я людини.

Лікування для хворих на лейкоз тварин відсутнє. Особин, у яких при обстеженні виявлено зараження лейкозом, відправляють на вимушений забій. 5-10 % уражених тварин гинуть раптово без попередніх проявів хвороби. Тому зрозуміло, що ЕЛ ВРХ заподіює господарствам певних економічних збитків, пов'язаних з вилученням інфікованих тварин зі стада, та стоїть на перешкоді до вдосконалення промислового тваринництва. Крім того, додаткові економічні втрати від лейкозу ВРХ обумовлені також заборною продавати та експортувати хворих тварин. Всі ці обставини свідчать про необхідність

своєчасного виявлення хворих особин та забезпечення належної діагностичної роботи на фермах.

Етіологія

Збудник лейкозу ВРХ – вірус лейкемії (лейкозу) ВРХ (ВЕЛ ВРХ – *bovine leukemia virus, bovine leucosis virus, BLV*), що входить до підродино *Oncovirinae* родини *Retroviridae* та належить до групи С пухлинних вірусів, патогенних для ссавців. Показано, що структурно та функціонально ВЕЛ ВРХ споріднений з відомими Т-лімфотропними вірусами людини (HTLV-1 та HTLV-2) (Сергеев и Орлякин, 1993; Сюрин и др., 1998; Renström, 2000). Встановлено, що віруси цієї групи викликають у чутливих тварин виникнення сарком та лейкозів. Лімфосаркоми у ВРХ можуть бути викликані також іншими чинниками, але єдиний досі відомий збудник ензоотичного лейкозу цих тварин – це саме ВЕЛ ВРХ.

Зрілі віріони лейкозу сферичної форми, діаметр яких становить 73-120 нм (Сюрин и др., 1998; Renström, 2000). Вірусна часточка складається з капсида (core) у центрі, проміжного шару та ліпидовмісної зовнішньої оболонки, на поверхні якої під електронним мікроскопом видно характерні виступи завдовжки 8-11 нм. Вони утворені глікозилітованими білками gp51 та gp28 (gp30), відповідальними за типоспецифічність вірусу. Загалом же у часточках ВЕЛ виявлено шість основних білків з молекулярними масами від 10 до 51 кДа. Чотири неглікозилітованих білків (p24, p15, p12 та p10) входять до серцевини віріону, найбільша кількість серцевинного білку припадає саме на долю антигену p24. Як у всіх ретровірусів, серцевина ВЕЛ містить дві тогोजні молекули одноланцюгової вірусної РНК (60-70 S), що зв'язані між

Література

1. Анонім. План основних заходів щодо оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу в Україні на 1996-2000 р.р./ Ветеринарна медицина України, 1997, № 1, с.36-42.
Бусол В.О., Постой В.П., Бондаренко Д.І., Козаченко О.І. Закономірності епізоотичного процесу при лейкозі великої рогатої худоби. – Ветеринарна медицина (міжвідомчий тематичний науковий збірник). – Харків. – 2004. – Т. 84. – с. 155-160.
Горбатенко С.К., Семенченко О.Ю., Цимбал В.І., М'ягих Н.В., Зданевич П.П., Корнейков О.М. Розробка алергену для діагностики лейкозу великої рогатої худоби. – Ветеринарна медицина (міжвідомчий тематичний науковий збірник). – Харків. – 2004. – с.255-258.
Нагаєва Л.І., Аранчій С.В., Синицин В.А., Стародуб М.Ф., Добросол Г.І., Нагаєва Г.Г. Діагностика та профілактика лейкозу великої рогатої худоби. – Бібліотека ветеринарної медицини. – К.: 2003. – №№ 9-12. – 64 с.
3. Павленко С., Говдин А.К., Миролубова А., Изучение возможности выявления носительства ВЛКРС у телят 6-месячного возраста. Международный сельскохозяйственный журнал, № 4, 2002, с.53-58.
Сергеев В.А., Орлякин Б.Г. Структура и биология вирусов животных. М., "Колос", 1983, 336 с. (с.311-313).
8. Спивак Н.Я., Ганова Л.А., Стегний Т.Б., Киприч В.В., Синицын В.А. Иммуноферментная система для диагностики лейкоза крупного рогатого скота. – Ветеринарна медицина (міжвідомчий тематичний науковий збірник). – Харків. – 2004. – Т. 84. – с. 641-646.

до свого імпортного аналога виробництва VMRD, Inc. (США), широко застосовуваного у світі для діагностики лейкозу. Характеристики якості тест-системи «DIA-BLV-Ab» дають змогу використовувати її при скринінгових дослідженнях на присутність у ВРХ антитіл проти ВЕЛ. Простота постановки реакції, швидкість проведення аналізу, автоматичний облік отриманих результатів складають перевагу даного тесту в порівнянні з РІДА при середіагностиці ВЕЛ ВРХ.

собою в області 5'-кінців. Ці РНК – носії вірусної генетичної інформації, яка реалізується при проникненні вірусу в клітини-мішені при участі присутньої у віріонах зворотної транскриптази.

