

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ**  
**УНІВЕРСИТЕТ**

**ІНСТИТУТ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ЗДОРОВ'Я ТВАРИН**  
**ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ**

Спеціальність 211 – «Ветеринарна медицина»

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**  
Зав. кафедри фізіології та  
біохімії с.-г. тварин  
к. біол. наук, проф. \_\_\_\_\_ Л.М. Степченко  
«        » \_\_\_\_\_ 2020 р.

**ДИПЛОМНА РОБОТА**

**ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ**  
**КОНТРОЛЮ СПЕЦИФІЧНОЇ ІМУНОПРОФІЛАКТИКИ**  
**ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ ПТИЦІ В УМОВАХ НАУКОВО-**  
**ДОСЛІДНОГО ЦЕНТРУ БІОБЕЗПЕКИ ТА ЕКОЛОГІЧНОГО**  
**КОНТРОЛЮ РЕСУРСІВ АГРОПРОМИСЛОВОГО КОМПЛЕКСУ**  
**ДНІПРОВСЬКОГО ДЕРЖАВНОГО АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНОГО**  
**УНІВЕРСИТЕТУ**

**26.06 – ДР. 0873 20 05 08. 48 ПЗ**

Студент-дипломник \_\_\_\_\_ В.В. Чернова

Керівник дипломної роботи  
канд. вет. наук, проф. кафедри \_\_\_\_\_ Д.М. Масюк

Консультанти:  
з охорони праці  
канд. с.-г. наук, доц. \_\_\_\_\_ В.О. Сапронова

з економічних питань  
канд. вет. наук, доц. \_\_\_\_\_ В.В. Зажарський

**Дніпро – 2020**

## Зміст

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
РЕФЕРАТ	5
АНОТАЦІЯ	6
ВСТУП	8
<b>1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>	<b>10</b>
1.1. Імуноферментний аналіз. Принцип методу, класифікація	12
1.2. Імуноферментний аналіз як універсальний інструмент для контролю специфічної імунопрофілактики інфекційних хвороб птиці	19
<b>2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ</b>	<b>21</b>
2.1. Матеріали і методи дослідження	21
2.2. Характеристика Науково-дослідного центру	29
2.3. Результати власних досліджень	34
2.3.1. Порівняння компонентів тест-систем різних виробників для серологічної діагностики хвороби Ньюкасла, інфекційного бронхіту та бурсальної хвороби	34
2.3.2. Рівень антитіл до антигенів вірусу бурсальної хвороби у сироватці крові імунізованої птиці	36
2.3.3. Рівень антитіл до антигенів вірусу хвороби Ньюкасла у сироватці крові імунізованої птиці	39
2.3.4. Рівень антитіл до антигенів вірусу інфекційного бронхіту у сироватці крові імунізованої птиці	41
2.4. Розрахунок економічної ефективності імуноферментного аналізу для контролю специфічної імунопрофілактики інфекційних хвороб птиці	45
<b>3. ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ</b>	<b>48</b>
3.1. Аналіз стану охорони праці в науково дослідному центрі	48
3.2. Аналіз небезпечних та шкідливих виробничих факторів	49
3.3. Пожежна безпека	51
ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ	53

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

3

ДОДАТКИ

55

59

## СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

*IBDV* – вірус бурсальної хвороби

*IBD* – бурсальна хвороба

*NDV* – вірус хвороби Ньюкасла

*ND* – хвороба Ньюкасла

*IBV* – вірус інфекційного бронхіту

*IB* – інфекційний бронхіт

ІФА – імуноферментний аналіз

ПЛР – полімеразно-ланцюгова реакція

d.p.v. – днів після вакцинації

cut-off – межа, вище якої значення титру антитіл вважаються позитивними,  
нижче – негативним

SPF – Specific-pathogen-free – тварини, що є вільними від специфічних патогенів

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота викладена на 68-и сторінках та включає такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати власних досліджень та їх аналіз, розрахунок економічної ефективності, охорону праці у ветеринарній медицині, висновки та пропозиції виробництву, список використаної літератури. Робота містить 6 рисунків, 7 таблиць та 5 додатків. Список використаної літератури налічує 39 джерел, включаючи 26 латиницею.

Метою роботи було встановити особливості застосування імуноферментного аналізу для контролю специфічної імунопрофілактики інфекційних хвороб птиці.

Об'єктом дослідження були лабораторні дослідження для контролю специфічної імунопрофілактики інфекційних хвороб птиці.

У дипломній роботі наведено вирішення завдань щодо проведення порівняння компонентів тест-систем різних виробників для серологічної діагностики хвороби Ньюкасла, інфекційного бронхіту птиці, бурсальної хвороби; визначення титру антитіл до антигенів вірусу бурсальної хвороби у сироватці крові імунізованої птиці діагностичними наборами різних виробників; з'ясування рівня специфічних антитіл до антигенів вірусу хвороби Ньюкасла у сироватці крові імунізованої птиці діагностичними наборами різних виробників; визначення титру специфічних імуноглобулінів до антигенів вірусу інфекційного бронхіту у сироватці крові імунізованої птиці діагностичними наборами різних виробників; розрахунку економічної ефективності проведеного імуноферментного аналізу для контролю специфічної імунопрофілактики інфекційних хвороб птиці.

За результатами проведених досліджень лабораторіям рекомендовано для визначення антитіл до антигенів вірусів бурсальної хвороби, інфекційного бронхіту та хвороби Ньюкасла використовувати використовувати тест-системи компаній «IDVet» (Франція) та IDEXX (США) як високо специфічні та більш технологічні діагностикуми.

## АНОТАЦІЯ

Представлена робота Чернової В.В. на тему: «Застосування імуноферментного аналізу для контролю специфічної імунопрофілактики інфекційних хвороб птиці в умовах Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів агропромислового комплексу Дніпровського Державного Аграрно-економічного Університету». Встановлено, що тест-набори фірми BioChek містять компоненти субстрату та миючого розчину у сухому вигляді. Тест-набори фірми IDVet та IDEXX є найбільш зручними, оскільки більшість реагентів є готові до використання. Всі досліджені тест-системи успішно виявляють антитіла до антигенів відповідних вірусів, про що свідчить позитивний результат при дослідженні референтних сироваток від імунізованої птиці та негативний результат при дослідженні референтних сироваток від SPF тварин. Рівень антитіл до антигенів *IBDV* за використання тест-наборів виробництва IDVet та IDEXX суттєво не відрізняються, а титр антитіл отриманий при дослідженні набором фірми BioChek є вищим у 3,5 та 2,7 рази порівняно до наборів фірм IDVet та IDEXX відповідно. При дослідженні антитіл до антигенів *NDV* титри отримані набором IDEXX є меншими за результати, отримані наборами фірм IDVet і BioChek відповідно у 1,9 та 2,0 рази. За визначення антитіл до антигенів *IBV* набір фірми IDEXX показав найнижчі титри імуноглобулінів. Результати використання тест-набору фірми IDVet у середньому є вищими на 39,8% порівняно до значень набору фірми IDEXX, а результати отримані набором BioChek є вищими у 2,6 та 1,7 рази порівняно до попередніх виробників. Економічна ефективність використання тест-систем для дослідження імунізованої птиці за використання тест-наборів виробництва BioChek складає 28,68 грн, IDVet – 26,18 грн, а IDEXX – 8,68 грн на одну пробу.

**Ключові слова:** ІФА, вірус хвороби Ньюкасла, вірус бурсьольної хвороби, вірус інфекційного борнхиту птиці, IDVet, IDEXX, BioChek.

## SUMMARY

The work of Chernova VV is presented. on the topic: "Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the control of specific immunoprophylaxis of infectious diseases of poultry in the Research Center for Biosafety and Environmental Control of Resources of the Agro-Industrial Complex of the Dnieper State Agrarian and Economic University." BioChek test kits have been found to contain dry substrate and detergent components. IDVet and IDEXX test kits are the most convenient, as most reagents are ready to use. All tested test systems successfully detect antibodies to antigens of the respective viruses, as evidenced by a positive result in the study of reference sera from immunized birds and a negative result in the study of reference sera from SPF animals. The level of antibodies to IBDV antigens using IDVet and IDEXX test kits did not differ significantly, and the antibody titer obtained in the BioChek kit was 3.5 and 2.7 times higher than in the IDVet and IDEXX kits, respectively. In the study of antibodies to NDV antigens, the titers obtained by the IDEXX kit are 1.9 times and 2.0 times lower than the results obtained by the IDVet and BioChek kits. When determining antibodies to IBV antigens, the IDEXX kit showed the lowest immunoglobulin titers. The results of using the IDVet test kit are on average 39.8% higher compared to the values of the IDEXX kit, and the results obtained by the BioChek kit are 2.6 and 1.7 times higher than the previous manufacturers. The economic efficiency of using test systems for the study of immunized birds using test kits manufactured by BioChek is UAH 28.68, IDVet - UAH 26.18, and IDEXX - UAH 8.68 per sample.

Key words: ELISA, Newcastle disease virus, bursal disease virus, avian infectious bornchitis virus, IDVet, IDEXX, BioChek.

## ВСТУП

У зв'язку з інтенсивним розвитком промислового птахівництва, виникненням нових і мутацією вже відомих збудників інфекційних хвороб птахів, проти яких проводиться профілактична вакцинація, потрібна розробка чутливих, високоспецифічних і автоматизованих методів оцінки імунного статусу птахів. Своєчасний моніторинг інфекційних хвороб птахів є невід'ємною частиною комплексу заходів, спрямованих на профілактику цих захворювань, що передбачає впровадження в практику діагностичних досліджень, що відповідають сучасному рівню розвитку науки.

Висока ефективність моніторингу інфекційних захворювань може бути досягнута тільки в тому випадку, коли методи діагностики доступні лабораторій на підприємстві і широко застосовуються в їх практичній роботі. Незважаючи на те, що традиційні імунологічні методи, як і раніше широко використовуються у ветеринарній практиці, метод ІФА займає провідне місце при проведенні рутинних досліджень. Переваги ІФА як методу полягають в швидкості постановки, чутливості, специфічності, безпеці, можливості автоматизації процесу. Комерційні набори для ІФА знайшли широке застосування в національних програмах боротьби з інфекційними хворобами птахів у багатьох країнах світу.

Найбільш актуальним для промислового птахівництва є моніторинг хвороб списку МЕБ (особливо небезпечних) і економічно значущих хвороб курей – ньюкаслської хвороби, інфекційної бурсальної хвороби, інфекційного бронхіту а також постійний суворий контроль за рівнем імунної відповіді за специфічної імунопрофілактики.

На сьогоднішній день у світі лабораторної діагностики існує велика кількість тест-систем для визначення рівня антитіл. Проте, найбільш розповсюдженими є діагностикуми виробників IDEXX (США), IDVet (Франція) та BioChek (Голландія). Кожна діагностична система цих виробників має ряд переваг та недоліків у використанні, що можуть



позначатися на результатах досліджень, їх інтерпретації та практичному застосуванні. З огляду на це актуальним є проведення досліджень з порівняння особливостей застосування тест-систем різних виробників для контролю специфічної імунопрофілактики інфекційних хвороб птиці.

**Об'єкт дослідження** – лабораторні дослідження для контролю специфічної імунопрофілактики інфекційних хвороб птиці.

**Предмет дослідження** – титри антитіл до антигенів вірусів хвороби Ньюкасла, інфекційного бронхіту та бурсальної хвороби.

**Метою роботи** було встановити особливості застосування імуноферментного аналізу для контролю специфічної імунопрофілактики інфекційних хвороб птиці.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- провести порівняння компонентів тест-систем різних виробників для серологічної діагностики хвороби Ньюкасла, інфекційного бронхіту птиці, бурсальної хвороби;
- визначити титр антитіл до антигенів вірусу бурсальної хвороби у сироватці крові імунізованої птиці діагностичними наборами різних виробників;
- з'ясувати рівень специфічних антитіл до антигенів вірусу хвороби Ньюкасла у сироватці крові імунізованої птиці діагностичними наборами різних виробників;
- встановити рівень специфічних імуноглобулінів до антигенів вірусу інфекційного бронхіту у сироватці крові імунізованої птиці діагностичними наборами різних виробників;
- розрахувати економічну ефективність проведеного імуноферментного аналізу для контролю специфічної імунопрофілактики інфекційних хвороб птиці.

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Суттєвою ланкою оптимізації економічних показників птахівництва є профілактика вірусних хвороб, що стало невід'ємною частиною технології ведення промислового птахівництва [16,18].

Власне вакцинація як захід може забезпечити повне благополуччя господарства лише в комплексі загально-господарських, ветеринарносанітарних та гігієнічних заходів. Серологічний моніторинг є одним із важливих інструментів розробки та підтримки ефективних програм вакцинацій птиці проти вірусних захворювань, в тому числі проти інфекційної бурсальної хвороби, інфекційного бронхіту птиці та хвороби Ньюкасла [22].

Існує безліч методів серологічного контролю: реакція нейтралізації (РН), реакція гемаглютинації (РГА), реакція затримки гемаглютинації (РЗГА), реакція непрямой (або пасивної) гемаглютинації (РНГА або РПГА відповідно), реакція дифузної преципітації (РДП), реакція імунної дифузії (РІД), реакція зв'язування комплементу (РЗК), імунохроматографічний метод, реакція імунофлюоресценції (РІФ), реакція латекс-аглютинації (РЛА), імуно-блотинг, імуноферментний аналіз (ІФА) та ін. У ветеринарній практиці в даний час провідне місце займає імуноферментний аналіз (ІФА) [32].

Переваги ІФА як методу (швидкість, чутливість, специфічність, безпечність, можливість автоматизації процесу), широке застосування комерційних наборів для ІФА в національних програмах боротьби з інфекційними хворобами птахів у багатьох країнах Західної Європи і Америки визначають його одним з провідних діагностичних тестів. Висока ефективність моніторингу інфекційних захворювань може бути досягнута тільки в тому випадку, коли методи діагностики доступні для регіональних і виробничих лабораторій і широко застосовуються в їх практичній роботі [20,39].

Протягом останнього десятиліття в промисловому птахівництві були зроблені спроби модернізації серологічної діагностики із застосуванням імуноферментного аналізу. Для збільшення кількості тестованих проб і зменшення витрати реактивів і трудовитрат була проведена оцінка різних методик визначення в ІФА титрів антитіл при дослідженні проб сироваток крові птахів в одному розведенні [29,30].

Точність і достовірність результатів, отриманих при дослідженні методом імуноферментного аналізу залежить від таких критеріїв:

1. Якості набору

- коректно вибраний тип набору та метод дослідження, який лежить в його основі (непрямий, конкурентний, а/Г-захват та інші);
- набір має бути високоспецифічним та чутливим.

2. Якості відбору зразків та правильному їх тестуванні, в залежності від типу набору;

3. Якості постановки

- дотримання умов зберігання та температурного режиму всіх складових набору;
- висококваліфікований оператор-серолог;
- каліброване та валідоване обладнання;
- зберігання температурного режиму та сталої вологості при тестуванні, поетапне слідування протоколу;
- використання правильної референсної сироватки.

4. Вірної інтерпретації результатів [7].

Беручи до уваги вище сказане, можна зробити висновок, що якість набору – одна з головних умов, так як інші дослідник може контролювати [7,8].

