

Комбинированный
состав –
синергетический
эффект!



- ✓ Стабильность растворов в системе водоснабжения
- ✓ Широкий спектр антибактериальной активности
- ✓ Высокий уровень безопасности

Энрофлон-К®

1 мл содержит 100 мг энрофлоксацина
и 2 000 000 ME колистина сульфата

Долинк®

1 мл содержит 100 мг доксицилина
и 100 мг линкомицина

Группа компаний ВИК – крупнейшая ветеринарная компания в СНГ

Москва
+7(495) 777-60-85
+7(495) 777-60-81
Санкт-Петербург
+7(812) 249-92-51
+7(812) 423-04-83
Орел
+7(4862) 44-36-50
+7(4862) 44-36-54
+7(4862) 44-36-55

Вологда
+7(8172) 51-71-36
+7(8172) 51-58-16
Нижний Новгород
+7(902) 784-42-30
Белгород
+7(4722) 20-71-27
+7(4722) 21-81-41
+7(4722) 21-81-51

Воронеж
+7(473) 276-14-20
Аксай
+7(863) 268-88-61
+7(863) 268-88-59
Краснодар
+7(861) 258-38-35
+7(861) 258-39-68
Пенза
+7(8412) 999-424

Екатеринбург
+7(343) 278-53-41
Тюмень
+7(3452) 68-93-77
Омск
+7(3812) 78-00-11
+7(3812) 78-01-42
Новосибирск
+7(383) 262-17-76
Красноярск
+7(3912) 68-39-77

Иркутск
+7(914) 933-33-71
Беларусь, Минск
+375(17) 259-17-49
+375(17) 259-17-56
Беларусь, Витебск
+375(212) 60-02-35
Казахстан, Астана
+7(747) 664-71-96

ОЦЕНКА ДОСТОВЕРНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТ-СИСТЕМ ELISA КОМПАНИИ BIOCHECK (ГОЛЛАНДИЯ) В ПТИЦЕВОДСТВЕ

С.А. Седов, специалист группы птицеводства ГК ВИК

Э.М. Аминова, ведущий специалист по серологическим и молекулярно-генетическим исследованиям ЗАО Уралбройлер (ГК Здоровая Ферма)

Современные кроссы птиц яичных и мясных пород являются высокопродуктивными. Для достижения высоких производственных показателей необходимо соблюдать высокий уровень организации производства.



Сохранность поголовья птицы и достижение максимальных производственных показателей зависят от ряда общеизвестных факторов: благополучие по эпизоотической ситуации в хозяйстве, содержание, кормление, проведение ветеринарно-санитарных мероприятий, а также постоянного мониторинга иммунной системы птицы. Известно, что определение заболеваний на ранней стадии является гарантом снижения возможных экономических потерь. Современное развитие птицеводства должно базироваться на комплексе диагностических профилактических мероприятий. Среди наиболее перспективных методов диагностики – иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA).

Современные тест-системы ELISA компании BioCheck – это чувствительный и простой в постановке метод определения уровня антител к различным заболеваниям птиц вирусной и бактериальной природы. Благодаря серологическому мониторингу тест-системами компании BioCheck представляется возможным диагностировать инфекцию на раннем ее этапе до появления клинической картины, а также оценить титры антител после проведенной вакцинации. [2]

Для получения реальной картины состояния стада очень важно количество отобранных проб крови, достаточное для получения «реального среднего титра стада». Количество образцов зависит от того, однородно или неоднородно стадо по титрам. Чем больше вариация титров по стаду, тем больше образцов должно быть отобрано для получения «реального среднего титра». В среднем отбирают 23 пробы. При количестве проб менее 23 происходит отчетливое снижение надежности среднего титра и оценок даты вакцинации. Уменьшение количества проб в целях экономии материальных средств оказывает негативное воздействие на надежность подсчитанных средних титров и может привести к вводящим в заблуждение результатам и заключениям.

Результат серологических исследований во многом зависит от правильного отбора образцов. Для получения надежных и воспроизводимых результатов средних титров стада очень важно применять статистически достоверные методы отбора проб. Таким является метод случайной выборки птиц.