Поza організмом ВЕЛ досить швидко інактивує, хоча й може заражати чутливих тварин через недавно забруднені корми (Lucas, 1996; Сюрин и др., 1998; Renström, 2000). ВЕЛ не стійкий проти температурних впливів (при температурі 56 °С він інактивується вже через 15 хв.), легко втрачає здатність заражати клітини після заморожування та розморожування. У сирому молоці вірус зберігається протягом 18 днів при кімнатній температурі, у розбавленому (до 37,7 %) – вже лише 12 год. Зниження кислотності молока до значень рН 4,5 не знезаражує збудника протягом 2 год. Поширені дезінфектанти досить швидко призводять до інактивації ВЕЛ (пряме сонячне проміння – через 4 год., 0,5 % NaOH – через 30 хв., 2 % етанол – через 4 год., 0,5 % формальдегід – через 8 год., 0,5 % фенол – через 72 год. (Бусол та ін., 2004). Однак лімфоцити з провірусною ДНК зберігають контагіозність протягом декількох років у рідкому азоті.

Патогенез ВЕЛ ВРХ

Проникнення вірусу в клітину відбувається після декількох поступових етапів взаємодії його з клітинними рецепторами. Спершу вірус впізнає специфічну рецепторну структуру на поверхні клітини-мішені. Після цього відбувається злиття вірусної оболонки з клітинною мембраною, проникнення вірусу в цитоплазму та „роздягання” його. Як це взагалі типове для ретровірусів, у випадку зараження ВЕЛ під дією зворотної транскриптази

на матриці віріонної РНК відбувається синтез вірусоспецифічної комплементарної ДНК (кДНК), тобто провірусної ДНК. Ця ДНК вбудовується в геном клітини-хазяїна, що призводить до неопластичної трансформації цієї клітини. Разом з тим у деяких клітинах (перш за все – клітинах крові) внаслідок розмноження вірусу відбувається синтез віріонної РНК на матриці до ДНК, синтез вірусоспецифічних білків та утворення вірусних часточок. Віріони виходять з клітини, відбрункуючись від клітинної оболонки.

Розвиток лейкозу, викликаний ВЕЛ ВРХ, мабуть обумовлено вбудовуванням провірусної ДНК у клітинний геном та наступною активацією сусіднього клітинного гена (онкогена) під впливом вірусного промотора, розташованого у правій кінцевій області інтегрованої провірусної ДНК (Сюрин и др., 1998). Не виключена, крім того, також можливість непрямої активації клітинних онкогенів, віддалених від інтегрованої провірусної ДНК (Renström, 2000).

Клінічні ознаки лейкозу у корів включають втрату апетиту, схуднення, зниження надойв молока, набухання зовнішніх та внутрішніх лімфатичних вузлів, частковий параліч задніх кінцівок, підвищення температури, порушення дихання, вип'ячення очей, розлади травлення - проноси чи запори (Нагаєва та ін., 2003).

В зараженому організмі відбувається також накопичення трансформованих клітин, які можна знайти при гематологічних обстеженнях периферичної крові (Нагаєва та ін., 2003).

Може відбуватися активне розмноження вірусу та зараження нових клітин. Багато що при цьому залежить від імунної відповіді організму та від активності

мікроорганізмів Міністерства аграрної політики України (м. Київ) та на стандартній позитивній сироватці E4 виробництва Національної ветеринарної лабораторії Данії (National Veterinary Laboratory, Copenhagen, Denmark). Результати тестування зразків в РІДА та ПІП подано в таблиці 3 з паспортних даних для панелей сироваток.

Таблиця 3. Результати оцінки якості тест-системи «DIA-BLV-Ab» на стандартних панельних сироватках Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів та міжнародному стандартному позитивному зразку E4

Сироватки	Всього сироваток	Кількість позитивних результатів реакції		
		РІДА	ПІП	ІФА «DIA-BLV-Ab»
позитивні до ВЕЛ ВРХ	33	33	33	33
негативні до ВЕЛ ВРХ	29	0	0	0
стандартна позитивна E4	1	1	1	1

При дослідженні даних зразків на тест-системі «DIA-BLV-Ab» сироватки, які містять антитіла до ВЕЛ ВРХ, діагностувалися як позитивні, а зразки, що не містять специфічних антитіл, – як негативні.

Таким чином, діагностична тест-система «DIA-BLV-Ab», призначена для виявлення антитіл класу IgG до ВЕЛ ВРХ, за своїми показниками інформативності близька

Із 43 зразків сироваток, позитивних в РІДА, за допомогою тест-системи «DIA-BLV-Ab» антитіла класу IgG до ВЕЛ були виявлені в усіх пробах, а з 41 зразка, негативного в РІДА, за допомогою ІФА на тест-системі «DIA-BLV-Ab» в 2 зразках виявлено антитіла до ВЕЛ. У 5 сироватках, які містять антитіла, що можуть давати хибно-позитивні результати при серодіагностиці лейкозу (це антитіла проти збудників трихінелёзу, інфекційного ринотрахеїту, вірусної діареї)¹, при аналізі на тест-системі «DIA-BLV-Ab» антитіл проти ВЕЛ ВРХ не виявлено. З отриманих результатів видно, що в порівнянні з РІДА чутливість та специфічність тест-системи «DIA-BLV-Ab» складає, відповідно, 95,3% і 95,1%. Однак необхідно підкреслити, що облік результатів РІДА проводиться візуально і може дати похибку при недостатній фаховій підготовці дослідника. При проведенні ІФА результати реакції фіксуються в автоматичному режимі, що запобігає від помилок. Оскільки тест-система «DIA-BLV-Ab» виявляє в досліджуваному матеріалі антитіла до р24 та до гр51 ВЕЛ ВРХ, то вона дає змогу виявляти не лише більш ранні специфічні антитіла до ВЕЛ, але й субкласи IgG антитіл, які не визначаються в РІДА.