## 1.1. Імуноферментний аналіз. Принцип методу, класифікація

Імуноферментний аналіз (ІФА) або, точніше, ферментний імуносорбентний аналіз (англ. enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA) – лабораторний імунологічний метод для виявлення антигенів і антитіл, заснований на визначенні комплексу «антиген-антитіло» за рахунок введення в один із компонентів реакції ферментативної мітки з подальшою її детекцією за допомогою відповідного субстрату, що змінює своє забарвлення. Основою проведення будь-якого варіанту ІФА служить визначення продуктів ферментативних реакцій при дослідженні тестованих зразків порівняно з негативними і позитивними контролями [15].

ІФА з'явився в середині 60-х років і спочатку був тісно пов'язаний з розробкою радіоімунологічного аналізу. В первинному вигляді застосовувався як метод для ідентифікації антигену в гістологічному препараті (початкове застосування імуногістохімічного аналізу), а також для візуалізації ліній преципітації в тесті імунодифузії і імуноелектрофореза, а потім став використовуватися для кількісного визначення антигенів і антитіл в біологічних рідинах (стабілізована кров, сироватка крові, плазма, ексудат). У розробці методу брали участі Е. Енгвалла і Р. Пелман, а також незалежно від них В. Ван Веєман і Р. Шурс [16,17].

**Принцип методу.** Метод заснований на специфічному зв'язуванні антитіла з антигеном. Важливою відмінністю від інших серологічних реакцій є те, що один з компонентів кон'югований з ферментом, в основному це є вторинні антитіла. В результаті проведеної реакції утворених комплексів з відповідним хромогенним субстратом утворюється забарвлений продукт, кількість якого можна визначити спектрофотометрично (рис. 1) [14].

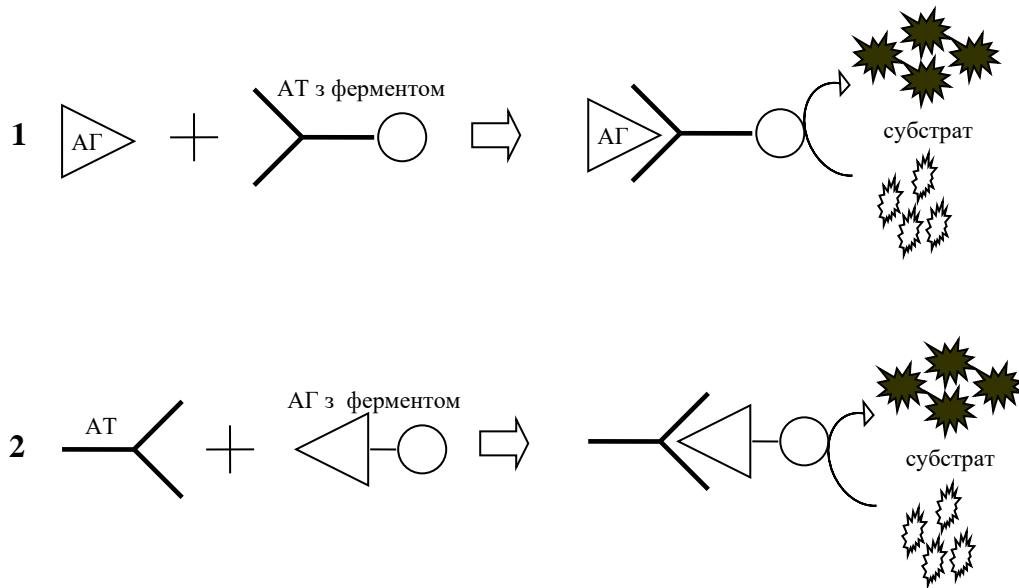


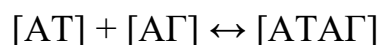
Рис. 1 Основні принципи ІФА

1) Для виявлення антигенів; 2) Для виявлення антитіл

Теоретично ІФА ґрунтується на даних сучасної імунохімії і хімічної ензимології, знанні фізико-хімічних закономірностей та основ взаємодії (гідрофобні, йонні, ван-дер-ваальсові та водні зв'язки), реакції антиген-антитіло, а також на головних принципах аналітичної хімії. Чутливість і специфічність ІФА, час, який витрачається на його проведення визначається трьома основними факторами:

- кінетичними,
- термодинамічними характеристиками реакції антиген-антитіло,
- співвідношенням реагентів, часом їх інкубації в розчині, здатністю до активності ферменту і роздільною здатністю методів його детекції [8,9].

У загальному вигляді утворення комплексу антиген-антитіло за принципом «ключ-замок» може бути описана простою схемою:



Будь-який метод ІФА містить 3 обов'язкові стадії:

1. стадія впізнавання тестованої сполуки специфічним до нього антитілом, що веде до утворення неподільного імунного комплексу;

2. стадія формування зв'язку кон'югату з імунним комплексом або з вільними місцями зв'язування;

3. стадія перетворення ферментної мітки в реєстрований сигнал, який можна детектувати за допомогою різних методів (фотометричний, спектрофотометричний, флуориметричний, хемілюмінісцентний, електрохімічний та інші) [8,9,33].

Імуноферментний аналіз порівняно з іншими методами детекції антигенів і антитіл має наступні переваги:

- висока чутливість, що дозволяє виявляти концентрації до 0,05 нг / мл (при умові правильного використання антигену або його частини для адсорбції на тверду фазу) , а за допомогою каскадних систем посилення дозволяє виявляти поодинокі молекули аналізованої речовини. Така чутливість методу визначається здатністю однієї молекули ферменту каталізувати перетворення великого числа молекул субстрату;

- можливістю використовувати мінімальні обсяги досліджуваного біологічного матеріалу (починаючи з 1 мкл);

- стабільністю при зберіганні всіх інгредієнтів, необхідних для проведення ІФА (до року і більше), дотримуючись температурного режиму, починаючи одразу після виготовлення, при транспортуванні та таке інше;

- простотою і швидкістю проведення реакції;

- наявністю як інструментального (в якісному і кількісному варіанті), так і візуального обліку;

- можливістю автоматизації всіх етапів реакції;

- відносно інших методів, низькою вартістю діагностичних наборів;

- можливість ранньої діагностики інфекції;

- уніфікованість та придатність для масових обстежень;

- легкість у відстеженні динаміки розвитку процесу інфекційного захворювання;

- завдяки новітній DIVA-стратегії (Differentiation of Infected from Vaccinated Animals) є можливість диференціації антитіл, які утворились

внаслідок сероконверсії після інфікування польовим штамом збудника та вакцинним штамом із застосуванням рекомбінантних векторних антигенів для тест-наборів. Ця тема є особливо актуальною в птахівництві і не тільки [15,23,39].

Серед недоліків слід виділити наступне:

- присутня можливість людського фактору;
- автоматизовані системи для проведення ІФА без вторгнення в процес людини коштують відносно дорого;
- не є прямим методом дослідження, адже виявляє наслідки хвороби, а не самого збудника;
- для визначення стадії захворювання (ранній або пізній період) потрібно застосовувати тест-системи з бі-лунковим форматом або декілька наборів одночасно, що підвищує вартість аналізу, адже IgM та IgG мають різну будову [16,25,34].

Завдяки своїй невисокій вартості та екологічній безпеці, ІФА перейшов в розряд стандартних, «рутинних» аналізів [6].

### **Класифікація ІФА**

В основу класифікації методів ІФА лежить кілька підходів:

1. За типом реагентів, присутніх на першій стадії ІФА, розрізняють непрямий (неконкурентний) і конкурентний методи [8].

А) У конкурентному ІФА на першій стадії в системі присутні одночасно аналізоване з'єднання і його аналог, мічений ферментом. При проведенні реакції мічені (вторинні) і досліджувані антитіла конкурують за активні центри антигену, імобілізованого на твердій фазі. Після завершення інкубації і видалення прореагувавших компонентів проводиться ферментативна реакція, результати якої обернено пропорційні кількості антитіл в досліджуваному зразку (Рис. 2) [8,9].

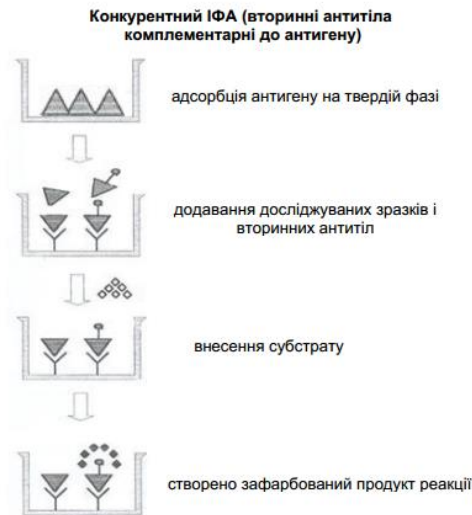


Рис. 2 Схематичне зображення конкурентного ІФА

Б) Прямий ІФА. На першому етапі реакції досліджуваний зразок вносять на плашку для зв'язування з антигеном. Потім до утвореного або неутвореного комплексу додають кон'югат. Після видалення непрореагувавших компонентів реакції проводиться ферментативна реакція, інтенсивність якої прямо пропорційна вмісту досліджуваних антигенів у зразку і взагалі говорить про їх наявність в досліджуваному матеріалі (Рис. 3) [22].

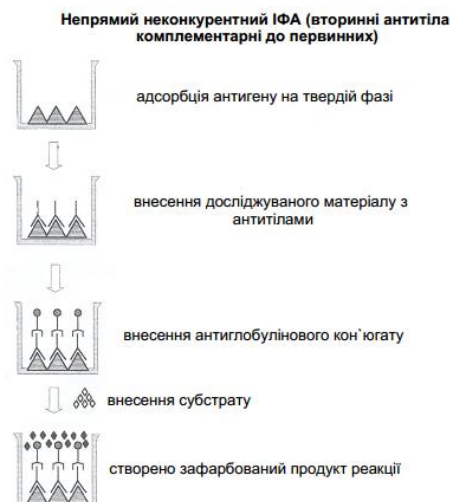


Рис. 3 Схематичне зображення непрямого ІФА



Конкурентні твердофазні методи мають меншу чутливістю порівняно з неконкурентними і є лише якісними, а не кількісними методами. Межа виявлення різних з'єднань для них обмежена як чутливістю реєстрації ферментної мітки, так і афінністю антитіл, в той час, як для неконкурентних методів, при відсутності неспецифічних взаємодій, - тільки чутливістю визначення ферменту. Тому для досягнення високої чутливості аналізу конкурентним методом необхідно використовувати високоафінні антитіла. Сфера застосування конкурентних методів ІФА, тобто їх перевага – це можливість тестування різних видів тварин за допомогою однієї тест-системи [38].

## 2. Всі методи ІФА поділяють на гомогенні і гетерогенні.

Якщо всі три стадії ІФА проходять в розчині і між основними стадіями немає додаткових етапів поділу утворених імунних комплексів від непрореагованих компонентів, метод відноситься до групи гомогенних [6,15].

До гомогенних відносяться методи, здійснювані в однофазній системі, і які не потребують стадії механічного поділу утворених комплексів. У всіх схемах проведення гомогенного імуноферментного аналізу реєструється концентрація не утворених специфічних комплексів антитіло-антиген, а тих, що залишилися вільних центрів специфічного зв'язування. При зв'язуванні антитіла з антигеном, що містить ферментну мітку, відбувається інгібування активності ферменту на 95% по відношенню до високомолекулярного субстрату, що обумовлено стеричним виключенням субстрату з активного центру ферменту. У міру збільшення концентрації антигену зв'язується все більше антитіл і зберігається все більше вільних кон'югатів антиген-фермент, здатних гідролізувати високомолекулярний субстрат. Відповідна концентрація незайнятих місць специфічного зв'язування, може як зменшуватися, так і збільшуватися, що обумовлено різною природою впливу зв'язування лігандів на ферментативну активність. Введення мітки в молекулу антигену є одним з найбільш поширених підходів в гомогенних методах імуноферментного аналізу. Всі гомогенні методи відносяться до конкурентних та засновані на

одночасній взаємодії з антитілами аналізованого і міченого антигенів. Після утворення в розчині відповідного імунохімічного комплексу проводять вимір ферментативної активності, яка пропорційна концентрації вільного або пов'язаного міченого ліганду. Антитіло, утворюючи комплекс з антигеном, пригнічує активність пов'язаного ферменту [11,12].

Аналіз проводять дуже швидко, для одного визначення потрібно 1 хвилина. Чутливість методу досить висока. З його допомогою можна визначити речовину на рівні пікомоль ( $10^{-12}$  ступені) [37].

Для гетерогенних методів характерно проведення аналізу в двофазній системі за участю твердої фази – носія, і обов'язкова стадія поділу імунних комплексів від непрореагованих компонентів (відмивання), які знаходяться в різних фазах (утворені імунні комплекси знаходяться на твердій фазі, а не прореаговані комплекси – в розчині). Гетерогенні методи, в яких формування імунних комплексів на першій стадії протікає на твердій фазі, називають твердофазними методами [16,36].

Методи відносяться до гомогенно-гетерогенних, якщо перша стадія – утворення специфічних комплексів відбувається в розчині, а потім для поділу компонентів використовують тверду фазу з іммобілізованим реагентом [14].

### 3. За принципом визначення тестованої речовини:

А) Пряме визначення концентрації речовини (антигену або антитіла) по числу провзаємодіяних з ним центрів зв'язування. В цьому випадку ферментна мітка буде перебувати в нинішньому специфічному комплексі АГ-АТ. Концентрація речовини, що визначається буде прямо пропорційна реєстрованому сигналу [8,36].

Б) Визначення концентрації речовини по різниці загального числа місць зв'язування і залишившихся вільних центрів зв'язування. Концентрація речовини, що визначається при цьому буде зростати, а реєстрований сигнал знижуватися, отже, в даному випадку простежується зворотна залежність від величини реєстрованого сигналу [27,28].

## **1.2. Іміноферментний аналіз як універсальний інструмент для контролю специфічної імунопрофілактики проти інфекційних хвороб птиці**

Використання даних серології, отриманих за допомогою методу ІФА, допомагають контролювати епізоотологічну ситуацію в стаді. В системі організації здоров'я птиці було повсюдно прийнято використання імуноферментного аналізу для контролю багатьох захворювань, включаючи інфекційний бронхіт (IB), хворобу Ньюкасла (ND) та інфекційну бурсальну хворобу (IBD). Серологія є корисним лабораторним інструментом для відстеження імунної відповіді після вакцинації і для постановки діагнозу [11].

Моніторинг імунної відповіді на імунопрофілактичні заходи допомагає виявити і діагностувати будь-які зміни в системі захисту поголів'я з подальшими коригувальними заходами, якщо вакцинація виявилася невдалою. Таким чином, відстеження результатів вакцинації слід розглядати як «Контроль якості» вакцинацій. Важливо при відстеженні імунної відповіді за допомогою ІФА вживати також належних заходів в залежності від результатів для поліпшення, оптимізації і підтримки ефективності програм вакцинації [11,13].

Важливим етапом у відстеженні імунної відповіді за допомогою ІФА є інтерпретація результатів. Для того щоб успішно інтерпретувати результати ІФА повинні бути дотримані наступні умови. У лабораторії слід використовувати зовнішні референсні контролю, щоб мати додаткову гарантію продуктивності і точності результатів і забезпечити правильну інтерпретацію. Використання референсної сироватки дає змогу майже повністю виключити помилки при проведенні реакції [10].