Метод случайной выборки птиц фактически означает, что для исследований может быть выбрана любая птица из стада. На практике существует несколько способов для случайной выборки птиц в птичнике, и пример представлен на рисунке 1.

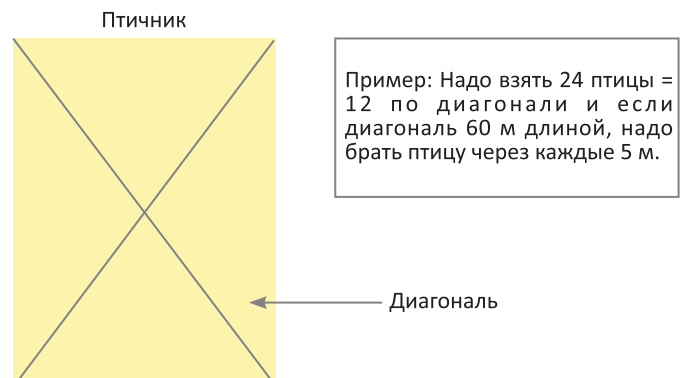


Рис. 1. Метод случайной выборки птиц.

Необходимо брать птицу в птичнике методом случайной выборки, для того, чтобы избежать влияния так называемых «неконтролируемых вариаций» (например, неравномерная вакцинация через питьевую воду, неравномерное потребление корма, влияние неравномерного распределения температуры, влажности и т.д.). Для иллюстрации этого предположим, что в птичнике нарушена система поения. В одной половине птичника система поения не работает, а в другой работает хорошо. Птица была вакцинирована через систему поения. Если взять образцы из первой половины птичника, то на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что вся птица была плохо вакцинирована. А если брать образцы только из второй половины птичника, можно прийти к выводу о том, что вся птица была вакцинирована хорошо. Если птиц отбирать по всему птичнику, то можно будет заметить, что частично вакцинация была проведена успешно.

Достоверность проведения иммуноферментного анализа диагностической тест-системы ELISA компании BioChek, определяется по трём критериям: положительный контроль, отрицательный контроль, референсный контроль.

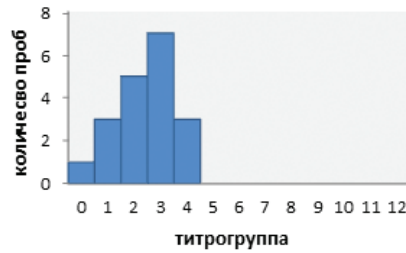
Положительный контроль – сыворотка, которая содержит специфические антитела к определенному антигену в фосфатном буфере с белковыми стабилизаторами и азидом натрия в качестве консерванта. При образовании комплекса антиген-антитело в положительном контроле, изменяется оптическая плотность, минимальное среднее значение должно быть не менее 0,3.

Отрицательный контроль – сыворотка, свободная от специфических патогенов в фосфатном буфере с белковыми стабилизаторами и азидом натрия в качестве консерванта, соответственно комплекс антиген-антитело не образуется и максимальное среднее значение не должно превышать 0,3. [4]

В случае, если данные критерии не соответствуют указанным выше значениям, данные считаются недействительными. Наиболее вероятной причиной несоответствия значений является низкая температура одного из реагентов набора при проведении исследований или низкая температура в самой лаборатории. Температура должна находиться в пределах 22-27 °С. Все реагенты в составе набора до постановки самой реакции необходимо выдержать при комнатной температуре не менее 2 часов. Планшет не должен находиться на холодной поверхности – камень, металл. Если температура в помещении ниже комнатной, необходимо вести инкубацию планшетов на всех стадиях ИФА в настроенном на комнатную температуру термостате. Оптимальным вариантом будет установка кондиционера в кабинете ИФА-диагностики для создания благоприятных условий ежедневно. Другой причиной может быть испорченный положительный или отрицательный контроль, конъюгат или ослабленный антиген в плашке. При проведении исследований оптический фильтр на спектрофотометре должен использоваться с длиной волны 405 нм. Еще одна причина изменения значений даже при соблюдении всех требований при постановке реакции ИФА – неправильно настроенный автоматический дозатор, поэтому все они должны своевременно проходить проверку. Во избежание ложных результатов, не следует забывать, что промывка планшетов осуществляется моющим буферным раствором, а не дистиллированной, и тем более водопроводной водой. [1]

На рисунке 2 представлена гистограмма, полученная в результате исследования сыворотки крови бройлеров при убое в 44 дня после проведенной вакцинации в сутки и ревакцинации на 18 день вакциной Пулвак IB Праймер против инфекционного бронхита кур. На данном рисунке видно, что результат достоверный с соблюдением всех требований при постановке реакции ИФА. Средняя оптическая плотность отрицательного контроля ниже 0,3, а положительного контроля больше 0,3.

На рисунке 3 представлена гистограмма, полученная в результате исследования сыворотки крови бройлеров при убое в 44 дня, схема вакцинации аналогичная. Показанный средний титр очень низкий, коэффициент вариации высокий, можно было бы считать, что птица не отреагировала на вакцинацию, но средняя оптическая плотность отрицательного контроля больше 0,3, а положительного контроля меньше 0,3, следовательно, результат недостоверный. [3]



Название: -
Код: -
Возраст: 44D
Вид птицы: BR

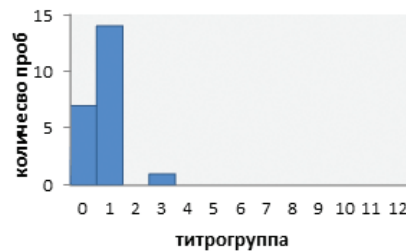
Тест: IBV
Дата взятия крови: -
Дата тест: -

Sample ID	Лунка	Опт. Плотн. – O.D.
-	A01	0,162
-	B01	0,160
+	C01	0,669
+	D01	0,665

Средний титр: 3895
% CV: 51

Ожидаемый титр:
1000-4000
Ожидаемый % CV:
40-60

Рис. 2. Достоверный результат, оптическая плотность отрицательного и положительного контроля в норме.



Название: -
Код: -
Возраст: 44D
Вид птицы: BR

Тест: IBV
Дата взятия крови: -
Дата тест: -

Sample ID	Лунка	Опт. Плотн. – O.D.
-	A01	0,459
-	B01	0,405
+	C01	0,230
+	D01	0,196

Средний титр: 678
% CV: 90

Ожидаемый титр:
1000-4000
Ожидаемый % CV:
40-60

Рис. 3. Недостоверный результат, оптическая плотность отрицательного и положительного контроля не соответствует норме.

Кроме того, разница между средним значением отрицательного и положительного контроля должна быть равна или больше 0,15. Если это значение будет меньше 0,15 результат считается недостоверным (Таблицы №1, №2).

Таблица №1. Результат недостоверный.

Sample ID	Лунка	Опт. Плотн. – O.D.	Сред. опт. плотн. – O.D.	Разница между сред. опт. плотн. O.D. + и – контроля
-	A01	0,216	0,2055	0,12
-	B01	0,195		
+	C01	0,321	0,3265	
+	D01	0,332		

Таблица №2. Результат достоверный.

Sample ID	Лунка	Опт. Плотн. – O.D.	Сред. опт. плотн. – O.D.	Разница между сред. опт. плотн. O.D. – и + контроля
-	A01	0,193	0,1865	0,63
-	B01	0,180		
+	C01	0,823	0,816	
+	D01	0,809		

Следующий критерий оценки достоверности ИФА – референсный контроль. Это предварительно разведенная контрольная куриная сыворотка с известным количеством антител против различных возбудителей болезней птиц, которая используется в реакции с антигеном, нанесенным на планшет. В результате референсный контроль должен давать значения в ожидаемых границах для подтверждения корректной воспроизводимости титров, точности и правильной интерпретации результатов в реакции ИФА.

Без референсного контроля, в случае получения аномальных высоких или низких титров, мы не знаем, либо это результат ошибок при проведении процедуры теста, либо это фактическое отражение иммунного статуса птиц в полевых условиях. [4]

На рисунке 4 представлена гистограмма, полученная в результате исследования сыворотки крови бройлеров при убое в 44 дня после проведенной вакцинации в 16 дней и ревакцинацией в 21 день вакциной Пулвак Бурса Ф против инфекционной бурсальной болезни. На данном рисунке видно, что результат точный и достоверный, средний титр референсного контроля находится в ожидаемом диапазоне.

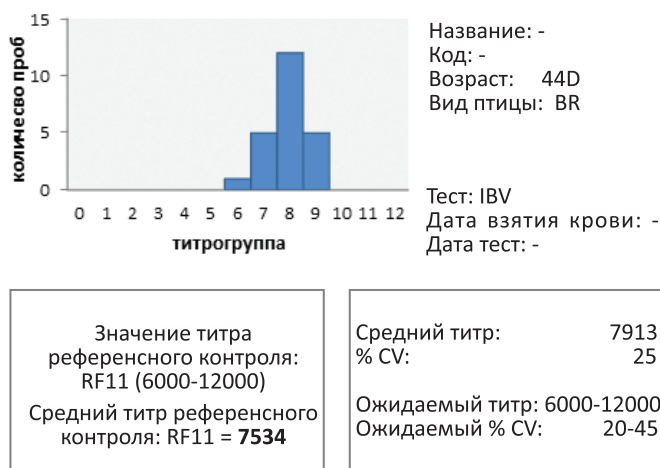


Рис. 4. Достоверный результат, средний титр референсного контроля в ожидаемых границах.

На рисунке 5 представлена гистограмма, полученная в результате исследования сыворотки крови бройлеров при убое в 44 дня, схема вакцинации аналогичная. На рисунке видно, что средний титр низкий, коэффициент вариации в пределах нормы, но результат не явля-

ется достоверным, так как средний титр референсного контроля не находится в ожидаемом диапазоне.

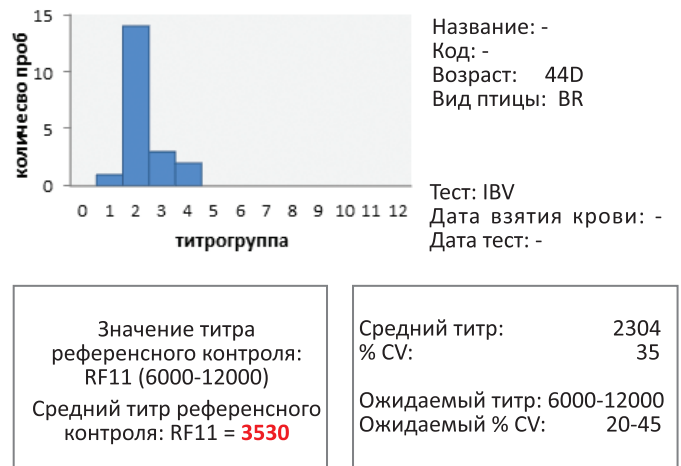


Рис. 5. Недостоверный результат, средний титр референсного контроля не в ожидаемых границах.

Таким образом, ветеринарный врач, получая результаты ИФА от лаборатории, должен в первую очередь обращать внимание на значения положительного, отрицательного и референсного контроля. Только в случае получения оптимальных для реакции контролей, можно доверять результатам теста. Знания в области оценки достоверности необходимы каждому ветеринарному врачу с целью проверки достоверности результатов ИФА-тестов лаборатории. Именно точность и достоверность позволяют в дальнейшем обеспечить правильную интерпретацию результатов тест-системы ELISA компании BioChek.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Мясяго А.В. Некоторые ошибки при постановке ИФА: учеб.-метод.пособие. – Новосибирск. – 2001. – 36 с.
2. Черников А.А., Клинков А.В. Применение метода ИФА в птицеводстве // Ценовик. – 2012. -№2. – с. 122-124.
3. Dr. Bart van Leerdam, Drs Pieter Kuhne. Интерпретация результатов ELISE для вируса инфекционного бронхита кур (IBV) // Poultry Focus. – 2009. - №5.
4. BioChek technical manual. -2006.