Оцінку показників інформативності тест-системи «DIA-BLV-Ab» було також проведено на ВЕЛ-позитивних та ВЕЛ-негативних сироватках, які входять до складу стандартних панелей виробництва Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів

цитотоксичних Т-лімфоцитів. Розвиток інфекції супроводиться наростанням кількості В-клітин у крові, які виражають антиген CD5. У той же час посилений синтез імунодомінантного антигену гр51 відбувається, головним чином, у клітинах CD19.

Важливо зазначити, що у ВРХ, інфікованої ВЕЛ, не обов'язково розвиваються прояви хвороби (лейкоз та лімфосаркома). Це один з тих випадків, коли між зараженням та розвитком хвороби ніяк немає прямого беззастережного зв'язку. Лише у біля 5 % заражених тварин, що гинуть від лімфосаркоми утворюються пухлини. Клінічні ознаки цієї хвороби довго (протягом 1-8 років, за іншими даними – до 4-8 років після зараження, або пожиттєво) лишаються непоміченими (Szczotka & Rulka, 2004; Szczotka et al., 2004). У більшості тварин спостерігається латентна та персистентна хвороба з хронічним перебігом. При цьому вірус часто присутній в заражених лімфоцитах у непродуктивному стані і, отже, цілковито захищений від впливу антитіл.

Епідеміологія ВЕЛ ВРХ

Як вже зазначено, у природних умовах ВЕЛ викликає злюккісне захворювання кровотворної тканини ВРХ.. ВЕЛ поширений на всіх континентах. Багато дослідників вважають, що природна інфекція буває лише у ВРХ. На думку деяких авторів (Lucas, 1996; Renström, 2000), природна інфекція на лейкоз зустрічається також у овець, водяних буйволів та південноамериканських водосвинок. За даними Сюріна та співав. (1998), ВЕЛ у природних умовах може вражати також шведських лосів та зебу.

¹ Йдеться, мабуть, про детальніше не досліджені антитіла проти спільних епітопів, які через наявність антигенної мімікрії бувають присутні у дуже віддалених організмів. Крім того, різні віруси, що заражають ВРХ, можуть запозичати при розмноженні в бичачих клітинах близько споріднені антигени хазяїна.

Експериментальне зараження намагалися викликати у тварин багатьох видів. У свиней та коней ВЕЛ не викликає ані хронічної, ані гострої інфекції, тоді як у заражених овець хвороба звичайно розвивається в хронічній, а іноді й у гострій формі. Є дані, що лейкозний процес у заражених мишей проявляється в пухлинній формі і супроводиться розвитком вторинного імунodefіциту (Бусол та ін., 2004). За даними цих авторів, лабораторною моделлю для вивчення лейкозу ВРХ можуть бути кролі, у яких антитіла, виникають через 28-35 днів після зараження ВЕЛ. Молекулярно-біологічні дослідження доводять при цьому, що ВЕЛ не розмножується в цих тварин у клітинах нелімфоїдного походження.

Старі тварини чутливіші до зараження, ніж молодняк. Дослідження показують, що хвороба активніше поширюється влітку. Припускають участь у передачі інфекції комах-кровососів як механічних переносиків (Renström, 2000).

Кров – найпоширеніше джерело лейкозної інфекції. Тому зараження на молочних фермах, тобто в частково штучних умовах, може передаватися через нестерильні голки (при вакцинації та при проведенні інших ветеринарних маніпуляцій), через забруднені інфікованою кров'ю інструменти, якими користуються ветеринари, щоб полегшити отелення корів, а також інструменти для зрізування рогів, таврування та татуювання худоби (Ollis, 2004).

Найважливіше значення для розповсюдження інфекції мають заражені тварини до появи проявів хвороби та клінічно здорові (протягом дуже тривалого часу або й пожиттєво) носії вірусу. Виділяючи вірус у довілля, вони сприяють його передачі здоровим тваринам насамперед

47	-	0,7	0,3
48	-	0,4	0,3
49	-	0,8	0,7
50	-	0,4	0,4
51	-	0,3	0,5
53	-	0,3	0,4
54	-	0,4	0,4
55	-	0,7	0,4
56	-	0,3	0,4
721	-	0,2	0,1
722	-	0,7	0,5
723	-	0,3	0,2
724	-	0,3	0,3
725	-	0,5	0,3
726	-	0,5	0,3

Таблиця 2. Оцінка показників інформативності тест-системи «DIA-BLV-Ab» в порівнянні з РІДА

Сироватки ВРХ з діагнозом:	Кількість зразків	Метод дослідження, позитивні дані	
		РІДА	«DIA-BLV-Ab»
ЕЛ	43	43	41
трихінельоз	1	0	0
інфекційний ринотрахеїт	1	0	0
ротавірусна діарея	1	0	0
діарея іншого походження	2	0	0

Таблиця 1. Результати порівняння різних тест-систем для визначення антитіл проти ВЕЛ при дослідженні сироваток крові ВРХ

Сироватки	Тест	
	РІДА	ІФА, ОГ/ГЗ Test Kit, VMRD, «DIA- Inc., США BLV-Ab»
4	+	6,3 3,8
5	+	5,9 3,4
6	+	5,2 4,2
7	+	4,9 3,3
8	+	3,5 2,6
9	+	3,9 2,6
10	+	3,9 1,3
12	+	6,4 3,2
13	+	4,2 3,1
14	+	4,3 2,5
17	+	6,4 4,1
24	+	4,5 2,1
29	+	5,2 2,4
60	+	4,7 2,9
61	+	4,2 2,1
62	+	2,8 1,5
63	+	2,7 1,9
25	-	0,1 0,1
27	-	0,4 0,2
31	-	0,6 0,8
34	-	0,4 0,3
42	-	0,4 0,1
46	-	0,5 0,4

через заражені корми. Розповсюдження контактної інфекції ВРХ залежить від умов утримання: що тісніші контакти поміж тваринами, то швидше передається хвороба іншим особинам. При горизонтальній передачі збудник звичайно поширюється всередині популяції в результаті контактів поміж тваринами різного віку завдяки забрудненню вірусом довілля (Бусол та ін., 2004).