Перед проведенням аналізу необхідно мати уявлення про те, який результат має бути після застосування тиеї чи іншої вакцини – базовий рівень титрів для успішного специфічного захисту птиці. Це дозволяє коректно інтерпретувати отримані результати, порівнюючи з базовим значенням рівня, і

зробити висновок про успішність програми вакцинації. Деякі виробники комерційних тест-систем для ІФА та виробники вакцин мають базові лінії для кожного типу стада з різними можливими програмами вакцинації, але вони знаходяться в широкому діапазоні [12,13].

Інтерпретація результатів ІФА зазвичай проводиться шляхом оцінки трьох основних компонентів гуморального відповіді після введення вакцини, якими є:

1. Інтенсивність імунної відповіді на що вказує значення середнього титру.
2. Однорідність значень титрів, на що вказує коефіцієнт варіації (% CV).
3. Тривалість імунної відповіді, на що вказує середній титр в залежності від часу (дослідження парних сироваток крові) [23].

Імунна відповідь на вакцинні (живі, атенуйовані, вбиті, векторні) штами мікроорганізмів відрізняється від сероконверсії після інфікування польовим штамом, інтенсивність якої залежить від виду вакцин та шляху введення. Завдяки новітній DIVA-стратегії (Differentiation of Infected from Vaccinated Animals) є можливість диференціації антитіл, які утворились внаслідок сероконверсії після інфікування польовим штамом збудника та вакцинним штамом із застосуванням рекомбінантних векторних антигенів для тест-наборів. Ця тема є особливо актуальною в птахівництві [20].

Необхідно також пам'ятати, що коректний вибір тест-системи (а головне методу ІФА, що лежить в основі) та правильний відбір патологічного матеріалу забезпечує ефективну і правильну оцінку імунного статусу поголів'я. Тест-система має відповідати таким критеріям:

- висока чутливість (аналітична також), специфічність та ексклюзивність;
- виключення можливості перехресних реакцій;
- стійкість компонентів набору до умов навколишнього середовища [10].

## 2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Матеріал і методи досліджень

Дипломна робота виконана на базі Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів агропромислового комплексу Дніпровського державного аграрно-економічного університету.

Для проведення досліджень рівня антитіл методом імуноферментного аналізу в умовах програми міжнародних міжлабораторних порівняннях було обрано 3 виробники комерційних тест-систем - IDVet (Франція), IDEXX (США), BioChek (Голландія). Сироватки крові курей надані в рамках програми міжлабораторного контролю «International Proficiency Testing Scheme (PTS)» (Міжнародна схема тестування кваліфікації (PTS)), організована лабораторією GD Animal Health (м. Девентер, Нідерланди), в якому приймав участь Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів агропромислового комплексу Дніпровського Державного Аграрно-економічного Університету впродовж 2019 року.

Дослідження рівня антитіл до *IBDV*, *NDV* та *IBV* проводився методом твердофазного гетерогенного непрямого імуноферментного аналізу. В умовах програми міжлабораторного контролю «International Proficiency Testing Scheme (PTS)» для досліджень було необхідно використовувати наступні тест-системи: виробника IDVet (Франція) «ID Screen® IBD Indirect», «ID Screen® Infectious Bronchitis Indirect», «ID Screen® Newcastle Disease Indirect Conventional Vaccines»; IDEXX (США) – «IDEXX NDV Ab Test for chickens», «IDEXX IBD Ab Test», «IDEXX IB Test Ab»; BioChek (Голландія) – «BioChek Infectious Bursal Disease Antibody Test Kit», «BioChek Infectious Bronchitis Antibody Test Kit», «BioChek Newcastle Disease Antibody Test Kit».

Сироватки крові від курей (бройлери та несучки) надані лабораторією GD Animal Health (м. Девентер, Нідерланди) і представляли собою 16 ліофілізованих сироваток. Отримання зразків на базі лабораторії GD Animal

Health (м. Девентер, Нідерланди) відбувалось наступним чином. Спочатку SPF (specific pathogens free, вільні від специфічних патогенів) тварини утримувались окремо по 16-ти групам, у відповідний для кожної групи тварин день щеплені відповідними різними вакцинами. Далі було здійснено забір крові від тварин, відстоювання зразків при кімнатній температурі, відділення згустку, отримання сироватки крові, об'єднання зразків з кожної групи в пули, процес гомогенізації, стабілізації та ліофілізації. Ліофілізовані зразки були ідентифіковані за вибірковими номерами IBDV №1, IBDV №2, IBDV №3, IBDV №4, IBDV №5, IBDV №6, NDV №1, NDV №2, NDV №3, NDV №4, NDV №5, IBV №1, IBV №2, IBV №3, IBV №4, IBV №5.

Опис зразків, що досліджувалися на рівень антитіл до збуднику бурсальної хвороби (*IBDV*). Зразок IBDV №1 – це ліофілізована сироватка крові від SPF (specific pathogens free, вільні від специфічних патогенів) нещеплених курей несучок, відібрана від тварин на 7-му тижні життя. Зразок IBDV №2 – це ліофілізована сироватка крові від курей несучок, відібрана від тварин на 17-му тижні життя на 7-й день після щеплення комерційною живою вакциною «Nobilis Gumboro D78» на 16-му тижні життя. Зразок IBDV №3 – це ліофілізована сироватка крові від курей бройлерів, відібрана від тварин на 13-му з половиною тижні життя на 10-й день після щеплення комерційною живою вакциною «HIPRAGUMBORO® GM/97» на 12-му тижні життя. Зразок IBDV №4 – це ліофілізована сироватка крові від курей бройлерів, відібрана від тварин на 14-му тижні життя на 14-й день після щеплення комерційною живою вакциною «HIPRAGUMBORO® CH/80 - CW» на 12-му тижні життя. Зразок IBDV №5 – це ліофілізована сироватка крові від курей несучок, відібрана від тварин на 18-му тижні життя на 14-й день після щеплення комерційною живою вакциною «BURSINE®-2» на 16-му тижні життя. Зразок IBDV №6 – це ліофілізована сироватка крові від курей несучок, відібрана від тварин на 15-му тижні життя на 21-й день після щеплення комерційною живою вакциною «СЕВАК® IBD L» на 12-му тижні життя.

Опис зразків, що досліджувалися на рівень антитіл до збуднику хвороби Ньюкасла (*NDV*). Зразок *NDV* №1 – це ліофілізована сироватка крові від SPF (specific pathogens free, вільні від специфічних патогенів) нещеплених курей несучок, відібрана від тварин на 7-му тижні життя. Зразок *NDV* №2 – це ліофілізована сироватка крові від курей несучок, відібрана від тварин на 35-й добі життя на 7-й день після щеплення комерційною живою вакциною «*AviPro® ND HB1*» на 28-й добі життя. Зразок *NDV* №3 – це ліофілізована сироватка крові від курей несучок, відібрана від тварин на 5-му з половиною тижні життя на 10-й день після щеплення комерційною живою вакциною «*Вольвак® ND LaSota MLV*» на 4-му тижні життя. Зразок *NDV* №4 – це ліофілізована сироватка крові від курей несучок, відібрана від тварин на 35-й добі життя на 14-й день після щеплення комерційною живою вакциною «*Nobilis ND Clone 30*» на 21-й добі життя. Зразок *NDV* №5 – це ліофілізована сироватка крові від батьківського стада бройлерів, відібрана від тварин на 55-му тижні життя на 20-й день після щеплення комерційною живою вакциною «*Poulvac® NDV Ulster*» на 52-у тижні життя.

Опис зразків, що досліджувалися на рівень антитіл до збуднику інфекційного бронхіту (*IBV*). Зразок *IBV* №1 – це ліофілізована сироватка крові від SPF (specific pathogens free, вільні від специфічних патогенів) нещеплених курей несучок, відібрана від тварин на 7-му тижні життя. Зразок *IBV* №2 – це ліофілізована сироватка крові від курей несучок, відібрана від тварин на 5-му з половиною тижні життя на 10-й день після щеплення комерційною живою вакциною «*Poulvac® IB H120*» на 4-у тижні життя. Зразок *IBV* №3 – це ліофілізована сироватка крові від курей несучок, відібрана від тварин на 14-му тижні життя на 14-й день після щеплення комерційною живою вакциною «*Poulvac® IBV QX*» на 12-у тижні життя. Зразок *IBV* №4 – це ліофілізована сироватка крові від курей несучок, відібрана від тварин на 14-му тижні життя на 14-й день після щеплення комерційною живою вакциною «*Nobilis IB 793B 4/91*» на 12-у тижні життя. Зразок *IBV* №5 – це ліофілізована сироватка крові від курей несучок, відібрана від тварин на 14-му тижні життя

на 14-й день після щеплення комерційною живою вакциною «Nobilis MM Ark» на 12-у тижні життя.

Кожен зразок (IBDV №1-№6, NDV №1-№5, IBV №1-№5) був протестований у 5-ти паралелях.

Для первинної обробки матеріалу та готування зразків використовувались дозатори змінного об'єму Biohit-Proline 0,5-10,0 мкл одноканальний, 20-200 мкл одноканальний, 100-1000 мкл одноканальний. Після отримання ліофілізованих сироваток крові, проводилось їх відновлення дистильованою водою у співвідношенні 1:1. Наявність антитіл до антигенів збудників хвороби Ньюкасла, інфекційного бронхіту та бурсальної хвороби проводився фотометричним методом на аналізатор-спектрофотометрі BioTek ELx800 (виробництва США) із використанням вищеперерахованих комерційних тест-систем.

Після реконструкції ліофілізованих сироваток крові їх поміщали в епендорфи об'ємом 500 мкл, використовуючи для кожного зразка окремий одноразовий накінцівник та маркували їх.

Специфічні імуноглобуліни до *IBDV*, *NDV* та *IBV* виявляли у діагностичному титрі 1:500. Для цього у планшет для попереднього розведення зразків вносили 5 мкл сироватки крові та 245 мкл для кожної системи відповідного буферного розчину для зразків. Перемішували, піпетуючи розчин в кожній лунці одноразовим окремим накінцівником та дозатором змінного об'єму Biohit-Proline 100-300 мкл 8-канальним.

У робочий планшет вносили 90 мкл для кожної системи відповідного буферного розчину для зразків та 10 мкл попередньо розведених сироваток крові, піпетували. Таким чином, ми отримали кінцеве розведення 1:500.

У лунки, що відведені для контрольних та референсних зразків, буферний розчин не вносився, так як вони по протоколу постановки вносяться нерозведеними, тобто є готовими до використання. Для постановки реакції ІФА на виявлення специфічних антитіл до збудників IBV та NDV наборами виробника IDVet (Франція) «ID Screen®: IBVS» та «ID Screen®: NDVS-CV»



також використовувалась референсна сироватка «Ready-to-use multi-positive serum – ref. A» для контролю якості постановки. «Ready-to-use multi-positive serum – ref. A» – це готова до вживання мультипозитивна куряча сироватка, позитивна з наборами ID Screen®: IBDVP2, IBVS, ILTS, ILTGBS, EDS, MG / MS (комбінований комплект), NDVS, NDVS-CV. Використовується як внутрішній довідковий матеріал для контролю якості. Для постановки реакції ІФА на виявлення специфічних антитіл до збуднику ІВ набором виробника IDVet (Франція) «ID Screen®: IBDS» також використовувалась референсна сироватка «Ready-to-use multi-positive serum – ref. B» виробництва компанії IDVet (Франція) в якості внутрішнього довідкового матеріалу для контролю якості. «Ready-to-use multi-positive serum – ref. B» – готова до використання мультипозитивна куряча сироватка для використання з наборами ID Screen®: AEVS, IBDS, ILTGIS, MPVS, MG, MS, NDVNP, PMS-CHICK, REOS, SALS, SALSGPD. Використовується як внутрішній довідковий матеріал для контролю якості.

Заповнений мікропланшет поміщали до термошейкери для інкубації за температури 21 °C на 30 хв. Цей крок є спільним для усіх протоколів постановки обраних тест-систем.

За 5 хвилин до кінця інкубації готували робочий розчин кон'югату. Після інкубації мікропланшети поміщали до автоматичної мийки для мікропланшетів ВіоТек ELx50 (виробництва США), кількість промивань різниться в залежності від протоколу постановки. Промиті лунки обережно вибивали на бавовняний рушник для повного звільнення від розчину для промивання.

Попередньо підготовлений розчин кон'югату вносили по 100 мкл в кожен лунку, планшети поміщали в термошейкер за температури 21 °C на 30 хв. Після другої інкубації мікропланшети поміщали до автоматичної мийки для мікропланшетів ВіоТек ELx50 (виробництва США), повторно здійснюючи етап промивання і потім вносили 100 мкл субстратного розчину і поміщали на 15 хвилин до термошейкери для інкубації. По закінченню часу без етапу

промивання вносили по 100 мкл стоп-розчину для зупинки ферментативної реакції.

Мікропланшет поміщали у каретку аналізатора-спектрофотометра для зчитування оптичної щільності розчинів BioTek ELx800 (виробництва США) за допомогою комп'ютерної програми. Для тест-систем виробництва IDEXX довжина хвилі складає 650 нм, BioChek – 405 нм, IDVet – 450 нм.

Валідація тесту для систем виробництва IDVet. Результати тесту вважаються вірними, якщо:

- середнє значення\* оптичної щільності позитивного контролю (ОЩк+) більше 0,250:

$$\text{ОЩк+} > 250$$

\* - середнє значення ОЩк+ та ОЩк- вираховується за звичайною математичною формулою для середніх значень.

- співвідношення між середніми значеннями оптичних щільностей позитивного контролю (ОЩк+) і негативного контролю (ОЩк-) більше 3:

$$\text{ОЩк+} / \text{ОЩк-} > 3$$

Валідація тесту для систем виробництва IDEXX. Результати тесту вважаються вірними, якщо:

- різниця між середніми значеннями\* оптичних щільностей позитивного контролю (ОЩк+) і негативного (ОЩк-) більше 0,075:

$$\text{ОЩк+} - \text{ОЩк-} > 0,075$$

\* - середнє значення ОЩк+ та ОЩк- вираховується за звичайною математичною формулою для середніх значень.

- середнє значення оптичних щільностей негативного контролю (ОЩк-) більше 3:

$$\text{ОЩк-} > 0,150$$

Валідація тесту для систем виробництва BioChek. Результати тесту вважаються вірними, якщо:

- середнє значення\* оптичної щільності позитивного контролю (ОЩк+) більше 0,3:

$$\text{ОЩк+} > 0,3$$

\* - середнє значення ОЩк+ та ОЩк- вираховується за звичайною математичною формулою для середніх значень.

- різниця між середніми значеннями оптичних щільностей позитивного контролю (ОЩк+) і негативного контролю (ОЩк-) більше 0,15:

$$\text{ОЩк+} - \text{ОЩк-} > 0,15$$

Інтерпретація результатів. Для кожного зразка розраховується значення S/P (для всіх систем формула спільна) і титр антитіл за формулами:

1) Значення S/P

$$S/P = (\text{ОЩзразку} - \text{ОЩк-}) / (\text{ОЩк+} - \text{ОЩк-})$$

2) Титр антитіл

$$\log_{10}(\text{титр}) = A1 * \log_{10}(S/P) + A2$$

$$\text{титр} = 10^{\log_{10}(\text{титр})},$$

де значення A1, A2 для розрахунку титру антитіл для кожної системи містяться в протоколі досліджень.