Крім горизонтальної, встановлено також вертикальну передачу лейкозу (Lucas, 1996; Сюрин та ін., 1998; Renström, 2000; Нагаєва та ін., 2003; Бусол та ін., 2004). Доведено його проникнення від зараженої вагітної корови до плоду. Як вважають, ВЕЛ у ряді випадків здатен подолати плацентарний бар'єр (Нагаєва та ін., 2003). Встановлено, що у господарствах, де виявлено лейкоз ВРХ, інфікована лише деяка частина телят (біля 20 %), народжених від заражених корів. Оскільки вірус знайшли в молозиві та у молоці, зрозуміло, що ці секрети можуть відігравати певну роль у розповсюдженні ВЕЛ (Нагаєва та ін., 2003), передаючи інфекцію телятам після народження. Отже, вертикальна передача ВЕЛ значно сприяє його поширенню в популяції ВРХ та посилює можливість його збереження в природі.

Таким чином, епідеміологічні дослідження (Lucas, 1996; Renström, 2000; Нагаєва та ін., 2003) чітко показують, що джерелом інфекції в природних умовах стають хворі тварини на всіх стадіях недуги. Вірус міститься у крові, молоці, різних секретах та екскретах, особливо в таких випадках, коли там присутні лейкоцити. Тому дуже важливо своєчасно виявляти та ізолювати інфікованих тварин від здорових корів та биків, які заражаються, головним чином, ентеральним, парентеральним та внутрішньоутробним шляхом. Є також думка про передачу

ВЕЛ через сперму биків-вірусоносіїв (Нагасва та ін., 2003). Проте Сюрін та ін. (1998) стверджують, що безпосередньо в бичачих сперматозоїдах вірусу не виявлено, а зараження від інфікованого бугая може відбуватися завдяки присутності в його спермі лімфоцитів-носіїв ВЕЛ. Ймовірно, що заразність інших фізіологічних рідин організму, крім крові, та передача ВЕЛ завжди обумовлені присутністю заражених лімфоцитів.

В офіційному документі Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ, ОІЕ) (Lucas, 1996) підсумовано, що досі неодноразово намагалися встановити, чи небезпечно для зараження людини споживання молока від корів, інфікованих ВЕЛ, та від особин з чітко вираженим лейкозом. Певен час вважали, що немає беззаперечних даних про передачу ВЕЛ ВРХ від тварини до людини і що для зараження людини ВЕЛ ВРХ не становить небезпеки. Не можна відкинути можливості того, що статистичні дані про паралелізм частоти лейкозів у ВРХ та людини свідчать не про передачу ВЕЛ людині (наприклад, через сире молоко), а про одночасний вплив певних шкідливих лейкомогенних факторів. Є думка, що фактори довкілля (грунтови, кліматичні та радіаційні), а також внутрішні фактори організму можуть сприяти чи заважати розмноженню ВЕЛ, який потрапляє в організм. Зокрема, при низькому вмісті потрібних поживних речовин у кормах найчастіше слабують на лейкоз саме високопродуктивні молочні корови, у молочній залозі яких найактивніше перебігають фізіологічні процеси, а тому недостатність харчування відчувається гостріше; ця обставина сприяє розвитку вже започаткованого лейкозу (Уразаєв, 1978).

Важливість даної проблеми добре розуміють господарники, фахівці ветеринарної медицини та

УААН (Харків). Сироватки були попередньо охарактеризовані за допомогою РІДА.

Результати ІФА представлено в таблиці 1 як відношення оптичної густини до граничного значення (ОГ/ГЗ), величина якого розраховувалась згідно з інструкцією, доданою до тест-системи. При значенні ОГ/ГЗ, більшому за 1,0 результати аналізу вважались позитивними, а при значенні, меншому за 1,0 – негативним. При перевірці в ІФА з використанням діагностичних тест-наборів усі досліджені сироватки крові, що охарактеризовані в РІДА як позитивні, дали позитивний результат, а негативні в РІДА – негативний результат. Згідно з отриманими даними, показники інформативності тест-системи «DIA-BLV-Ab» аналогічні показникам її імпортного аналога. Крім того, якість тест-набору «DIA-BLV-Ab» дає змогу при тестуванні досліджуваних сироваток уникнути попереднього їх розведення перед аналізом, необхідного при використанні тест-системи VMRD, Inc., коли досліджувані зразки перед тестуванням розводяться буфером (1:50).

Оскільки в клінічно-лабораторній практиці при серологічній діагностиці ВЕЛ ВРХ широко використовують РІДА, було проведено порівняльне вивчення результатів, отриманих при тестуванні 89 сироваток крові ВРХ на тест-системі «DIA-BLV-Ab» та за допомогою РІДА. Результати дослідження представлено в таблиці 2.

Умови зберігання та транспортування

Набір зберігають і транспортують при температурі 2-8 °С. Заморожувати набір не дозволяється.

Упаковка

- Імуносорбент вкладено в пакунки з багатшарової та комбінованої плівки, пакунки термоізоляційні.
- Концентрат кон'югату, позитивний контроль, негативний контроль розлито в пластикові ампули об'ємом 0,5 мл або 2,0 мл.
- Розчини, крім розчину ТМБ, розлито в поліетиленові флакони об'ємом 30 мл або 35 мл.
- Розчин ТМБ розлито у флакони з поліетилену коричневого кольору об'ємом 15 мл.
- Набір компонентів разом з листівкою-вкладкою вміщено в коробку з гофрокартону з пластиковою вставкою.

Характеристика показників якості тест-системи «DIA-BLV-Ab»

Для оцінки якості тест-системи «DIA-BLV-Ab» проводили порівняльне дослідження її чутливості та специфічності з аналогічними показниками імпортного аналога – тест-системою «Vovine Leukemia Virus AntibodyTest Kit», виробництва VMRD, Inc. (США). Дослідження сироваток на обох діагностикумах проводили відповідно до інструкцій, доданих до наборів.

Постановку здійснювали на сироватках ВРХ, взятих від тварин у господарствах різних областей України (Київської, Сумської, Донецької, Запорізької) та наданих для роботи Інститутом ветеринарної медицини Української академії аграрних наук (Київ) та Інститутом експериментальної та клінічної ветеринарної медицини

вірусологи. Тому в цьому напрямку постійно проводиться ряд заходів як за кордоном (Lucas, 1996; Repstgöm, 2000), так і в нашій країні (Нагаєва та ін., 2003). Чинна державна галузева науково-технічна програма «Забезпечення ветеринарно-санітарного благополуччя в Україні» (від 25 квітня 2002 р.) передбачає беззастережну необхідність «створити інтегровану систему захисту ВРХ від лейкозу» (розділ 03-103). Зрозуміло, що одне з найважливіших знарядь у контролі ВЕЛ ВРХ та в боротьбі з недугою є своєчасна діагностика захворювання. Що раніше виявлено інфікованих тварин, то вища ймовірність оздоровлення поголів'я та викорінення хвороби.

Діагностика ВЕЛ ВРХ

В наші дні значною мірою втратили своє попереднє значення клінічний, патологоанатомічний, гістологічний та гематологічний методи, що гідно служили ветеринарній практиці до відкриття та становлення пізніших та сучасніших методів – вірусологічних, серологічних та молекулярно-біологічних. Особливо важливу роль в оздоровленні поголів'я ВРХ від ВЕЛ відіграють серологічні методи, за допомогою яких визначають антитіла проти вірусу (Анонім, 1997; Стурин и др., 1998; Горбатенко та ін., 2004; Спивак и др., 2004). Важливе значення мають також підходи, спрямовані на пряме визначення збудника.

Ідентифікація вірусу

Згідно з настановами МЕБ, при спробах культивувати ВЕЛ ВРХ з метою його ідентифікації вірусологічними

методами використовують моноклеарні клітини, отримані від заражених тварин. Ці клітини, виділені з периферичної крові ВРХ, вирощують у суміші з перещеплюваними клітинами легені бичачого зародка (fetal bovine lung cells, FBL), які легко заражаються ВЕЛ, що виходить з інфікованих моноклеарів (Repström, 2000).

Іноді при відсутності перещеплюваних клітин FBL чи з інших міркувань для ідентифікації ВЕЛ вдаються до зараження овець. У цьому випадку при позитивній відповіді в овечих сироватках через 6 місяців виявляють антитіла проти вірусу.

Ще один прямий метод ідентифікації ВЕЛ - виявлення специфічних нуклеотидних послідовностей у пробах від заражених тварин за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР = polymerase chain reaction, PCR). Праймери для проведення ПЛР повинні містити консервативні ділянки нуклеотидних послідовностей вірусних генів env (він кодує gp51), gag та pol. Найчутливішим вважають метод подвійної ПЛР (гніздової ПЛР, nested PCR) з наступним електрофорезом та візуалізацією отриманих фрагментів. Високочутливий та порівняно швидкий метод ПЛР вимагає дотримання певних умов праці та дуже високого вишколу співробітників спеціалізованої лабораторії. Методи ПЛР становлять особливу цінність для виявлення тварин на ранніх стадіях інфекції, коли серологічними методами ще не можна знайти антитіл проти вірусу. ПЛР важливий також у тих випадках, коли антитіла в теляти знайшли, але неможливо відрізнити материнські антитіла, які передані через плаценту, від антитіл, набутих через інфікування. ПЛР приносить користь, коли її застосовують для підтвердження діагнозу (наприклад, при отриманні

Форма випуску наборів

- Набір з 2 монолітними планшетами, проявник з ОФД – 2 монолітних планшети, хромоген – таблетки ОФД; тест-система розрахована на проведення 2 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);
 - Набір з 2 стриповими планшетами, проявник з ОФД– 2 стрипових планшети, хромоген – таблетки ОФД; тест-система розрахована на 6 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 2 стрипи (32 лунок);
 - Набір з 2 монолітними планшетами, проявник з ТМБ – 2 монолітних планшети, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на 2 постановки імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок).
 - Набір з 2 стриповими планшетами, проявник з ТМБ – 2 стрипових планшети, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на 12 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 стрип (16 лунок).
- Набори розраховані на проведення 192 аналізів (включаючи контролю).
- Набір з 1 стриповим планшетом, проявник з ТМБ – 1 стриповий планшет, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на 12 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 стрип (8 лунок).
- Набір розрахований на проведення 96 аналізів (включаючи контролю).

Термін придатності

Термін придатності набору – 1 рік від дати виготовлення.

використанням значення ОГ негативного контролю, що не перевищує 0,2 ОО.