Інтерпретація результатів наведена у таблиці 1.

*Таблиця 1*

#### Інтерпретація результатів за значенням S/P та титром

S/P	Титр антитіл	Імунний статус
$S/P \leq A3$	Титр $\leq A4$	Негативний
$S/P > A3$	Титр $> A4$	Позитивний

де значення A3 та A4 для інтерпретації результатів за значенням S/P та титром для кожної системи містяться в таблиці 2.

Таблиця 2

**Значення А3 та А4 для інтерпретації результатів за значенням S/P  
та титром для кожної системи**

Назва набору	Значення А3 (S/P)	Значення А4 (титр антитіл)
«ID Screen® IBD Indirect»	0,3	875
«ID Screen® Infectious Bronchitis Indirect»	0,2	853
«ID Screen® Newcastle Disease Indirect Conventional Vaccines»	0,3	993
«IDEXX NDV Ab Test for chickens»	0,2	396
«IDEXX IBD Ab Test»	0,2	396
«IDEXX IB Test Ab»	0,2	396
«BioChek Infectious Bursal Disease Antibody Test Kit»	0,450	391
«BioChek Infectious Bronchitis Antibody Test Kit»	0,680	834
«BioChek Newcastle Disease Antibody Test Kit»	0,750	1159

Отримані дані статистично обробляли за допомогою пакету прикладних програм MS Excel із використанням критерію вірогідності Стюдента. Селективні параметри, представлені в роботі, мають такі позначення: М – середнє арифметичне, m - стандартна похибка середнього арифметичного. Вірогідними вважали зміни між наборами для виявлення антитіл за рівня статистичної значущості  $*-p \leq 0,05$ ;  $** -p \leq 0,01$ .

Економічну ефективність визначали згідно з діючими методичними рекомендаціями [5].

## 2.2. Характеристика науково-дослідного центру

Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету був створений за наказом ректора агроуніверситету № 1484 від 14 липня 2008 року, у відповідності з рішенням Вченої ради протокол № 8. НДЦ відкритий на факультеті ветеринарної медицини на базі проблемної науково-дослідної лабораторії фізіології та функціональної морфології продуктивних тварин, за адресою м. Дніпро, Соборний р-н, вул. Мандриківська 256. Директор центру - кандидат ветеринарних наук, професор ДДАЕУ Масюк Дмитро Миколайович.

Науково-дослідний центр атестований Державним науково-дослідним інститутом з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи на проведення робіт в сфері державного метрологічного контролю, акредитований Державним науково-дослідним контрольним інститутом ветеринарних препаратів та кормових добавок на проведення ПЛР і ELISA - діагностики, біохімічних, хіміко-токсикологічних і морфологічних досліджень в галузі ветеринарної медицини і сільського господарства і сертифікований Українським біологічним центром сертифікації на визначення вимірювальних можливостей.

Основними завданнями НДЦ є:

1. розробка методів діагностики хвороб тварин із застосуванням сучасних молекулярних методів (імунохімічний, імуногістохімічний аналіз та ПЛР);
2. визначення морфологічних та функціональних маркерів стану життєзабезпечуючих систем у продуктивних тварин в умовах антропогенного пресингу та інтенсивного використання;
3. удосконалення технологій вирощування, годівлі, систем імунопрофілактики та її оцінки ефективності у продуктивних та інших видів свійських тварин;

4. дослідження якості кормів, морфофункціонального статусу організму тварин та показників біобезпеки тваринницької продукції та розробка системи моніторингу при здійсненні екологічного контролю виробництва сільськогосподарської продукції промислових регіонів України;

5. розробка ефективних способів профілактики і корекції порушень метаболізму та стимуляції неспецифічної та імунологічної реактивності організму у тварин в екологічно небезпечних умовах під дією інтенсивних антропогенних факторів;

6. проведення науково-дослідних і виробничих експериментів у господарствах різних областей України.

Проведення наукових досліджень в науково-дослідному центрі зосереджено на питаннях функціональної морфології та фізіології основних систем життєзабезпечення продуктивних тварин, ветеринарної клінічної біохімії, токсикології та хіміко-токсикологічного аналізу кормів та продуктів харчування, а також імунологічних та молекулярно-генетичних методів діагностики та контролю інфекційних хвороб тварин; удосконалення системи оцінки якості та біологічної безпеки продукції АПК на всіх етапах її виробництва.

Науково-дослідний центр працює у тісній творчій співпраці (на основі відповідних договорів) зі структурними підрозділами Міністерства аграрної політики та продовольства України, науково-дослідними установами Української академії аграрних наук та може здійснювати спільну науково-виробничу діяльність з провідними підприємствами України в галузі тваринництва на основі господарчих договорів.

Науково-дослідні роботи в науково-дослідному центрі виконуються:

□ науковими працівниками, технічним і допоміжним персоналом науково-дослідного центру, а також працівниками із числа навчально-допоміжного персоналу університету, співвиконавцями з інших вузів і організацій у порядку виконання договірних робіт;

□ професорсько-викладацьким складом, претендентами на здобуття вченого ступеня та аспірантами, що працюють над дисертаціями, які відповідають науковому профілю НДЦ;

□ магістрами і студентами під час виконання курсових, дипломних та інших дослідницьких робіт;

□ стажистами-дослідниками з числа молодих спеціалістів кафедри та відряджених з інших організацій.

НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК складається з 5 відділів:

1. Відділ імунохімічного та молекулярно-генетичного аналізу;
2. Відділ фізіології, біохімії та хіміко-токсикологічного аналізу;
3. Відділ бактеріології та біотехнології;
4. Відділ патоморфології та імуногістохімії;
5. Аналітичний відділ.

Кожен з вищенаведених відділів обладнаний сучасним обладнанням, необхідним для вирішення вище перерахованих завдань.

Відділ фізіології, біохімії та хіміко-токсикологічного аналізу складається з лабораторії клінічної біохімії та лабораторії хіміко-токсикології, які оснащені сучасним обладнанням (КФК-3, спектрофотометри «Спектрофотометр 2000» і «Spectrometer T 60 U», атомно-абсорбційний спектрофотометр Selmi - 115 FCM, Флюорат 02 – 2М, мікроскоп Olympus CH 20, концентратор центрифужного типу «Eppendorf Plus», газовий хроматограф «Цветхром-500», два рідинні хроматографи «Agilent Technologies 1260 Infinity», роторний випарювач РИ 2, автоматичними біохімічними «Biochem 200» і «Miura 200», та гематологічними аналізаторами, тощо.), завдяки якому проводяться морфологічні та біохімічні дослідження крові та сечі, у біологічних субстратах визначається вміст сирого протеїну, клітковини, жиру, мінеральних речовин, вітамінів, амінокислот, мікотоксинів, пестицидів, тощо.

Відділ морфологічних досліджень застосовує методи гістології та імуногістохімії для діагностики хвороб тварин та визначення їх імунного

статусу, займається мікроструктурним аналізом кормів, м'яса та м'ясних продуктів для встановлення їх якості та відповідності вимогам нормативних документів. Цей відділ забезпечений: термостатами ТМ – 80 на 37°C, та 56 °C, санними мікротомами МС 2, ротаційним мікротом МРС, мікротомом-кріостатом, мікроскопами: МБС 10, Olympus CH 20 та CX 41, Leica DM1000 та ін.

У відділі бактеріології та біотехнології за допомогою класичних бактеріологічних методів проводиться діагностика інфекційних хвороб тварин, культивуються, індикуються та ідентифікуються мікроорганізми зподальшим встановленням їх чутливості до різних антибіотиків, здійснюється контроль за ефективністю дезінфекції, проводяться ветеринарно-санітарні дослідження кормів, води, харчових продуктів, тощо. Цей відділ обладнаний наступним устаткуванням: термостати ТС-80 та ТСО-80, шафа ламінарна II класу біобезпеки «ШЛВ-2а», стерилізатор ВК-75, автоклав «Нарсо», ваги електронні лабораторні PS 210 та ін.

Лабораторія ПЛР досліджень відділу імунохімічного та молекулярно-генетичного дослідження має Атестат акредитації ДНДКІВПКД (№ 027/вир.лаб. від 11.08.2017 р.), а також Сертифікат визнання вимірювальних можливостей ОС «УБЦС» (№ LB/04/2016 від 08.11.2016 р.).

Лабораторія полімеразної ланцюгової реакції складається з двох умовних зон: «брудної», що включає в себе кімнату підготовки зразків та кімнату виділення нуклеїнових кислот, та «чистої» – кімната приготування реакційних сумішей, кімната внесення зразків, кімната проведення ампліфікації та детекції результатів.

Кімнати екстракції нуклеїнових кислот, приготування реакційних сумішей, внесення зразків та проведення ПЛР-ампліфікації складаються з двох частин: передбоксу та боксу. Передбокси кожної кімнати обладнані рукомийниками, вішаками зі спецодягом та полицками, на яких розташовані одноразові паперові рушники, одноразові рукавички та маски, ємності-дозатори з дезінфікуючим розчином. В боксах знаходиться відповідне



обладнання, необхідне для проведення цільових досліджень. Перед входом або виходом з боксу відповідальний працівник НДЦ зобов'язаний змінити спецодяг та обробити шкірні покриви рук дезінфікуючим розчином з метою попередження контамінації робочого місця.

Лабораторія ПЛР та ІФА досліджень обладнана вентиляцією, конструкція якої попереджує обмін повітряних мас між «брудною» та «чистою» зонами та забезпечує оновлення повітря в робочих кімнатах. Припливно-витяжна вентиляція забезпечує очищення повітря фільтрами грубої фільтрації (для очищення припливних повітряних мас), та тонкої фільтрації (для очищення витяжних повітряних мас).

Лабораторії відділу імунохімічного та молекулярно-генетичного дослідження обладнані водопроводом, каналізацією, електрикою, а також забезпечені достатнім природним та штучним освітленням відповідно до норм чинного законодавства України.

Лабораторія імунохімічних досліджень оснащена наступним обладнанням: морозильною камерою для зберігання зразків сироваток крові у температурному діапазоні від -18 до -2 °С; холодильною камерою для зберігання реактивів які використовуються у проведенні дослідження (+8 – +2 °С); термостатом-шейкером з твердотільним термоблоком для термостатування та перемішування полістиролових планшетів для ELISA; автоматичною мийкою BioTek ELx50 для відмивання лунок при проведенні імуноферментного аналізу; імуноферментним аналізатором BioTek ELx800, який оснащений чотирма світлофільтрами з довжинами хвилі – 405, 450, 490, 630 та 650 нм Biohit для вимірювання оптичної щільності забарвлених розчинів у лунках полістиролових планшетів; набором одно- та восьмиканальних мікродозаторів з перемінним об'ємом та штативами для них, а також витратними матеріалами: наконечники; пробірки типу Eppendorf об'ємом 1,5 мл; титр-трубки; гумові перчатки; робочі штативи для мікропробірок; ванни для приготування та використання робочих розчинів, тощо.

## 2.3. Результати власних досліджень

### 2.3.1. Порівняння компонентів тест-систем трьох виробників для серологічної діагностики хвороби Ньюкасла, інфекційного бронхіту та бурсальної хвороби

Порівняльна характеристика складових наборів, що використовувались для дослідження мають ряд відмінностей, які наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

#### Характеристика складових тест-систем різних виробників для серологічної діагностики хвороб птиці

Складова набору	Фірми-виробники		
	BioChek	IDVet	IDEXX
Формат плашок	Моноплашка (96 лунок)	Стриповані (стрипи по 8 лунок)	Моноплашка (96 лунок)
Антиген, що використовується для адсорбції	Нативний антиген	Нативний антиген	Нативний антиген
Концентрація кон'югату	Готовий до використання	10X	Готовий до використання
Субстратний розчин	Міститься в сухому вигляді в таблетках	Готовий до використання	Готовий до використання
Розчин для промивання	Міститься в сухому вигляді в таблетках	20X	Дистильована вода

1. Антиген, який використовується для адсорбції лунок. Виробники комерційних тест-систем IDEXX, BioChek використовують для покриття дна лунок нативні інактивовані антигени збудників хвороби Ньюкасла,

інфекційного бронхіту та бурсальної хвороби для кожного набору відповідно. Використання хімічно неочищеного антигену (тобто цілого інактивованого збуднику) знижує специфічність і чутливість набору та зменшує кількість перехресних реакцій. Виробник тест-систем IDVet використовують для адсорбції на дно лунки очищений нативний антиген відповідних збудників для промислового виробництва набору.

2. Кон'югат. Виробники BioChek та IDEXX використовують кон'югат готовий для використання. Це спрощує постановку реакції, пришвидшує отримання результатів, зводить до мінімуму похибку оператора при розведенні кон'югату. Так, збільшення або зменшення концентрації кон'югату, що не передбачено протоколом постановки, призводить до хибнопозитивних та хибнонегативних результатів відповідно, а за контролю вакцинації – невірної оцінки імунного статусу поголів'я. Виробник IDVet використовує концентрований кон'югат (10X), що подовжує його строк використання.

3. Таблетки для приготування розчинів субстрату та для етапу промивання. Виробник BioChek використовує концентрати для розчинів субстрату (п-Нітрофеніл фосфотаза) та для етапу промивання (фосфатний сольовий порошок з Tween) у вигляді сухої пресованої речовини. Перед використанням їх необхідно розчинити у відповідному буфері. При розведенні таблеток в розчиннику велика вірогідність помилки у розрахунках, а також зменшення маси таблеток під час транспортування, що зменшує концентрацію розчину, що негативно впливає на отримання якісних результатів.

4. Формат планшетів виробників BioChek та IDEXX є моноплашковим (96 лунок), фірми-виробника IDVet – стріпованими (12 стріпів по 8 лунок у кожній), тобто зйомного типу. Монопланшети не є зручними у використанні, так як при умові тестування кількості зразків, меншої від 96, вільні лунки при дослідженні контактують з повітрям, світлом і водою, що негативно впливає на результат.

Тикам чином, набори фірми BioChek є найменш зручними для використання, оскільки містять компоненти субстрату та миючого розчину у сухому вигляді, що ускладнює проведення доліджень завдяки необхідності попередньої підготовки цих компонентів. Тест-системи фірми IDVet навпаки є найбільш зручними для використання, на що вказує наявність у їх комплектації стрипованих плашок, готового до використання субстратного розчину та 10X концентрованого кон'югату, що сприяє більш ефективному та тривалому використанню наборів цього виробника на підприємствах.

### **2.3.2. Рівень антитіл до антигенів вірусу бурсальної хвороби у сироватці крові імунізованої птиці**

У результаті проведеного дослідження встановлено, що зразки IBDV №2-№6 є серопозитивними до IBDV, зразок IBDV №1 є серонегативним до IBDV, тобто не містить специфічних антитіл до збудника бурсальної хвороби.