- Граничне значення ОГ (ГЗ). ГЗ розраховують, додаючи поправочний коефіцієнт **0,20** до значення ОГсер К (значення коефіцієнта може змінюватись залежно від серії тест-системи).
- “Сіра зона” – зона значень ОГ, яка знаходиться в межах від ГЗ до значень менших ГЗ на 10 %.
- Результати аналізу вважаються **негативними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка менше нижнього рівня ОГ “сірої зони”.
- Результати аналізу вважаються **позитивними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка більше ГЗ.
- Зразки зі значеннями ОГ в межах “сірої зони” вважаються **невизначеними**.
- Зразки, що дали позитивний або невизначений результат, необхідно досліджувати повторно не менш ніж в двох лунках тест-системи:
 - Зразки, позитивні в одній або більше лунках, слід вважати позитивними;
 - Зразки, негативні в двох або більше лунках, слід вважати негативними.

поодиноких сумнівних даних та при підозрі на лейкоз у корів з благополучних господарств, а також при закупівлі та імпорті елітних тварин).

Для діагностики методом ПЛР достатньо наявності в пробі однієї копії молекули-мішені. ПЛР дозволяє виявити 5-10 молекул вірусного генома на 100000 клітин (Apopoulos, 1999). Завдяки дуже високій чутливості ПЛР забруднення зразків може призвести до хибно-позитивних результатів реакції. Разом з тим не виключене й отримання хибно-негативних відповідей через те, що до проби можуть не потрапити саме заражені клітини (якщо їх взагалі ще мало на ранніх етапах інфекції), або через дію інгібіторів реакції (Lucas, 1996; Сюрин и др., 1998).

Серологічні методи діагностики ВЕЛ ВРХ

Для ВЕЛ ВРХ притаманна виражена антигенна активність; він викликає синтез антитіл, що нейтралізують вірус, осаджують (преципітують) його та беруть участь у реакції фіксації комплементу (РФК). Виявлено спільну антигенну детермінанту в головному серцевинному білку ВЕЛ, вірусів лейкозо-саркоматозного комплексу птахів та вірусів типів С та D ссавців. Така подібність свідчить про значний консерватизм цього білку у ВЕЛ та інших онкорнавірусів, не споріднених близько з ВЕЛ. Крім того, у ВЕЛ виявлено здатність аглютинувати еритроцити мишей; вона пов'язана з оболонковим глікопротеїном (gp51).

Тварина, інфікована ВЕЛ ВРХ, пожиттєво зберігає збудника в організмі. Через хронічну інфекцію відбувається постійний синтез антитіл. Вперше антитіла з'являються через 3-16 тижнів після зараження. Антитіла, отримані від матері, зникають у молодих тварин у віці 6-7

місяців. При дослідженні сироваток телят від заражених корів не можна встановити, чи ці антитіла пасивно передані, чи синтезовані в організмі молоді інфікованої тварини. Антитіла, передані матір'ю, можуть в окремих випадках захистити теля від зараження при зіткненні його з вірусом або ж (так буває частіше) тільки подовжити інкубаційний період захворювання. Трапляється, що у корів, достеменно заражених ВЕЛ, не вдається виявити протівірусних антитіл за 2-3 тижні до отелення та через 2-3 тижні після нього, бо материнські антитіла переходять у молозиво. Тому діагностику ВЕЛ у таких випадках можна проводити лише із застосуванням ПЛР. Серологічну ж діагностику ВЕЛ за наявністю антитіл у випадку негативного результату не вважають за повноцінну (Renström, 2000), особливо в тому випадку, коли для серологічної діагностики використано реакцію імунодифузії в агарі (РІДА, agar gel immunodiffusion, AGID test). Зрозуміло, що це особливо стосується корів за 2-3 тижні до отелення та через 2-3 тижні після нього. Загальновідомо, що для РІДА характерна висока специфічність, але дуже низька чутливість.

У величезній більшості випадків протівірусні антитіла утворюються проти глікозильованого антигену вірусної оболонки gp51 (особливо проти трьох його імунодомінантних епітопів – F, G та H) і проти внутрішнього білку р24. Зворотна транскриптаза ВЕЛ, кодована геном р01, належить до слабких антигенів, і антитіла проти неї знаходяться лише в окремих особин, заражених вірусом у природних умовах. Не виявлено будь-яких взаємозв'язків поміж концентрацією таких антитіл та рівнем сироваткових антитіл проти структурних вірусних білків (Сюрин и др., 1998). У більшості комерційних тест-

після чого позбавляються зайвої вологи в лунках (поступуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

- Готують розчин ТМБ субстрату згідно п. 1.3
 - Вносять в лунки стрипів по 100 мкл ТМБ субстрату.
 - Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 18-30 °С в темному місці протягом 30 хв.
 - Зупиняють кольорову реакцію внесенням в лунки по 100 мкл стол-реагенту.
 - Не більше як через 1 хвилину після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину в лунках у двоххвильовому режимі (450 нм відносно 620 нм).
- Оптичну густину можна визначати в однохвильовому режимі (450 нм) відносно порожньої лунки (бланк). Необхідно передбачити порожню лунку в аналізі. При роботі в однохвильовому режимі знижується специфічність та точність аналізу.*

Облік результатів аналізу

- Проведення аналізу вважають коректним, якщо обидва значення оптичної густини (ОГ) у лунках з негативним контролем або одне з них не вище 0,2 оптичної одиниці (ОО), а значення ОГ кожного з двох позитивних контролів не нижче 0,6 ОО.
- Розраховують середнє значення ОГ для лунк негативного контролю (ОГсер К-). Якщо одне з двох значень ОГ негативного контролю більше 0,2 ОО, його відкидають, а подальший облік результатів проводять із

8-канальної піпетки один раз, після чого позбавляються зайвої вологи в лунках (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

В кожну лунку стрипів вносять по 95 мкл розчину для розведення сироваток.

В лунки стрипів до 95 мкл розчину для розведення сироваток вносять по 5 мкл зразків досліджуваних сироваток, залишивши вільними перші 4 лунки (лунки для контролів).

- В дві лунки (A1, B1) вносять по 5 мкл позитивного контролю та в дві лунки (C1, D1) – по 5 мкл негативного контролю. *При внесенні контрольних та досліджуваних зразків необхідно обережно піпетувати суміш.*
- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37 °С протягом 60 хвилин.
- По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином для промивання, після чого позбавляються зайвої вологи в лунках (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- Готують розчин кон'югату згідно п. 1.2.
- В лунки стрипів вносять по 100 мкл розчину кон'югату.
- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37 °С протягом 30 хвилин.
- По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки шість разів розчином для промивання,

систем, призначених для виявлення протівірусних антитіл, визначають саме антитіла проти gp51. Вони синтезуються раніше, ніж антитіла проти інших вірусоспецифічних антигенів, а потім майже постійно присутні в організмі заражених тварин. Інший діагностично важливий антиген – р24.

Згідно з міжнародними стандартами, при обстеженнях ВРХ для виявлення ВЕЛ (зокрема, при перевірці на лейкоз при міжнародних торгових операціях) використовують РІДА та імуноферментний аналіз (ІФА). При проведенні досліджень обома вказаними методами обов'язково використовують дві контрольні стандартні сироватки – E1 та E4. Сироватка E1 не містить антитіл проти р24 та застосовується для стандартизації препаратів антигену gp51. E4 – це стандартна сироватка МЕБ для порівняння чутливості різних тестів. Обидві сироватки перевірено й схвалено контрольними лабораторіями Європейського економічного союзу (European Economic Community, ЕС, тепер European Union). Такі сироватки продають країнам-членам ЕС; їх отримують у Данії (National Veterinary Laboratory, P.O.Box 373, DK1503, Copenhagen, Denmark). Сироватки, які виробляють у країнах-членах ЕС для визначення антитіл проти ВЕЛ, мають бути неодмінно стандартизовані з використанням сироватки E4.

РІДА – тест досить простий для виконання та високоспецифічний, часто виявляється досить чутливим для широкого скринінгового використання при дослідженні сироваток окремих тварин, особливо при первинних обстеженнях у проблемних господарствах. Однак цей тест зовсім не годиться для дослідження проб молока через дуже низьку чутливість. В РІДА

використовують антигени, синтезовані в культурі клітин, які частково контаміновані вірусом бичачої діареї, що часто призводить до хибно-позитивного результату. Тому даний метод не придатний для аналізу злитих сироваток. Тест РІДА дає змогу виявити протівірусні антитіла до ВЕЛ при розведеннях сироватки Е4 у 10 разів. Використання РІДА обмежене необхідністю застосування агарозного гелю, складністю постановки тесту та візуального обліку результатів реакції.

Метод ІФА можна застосовувати при дослідженні злитого молока від декількох чи більше корів, якщо на момент дослідження на фермі доїться не менш як 30 % корів. Таке співвідношення обумовлене практичною можливістю перевірити усіх корів на фермі один раз на рік. При такому застосуванні метод ІФА годиться для того, щоб судити про стан з ЕЛ на фермі, але не для того, щоб встановити статус кожної тварини.

Якщо окремі сироватки для проведення аналізу зливають в одну пробу, то стандартна позитивна сироватка Е4 при цьому має залишатися позитивною при розведенні, яке у 10 разів перевищує кількість досліджуваних сироваток в пулі. Наприклад, якщо в одній пробі об'єднано 50 сироваток, то Е4 повинна давати позитивний результат при розведенні в $10 \times 50 = 500$ разів.

Твердофазний імуноферментний метод аналізу (ELISA test = ПІФА) для виявлення антитіл до ВЕЛ ВРХ тепер широко розповсюджений завдяки доступності ряду сучасних комерційних діагностикумів на основі найрізноманітніших модифікацій: прямих, непрямих, блокувальних, конкурентних, з використанням кон'югатів на основі моно- та поліклональних антитіл проти імуноглобулінів ВРХ. Як правило, для роботи з

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8 °С не більш як 5 діб.

1.2 Приготування розчину кон'югату

У чистий флакон відбирають 2 мл розчину для розведення кон'югату та додають 40 мкл концентрату кон'югату (50X). Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи утворення піни.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

1.3 Приготування ТМБ субстрату

У чистий флакон відбирають 1,0 мл розчину ТМБ і додають 1,0 мл субстратного буфера, суміш інтенсивно потрушують.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин ТМБ необхідно берегти від попадання світла та контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин ТМБ субстрату повинен бути безбарвним.

2 Проведення аналізу

- Готують розчин для промивання згідно п. 1.1.

- Звільняють від упаковки необхідну кількість стрипів і вставляють їх у рамку.

Стрипи, які не використовуються в даній постановці, зберігають у щільно закритому пакеті при температурі 2-8°С не більше 1 місяця з моменту розкриття упаковки пліни.