Виявлення специфічних антитіл до антигенів збудника бурсальної хвороби тест-системами виробника IDVet (Франція) «ID Screen® IBD Indirect», IDEXX (США) – «IDEXX IBD Ab Test» та BioChek (Голландія) – «BioChek Infectious Bursal Disease Antibody Test Kit» показало, що зразок IBDV №1 не містить специфічних антитіл до антигену IBDV. Це свідчить про те, що всі три системи є специфічними (рис. 4). Значення титрів антитіл зразку IBDV №1 (від SPF тварини) при тестуванні діагностичними системами виробництва BioChek є вищими у 4 рази і знаходяться ближче до лінії Cut-off порівняно з двома іншими виробниками. Це означає, що за умов отримання сумнівних результатів тестування набором BioChek виникає ймовірність отримати хибнопозитивні результати.

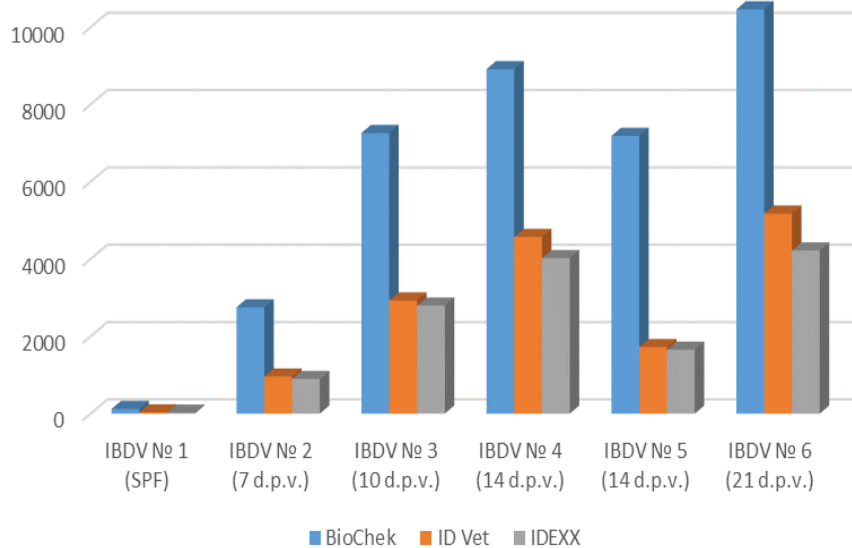


Рис. 4 Рівні антитіл до антигенів вірусу бурсальної хвороби

Значення cut-off для «ID Screen® IBD Indirect» складає 875, для «IDEXX IBD Ab Test» – 396, для «BioChek Infectious Bursal Disease Antibody Test Kit» – 391. Середні значення титрів від зразків IBDV №2 – №6 показали достатньо високу кореляцію (значення рівня специфічних антитіл знаходяться на одному рівні) між титрами тестів виробництва IDVet та IDEXX. Порівнюючи ці значення з титрами, отриманими під час дослідження діагностичними системами виробництва BioChek на виявлення антитіл до *IBDV* спостерігаються значні відмінності у значеннях титрів порівняно з двома іншими діагностичними системами. Значення титрів зразку IBDV №2, отриманому при тестуванні набором BioChek, у 2,8 разів вище значення титрів антитіл отриманому при тестуванні наборами IDVet та IDEXX. Значення титрів зразку IBDV №3, отриманому при тестуванні набором BioChek, у 3,1 разів вище значення титрів антитіл отриманому при тестуванні наборами IDVet та IDEXX. Значення титрів зразку IBDV №4, отриманому при тестуванні набором BioChek, у 2,1 рази вище значення титрів антитіл отриманому при тестуванні наборами IDVet та IDEXX. Значення титрів зразку IBDV №5, отриманому при тестуванні набором BioChek, у 4,5 рази вище значення титрів антитіл отриманому при тестуванні наборами IDVet та IDEXX. Значення

титрів зразку IBDV №6, отриманому при тестуванні набором BioChek, у 2,2 разів вище значення титрів антитіл отриманому при тестуванні наборами IDVet та IDEXX, що може бути результатом кросс-реакції.

Тестування зразку IBD №1 виявило значні відмінності у значеннях титрів антитіл трьома різними виробниками (табл. 4).

Таблиця 4

**Значення титрів специфічних антитіл до антигенів збуднику бурсальної хвороби ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Зразок	Середнє значення титру антитіл (M)		
	Набори виробництва BioChek	Набори виробництва IDVet	Набори виробництва IDEXX
IBD № 1	120±10,00 <sup>••</sup>	33±7,50 <sup>*•</sup>	22,50±3,50 <sup>0*</sup>
IBD №2	2749±59,00 <sup>0•</sup>	960±13,00 <sup>*•</sup>	896±6,50 <sup>0*</sup>
IBD №3	7261±64,00 <sup>••00</sup>	2927±84,50 <sup>*•</sup>	2794±6,00 <sup>0</sup>
IBD №4	8911±7,00 <sup>••00</sup>	4571±78,00 <sup>*•</sup>	4023±4,00 <sup>0**</sup>
IBD №5	7185±47,50 <sup>••0</sup>	1724±9,50 <sup>•</sup>	1651,50±17,50 <sup>*0</sup>
IBD №6	10460,50±51,50 <sup>••00</sup>	5177,50±26,50 <sup>*•</sup>	4222,50±20,50 <sup>0*</sup>

Примітка: \*- $p \leq 0,05$ , \*\*- $p \leq 0,01$  у відношенні до набору виробництва BioChek; <sup>0</sup>- $p \leq 0,05$ , <sup>00</sup>- $p \leq 0,01$  у відношенні до набору фірми IDVet; <sup>•</sup>- $p \leq 0,05$ , <sup>••</sup>- $p \leq 0,01$  у відношенні до набору виробництва IDEXX

При тестуванні діагностичними системами виробництва BioChek рівень імуноглобулінів є вищим у 4 рази порівняно з фірмами-виробниками IDVet та IDEXX і знаходяться ближче до лінії cut-off. Статистичний аналіз цифрових значень сироваток IBD №2–№6 має достовірні значення при порівнянні отриманих результатів титрів антитіл за використання наборів BioChek, IDVet та IDEXX.

Отже, при діагностуванні сироваток крові IBD №2–№6 на виявлення антитіл до збуднику бурсальної хвороби значення титрів антитіл, отримані від

тест-систем виробництва BioChek, є найвищими і в середньому більші в 3,5 рази від значень, отриманих від наборів IDVet та 2,7 разів від наборів IDEXX. Значення рівнів антитіл, отриманих від діагностикумів IDVet та IDEXX є подібними і відрізняються між собою в середньому на 6,97%.

### 2.3.3. Рівень антитіл до антигенів вірусу хвороби Ньюкасла у сироватці крові імунізованої птиці

У результаті проведеного дослідження встановлено, що зразки NDV №2 – № 5 є серопозитивними до NDV, зразок NDV №1 є серонегативним до NDV, тобто не містить специфічних антитіл до збуднику хвороби Ньюкасла (рис. 5).

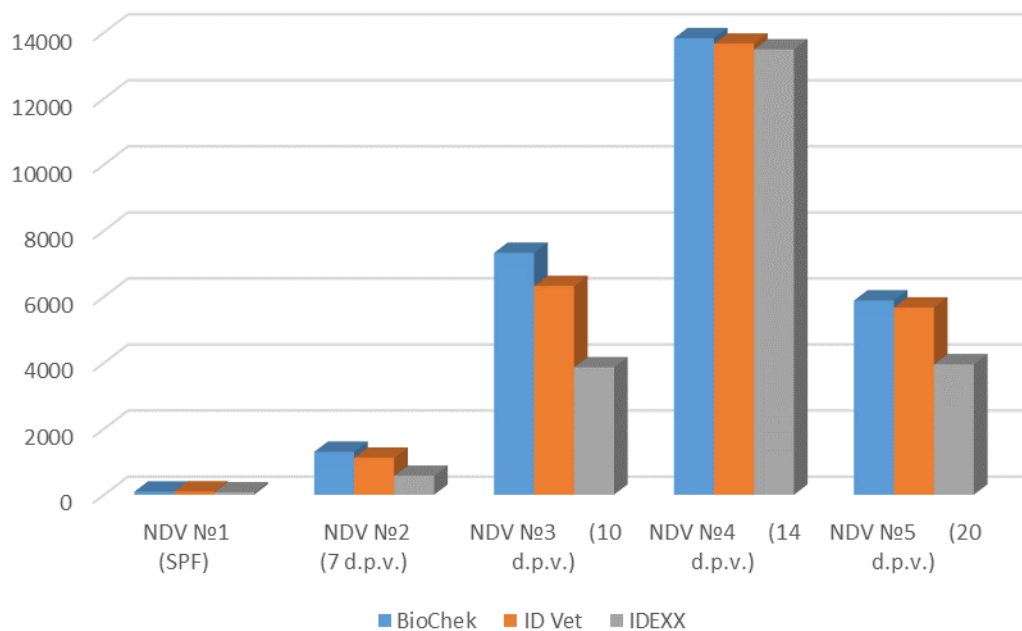


Рис. 5. Рівні антитіл до антигенів вірусу хвороби Ньюкасла

У результаті проведених досліджень на виявлення специфічних антитіл до антигенів збудника хвороби Ньюкасла тест-системами виробника IDVet (Франція) «ID Screen® Newcastle Disease Indirect Conventional Vaccines», IDEXX (США) – «IDEXX NDV Ab Test for chickens» та BioChek

(Голландія) – «BioChek Newcastle Disease Antibody Test Kit» встановлено, що зразок NDV №1 не містить специфічних антитіл до антигену NDV. Це свідчить про те, що всі три системи є специфічними, тобто вони не дають при відсутності захворювання хибнопозитивних результатів, які визначаються як частка істинно негативних результатів серед здорових осіб в групі дослідження.

Значення cut-off для «ID Screen® Newcastle Disease Indirect Conventional Vaccines» складає 993, для «IDEXX NDV Ab Test for chickens» – 396, для «BioChek Infectious Bursal Disease Antibody Test Kit» – 1159. Середні значення титрів, отримані від зразку NDV №2 при тестуванні набором IDEXX, у 2 рази нижче значення титрів антитіл отриманому при тестуванні наборами IDVet та BioChek. Середні значення титрів зразку NDV №2, отриманому при тестуванні діагностикомом BioChek є дуже близьким до значення cut-off. Це означає, що у випадку слабкопозитивних зразків тест-системи виробництва BioChek будуть відображати хибнонегативні результати. Значення титрів антитіл від зразку NDV № 3 отриманими від діагностичних систем виробництва BioChek у 1,3 рази вище значення титрів антитіл, отриманому при тестуванні наборами IDVet та IDEXX. Середні значення титрів, отримані при тестуванні NDV №4 наборами BioChek, IDVet та IDEXX є тотожними. Середні значення титрів від зразків NDV №5 отриманому при тестуванні набором IDEXX, у 1,2 рази нижче значення титрів антитіл отриманому при тестуванні наборами IDVet та BioChek.

Тестування SPF сироватки не виявило значних відмінностей у значенні значення титрів специфічних антитіл до антигенів збуднику хвороби Ньюкасла при використанні трьох діагностичних наборів. Статистичний аналіз цифрових значень сироваток 2-5 має достовірні значення при порівнянні отриманих результатів титрів антитіл за використання наборів BioChek, IDVet та IDEXX (табл. 5).



Таблиця 5

**Значення титрів специфічних антитіл до антигенів збуднику хвороби  
Ньюкасла ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Зразок	Середнє значення титру антитіл (M)		
	Набори виробництва BioChek	Набори виробництва IDVet	Набори виробництва IDEXX
NDV №1	94,50±13,50 <sup>0•</sup>	99±3,00*•	84,0±6,00* <sup>0</sup>
NDV №2	1298±14,00 <sup>0•</sup>	1121,5±4,50*•	574±16,00** <sup>00</sup>
NDV №3	7326±25,50 <sup>00••</sup>	6319±48,00*•	3859±38,00 <sup>0</sup>
NDV №4	13824,5±81,50 <sup>0•</sup>	13657±73,00*•	13485±90,00* <sup>0</sup>
NDV №5	5880,5±41,50 <sup>0•</sup>	5670,50±16,50*•	3949,5±177,50** <sup>00</sup>

Примітка: \*- $P \leq 0,05$ , \*\*- $P \leq 0,01$  у відношенні до набору виробництва BioChek; <sup>0</sup>- $P \leq 0,05$ , <sup>00</sup>- $P \leq 0,01$  у відношенні до набору фірми IDVet; •- $P \leq 0,05$ , ••- $P \leq 0,01$  у відношенні до набору виробництва IDEXX

Отже, рівень антитіл до збуднику хвороби Ньюкасла у зразках NDV №2 – №5 найнижчі при тестуванні наборами виробництва IDEXX і в середньому є нижчими від наборів IDVet в 1,9 разів, BioChek – у 2 рази. Значення рівнів антитіл, отриманих від застосування діагностиків IDVet та BioChek є тотожними і відрізняються в середньому на 4,44%.

**2.3.4. Рівень антитіл до антигенів вірусу інфекційного бронхіту у сироватці крові імунізованої птиці**

У результаті проведеного дослідження встановлено, що зразки IBV №2 – №5 є серопозитивними до IBV, зразок IBV №1 є серонегативним до IBV, тобто не містить специфічних антитіл до збуднику інфекційного бронхіту (рис. 6).

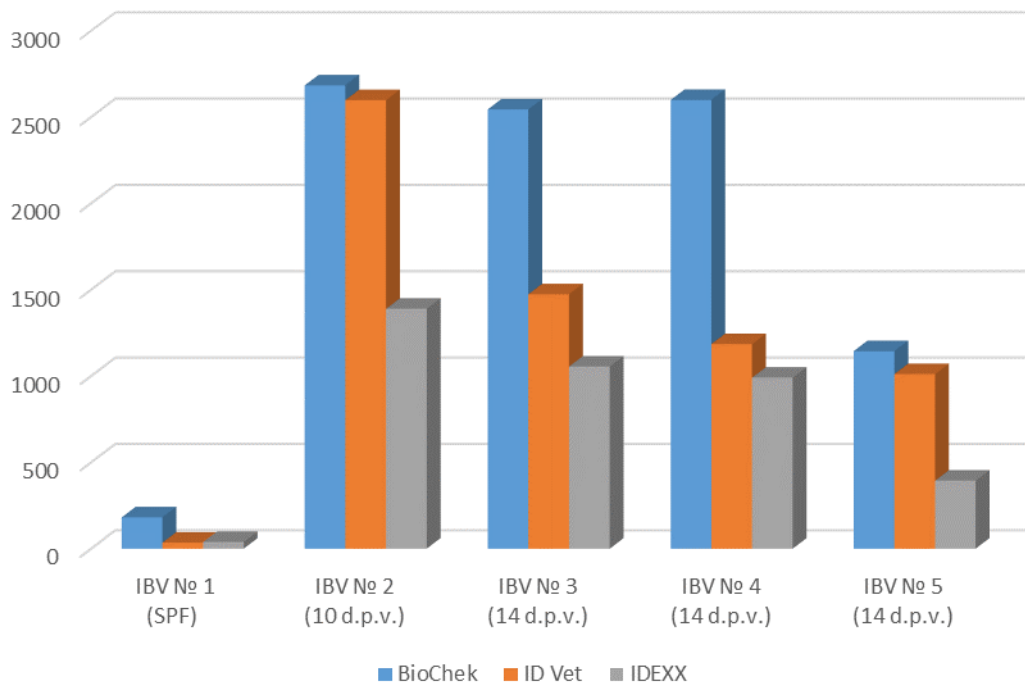


Рис. 6 Рівні антитіл до антигенів вірусу інфекційного бронхіту

У результаті проведених досліджень на виявлення специфічних антитіл до антигенів збудника інфекційного бронхіту тест-системами виробника IDVet (Франція) «ID Screen® Infectious Bronchitis Indirect», IDEXX (США) – «IDEXX IB Test Ab» та BioChek (Голландія) – «BioChek Infectious Bronchitis Antibody Test Kit» встановлено, що зразок IBV №1 не містить специфічних антитіл до антигену *IBV*. Це свідчить про те, що всі три системи є специфічними, тобто вони не дають при відсутності захворювання хибнопозитивних результатів, які визначаються як частка істинно негативних результатів серед здорових осіб в групі дослідження. Значення Cut-off для «ID Screen® IBD Indirect» складає 315, для «IDEXX IBD Ab Test» – 396, для «BioChek Infectious Bursal Disease Antibody Test Kit» – 834. Середнє значення титрів від зразку IBV №2 отриманому при тестуванні наборами IDVet та BioChek є тотожними, а середнє значення титрів зразку IBV №2, отриманому при тестуванні діагностикумом IDEXX у 1,3 рази нижче значення титрів антитіл отриманому при тестуванні наборами IDVet та BioChek. Середнє значення титрів від зразку IBV №3 отриманому при тестуванні набором

BioChek є в 1,5 рази вищим, порівняно з рівнем антитіл, отриманому при тестування набором IDVet, також середнє значення титрів зразку IBV №3, отриманому при тестуванні тест-системою IDEXX є в 1,3 рази нижче значення титрів антитіл отриманому при тестуванні наборами IDVet. Середнє значення титрів від зразку IBV №4 отриманому при тестуванні наборами IDVet і IDEXX є аналогічними Також середнє значення титрів зразку IBV №4, отриманому при тестуванні набором BioChek, є у 2 рази вищим від значення титрів антитіл отриманому при тестуванні наборами IDVet та IDEXX. Середнє значення титрів від зразку IBV №5 отриманому при тестуванні наборами IDVet і BioChek є тотожними, також середнє значення титрів зразку IBV №5, отриманому при тестуванні набором IDEXX є у 2,3 рази вищим від значення титрів антитіл отриманому при тестуванні наборами IDVet та IDEXX. Середнє значення титрів від зразку IBV №5 отриманому при тестуванні діагностичним набором IDEXX є дуже близьким до значення cut-off. Це означає, що у випадку слабопозитивних зразків набори IDEXX будуть відображати хибнонегативні результати.

Тестування зразку IBV №1 виявило значні відмінності у значеннях титрів антитіл трьома різними виробниками. При тестуванні діагностичними системами виробництва BioChek рівень імуноглобулінів є вищим у 4,5 рази порівняно з фірмами-виробниками IDVet та IDEXX і знаходяться ближче до лінії cut-off. Статистичний аналіз цифрових значень сироваток IBV №2–№6 має достовірні значення при порівнянні отриманих результатів титрів антитіл за використання наборів BioChek, IDVet та IDEXX (табл. 6).

Таблиця 6

**Значення титрів специфічних антитіл до антигенів збуднику хвороби  
інфекційного бронхіту ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Зразок	Середнє значення титру антитіл (M)		
	Набори виробництва BioChek	Набори виробництва IDVet	Набори виробництва IDEXX
IBV №1	181,5±10,5 <sup>00••</sup>	35,0±2,0 <sup>•*</sup>	38,5±5,5 <sup>0*</sup>
IBV №2	2683±29 <sup>0•</sup>	2598±27 <sup>•*</sup>	1389,5±89,5 <sup>00**</sup>
IBV №3	2544±40 <sup>00••</sup>	1473,5±43,5 <sup>••**</sup>	1055±45 <sup>0*</sup>
IBV №4	2599±9 <sup>00••</sup>	1185±14 <sup>•*</sup>	990,5±63,5 <sup>0*</sup>
IBV №5	1144±29 <sup>0••</sup>	1011±29 <sup>••*</sup>	394,5±7,5 <sup>00**</sup>

Примітка: \*- $P \leq 0,05$ , \*\*- $P \leq 0,01$  у відношенні до набору виробництва BioChek; <sup>0</sup>- $P \leq 0,05$ , <sup>00</sup>- $P \leq 0,01$  у відношенні до набору фірми IDVet; •- $P \leq 0,05$ , ••- $P \leq 0,01$  у відношенні до набору виробництва IDEXX

Отже, найнижчі значення титру антитіл до збуднику інфекційного бронхіту виявлено при тестуванні референтних сироваток наборами виробництва IDEXX. Значення титру антитіл є нижчими від наборів IDVet та BioChek у середньому на 39,8%. Найвищі значення спостерігаються при тестуванні діагностичних наборів виробництва BioChek, що в середньому є вищими у 1,7 рази порівняно з IDVet та 2,6 разів з BioChek.

## **2.4. Розрахунок економічної ефективності імуноферментного аналізу для контролю специфічної імунопрофілактики інфекційних хвороб птиці**

Згідно поставленої мети дипломної роботи було проведено ІФА - дослідження, направлені на виявлення специфічних антитіл проти хвороби Ньюкасла, інфекційного бронхіту птиці та бурсальної хвороби, із використанням трьох різних комерційних наборів. З огляду на це, ми розрахували економічну ефективність проведених досліджень.

Показник собівартості певного діагностичного дослідження в науково-дослідному центрі формується з урахуванням наступних факторів:

1. Вартість одиниці часу працівника лабораторії, відповідального за проведення відповідного виду дослідження, що залежить від середньомісячного рівня оплати праці;
2. Вартість електроенергії, води, опалення, витраченої під час виконання дослідження;
3. Вартість витратних матеріалів та амортизаційні відрахування від використання приладів;
4. Відрахування в центр зайнятості, медичне страхування та пенсійний фонд.
5. Відрахування на оплату податків.

Проводимо розрахунок витрат на проведення одного ІФА-дослідження із врахуванням вищенаведених факторів.

Відповідальним працівником за проведення ІФА-дослідження в науково-дослідному центрі є молодший науковий співробітник, середньомісячна оплата праці якого становить 4723 грн. Враховуємо, що середня кількість робочих днів за календарний місяць складає 21 день, кількість годин робочого дня становить 7 годин, кількість годин, що необхідна для проведення одного ІФА-дослідження в середньому становить 3 години.

Розраховуємо вартість одиниці часу для проведення одного ІФА-дослідження:  $4723/21/7/60 \times 180 = 96,38$  грн.

Вартість витраченої електроенергії на роботу холодильнику, 1 вортексу, 1 шейкеру, 1 автоматичної установки для промивання, 1 спектрофотометра, комп'ютера, принтера та витрати на освітлення під час проведення одного ІФА-дослідження в середньому складають 12 грн.

Витрати на амортизацію приладів, необхідних для проведення ІФА-досліджень, розраховуються в залежності від їх загальної вартості, що складає 650123 грн, строку 5 років, часу використання при проведенні досліджень (3 год.), та кількості зразків, що можуть одночасно досліджуватися за умови повної завантаженості приладу (96 зразків).

Амортизаційні витрати складають:  $650123/5/12/21/7/60 \times 180/96 = 2,30$  грн.

Вартість витратних матеріалів для проведення ІФА-дослідження одного зразка складається з вартості витрат на набір для проведення ІФА, накінцівників та епендорфів.

Набори «ID Screen® IBD Indirect», «ID Screen® Infectious Bronchitis Indirect», «ID Screen® Newcastle Disease Indirect Conventional Vaccines», «IDEXX NDV Ab Test for chickens», «IDEXX IBD Ab Test», «IDEXX IB Test Ab», «BioChek Infectious Bursal Disease Antibody Test Kit», «BioChek Infectious Bronchitis Antibody Test Kit», «BioChek Newcastle Disease Antibody Test Kit» випускаються виробниками по 5 плашок (480 тестів) (табл. 7).

Таблиця 7

**Вартість тест-систем для проведення дослідження методом ІФА**

Назва реактиву або розхідного матеріалу	Ціна, грн/упаковку	Витрати для проведення аналізу	Вартість аналізу, грн
Набори виробнику IDVet	41 600	98 зразків	8820
Набори виробнику IDEXX	74 000	98 зразків	15680
Набори виробнику BioChek	37 600	98 зразків	7840

Собівартість 1 проби при використанні наборів виробнику IDVet складає 90 грн, IDEXX – 160 грн, BioChek – 80 грн.

Із врахуванням вищенаведених розрахунків визначаємо собівартість проведення одного ІФА-дослідження із використанням різних наборів:

- із використанням наборів фірми IDVet  $-96,38+12+2,30+90+71,96=272,64$  грн
- із використанням наборів фірми IDEXX  $-96,38+12+2,30+160+71,96=342,64$  грн
- із використанням наборів фірми BioChek  $-96,38+12+2,30+80+71,96=262,64$  грн

Вартість ІФА-дослідження, направленою на виявлення специфічних антитіл до хвороби Ньюкасла, інфекційного бронхіту, хвороби Гамборо в науково-дослідному центрі становить 350 грн.

Отже, прибуток від проведених досліджень 1 проби:

- із використанням наборів фірми IDVet – 28,68 грн;
- із використанням наборів фірми IDEXX – 8,68 грн;
- із використанням наборів фірми BioChek – 26,18 грн.

Отже, економічна ефективність застосування методу ІФА для контролю специфічної імунопрофілактики інфекційних хвороб птиці складає із використанням наборів фірми BioChek – 28,68 грн, IDEXX – 8,68 грн, IDVet – 26,18 грн.

### **3. ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ**

#### **3.1 Аналіз стану охорони праці в науково-дослідному центрі біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК ДДАЕУ**

Дипломна робота виконана на базі Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів агропромислового комплексу Дніпровського державного аграрно-економічного університету. Охорона праці в НДЦ забезпечується відповідно до наказу Держнаглядохоронпраці від 20.04.99 N 67, затвердженого та зареєстрованого Міністерством юстиції України від 11 жовтня 1999 р. за N 695/3988 [1,5].

Згідно Кодексу Законів про Охорону Праці (затвердженого Законом № 322-VIII від 10.12.71 ВВР, 1971, додаток до № 50, ст. 375) до роботи у відділах НДЦ допускаються лише повнолітні особи, які пройшли відповідну спеціальну підготовку, а також детально ознайомились з правилами роботи з культурами бактерій, вірусів та інших мікроорганізмів, з інфікованим або підозрілим в інфікуванні матеріалом та хімічними речовинами. Тривалість робочого часу працівників лабораторії встановлюється згідно з Кодексом законів про працю України (322-08) та Списком виробництв, цехів, професій і посад із шкідливими умовами праці, робота в яких дає право на додаткову відпустку й скорочений робочий день і не перевищує 40 годин на тиждень [1,3].

Колективний договір в науково-дослідному центрі укладено у відповідності до чинного законодавства України, зокрема згідно зі 10-20 статтями глави 2 Кодексу Законів про Працю України та Законом України «Про колективні договори і угоди».

Навчання з охорони праці організовує відділ охорони праці. Відповідальність за організацію навчання та перевірку знань із безпеки праці в науково-дослідному центрі покладено на завідувачів відділів.



Перед початком роботи та впродовж роботи всі працівники лабораторії проходять інструктажі та ознайомлюються з діючим трудовим законодавством України з охорони праці: Закон України «Про охорону праці», Закон України «Про загальнообов'язкове державне соціальне страхування від нещасного випадку на виробництві та професійного страхування, які спричинили втрату працездатності».

При проведенні первинного інструктажу на робочому місці пояснюють основні вимоги безпеки при виконанні роботи та її закінченню. Факт проведення інструктажу реєструється в журналі реєстрації інструктажу на робочому місці. Повторний інструктаж проводиться не рідше, ніж через шість місяців. Після проведення інструктажів проводиться перевірка знань правил, норм та інструкцій з питань охорони праці у порядку і в строки, які встановлені для відповідних робіт. Проведення позапланового інструктажу виникає при зміні правил техніки безпеки або при порушенні працівниками інструкції з охорони праці. Не допускаються до роботи працівники, які не пройшли навчання, інструктаж та перевірку знань з питань охорони праці. Перед початком роботи працівники проходять навчання з правил експлуатації лабораторного обладнання згідно робочих інструкцій. Нагляд за правильністю використання приладу покладено на керівника відповідним відділом НДЦ.

Фінансування робіт з охорони праці здійснюється керівництвом ДДАЕУ, а саме: виконання загальнодержавних, галузевих та регіональних програм поліпшення стану безпеки, гігієни праці та виробничого середовища, спрямованих на запобігання нещасним випадкам та професійним захворюванням та фінансування профілактичних заходів з охорони праці.

### **3.2. Аналіз небезпечних та шкідливих виробничих факторів**

Санітарний стан лабораторій науково-дослідного центру є задовільним. Кожне робоче місце є відокремленим один від одного та має достатній обсяг для виконання відповідної роботи, забезпечене необхідною

кількістю світла, робочого простору та інвентарю. Підлога та стіни робочих місць вкриті кахелем, робоча поверхня меблів є гладкою, що забезпечує проведення ефективного прибирання, очищення та дезінфекції.

Приміщення відділів НДЦ забезпечені приточно-витяжною вентиляцією, конструкція якої попереджує обмін повітряних мас між «брудною» та «чистою» зонами лабораторії. Вентиляція обладнана різнопористими фільтрами, що забезпечує високоякісне очищення як припливних, так і витяжних повітряних мас. Прилади контролю температури і відносної вологості повітря встановлені на легкодоступних для огляду місцях у всіх приміщеннях НДЦ. Освітлення лабораторій є достатнім, рівномірним, та забезпечується природніми та штучними джерелами освітлення, що відповідає санітарним нормам. Яскраві джерела світла, спрямовані в зону роботи приладів, відсутні.

Робочі місця закріплені за кожним працівником відповідного відділу НДЦ. Перед тим як почати роботу у відповідному робочому місці, працівник повинен одягнути спеціальний одяг та взуття – халат та медичну шапочку.

Матеріал, що надходить для дослідження у відділі НДЦ, вноситься через окремий, передбачений для цього, вхід. Приймання матеріалу, підготовку і розподіл проводить відповідальний працівник, який закріплений за відповідним відділом.

У кожному передбоксі та боксі відділів НДЦ розташовані бактерицидні лампи, які вмикаються за межами опромінюваної зони на 1-2 години за 30 хв. до початку роботи та після роботи. Перебування людей у приміщенні під час його опромінення суворо заборонено. Під час роботи двері боксу та передбоксу повинні бути щільно зачинені. У цей час заборонено виходити з боксу, а також заходити до передбоксу іншим працівникам лабораторії. Після закінчення роботи в боксі працівник прибирає робоче місце та проводить дезінфекцію робочої поверхні. Приміщення боксів один раз на тиждень миється гарячою водою з милом, дезінфекційними засобами і витирається насухо.

Причинами виробничого травматизму у науково-дослідному центрі можуть бути: підвищена концентрація шкідливих речовин у повітрі робочої зони, наявність УФ випромінювання під час проведення заходів з дезінфекції робочих місць, незастосування засобів індивідуального захисту, електротравми внаслідок експлуатації пошкодженого обладнання тощо. Суворий контроль за надійністю засобів виробництва, відповідність вимогам безпеки технологічного процесу, а також задовільне функціонування системи охорони праці мінімізують ризики виникнення виробничого травматизму у лабораторіях науково-дослідного центру. Травматизм є одним з важливих показників в охороні праці. Тому трудовій дисципліні і підвищенню кваліфікації працівників приділяється велика увага. Регулярно проводиться система технічних, санітарно-гігієнічних та правових заходів з питань охорони праці та безпеки. При прийнятті на роботу та на протязі трудової діяльності всі працівники науково-дослідного центру мають санітарні книжки, в яких зазначено відомості про проходження медичного огляду. До роботи у відділах НДЦ допускаються лише повнолітні особи, які пройшли попередній медичний огляд. У разі спричинення шкоди здоров'ю, відшкодування проводиться відповідно до наказу ДНАОП 0.05-1.02-93 [2].

### **3.3 Пожежна безпека**

Відповідно до положень Закону України "Про пожежну безпеку" (3745-12) (статті 2-7) Правила пожежної безпеки в Україні є обов'язковими для виконання всіма центральними і місцевими органами виконавчої влади, органами місцевого самоврядування, підприємствами, установами, організаціями (незалежно від виду їх діяльності та форм власності), посадовими особами та громадянами. Пожежна безпека в науково-дослідному центрі забезпечується шляхом проведення організаційних, технічних та інших заходів відповідно до Правил пожежної безпеки в Україні. Відповідальність за пожежну безпеку покладена на завідуючого науково-дослідним центром

біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету – Масюка Дмитра Миколайовича [4].

Для уникнення виникнення пожежі, виконуються наступні правила протипожежної безпеки:

- регулярно перевіряється справність електроприладів та електроустаткування до початку роботи з ними;
- усі електропроводи (приладів та електричної мережі) заізолювані;
- забороняється паління у виробничих приміщеннях;
- не допускається перегрів приладів;
- проходи до щитків і виходу з центру не загороджуються.

У коридорі науково-дослідного центру розташований щит з набором протипожежного інвентарю: вогнегасники, ящики з піском та пожежний гідрант. Вогнегасники також розташовані в приміщеннях, де проводяться роботи з вогненебезпечними або вибуховими реактивами і небезпечними в пожежному відношенні нагрівальними приладами. Первинні засоби пожежогасіння знаходяться в справному стані та постійній готовності до дії. Усі працівники НДЦ навчені правилам експлуатації засобів пожежогасіння також навчені правилам дії за умов виникнення пожежі та ознайомлені з планом евакуації людей з приміщень, схема якої розташована в коридорі науково-дослідного центру.

В НДЦ проводиться протипожежна підготовка працівників, що є невід'ємною ланкою у забезпеченні пожежної безпеки. Протипожежна підготовка складається з протипожежного інструктажу (вступного, первинного і повторного). Вступний і первинний інструктажі з пожежної безпеки проводяться при прийомі на роботу. Первинний і повторний інструктажі проводить на робочому місці особа, відповідальна за пожежну безпеку в цьому підрозділі. Після чого наймана особа розписується у відповідному журналі з пожежної безпеки.

## ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦВУ

У дипломній роботі наведено вирішення завдань щодо встановлення особливостей застосування імуноферментного аналізу для контролю специфічної імунопрофілактики інфекційних хвороб птиці:

1. Тест-набори фірми BioChek містять компоненти субстрату та м'якого розчину у сухому вигляді, що ускладнює процес підготовки до проведення досліджень. Тест-набори фірми IDVet та IDEXX навпаки є найбільш зручними, оскільки більшість реагентів є готові до використання.

2. Всі досліджені тест-системи успішно виявляють специфічні антитіла до антигенів відповідних вірусів, про що свідчить позитивний результат при дослідженні референтних сироваток від імунізованої птиці та негативний результат при дослідженні референтних сироваток від SPF тварин.

3. Рівень антитіл до антигенів вірусу бурсальної хвороби отриманий за використання тест-наборів виробництва IDVet та IDEXX суттєво не відрізняються, тоді як титр антитіл отриманий при дослідженні набором фірми BioChek є вищим у 3,5 та 2,7 рази ( $p \leq 0,001$ ) порівняно до наборів фірм IDVet та IDEXX відповідно.

4. При дослідженні титру антитіл до антигенів збудника хвороби Ньюкасла значення отримані за використання набору виробництва IDEXX є меншими за результати, отримані наборами фірм IDVet і BioChek відповідно у 1,9 та 2,0 рази ( $p \leq 0,01$ ).

5. За визначення антитіл до антигенів вірусу інфекційного бронхіту у сироватці імунізованої птиці набір фірми IDEXX показав найнижчі титри імуноглобулінів. Результати отримані за використання тест-набору фірми IDVet у середньому є вищими на 39,8% ( $p \leq 0,05$ ) порівняно до значень набору фірми IDEXX, а результати отримані набором BioChek є вищими у 2,6 та 1,7 рази ( $p \leq 0,01$ ) порівняно до попередніх виробників.

6. Економічна ефективність застосування тест-систем для дослідження специфічних антитіл у імунізованої птиці за використання тест-наборів

виробництва BioChek складає 28,68 грн, IDVet – 26,18 грн, а IDEXX – 8,68 грн на одну пробу.

### **Пропозиції виробництву**

За результатами проведених досліджень лабораторіям рекомендовано для визначення антитіл до антигенів вірусів бурської хвороби, інфекційного бронхіту та хвороби Ньюкасла використовувати тест-системи компаній «IDVet» (Франція) та IDEXX (США) як високо специфічні та більш технологічні діагностичними.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. ДСТУ 2293-99. Охорона праці. Терміни та визначення основних понять.
2. Постанова кабінету міністрів України № 559 від 23 травня 2001 р. перелік професій, виробництв та організацій, працівники яких підлягають обов'язковим профілактичним медичним оглядам, із змінами від 15.02.2002 N 170.
3. Наказ Державний комітет України з нагляду за охороною праці № 255 від 15.11.2004 «Про затвердження Типового положення про службу охорони праці»
4. ДСТУ 3855-99. Пожежна безпека. Визначення пожежної небезпеки матеріалів та конструкцій. Терміни та визначення
5. Методичні рекомендації до виконання і захисту дипломних робіт освітньо-кваліфікаційних рівнів «Бакалавр» і «Магістр» ветеринарної медицини / Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет. – 2015.– 60 с;
6. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.]. – М.:Высш. школа, 1991. – 288 с.
7. Ярилин, А.А. Иммунология / А.А.Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
8. Ройт, А. Иммунология. Пер. с англ./А.Ройт, Дж. Бростофф. Д.Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
9. Гальвидис, И.А. Иммуноферментный анализ на основе моноклональных антител для определения аминогликозидного антибиотика канамицина в продуктах питания / И.А. Гальвидис, М.А. Буркин //Биоорганическая химия. – 2010. – Т. 36, No 6. – С. 789-796.
10. Рекомендації з діагностики, заходів боротьби та профілактики інфекційних хвороб птиці (методичні вказівки) / [П.І. Вербицький, А.В. Березовський, Т.І. Фотіна та ін.]. – К.: ВЕТІНФОРМ, 2004. – 28 с.

11. Смоленский В.И. Эффективность вакцин против вирусных болезней птиц / В.И. Смоленский // *Ветеринария*. – 2001. – № 1. – С. 23–29.
12. Собко И.А. Практические советы по диагностике болезни Гамборо / И.А. Собко // *Сучасна ветеринарна медицина*. – 2008. – № 2. – С. 6–11.
13. А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. Теория и практика иммуноферментного анализа. — М.: Издательство "Высшая школа", 2007. — С. 3—42.
14. *Immunochemistry in 2008* / Jean-Pierre Goullé [et all] // *Annales toxicology Analytique*. – 2009. – Vol. 21, No1. – P. 49-53.
15. Labat, L. *Immunoanalysis and toxicology* / L. Labat, M. Deveaux // *Annales toxicology Analytique*. – 2009. – Vol. 21, No 1. – P. 1-2.
16. Applicability of an immunoassay test for its use in post-mortem blood regarding to cocaine and opiates / Arroyo A. [et all] // *Annales toxicology Analytique*. – 2010. – Vol. 22, No 4. – P. 201-206.
17. D. Cavanagh, S.A. Naqi,. In: Saif, A.M., Fadly, Y.M., McDougald, L.R., Swayne, D.E. (Eds.), *Diseases of Poultry*, (Iowa State University Press, Ames, IA, 2003) page 101–119.
18. Capua I, Terregino C , Cattoli G, Mutinelli F. and Rodriguez J F. Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *AvianPathol*.2003; 32:47–55.
19. Beard CW. Serological procedures, In H. Friedman (ed.) *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathotypes*. Kendall-Hunt Publishing, Dubuque, Iowa.2005; 192–200.
20. Zhao S, Jin M, Li H, TanY, Wang G, Zhang R, and ChenH. Detection of antibodies to the IBDV allows distinction between vaccinated and infected chickens. *Avian Dis*. 2009;49:488–493.
21. Hassan JO, Barrow PA, Mockett APA, Mcleod S. Antibody response to experimental Newcastle disease infection in chickens measured by ELISA. *VetRec* 1990; 126 : 519.



22. Serological diagnosis of avian disease infections in poultry by ELISA and other tests. *Int J Food Microbiol* 2004; 21 : 55–68.6.
23. Barrow PA, Desmidt M, Ducatelle R, et al. WorldHealth Organisation – supervised interlaboratory comparison of ELISAs for the serological detection of infectious bronchitis in chickens. *Epidemiol Infect* 1996; 117 : 69–77.
24. An enzyme-linked immunosorbent assay (SELISA) for the diagnosis of infectious bronchitis and for the screening of Babesia-specific monoclonal antibodies. Kung'u MW, Goodger BV *Int. J. Parasitol.*, (3):341-345
25. Hornbeck, P. Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr Protoc Immunol* Chapter 2, Unit 2.1 (2001).
26. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa. III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes 109, 129–135 (2002).
27. Lequin, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.* 51, 2415–2418 (2005).
28. Clark, M. F. & Adams, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475–483 (2007).
29. Vanmechelen, E. et al. Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci. Lett.* 285, 49–52 (2000).
30. John R. Crowther, *Methods in Molecular Biology, The ELISA Guidebook*. Second Edition. Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC 2009.
31. Butler J.E. The Behavior of Antigens and Antibodies Immobilized on a Solid Phase. In: M.H.V. Van Regenmortel, ed. *Structure of Antigens*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992: 209-259. Vol.1, 209; CRC Press, Inc.
32. Lequin, Rudolf M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry* 51.12 (2005): 2415-2418.

33. Engvall, Eva, and Peter Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8.9 (1971): 871-874.

34. Development of monoclonal antibodies to pre-haptoglobin 2 and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Flanagan JJ, Arjomandi A, Delanoy ML, Du Paty E, Galea P, Laune D, Rieunier F, Walker RP, Binder SR *J Immunol Methods*, 406:34-42, 25 Feb 2014

35. Varghese GM, Janardhanan J, Mahajan SK, Tariang D, Trowbridge P, Prakash JA, et al. Molecular Epidemiology and Genetic Diversity of *Orientia tsutsugamushi* from Patients with Scrub Typhus in 3 Regions of India. *Emerging Infectious Diseases*. 2015;21(1).

36. Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction / [A. Kant, G. Koch, D.J. van Roozelaar et al.] // *Avian Pathol.* – 1997. – Vol. 26. – No 4. – P. 837–849.

37. Efficacy in turkeys of spray vaccination with a temperature-sensitive mutant of IBD (Art Vax™) / [G.E. Houghten, J.K. Skceles, M. Rosenstein et al.] // *Avian Dis.* – 1987. – Vol. 31. – P. 309–314.

38. Efficacy of Baytril in the control of virus diseases of poultry / [M. Mazurkiewicz, A. Latala, A. Wieliczko et al.] // *Med Etery-naryjncgo* 1990. – Vol. 46. – P. 286–289.

39. Immunization of chickens with gene (DNA) vaccines / [C.Jr. Keeler, D. Poulsen, H. Robinson et al.] // 132nd Ann Meeting AVMA. Pittsburg, PA. – 1995. – 143 p.

## Додатки

## Додаток А

*IV Міжнародна науково-практична конференція викладачів і студентів "Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно санітарної експертизи", травень 2019*

УДК 619

ТРИВАЛІСТЬ КОЛОСТРАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ У ПОРОСЯТ ЗА  
ІМУНОПРОФІЛАКТИКИ ХВОРОБИ АУЄСКІ

Крутії К.О. магістр, Чернова В.В. магістр, Кокарев А.В. к. вет. н., с.н.с.,  
Василенко Т.О. к. с.-г. н., с.н.с., Масюк Д.М., к. вет. н., професор  
[katia.krytivy@gmail.com](mailto:katia.krytivy@gmail.com)

*Дніпровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпро, Україна*

**Вступ.** Виживання поросят у перші хвилини життя та протягом підсисного періоду залежить від багатьох факторів, але найвагомішим з них являється споживання молозива. Перші порції якого є багатими на легкозасвоювані поживні речовини, які мають вирішальне значення для виживання новонароджених поросят. Основні ролі молозива представлені забезпеченням поросят енергією, пасивним імунітетом до розвитку їх імунної системи та шлунково-кишкового тракту поросяти. Анатомічна будова плаценти свині зумовлює відсутність в організмі новонародженого поросяти специфічних імуноглобулінів, що могли б забезпечити відповідну реактивність імунної системи. Тому пасивна передача специфічних антитіл від матері до новонародженого, можлива лише через молозиво та є життєво важливою для поросят у перші хвилини життя. До відлучення, від зовнішніх патогенних мікроорганізмів, поросят захищає лише материнський імунітет, який залежить від імунологічної стимуляції свиноматок, перенесення активованих клітин імунної системи (В-клітин) в молочну залозу та місцевою продукцією імуноглобулінів.

Разом з молозивом до організму поросяти потрапляють материнські імуноглобуліни, що виконують, як специфічну, так і неспецифічну захисну функцію. Дослідження ряду авторів (Bandrick M., et all, 2011; Rooke J.A., et all, 2018) вказують на те, що після споживання молозива колостральні антитіла в крові новонародженого реєструються через 2 години та зберігаються в організмі певний період часу, що дає змогу активувати власну імунну систему. Неспецифічний імунітет - це сукупність факторів, які захищають від потраплення та розмноження збуднику в організмі тварин, до яких відносять бар'єрні функції слизових оболонок, шкіри, лімфатичних вузлів та крові. Специфічний же імунітет активується після того, як патогенний агент вторгся в системи організму. Механізм специфічного імунного захисту зумовлюється взаємодією специфічних антитіл з антигенами збуднику. З літературних джерел встановлено, що тривалість неспецифічного колострального імунітету в середньому досягає місячного віку, а специфічний, в свою чергу, двохмісячного віку.

Основним механізмом захисту організму від інфекційних агентів є опсонізація імуноглобулінами антигенів, які потім зв'язуються та поглинаються фагоцитами (Harty W.,

et al, 2003). Активувати представлений механізм можливо шляхом імунізації тварин проти збудників інфекційних хвороб. Слід зауважити, що одним з найважливіших факторів проведення ефективної імунопрофілактики є імунізація тварин з урахуванням рівня колостральних антитіл специфічних до вакцинного антигену.

Особливо актуальним це питання є для імунопрофілактики герпесвірусних інфекцій тварин, оскільки антигени цих мікроорганізмів є високо імуногенними, що сприяє формуванню більш тривалого колострального імунітету та безпосередньо впливає на час імунізації. Тому **метою роботи** було визначити тривалість колострального імунітету поросят до антигенів вірусу хвороби Ауескі за активної імунопрофілактики свиноматок.

**Матеріали і методи.** Для проведення серологічних досліджень сироватку крові відбирали від поросят віком 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 та 91 доби життя, по 5 проб з кожної вікової групи. Свиноматки, від яких отримано поросят, імунізовані проти хв. Ауескі вакциною «Адівак+», методом масових вакцинацій 3 рази на рік.

Імуноферментні дослідження (ІФА) проводили в НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету на аналізаторі-фотометрі BioTek ELx800 (США) із використанням тест-систем «TestLine Aujeszky gB Ab ELISA» («TestLine» Чехія). Специфічні імуноглобуліни класу В до антигену вірусу хв. Ауескі виявляли у титрі 1:20. Згідно інструкції до набору, зразок вважали позитивним при значенні показнику S/P, який є більшим 40%.

**Результати.** Аналізуючи результати ІФА досліджень на виявлення специфічних імуноглобулінів до збудника хв. Ауескі встановлено, що в організмі поросят наявні антитіла. Проведення вакцинопрофілактики поголів'я свиноматок на тлі відсутності вакцинації поросят, вказує на формування у новонароджених специфічного імунітету колострального походження майже до 3-х місячного віку. Напруженість групового імунітету тварин до 70 добового віку, включно, становила 100%, що зумовлює ефективний захист молодняка проти збудника хв. Ауескі.

Результати проведеного дослідження показують, що у тварин віком 7, 14, 21, 28, 35, 42 та 49 дів життя показник S/P коливається у межах величин від 152%±0,71 до 157%±0,60. Порівнюючи ці дані, не встановлено значних змін у рівні антитіл, середній показник коливається в межах 154%, що вказує на наявність високих титрів антитіл та сформований груповий імунітет.

Досліджуючи зразки крові від старших вікових груп свиней встановлено, що титр антитіл поступово знижується починаючи з 56 доби життя. Встановлено, що показник S/P у групі віком 56, 63 та 70 дів у середньому становить 133%±8,11, 152%±4,48 та 122%±14,79, відповідно, а у тварин віком 77 дів – 59%±17,10. Слід зауважити, що показник S/P у тварин віком 63 доби життя на 14% більший ніж у віці 56 дів та на 24% ніж у віці 70 дів, що більш за все обумовлено, отриманням поросятами молозива, з більшою концентрацією специфічних імуноглобулінів. Середній показник S/P тварин віком 56 дів на 16% менший ніж на 49 добу життя та у віці 77 дів життя знижується на 62% в порівнянні з тваринами віком 49 дів, що більш за все обумовлено природним катаболізмом колостральних антитіл.

Таким чином, тварини віком 7, 14, 21, 28, 35, 42 та 49 дів життя у діагностичному титрі 1:20 мають високий рівень антитіл, який починає знижуватись з 56 доби життя. Встановлено, що серопревалентність тварин до 70 доби життя становить 100%, що вказує на повноцінно сформований груповий імунітет у поросят.

Серед свиней вікових груп 77, 84 та 91 доба виявлено 20%, 40% та 60% не імунних поросят, відповідно, про що свідчить показник S/P (менше 40%). В подальшому ці тварини можуть знаходитись в зоні ризику для входу інфекції.

**Висновки.** Імунізація свиноматок сприяє формуванню колострального захисту молодняка майже до 3-х місячного віку, серологічний моніторинг якого забезпечує підвищення ефективності профілактичних заходів, що обов'язково слід враховувати при зміні схеми вакцинації.

Поросята віком 84 доби життя мають низькі титри антитіл, з числа яких виявлено 40% серонегативних тварин, що зумовлює утворення «серологічного вікна». Проведення вакцинопрофілактики поросят саме в цьому віковому діапазоні забезпечить високу імунологічну реактивність організму та утворення поствакцинальних антитіл.

Отримана інформація дає можливість планування проведення профілактичних заходів, ефективне їх застосування та контроль якості профілактики методом серологічного моніторингу стада.

---

*Додаток Б*

Сертифікати про участь НДЦ в Міжлабораторному міжнародному контролю «International Proficiency Testing Scheme (PTS)» (Міжнародна схема тестування кваліфікації (PTS)), організована лабораторією GD Animal Health (м.Девентер,Нідерланди).


Teaming up for animal health



# Certificate

**Biosafety-Center DSAEU**

has participated in the 2019 International Proficiency Testing Scheme (PTS) for  
**infectious bursal disease virus (IBDV) antibody detection in serum**

Signature:  
  
J.J. de Wit DVM PhD



GD Animal Health, [www.gdanimalhealth.com](http://www.gdanimalhealth.com), [pts@gdanimalhealth.com](mailto:pts@gdanimalhealth.com)



# Certificate

**Biosafety-Center DSAEU**

has participated in the 2019 International Proficiency Testing Scheme (PTS) for  
**Newcastle disease virus (NDV) antibody detection in serum**

Signature:

J.J. de Wit DVM PhD



# Certificate

**Biosafety-center DSAEU**

has participated in the 2019 International Proficiency Testing Scheme (PTS) for  
**Infectious Bronchitis Virus (IBV) antibody detection in serum**

Signature:

J.J. de Wit DVM PhD



*Додаток В*

## Проведення імуноферментного аналізу на базі Науково-дослідного центру





Згальний вигляд і основні кроки протоколу тестувань імуноферментного аналізу для усієї лінійки птиць, наданий виробником комерційних тест-систем

IDVet



## Додаток Д

Сертифікати якості, надані виробником комерційних тест-систем IDVet на діагностичні системи «ID Screen® IBD Indirect», «ID Screen® Infectious Bronchitis Indirect», «ID Screen® Newcastle Disease Indirect Conventional Vaccines»

**ID.vet**  
Innovative Diagnostics

**QUALITY CONTROL DATA SHEET – FICHE DE CONTRÔLE QUALITÉ**

Product / Produit: ID Screen® IBD Indirect Code / Code: IBDS	Batch n° / N° de lot : E05 Insert / Mode d'emploi : 0416 Manufacturing date / Date de fab. : 11/2018 Expiry date / Date d'expiration: 11/2020
---	--

**KIT COMPONENTS / COMPOSITION DU KIT**

Components / Composants	Batch n° / N° de lot
Coated Microplate / Microplaque sensibilisée	680-012
Positive Control / Contrôle positif	380-3,5-012
Negative Control / Contrôle négatif	39-3,5-006
Dilution buffer 14 / Tampon de dilution 14	14-300
Concentrated conjugate 10 X / Conjugué concentré 10 X	480-7-011
Dilution buffer 3 / Tampon de dilution 3	3-103
Wash concentrated 20 X / Solution de lavage concentrée 20 X	15-100
Substrate solution / Solution de révélation	7-016
Stop solution / Solution d'arrêt	10-102

**QUALITY CONTROL / CONTRÔLE QUALITÉ**

Tested parameters / Paramètres testés	Specifications / Spécifications	Results / Résultats
Mean OD of PC / Moyenne DO du CP	> 0.25	0.636*
Mean OD <sub>PC</sub> / OD <sub>CN</sub> ratio Ratio Moyenne DO <sub>CP</sub> / DO <sub>CN</sub>	> 3	14
Ref. sera expected titer range Intervalle de titres attendus du sérum de réf.	3 000 - 6 000 for MRIPOS-BIRD-RTU-B-006	4052
Sensitivity / Sensibilité	20 samples from vaccinated animals tested / 20 échantillons d'animaux vaccinés analysés	100%
Specificity / Spécificité	200 SPF samples tested / 200 échantillons d'animaux EOPS analysés	100%
PC intraplate repeatability CV% / %CV répétabilité intraplaque du CP	<10%	3%
PC interplate reproducibility CV% / %CV reproductibilité interplaque du CP	<15%	5%

PC = positive control / NC = negative control / CP = contrôle positif / CN = contrôle négatif  
\* These values were obtained in our Quality Control laboratory in our conditions. Laboratories may obtain slightly different values under their own conditions / Valeurs obtenues dans notre laboratoire de Contrôle Qualité, données à titre indicatif. Les laboratoires peuvent obtenir des valeurs légèrement différentes selon leurs propres conditions.

**FINAL REPORT / RAPPORT FINAL: CONFORM / CONFORME**

PERFORMED BY / REALISE PAR	VALIDATED BY / VALIDE PAR
ANAIS AGNEL anaïs.agnel@id-vet.com	PHILIPPE POURQUIER philippe.pourquier@id-vet.com
DATE : 11/2018	

11/2018  
Doc 9104

Tel : + 33 (0)4 67 41 49 33 - Fax: + 33 (0)4 67 45 36 95  
www.id-vet.com - E-mail: info@id-vet.com

# ID.vet

## QUALITY CONTROL DATA SHEET – FICHE DE CONTRÔLE QUALITÉ

Product / Produit: ID Screen® Infectious Bronchitis Indirect  
Code / Code: IBVS

Batch n° / N° de lot : E76  
Insert / Mode d'emploi : 0416  
Manufacturing date / Date de fabrication : 03/2019  
Expiry date / Date d'expiration : 03/2021

### KIT COMPONENTS / COMPOSITION DU KIT

Components / Composants	Batch n° / N° de lot
Coated Microplate / Microplaque sensibilisée	679-016
Positive Control / Contrôle positif	379-3,5-014
Negative Control / Contrôle négatif	39-3,5-007
Dilution buffer 14 / Tampon de dilution 14	14-201
Concentrated conjugate 10 X / Conjugué concentré 10 X	479-7-013
Dilution buffer 3 / Tampon de dilution 3	3-103
Wash concentrate 20 X / Solution de lavage concentrée 20 X	15-100
Substrate solution / Solution de révélation	7-016
Stop solution / Solution d'arrêt	10-102

### QUALITY CONTROL / CONTRÔLE QUALITÉ

Tested parameters / Paramètres testés	Specifications / Spécifications	Results / Résultats
Mean OD <sub>PC</sub> Moyenne DO <sub>CP</sub>	> 0.25	0,698*
Mean OD <sub>PC</sub> / OD <sub>CN</sub> ratio Ratio Moyenne DO <sub>CP</sub> / DO <sub>CN</sub>	> 3	11.6
Expected titer range for the IDvet ready-to-use positive serum/ Intervalle de titres attendus du sérum positif d'IDvet prêt à l'emploi.	2 000-4 000 for MRIPOS-BIRD-RTU-A-005	2597
Sensitivity Sensibilité	100 samples from vaccinated animals tested / 100 échantillons d'animaux vaccinés analysés	100
Specificity Spécificité	50 SPF samples tested / 50 échantillons EOPS analysés	100
PC intraplate repeatability CV% %CV répétabilité intraplaque du CP	<10%	3
PC interplate reproducibility CV% %CV reproductibilité interplaque du CP	<15 %	4

PC = positive control, NC = negative control, SPF = specific pathogen free; CV = coefficient of variation / CP = contrôle positif, CN = contrôle négatif, EOPS = exempt d'organisme pathogène spécifique, CV = coefficient de variation

\* These values were obtained in our Quality Control laboratory in our conditions. Laboratories may obtain slightly different values under their own conditions / Valeurs obtenues dans notre laboratoire de Contrôle Qualité, données à titre indicatif. Les laboratoires peuvent obtenir des valeurs légèrement différentes selon leurs propres conditions.

### FINAL REPORT / RAPPORT FINAL: CONFORM / CONFORME

PERFORMED BY / REALISE PAR	VALIDATED BY / VALIDE PAR
ANAIS AGNEL anais.agnei@id-vet.com	PHILIPPE POURQUIER philippe.pourquier@id-vet.com

03/2019  
DOC 9477

Tel : +33 (0)4 67 41 49 33 - Fax: +33 (0)4 67 45 36 95  
www.id-vet.com - E-mail: info@id-vet.com

# ID.Vet

## QUALITY CONTROL DATA SHEET – FICHE DE CONTRÔLE QUALITÉ

Product / Produit: ID Screen® Newcastle Disease Indirect Conventional Vaccines  
Code / Code: NDVS-CV

Batch n° / N° de lot: F41  
Insert / Mode d'emploi: 0416  
Manufacturing date / Date de fabrication: 07/2019  
Expiry date / Date d'expiration: 07/2021

### KIT COMPONENTS / COMPOSITION DU KIT

Components / Composants	Batch n° / N° de lot
Coated Microplate / Microplaque sensibilisée	6121-009
Positive Control / Contrôle positif	3121-3,5-009
Negative Control / Contrôle négatif	39-3,5-007
Dilution buffer 14 / Tampon de dilution 14	14-301
Concentrated conjugate 10 X / Conjugué concentré 10 X	4121-7-009
Dilution buffer 3 / Tampon de dilution 3	3-103
Wash concentrate 20 X / Solution de lavage concentrée 20 X	15-101
Substrate solution / Solution de révélation	7-017
Stop solution / Solution d'arrêt	10-102

### QUALITY CONTROL / CONTRÔLE QUALITÉ

Tested parameters / Paramètres testés	Specifications / Spécifications	Results / Résultats
Mean OD <sub>PC</sub> Moyenne DO <sub>CP</sub>	> 0.25	0.525*
Mean OD <sub>PC</sub> / OD <sub>NC</sub> ratio Ratio Moyenne DO <sub>CP</sub> / DO <sub>CN</sub>	> 3	6
Expected titer range for the IDvet ready-to-use positive serum / Intervalle de titres attendus du sérum positif d'IDvet prêt à l'emploi.	3 000 – 5 000 for MRIPOS-BIRD-RTU-A-003	3739
Sensitivity Sensibilité	100 samples from vaccinated animals tested / 100 échantillons d'animaux vaccinés analysés	100%
Specificity Spécificité	250 SPF samples tested / 250 échantillons EOPS analysés	100%
PC intraplate repeatability CV% %CV répétabilité intraplaque du CP	<10%	3%
PC interplate reproducibility CV% %CV reproductibilité interplaque du CP	<15%	5%

PC = positive control, NC = negative control, SPF = specific pathogen free, CV = coefficient of variation / CP = contrôle positif, CN = contrôle négatif, EOPS = exempt d'organisme pathogène spécifique, CV = coefficient de variation

\* These values were obtained in our Quality Control laboratory in our conditions. Laboratories may obtain slightly different values under their own conditions / Valeurs obtenues dans notre laboratoire de Contrôle Qualité, données à titre indicatif. Les laboratoires peuvent obtenir des valeurs légèrement différentes selon leurs propres conditions.

### FINAL REPORT / RAPPORT FINAL: CONFORM / CONFORME

PERFORMED BY / REALISÉ PAR	VALIDATED BY / VALIDÉ PAR
ANAIŠ AGNEL anais.agnel@id-vet.com	PHILIPPE POURQUIER philippe.pourquier@id-vet.com

07/2019  
DOC 9919

Tel: +33 (0)4 67 41 49 33 - Fax: +33 (0)4 67 45 36 95  
www.id-vet.com - E-mail: info@id-vet.com