Промивають лунки стрипів розчином для промивання (350 мкл розчину на лунку) за допомогою промивача, або

N	Назва компоненту	Кількість
1	Концентрат розчину для промивання	3 фл. по 25 мл
2	Імуносорбент	2 планшета
3	Розчин для розведення сироваток	1 фл. по 20 мл
4	Розчин для розведення кон'югату	1 фл. по 26 мл
5	Субстратний буфер	1 фл. по 14 мл
6	Розчин ТМВ	1 фл. по 14 мл
7	Концентрат кон'югату (50х)	1 амп. по 0,6 мл
8	Позитивний контроль	1 амп. по 0,15 мл
9	Негативний контроль	1 амп. по 0,15 мл
10	Стоп-реагент	1 фл. по 25 мл
11	Клейка плівка	6 шт.

Спосіб застосування

Проведення аналізу

1 Підготовка до аналізу (з розрахунку на 16 лунок)

Витримують компоненти набору при температурі 18-30°C протягом 30 хвилин.

1.1 Приготування розчину для промивання

Вміст одного флакону з концентратом розчину для промивання інтенсивно струшують. Відбирають 6 мл розчину і розводять в 180 мл дистильованої води, перемішують. Якщо концентрат розчину містить кристали, його прогрівають перед використанням при 35-37°C до повного розчинення кристалів.

сироватками ВРХ та з молоком використовують не ті самі тест-системи. Чутливість тест-систем для визначення антитіл залежить від дуже багатьох причин, зокрема, від того, якою буде конформация, просторове розміщення різних доменів молекул gp51 (чи інших антигенів), зв'язаних з поверхнею планшета. Велике значення має та обставина, які ж саме епітопи відкриті для специфічного зв'язування з антитілами.

При виготовленні імуносорбенту для тест-систем ІФА використовують природні або рекомбінантні антигени ВЕЛ ВРХ.

При роботі з природними вірусспецифічними та негативними (контрольними) антигенами їх готують на тій самій лінії перещеплюваних клітин. У першому випадку беруть клітини, хронічно заражені ВЕЛ (клітини з нирки зародка вівці). У другому випадку беруть такі самі культури, не заражені вірусом. Згідно з вимогами МЕБ, клітини, використовувани для цієї мети, мають бути вільні від вірусу бичачої діареї, а також інших ретровірусів ВРХ, зокрема, вірусу імунодефіциту ВРХ та бичачого синцитіального вірусу (див. Renström, 2000).

Комерційні діагностичні імуноферментні тест-системи при конструюванні імуносорбенту звичайно використовують рекомбінантні білки р24 (серцевинний) та gp51 (оболонковий), які є аналогами білків ВЕЛ. На основі даних білків у компанії «Діапроф-Мед» розроблено діагностичну імуноферментну тест-систему «DIA-BLV-Ab», що призначена для виявлення специфічних антитіл до ВЕЛ.

Методика роботи з імуноферментної тест-системою «DIA-BLV-Ab»

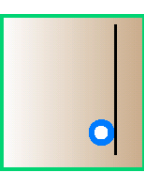
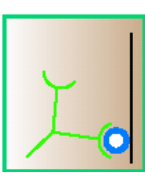
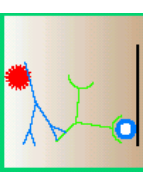
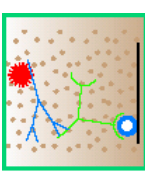
Імуноферментна тест-система «DIA-BLV-Ab» створена за принципом непрямого ІФА й призначена для виявлення антитіл класу IgG проти ВЕЛ ВРХ при аналізі сироваток крові ВРХ.

Принцип аналізу

Головні компоненти набору – імуносорбент та імуноферментний кон'югат. Імуносорбент являє собою полістироловий планшет, лунки якого сенсibilізовані рекомбінантними білками r24 та gp51 – аналогами специфічних антигенів ВЕЛ ВРХ. Кон'югат представлений моноклональними антитілами проти імуноглобулінів класу IgG ВРХ, міченими пероксидазою хрому.

При внесенні в лунки планшета зразків досліджуваних сироваток, ВЕЛ-специфічні антитіла, присутні в сироватці, зв'язуються з антигенами на твердій фазі, утворюючи комплекси антиген-антитіло, які виявляють за допомогою специфічного імуноферментного кон'югату. Після відмивання нез'язаних компонентів у лунки додають розчин проявника, який містить субстрат пероксидази (перекис водню) та хромоген (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, ТМБ). Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густина (ОГ) суміші у лунках; при довжині хвилі 450 нм. ОГ пропорційна концентрації специфічних антитіл у зразках сироваток крові.

Схема проведення ІФА

Процедура	Формування комплексу
<ul style="list-style-type: none"> Полістиролові стрипи, сенсibilізовані антигенами ВЕЛ 	
<ul style="list-style-type: none"> Внесення в лунки стрипів по 95 мкл розчину для розведення зразків та по 5 мкл зразків контролів та сироваток Інкубація протягом 60 хв. при 37 °С (формування комплексу антиген-антитіло) Промивання лунок буферним розчином 4 рази 	
<ul style="list-style-type: none"> Внесення в лунки по 100 мкл розчину кон'югату Інкубація протягом 30 хв. при 37 °С (формування комплексу з кон'югатом) Промивання лунок буферним розчином 6 разів 	
<ul style="list-style-type: none"> Внесення в лунки по 100 мкл розчину перекису водню та ТМБ Інкубація протягом 30 хв. при кімнатній температурі (забарвлення) Зупинка реакції додаванням стоп-реагенту Ресстрація оптичної густини 	

До складу тест-системи входять: