

Научно-технический центр иммунобиотехнологии  
Национальной академии наук Украины  
Научно-производственная компания “Диапроф-Мед”

**ПРАКТИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ**  
**по работе с иммуноферментной тест-системой**  
**“ИФА-лептоспироз-КРС”**  
**для обнаружения антител против лептоспир**  
**в сыворотках крови крупного рогатого скота**

Київ, 2004

УДК 616.98-07:578.826.6

**Практическое пособие по работе с иммуноферментной тест-системой “ИФА-лептоспироз-КРС” для обнаружения антител против лептоспир в сыворотках крови крупного рогатого скота**

Под редакцией профессора Н.Я. Спивака

Авторы: Иванская Н.В., Кучерявенко Алексей А., Кучерявенко Александр А., Резуненко Е.В., Ганова Л.А.

Лептоспироз – одно из самых распространенных антропозоонозных заболеваний, вызываемых лептоспирами. Высокий уровень летальности при тяжелых генерализованных формах этой инфекции у человека и значительные экономические потери при заболевании животных требуют постоянного контроля эпизоотической ситуации. В последнее время для диагностики лептоспироза успешно используют метод иммуноферментного анализа. Для микробиологов, иммунологов, работников диагностических лабораторий, студентов и аспирантов высших учебных заведений и научно-исследовательских институтов медицинского и ветеринарного профиля.

Рецензенты –

академик Украинской академии аграрных наук  
доктор биологических наук, проф. Бойко А.Л.,

член-корр. Украинской академии аграрных наук  
доктор ветеринарных наук, проф. Рыженко В.П.,

доктор ветеринарных наук, проф. Волинец Л.К.

Рекомендовано к печати на заседании Ученого совета  
Института ветеринарной медицины Украинской академии  
аграрных наук (протокол № 6 от 10.06.2003 г.)

Киев-2004

**Сокращения, использованные в тексте пособия:**

- БСА – бычий сывороточный альбумин;  
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;  
ГЗ – граничное значение;  
ИФА – иммуноферментный анализ;  
К<sup>-</sup> – отрицательный контроль;  
К<sup>+</sup> – положительный контроль;  
КРС – крупный рогатый скот;  
о.е. – оптическая единица;  
ОП – оптическая плотность;  
ОПср К<sup>-</sup> – среднее значение оптической плотности для лунок с отрицательным контролем;  
ОПср К<sup>+</sup> – среднее значение оптической плотности для лунок с положительным контролем;  
ОФД – *o*-фенилендиамин;  
ПЦР – полимеразная цепная реакция;  
РМА – реакция микроагглютинации;  
РНИФ – реакция непрямой иммунофлюоресценции;  
ТМБ – тетраметилбензидин;  
CDC (Centers for Disease Control and Prevention) – Центры контроля и предупреждения заболеваний (в США);  
dot-ELISA – точечная модификация ИФА;  
ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазный иммуноферментный анализ;  
FDA (USA Food and Drug Administration) – Государственная служба США по вопросам контроля лекарств и пищевых продуктов;  
IgA, IgG, IgM – иммуноглобулины классов А, G, М, соответственно;  
IR (initial reactive) – первично реактивная сыворотка;  
RR (repeat reactive) – повторно реактивная сыворотка.

## ВСТУПЛЕНИЕ

Проблема лептоспирозной инфекции приобретает в последнее время всё большее значение. Лептоспироз стал самым распространенным среди природно-очаговых антропозоонозов – инфекций, которые поражают и людей, и животных и могут передаваться от животных к человеку. Ныне это одна из главнейших зоонозных инфекций мирового значения.

Лептоспироз распространен на всех континентах. Так как чаще всего источником инфекции бывают грызуны, а в определенной мере – также и домашние животные, формируются городские и природные очаги инфекции, которые трудно обезвредить. Контроль лептоспироза осложняется еще и потому, что животные без клинических признаков заболевания могут месяцами выделять возбудителя с мочой. Даже вакцинированные животные могут быть носителями бактерий и загрязнять ими окружающую среду. Высокая чувствительность людей и очень многих животных к заражению лептоспирами создают опасность инфицирования и заболевания человека и домашних животных во время пребывания их в природных очагах лептоспироза, а также при наличии возбудителя в жилых помещениях, на фермах, в хранилищах, погребах, сараях и т.д. По данным ограниченного эпидемиологического исследования, около 30-40 % крыс в больших городах становятся носителями лептоспир [1].

В странах СНГ отмечается тенденция к росту заболеваемости лептоспирозом и среди городского, и среди сельского населения. В списке заболеваний, которые опасны для жизни и влияют на показатели смертности в Украине, лептоспироз по своему значению занимает шестое-седьмое место. Очень высокая смертность наблюдается при тяжелых генерализованных формах этой инфекции; по данным всемирной статистики, этот показатель лежит в пределах 5-30 %. Большая опасность для человека, а также значительный экономический ущерб, связанный с заболеваемостью и гибелью сельскохозяйственных животных, определяют важность этого зооноза в социально-экономическом плане [2].

Люди и животные могут заболеть лептоспирозом из-за потребления зараженных продуктов питания и при контакте с предметами домашнего обихода, которые загрязнены мочой

животных-носителей лептоспир [обычно крыс, реже мышей, свиней, крупного рогатого скота (КРС), собак и т.д.], у которых заболевание очень часто протекает в бессимптомной форме [3].

Эпидемиологические, эпизоотические, медицинские и ветеринарные особенности лептоспироза свидетельствуют о необходимости контроля этой инфекции, постоянной оценки эпидемиологической ситуации и опасности лептоспироза для людей и животных в том или ином биотопе. Имеющиеся данные доказывают актуальность проблемы лептоспироза для стран СНГ; понятно, что эта инфекция должна находиться в зоне повышенного внимания работников здравоохранения и ветеринарной службы. Однако дело пока что обстоит иначе [3]. До сих пор у медиков нет надлежащего внимания к лептоспирозу, а потому столь часты ошибки при первоначальной диагностике. Они становятся основной причиной тяжелых проявлений и смертельного исхода болезни у человека.

Основной путь предупреждения лептоспироза у людей – искоренение его среди животных, грамотный контроль этого заболевания в животноводстве.

### **Серогруппы лептоспир**

Лептоспироз вызывают патогенные бактерии – лептоспиры. Согласно современной классификации, эти бактерии относятся к виду *Leptospira interrogans* семейства *Leptospiraceae*, куда сегодня включают 224 серовара<sup>1</sup>, принадлежащих к 26 серологическим группам.

Каждая из этих серогрупп обычно наиболее приспособлена к какому-то определенному хозяину; однако она способна заражать также и животных других видов, которые становятся ее случайными хозяевами (*accidental hosts*). Заболевания лептоспирозом среди животных чаще всего вызывают

---

<sup>1</sup> Семейство *Leptospiraceae* недавно отделили от более широкого семейства *Spirochaetaceae*. Серовары, или серологические варианты возбудителя, выделили в границах вида *L.interrogans*; они родственны между собой, но отличаются по качественному и/или иногда количественному содержанию известных антигенных детерминант (см. далее).

представители следующих серогрупп: у КРС – *Hebdomadis*, *Grippytyphosa*, *Sejroe*, *Pomona*, *Tarassovi*; у свиней – *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae*, *Tarassovi*, реже – *Grippytyphosa*, *Canicola*; у мелкого рогатого скота – *Grippytyphosa*, *Sejroe*, *Pomona*, *Tarassovi*; у лошадей преобладают серогруппы *Pomona*, *Tarassovi*; у собак – *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*; у грызунов наиболее часты *Icterohaemorrhagiae*, *Grippytyphosa*, *Pomona*. У человека лептоспироз возникает преимущественно при заражении представителями *Icterohaemorrhagiae* та *Grippytyphosa*, реже – *Pomona* и *Canicola*. Основные носители лептоспир *Icterohaemorrhagiae* в Украине – мышеподобные грызуны. Вообще же носительство лептоспир описано для девяти из 18 отрядов класса млекопитающих, но основное эпидемиологическое значение в Украине имеют грызуны, насекомоядные и хищники [7].

Лептоспирозная инфекция часто связана с животноводством и с использованием искусственных водоёмов, где пьют животные, особенно если эти водоемы расположены в населенных пунктах. После начала 90-х гг. XX столетия очень распространился лептоспироз, вызванный возбудителями серологической группы *Canicola*. Случаются групповые (семейные) случаи такого лептоспироза. Важная роль в этом принадлежит бродячим собакам, контактирующим с разными сельскохозяйственными животными. Раньше считали, что лептоспироз не передается людям от собак через мочу из-за кислой реакции собачьей мочи, при которой возбудитель уничтожается. Однако вероятно, что среди бактерий есть мутанты, не погибающие в кислой среде, или что в результате заболевания и связанных с ним изменений в обменных процессах pH собачьей мочи сдвигается в щелочную сторону.

В последнее время в некоторых областях Украины у собак и у людей регистрируется заболевание, вызванное серогруппами *Sejroe* и *Hebdomadis*. Вообще же в медицине и ветеринарии, по данным специальной литературы, наиболее существенное значение имеют возбудители, принадлежащие к (серо)группам *Pomona* (для свиней), *Tarassovi*, *Grippytyphosa*, *Icterohemorrhagiae*, *Canicola*, *Heptomadis*, *Bataviae*; среди патогенов находят также представителей серогрупп *Australis*, *Autumnalis*, *Butembo*, *Castellonis*, *Celledoni*, *Cynopteri*, *Djasiman*, *Hardjo* (для КРС), *Javanica*, *Medanensis*, *Panama*, *Pyrogenes*, *Shermani*, *Wolffi*.

Согласно результатам эпидемиологических исследований, проведенных на Северо-Востоке Украины, лептоспирами разных серогрупп заражено около 20 % лиц, работающих в мясо-молочной промышленности; при этом около 81 % общей заболеваемости лептоспирозом среди этого контингента приходится на серогруппы Pomona, Neptomadis, Tarassovi, Icterohemorrhagiae. Существенно также, что отмечают некоторые особенности зараженности лептоспирами среди лиц определенных профессий. Если, например, среди доярок положительные реакции на лептоспироз приходятся, главным образом, на серогруппы Neptomadis и Grippotyphosa, то среди свиноводов – на серогруппы Pomona, Tarassovi и Icterohemorrhagiae, которые особенно распространены среди свиней и крыс. Таким образом, понятно, что полное оздоровление поголовья сельскохозяйственных животных и борьба с грызунами (дератизация) – это мероприятия, очень важные не только в ветеринарном и хозяйственном отношении (например, с точки зрения продуктивности животноводства), но и с точки зрения эпидемиологии и здравоохранения в целом [8].

### **Клиническая картина заболевания**

Клиническая картина заболевания в значительной мере зависит от вида зараженного животного. Обычно заболевание у дефинитивного хозяина протекает субклинически, без видимых признаков, переходя часто в хроническую форму; у случайного хозяина заболевание проявляется в острой форме [9].

Лептоспироз клинически очень разнообразен и характеризуется многогранными проявлениями на уровне многих органов и систем – от недуга легкой и средней степени, напоминающего простуду, острую респираторную инфекцию или грипп, до крайне тяжелых поражений печени и почек (так называемой болезни Вейля-Васильева, или иктерогеморрагического лептоспироза; при поверхностном осмотре врача такое заболевание можно принять за гепатит) и даже до лимфоцитарного менингита. Желтуха проявляется только примерно в 10 % случаев лептоспироза человека (icteric leptospiroses), другие же 90 % относятся к безжелтушным формам (anicteric leptospiroses). Болезнь может не только сильно поражать инфицированных людей и животных, приводя иногда и к



смертельному исходу, но и протекать в бессимптомной форме. При этом происходит все же выделение (shedding) лептоспир во внешнюю среду с мочой, что благоприятствует дальнейшему их распространению и заражению новых хозяев. Обычно человек становится тупиковым хозяином для лептоспир (dead end host), а потому передача данного заболевания от человека к человеку описана только как очень редкое явление [3].

Инкубационный период при лептоспирозе (в зависимости от особенностей и состояния организма, от серогруппы и серовара возбудителя и от дозы бактериальных клеток, вызвавших заражение) длится от двух до 20 дней, в среднем около 10 дней.

Часто лептоспироз у людей и животных протекает в две стадии. Первая из них (она длится 7-10 дней) характеризуется появлением возбудителя в крови (септицемия и антигенемия), в спинномозговой жидкости и многих тканях; клинически эта стадия проявляется в трудных случаях как тяжелый васкулит. Эндотоксины лептоспир, образующиеся в результате распада возбудителя под действием литических антител, вызывают поражение клеток крови и паренхиматозных органов. При разрушении эритроцитов у людей и животных развивается анемия. При этом в крови накапливается освобожденный гемоглобин, который клетки пораженной печени не успевают использовать для образования желчного пигмента билирубина. Тогда эту функцию берут на себя клетки ретикулоэндотелиальной системы. Билирубин, поглощенный тканями, окрашивает их в желтый цвет.

Во время второй, так называемой иммунной фазы лептоспироза (она длится 10-30 дней), бактерии исчезают из крови и спинномозговой жидкости, время от времени появляясь в моче и внутриглазной жидкости [9].

### **Диагностика лептоспирозов**

Для проведения полноценных эпидемиологических исследований, для планирования стратегии и тактики противоэпидемических мероприятий, для профилактики лептоспироза у людей и оздоровления животноводства невозможно обойтись без своевременной диагностики.

В медицине и ветеринарии для постановки диагноза прибегают к бактериологическому и биохимическому анализу

крови (на билирубин, активность некоторых ферментов), исследованию мочи (на присутствие крови, определение удельного веса мочи) и фекалий (для обнаружения крови) [7, 10].

Микроскопия в темном поле дает возможность обнаруживать лептоспир вскоре после начала заболевания при исследованиях образцов крови (лептоспиры видны через неделю после заражения) и мочи (где бактерии присутствуют после 8-го-16-го дня после заражения). Следует подчеркнуть, что кислая реакция мочи вскоре обеззараживает возбудителя. Через краткое время после убоя животных с первой стадией лептоспироза бактерий находят во многих образцах тканей и в спинномозговой жидкости (при наличии признаков менингита). Благодаря воздействию трупного автолиза (активации лизосомных ферментов, которая сопровождается отмиранием клеток) бактерии вскоре гибнут, и их уже не выявляют в тканях погибших и убитых животных. Поэтому материал, предназначенный для исследований, необходимо как можно скорее зафиксировать (обычно его обрабатывают формалином) [7].

Другой, иногда применяемый диагностический подход – биопроба. Для этой цели берут обычно золотистых хомячков в возрасте 20-30 дней или крольчат-сосунков в возрасте 10-20 дней; реже используют взрослых кроликов и морских свинок. Исследуемый материал вводится под кожу или же в брюшную полость. Биопробу считают положительной, если при выраженных клинических проявлениях и соответствующих патолого-анатомических изменениях у зараженных животных найдены лептоспиры или же антитела против них, а также если возбудитель выделен в культуре.

Основной распространенный сейчас подход для диагностики заболевания и для идентификации возбудителя – культурально-серологический. Из целого арсенала описанных в литературе серологических проб на практике обычно используют реакцию микроагглютинации (РМА, microscopic agglutination test, МАТ) с применением живых бактерий [10]. Это пока что действующий стандартный тест, по сравнению с которым оценивают все остальные диагностические методы. Чтобы получить предельно точный и безошибочный результат, при постановке пробы следует как можно полнее использовать культуры лептоспир именно тех сероваров, которые чаще всего выявляют в данной стране или в

данной местности, а также бактерии из важнейших «патогенных серогрупп». Чувствительность пробы иногда возрастает, если кроме «всемирных» стандартных штаммов взять для работы также и местные изоляты. Более того: иногда отрицательные результаты исследования обусловлены именно тем обстоятельством, что определенные антигены лептоспир или антитела против них отсутствуют в тест-наборах, при помощи которых исследовали материалы от определенных лиц или особей. Обойтись без таких ошибок можно при помощи РМА, поставленной с сапрофитными бактериями вида *L.biflexa* (эти микроорганизмы не вызывают заболевания, работать с ними совершенно безопасно). Благодаря общности родоспецифических антигенов можно установить, что речь идет именно о патологии, вызванной лептоспирами. Однако во всех случаях без стандартных штаммов не следует обходиться при постановке пробы, т.к. использование их помогает при необходимости сравнивать и оценивать результаты, получаемые в разных лабораториях, которые находятся иногда в разных местностях или даже в разных странах [11].

Штаммы лептоспир, используемые для постановки РМА, выращивают обычно при температуре 29 °С (28-30 °С для разных штаммов) в жидкой питательной среде с полисорбатом-80 и бычьим сывороточным альбумином (БСА) или на других стандартных средах, как, например, ЕМЖН (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) или РМЛ-5 (Armput Pharmaceutical Company, Kankakee, Ill.). Главнейшее обстоятельство, обуславливающее успех работы (информативность реакции, т.е. точность, специфичность, воспроизводимость получаемых результатов) при проведении РМА (да и всех других серологических реакций) – это чистота и идентичность используемых антигенов. В авторитетных клинических и ветеринарных пособиях по диагностике лептоспироза сказано, что идентичность лептоспирных антигенов должна оцениваться не менее чем дважды в год при помощи гипериммунных кроличьих сывороток или же препаратов моноклональных антител [12]. При этом использование нестандартных питательных сред, не указанных среди сред, на которых разрешено выращивать лептоспиры с целью дальнейшего их использования для серологических работ, может привести к отсутствию в клеточной оболочке культивированных бактерий

всех надлежащих диагностически важных антигенов (или же их иммунодоминантных эпитопов) по причинам общеизвестной модификационной изменчивости прокариотических (да и других) клеток. Такая приспособительная (адаптационная) изменчивость (речь идет о вирулентности<sup>2</sup>, уровне синтеза разных антигенов, укладке поверхностных антигенов, экспонировании разных эпитопов, мере гликозилирования антигенов, прочих особенностях этого процесса<sup>3</sup>) может происходить при смене культуральной среды. Антигенная (иммуногенная) активность лептоспир сравнительно легко изменяется в зависимости от состава среды. Поэтому в директивных документах ВОЗ, а также в наставлениях и пособиях, издаваемых Международным эпизоотическим бюро, ведущие специалисты по проблеме лептоспироза подчеркивают, что использование стандартных питательных сред – одно из основных требований успешной серологической работы. Нарушение этого требования, как правило, не дает возможности получать полноценные антигены, нужные для создания тест-систем [13].

Для работы берут жидкие культуры в возрасте 4-8 дней, плотность которых проверяют фотометрически при длине волны 400 нм, причем коэффициент пропускания антигена должен составлять 60-70 %. В этом случае для постановки реакции антиген разводят в 50 раз. В каждую лунку планшета вносят объем антигена, равный объему разведенной сыворотки; конечное

---

<sup>2</sup> Некоторые культуры лептоспир могут утратить вирулентность после нескольких пересевов при культивировании вне организма, на питательных средах. Механизм утраты вирулентности до конца не понят, хотя большинство исследователей склонны связывать такую изменчивость с явлением микробной диссоциации и с влиянием кислорода. После диссоциации на искусственной среде происходит отбор неvirulentных клонов. По литературным данным, восстановить вирулентность, утраченную *in vitro*, не всегда удается.

<sup>3</sup> Есть данные о роли присутствующих в среде жирных кислот, пирувата, Твина 80 и сывороточного альбумина для сохранения антигенной структуры лептоспир, но имеющиеся данные довольно противоречивы. Вопросы об антигенной изменчивости лептоспир, происхождении серологических вариантов и спонтанной изменчивости пока не исследованы в полной мере.

разведение сыворотки при постановке теста равно 1:100. Планшеты с исследуемыми пробами ставят на 2 ч при температуре 28-30 °С. Потом пробы рассматривают в темном поле микроскопа. Результат реакции описывают в процентах, в зависимости от степени агглютинации лептоспир (4+ при 100 %-ной агглютинации, 3+ – при приблизительно 75 %-ной, 2+ – при 50 %-ной и 1+ – в том случае, когда агглютинировано менее чем 50 % бактерий). При проведении массовых исследований любую сыворотку, дающую 50 %-ную агглютинацию при разведении в 100 раз, титруют до конечной точки в двух повторностях, разводя ее далее (до 12.800 раз и более). Титром считают то высшее разведение сыворотки, при котором она все еще склеивает 50 % клеток лептоспир.

В ветеринарной практике считают, что диагноз на лептоспироз поставлен и что в данном хозяйстве дело с лептоспирозом обстоит неблагоприятно, если:

- лептоспиры найдены при микроскопическом исследовании в крови или в суспензии органов больного животного, в абортном плоде, в моче или органах лабораторного животного, погибшего после заражения исследуемым материалом;
- из патологического материала или из органов лабораторного животного, зараженного этим материалом, выделили культуру лептоспир;
- лептоспиры найдены на гистологических срезах почек или печени после импрегнации серебром по методу Левадити;
- титр антител возрастает пятикратно или более при повторном исследовании сывороток в РМА через 7-10 дней или же при обнаружении антител у животных, которые были прежде серонегативными;
- при однократном обследовании в РМА специфические антитела нашли в сыворотках крови более чем 25 % обследованных животных в титрах 1:100 или выше [12].

Лептоспироз считают причиной выкидышей в тех случаях, когда:

- возбудитель найден в органах или тканях недоношенного плода;
- титр антител у матки, которая не смогла доносить плод, возрастает более чем в пять раз;

– у таких маток обнаружены высокие титры антител против лептоспир (1:2.500 и выше), тогда как у здоровых животных титры низкие (1:50) или реакция отрицательная.

Наличие антител в низких титрах при выраженных клинических проявлениях болезни свидетельствует о высокой вирулентности возбудителя или/и о слабом сопротивлении против него из-за истощения зараженного организма. Если же антитела обнаруживают в низких титрах при отсутствии клинических признаков лептоспироза, то логично предположить, что организм инфицирован слабовирулентными штаммами, или думать о перенесенном заболевании и/или о переживании возбудителя. Высокие титры в РМА (1:400-1:800) характеризуют давно случившееся заражение и легкое течение болезни, а также хорошую защиту организма. У животных, переболевших лептоспирозом, пожизненно сохраняется слабо-положительная реакция (1:5-1:10) [10].

#### Антигенная структура лептоспир

Антигенную структуру лептоспир характеризуют как “очень мозаичную”. Каждый серовар имеет несколько антигенов, качественно неравноценных с точки зрения иммунного ответа. Случается также, что штаммы, которые существенно не отличаются по антигенной структуре, бывают очень различны по своей патогенности для разных животных. Важно знать, что родоспецифические антигены возбудителя лежат внутри бактериальной клетки [13].

Антитела против возбудителя появляются через несколько дней после начала болезни. Среди этих антител есть такие, которые склеивают бактерии (агглютинины), осаждают (преципитины) и растворяют их (лизины), а также специфические антитела, которые связывают комплемент.

Сведения о длительности сохранения антител в крови весьма противоречивы. Есть данные об обнаружении сывороточных антител в течение нескольких недель, месяцев или даже лет. Описано длительное (даже до 16 лет) сохранение специфических IgG в крови лиц, переболевших лептоспирозом. Иногда бывает, что при клинически доказанном заражении и достоверном диагнозе лептоспироза антитела этого класса вовсе не появляются в

сыворотках. Известны также неожиданные (но подтвержденные несколькими независимыми группами авторов) данные о длительном сохранении в сыворотках переболевших лиц и носителей антител класса IgM, обнаружение которых связывают с более ранней диагностикой лептоспироза. Однако одновременно накапливаются также и убедительные сообщения о том, что когда инфекция у людей и животных принимает хроническое течение, то в большинстве случаев титры антител вскоре падают до очень низких уровней [14]. Поэтому для качественной диагностики, безусловно, требуются достаточно высокочувствительные методы.

Заключительный диагноз лептоспироза зависит от появления и уровня антител в крови, а также от успешного выделения бактерий из клинических образцов (прямое обнаружение бактерий в моче, крови и молоке, а иногда, посмертно – в различных органах животных).

Как уже отмечено, РМА пока что незаменима при диагностике лептоспирозов именно потому, что она позволяет не только установить наличие возбудителя, но и одновременно определить его серогруппу. Однако нередко при работе с культурами, полученными от людей и домашних животных, в РМА обнаруживают межгрупповые реакции с бактериями различных серогрупп. Ежегодно количество сывороток, полученных от разных животных с положительной реакцией на лептоспиры нескольких групп, достоверно возрастает. Эксперты ВОЗ рекомендуют в таких случаях считать возбудителями лептоспир той серогруппы, для которой установлены самые высокие титры сыворотки. Если титры антител против возбудителей разных серогрупп одинаковы или очень близки, положение усложняется, и необходимо проводить добавочные исследования [12].

### Диагностические тест-наборы

#### для определения лептоспир и антител против них

Министерство сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации разрешило использовать набор для диагностики лептоспир в микрореакции латекс-агглютинации на стекле [7]; в данном наборе антиген (полисахаридную фракцию из клеток лептоспир семи эпидемиологически актуальных серогрупп – Pomona, Canicola, Grippotyphosa, Icterohemorrhagiae, Sejroe,

Hebdomadis, Tarassovi) пришили к латексным частицам, суспендированным в глициновом буфере. Как и в РМА, животных считают зараженными, если обнаружили положительную реакцию при разведении положительной сыворотки 1:50 у невакцинированных особей и при разведении 1:100 и выше – у вакцинированных.

На основе тех же эпидемиологически актуальных серогрупп в РФ (в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва) и в Белоруссии (НИИ эпидемиологии и микробиологии, Минск) предложили диагностические тест-системы для обнаружения антигена и антител в реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ); антиген иммобилизован на дне углублений в специальных предметных стеклах. Отработана технология получения комплексного антигена с широким диапазоном внутривидовых и внутригрупповых эпитопов. В научно-исследовательской работе с лептоспирами используют иногда реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ)[15].

Кроме того, в РФ (в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва) разработан диагностический набор “Амплитест 1ер” на основе метода амплификации ДНК (полимеразной цепной реакции, ПЦР). Как считают авторы [16], данный набор особенно нужен при диагностике лептоспироза у пролеченных лиц с осложнениями и поражениями центральной нервной системы. Обычно поставить диагноз лептоспироза у таких лиц при помощи иных диагностических приемов не удается. Чувствительность и специфичность предлагаемого теста не уступают соответствующим показателям набора, который продает швейцарская фирма “Hoffman LaRoche”, и дает возможность обнаружить 100 микробных клеток/мл. Другие аналогичные по чувствительности тест-системы, основаны на амплификации генов кодирующих 23S рРНК. У Канаде (Agriculture & Agri-Food, Alberta, Canada) разработали тест-систему на основе ПЦР для диагностики лептоспироза КРС при использовании клинических образцов, таких как моча, ткань почки, перикардальная и/или перитонеальная жидкость плода. ПЦР может послужить прекрасным подспорьем для диагностических целей, но метод пока что слишком дорог для массовых исследований в ветеринарии и медицине.



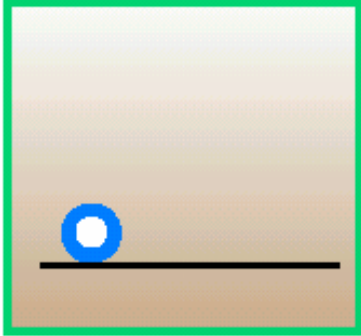
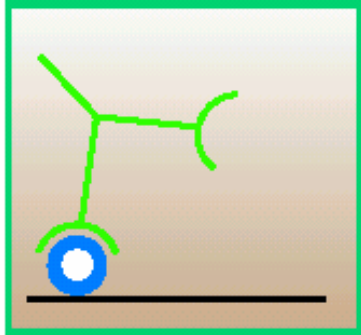
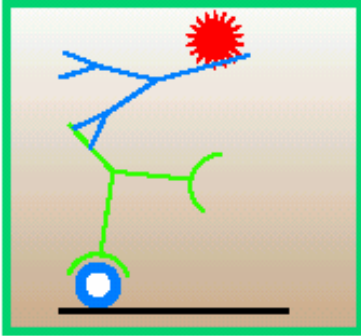
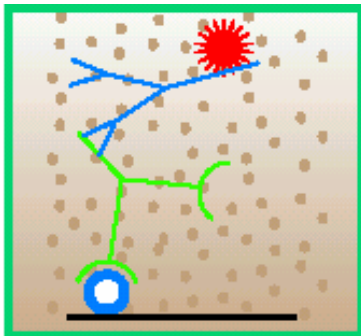
Наиболее распространены в современной лабораторной диагностике методы иммуноферментного анализу (ИФА) пока еще сравнительно мало используются для обнаружения противолептоспирных антител. ИФА для этой цели предложен в нескольких модификациях и вариантах. В частности, сравнительно недавно Институте им. Адольфа Лютца в Сан-Паулу (Бразилия) предложили точечную, технически упрощенную полуколичественную модификацию ИФА (dot-ELISA), предназначенную именно для выявления противолептоспирных антител класса IgM. Предложенная тест-система хорошо себя зарекомендовала также при проведении диагностической работы вне лаборатории, в полевых условиях; как твердофазный носитель использовали традиционную для такой цели нитроцеллюлозу. Ей присуща, как известно, очень высокая сорбционная ёмкость по сравнению с полистиролом и поливинилхлоридом, из которых обычно изготавливают планшеты для ИФА. Авторы подчеркивают, что данная модификация важна еще и с той точки зрения, что у некоторых больных лептоспирозом вовсе не появляется антител класса IgG. Кроме того, чувствительность точечной модификации ИФА оказалась выше, чем чувствительность РМА, а потому ее использование дает возможность обнаружить добавочно лептоспирозную инфекцию 38-43 % лиц на стадии острой фазы (IgM при лептоспирозе рано появляются и долго сохраняются); при классическом же подходе (РМА) антитела против лептоспир у этих лиц находят значительно позже. Таким образом, выявление противолептоспирных антител при наличии клинических признаков лептоспироза позволяет раньше приступить к лечению и помешать генерализованному заболеванию. Однако в точечных модификациях ИФА обычно используют антиген только одного актуального для данной местности серовара лептоспир, и это значительно сужает диагностические возможности тест-системы.

Иммуноферментную тест-систему для выявления антител против *L. interrogans* серовара Hardjo в сыворотках крови и в молоке КРС производит фирма Cypress Diagnostics (Cyprus). Эта тест-система основана на использовании полистироловых планшетов, в которых засорбирован обеззараженный антиген. Исследуемые сыворотки и молоко предварительно разводятся

(соответственно 1:200 та 1:4). Антитела, содержащиеся в сыворотках или молоке, связываются с антигеном на носителе. Такой комплекс потом выявляют при помощи моноклонального конъюгата антивидовых антител с пероксидазой хрена и проявителя – смеси хромогена с субстратом.

На таком же принципе создана иммуноферментная тест-система производства НПК “Диапроф-Мед”. Однако как антигены здесь используются 7 серогрупп лептоспир, актуальных в Украине, а именно *Pomona*, *Tarassovi*, *Grippotyphosa*, *Icterohemorrhagiae*, *Canicola*, *Kabura*, *Polonica*. Выделение, концентрирование и инактивация лептоспирных антигенов запатентованы в Украине сотрудниками Украинского института ветеринарной медицины УААН и НПК “Диапроф-Мед” [17, 18]. Ниже приведена схема проведения ИФА для выявления антител при помощи тест-системы “ИФА-лептоспироз-КРС”.

### Схема проведения ИФА

Процедура	Формирование комплекса
<ul style="list-style-type: none"> <li>Полистироловые стрипы, сенсibilизированные антигенами лептоспир</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Внесение в лунки стрипов по 80 мкл раствора для розведения образцов и по 20 мкл образцов контролей и испытуемых сывороток             <ul style="list-style-type: none"> <li>Инкубация в течение 60 мин при 37 °С (образование комплекса антиген-антитело)</li> <li>Промывание лунок буферным раствором (4 раза)</li> </ul> </li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Внесение в лунки по 100 мкл раствора конъюгата             <ul style="list-style-type: none"> <li>Инкубация 30 мин при 37 °С (образование комплекса с конъюгатом)</li> <li>Промывание лунок буферным раствором (6 раз)</li> </ul> </li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Внесение в лунки по 100 мкл раствора проявителя (перекиси водорода и хромогена)             <ul style="list-style-type: none"> <li>Инкубация 30 мин при комнатной температуре (появление окрашивания)</li> <li>Остановка реакции добавлением стоп-реагента</li> <li>Регистрация величины оптической плотности</li> </ul> </li> </ul>	

**Методика проведения иммуноферментного анализа  
при использовании тест-системы  
«ИФА-лептоспироз-КРС»**

«ИФА-лептоспироз-КРС», тест-система иммуноферментная для определения противолептоспирных антител в сыворотке крови крупного рогатого скота.

Назначение набора

Набор предназначен для анализа сыворотки крови КРС на присутствие протилептоспирных антител методом иммуноферментного анализа.

Принцип анализа

Главные компоненты набора – иммуносорбент и иммуноферментный конъюгат. Иммуносорбент – полистироловый планшет, лунки которого сенсibilизированы очищенными антигенами патогенных лептоспир. Иммуноферментный конъюгат – моноклональные антитела против бычьих иммуноглобулинов класса IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена.

При внесении в лунки планшета образцов исследуемых сывороток специфические антитела против патогенных лептоспир, содержащиеся в сыворотках, связываются с антигенами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся комплексы выявляют при помощи специфического иммуноферментного конъюгата. После отмывания несвязавшихся компонентов в лунки добавляют раствор проявителя – субстрат пероксидазы (перекись водорода) и хромоген (*орто*-фенилендиамин – ОФД). Пероксидазную реакцию останавливают, добавив стоп-реагент (2 М раствор серной кислоты), и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках; при длине волны 492 нм ОП пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемых образцах сывороток крови.

## Состав набора

N	Название компонента	Количество
1	Концентрат раствора № 1 для промывания планшета	1 фл., 25 мл
2	Иммуносорбент	1 планшет
3	Раствор № 3 для разведения сывороток	1 фл., 15 мл
4	Раствор № 4 для разведения конъюгата	1 фл., 15 мл
5	Концентрат раствора № 5Ф для приготовления проявителя	1 фл., 12 мл
6	Хромоген ОФД	3 табл.
7	Конъюгат иммуноферментный	1 амп., 0,5 мл
8	Положительный контроль (K <sup>+</sup> )	1 амп., 0,15 мл
9	Отрицательный контроль (K <sup>-</sup> )	1 амп., 0,3 мл
10	Стоп-реагент	1 фл., 8 мл
11	Клейкая пленка	3 шт.

Добавочные реактивы, материалы и оборудование

- вода дистиллированная;
- перекись водорода, 6 %;
- спирт этиловый, 70°;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага;
- пипетки одноканальные (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) и наконечники к ним;
- пипетки 8-канальные (50-300 мкл) и наконечники к ним;
- мерная склянка или цилиндр (1000 мл);
- ванночки для реагентов;
- флаконы для реактивов, 20 мл;
- суховоздушный термостат на 37 °С;
- аппарат для промывания планшетов (вошер);
- фотометр для измерения оптической плотности в лунках планшета;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей.

### Необходимые предостережения

Меры безопасности при использовании набора:

- работу проводить в специально оборудованном помещении;
- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворов ртом;
- все использованные растворы обрабатывать 6 % раствором перекиси водорода при комнатной температуре в течение 3 ч;
- все твердые отходы собирать в специальный контейнер, стерилизовать его в автоклаве в течение 1 ч при температуре 120 °С;
- инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности протирать 70° этиловым спиртом.

### Правила работы с тест-системой:

- не использовать набор после окончания срока годности, не смешивать компоненты наборов разных серий;
- тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа;
- использовать для приготовления реагентов чисто вымытую посуду, ополоснутую дистиллированной водой;
- не допускать подсыхания лунок на всех этапах постановки ИФА;
- проверять точность дозирования, следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;
- избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность  
во время проведения анализа.

### Требования к промыванию планшетов:

- некачественное промывание планшета приводит к некорректным результатам;
- для промывания планшета рекомендуют использовать автоматическую промывалку – вошер; при отсутствии или плохой работе вошера лунки можно промывать при помощи 8-канальной пипетки;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение лунок и полное удаление жидкости из них: лунки должны заполняться доверху (350 мкл промывной жидкости на лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок.

### Подготовка образцов

Образцы сывороток сохраняют температуре 2-8 °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже 20 °С) не более чем дважды. Образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлить при помощи центрифугирования.

Образцы, где заметны гемолиз, гиперлипидемия или бактериальное загрязнение (проросты), а также образцы, куда добавлен как консервант азид натрия, не годятся для анализа.

### Проведение анализа

#### 1. Подготовка к анализу (из расчета на 32 лунки)

Выдерживают компоненты набора при температуре 18-22 °С в течение 30 мин.

##### *1.1 Приготовление раствора № 1 для промывания планшетов*

Содержимое одного флакона с концентратом раствора № 1 интенсивно встряхивают. Отбирают 8 мл раствора и разводят его в 350 мл дистиллированной воды, перемешивают. Если концентрат раствора содержит кристаллы, его прогревают перед использованием при 35-37 °С до полного растворения кристаллов.

Раствор можно сохранять при температуре 2-8 °С не более 5 суток.

##### *1.2 Приготовление раствора конъюгата*

В чистый флакон отбирают 4 мл раствора № 4 для разведения конъюгата и добавляют 80 мкл конъюгата (50-кратного концентрата). Содержимое флакона тщательно перемешивают, не допуская пенообразования.

Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

### 1.3 Приготовление раствора проявителя

В чистый флакон вносят таблетку хромогена (ОФД) и добавляют 9 мл дистиллированной воды, интенсивно встряхивают и оставляют флакон в темноте до полного растворения хромогена. Непосредственно перед внесением в лунки стрипов к раствору хромогена добавляют 3 мл концентрата раствора № 5Ф для приготовления проявителя; смесь интенсивно встряхивают.

Раствор проявителя готовят непосредственно перед употреблением.

Этот раствор необходимо оберегать от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед употреблением раствор проявителя должен быть бесцветен.

### 2. Проведение иммуноферментной реакции

- Перед проведением анализа необходимое количество стрипов вынимают из упаковки, вставляют их в рамку. Стрипы, не используемые в данной постановке, сохраняют в плотно закрытом пакете при температуре 2-8 °С в течение 1 месяца.
- Готовят раствор № 1 согласно п. 1.1.
- Вносят во все лунки по 350 мкл раствора № 1, держат стрипы залитыми в течение 30-40 с и удаляют раствор при помощи промывалки или 8-канальной пипетки, после чего удаляют лишнюю влагу (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).
- В каждую лунку стрипов вносят по 80 мкл раствора № 3 для разведения сывороток.
- В лунки стрипов вносят по 20 мкл образцов исследуемых сывороток, оставив свободными 5 лунок первого ряда (лунки для контролей).
- В две лунки (А1, В1) вносят по 20 мкл положительного контроля ( $K^+$ ), а в три других (С1- Е1) – по 20 мкл отрицательного контроля ( $K^-$ ). При внесении контрольных



*и исследуемых образцов необходимо осторожно пипетировать смесь.*

- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 60 мин.
- После окончания инкубации удаляют содержимое лунок при помощи промывалки или 8-канальной пипетки и промывают лунки четыре раза раствором № 1, после чего удаляют лишнюю влагу (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).
- Готовят раствор конъюгата согласно п. 1.2.
- В лунки стрипов вносят по 100 мкл раствора конъюгата.
- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 мин.
- После окончания инкубации удаляют раствор конъюгата из лунок при помощи промывалки или 8-канальной пипетки и промывают лунки шесть раз раствором № 1, после чего удаляют лишнюю влагу (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).
- Готовят раствор проявителя согласно п. 1.3.
- Вносят в лунки стрипов по 100 мкл раствора проявителя.
- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 18-22 °С в темноте в течение 30 мин.
- Останавливают цветную реакцию внесением во все лунки по 50 мкл стоп-реагента.
- Не позже чем через 1 мин после остановки цветной реакции определяют оптическую плотность в лунках в двухволновом режиме (при 492 нм относительно 620 нм).

*Как исключение, ОП можно определять в одноволновом режиме (при 492 нм) относительно пустой лунки (бланка). Тогда необходимо оставлять пустую лунку при анализе. При работе в*

одноволновом режиме снижается чувствительность и точность анализа.

### Учет результатов анализа

- Вычисляют среднее значения оптической плотности (ОП) для лунок с отрицательным контролем (ОПср  $K^-$ ) и положительным контролем (ОПср  $K^+$ ).

Проведение анализа считается корректным, если ОПср  $K^-$  не превышает 0,1 оптической единицы (о.о.), а значение ОПср  $K^+$  не ниже 0,6 о.о.

Если одно из трех значений ОП  $K^-$  превышает 0,1 о.о. или более чем в два раза превышает ОПср  $K^-$ , его отбрасывают, а ОПср  $K^-$  рассчитывают по остальным значениям ОП  $K^-$ .

- Граничные значения (ГЗ) ОП. ГЗ рассчитывают, добавляя константную величину **0,12** к значению ОПср  $K^-$ .
- “Серая зона” – это область значений ОП, охватывающая ГЗ и величины ОП, меньшие, чем ГЗ, на 10 %.
- Результаты анализа считаются **отрицательными**, если значения ОП исследуемого образца меньше, чем нижний уровень ОП “серой зоны”.
- Результаты анализа считаются **положительными**, если значения ОП исследуемой пробы превышают ОП ГЗ.
- Образцы с величинами ОП, находящиеся в пределах “серой зоны”, считаются **неопределенными**.
- Для более достоверного учета результатов и возможности сравнивать данные ИФА с результатами, полученными при помощи других методов тестирования, введены следующие коэффициенты:

№ п/п	Величина ОП образца	Результат
1	Ниже чем 0,9xГЗ	отрицательные
2	0,9xГЗ — 1,1xГЗ	неопределенный, сомнительный
3	1,1xГЗ — 3xГЗ	слабоположительный
4	3,01xГЗ - 10xГЗ	положительный

5	Выше чем 10xГЗ	высокоположительный
---	----------------	---------------------

Например, для трех лунок с отрицательным контролем (С1, D1 та E1) получены значения ОП, равные 0,020, 0,022 та 0,018, соответственно. Тогда:

$$\text{ОПср К}^- = 0,020;$$

$$\text{ГЗ} = \text{ОПср К}^- + 0,12 = 0,020 + 0,12 = 0,14.$$

- Если исследуемая сыворотка имеет значения ОП ниже, чем  $0,9 \times \text{ГЗ}$ , например,  $0,9 \times 0,14 = 0,126$ , то ее следует считать отрицательной.
- Если исследуемая сыворотка имеет значения ОП в интервале между  $0,9-1,1 \times \text{ГЗ}$  (например,  $1,1 \times 0,14 = 0,154$ ), такую сыворотку с ОП в пределах  $0,126-0,154$  следует считать неопределенной, или сомнительной.
- Если исследуемая сыворотка имеет значения ОП в интервале  $1,1-3,0 \times \text{ГЗ}$  ( $0,155-0,420$ ), такая сыворотка считается слабоположительной .
- Если исследуемая сыворотка имеет значения ОП в интервале  $3,01-10,0 \times \text{ГЗ}$  ( $0,421-1,4$ ), такая сыворотка считается положительной.
- Если исследуемая сыворотка имеет значения ОП, превышающее  $10 \times \text{ГЗ}$  ( $>1,4$ ), такая сыворотка считается высокоположительной.

- Образцы, давшие положительный или неопределенный ответ, необходимо исследовать повторно не менее чем в двух лунках тест-системы; при этом:
  - Образцы, положительные в двух или более лунках, следует считать положительными;

- Образцы, отрицательные в двух или более лунках, следует считать отрицательными.
- В случае, когда повторно получен неопределенный результат, животных необходимо снова обследовать на лептоспироз через 14 дней.

### **Обсуждение результатов анализа**

Применение тест-системы “ИФА-лептоспироз-КРС” позволяет проводить массовые обследования животных, качественно обнаруживая суммарные антитела против 7 основных серогрупп лептоспир, актуальных для Украины, а именно Pomona, Tarassovi, Grippytyphosa, Icterohemorrhagiae, Canicola, Kabura, Polonica.

Данная тест-система не предназначена для обнаружения уровня антител против определенной отдельной серогруппы лептоспир, а поэтому количественное определение антител против отдельных серогрупп при помощи данной тест-системы невозможно. Это значит, что сравнивать результаты ИФА (значение оптической плотности) с титром антител против данного штамма лептоспир, определенного в РМА, недопустимо. При помощи тест-системы “ИФА-лептоспироз-КРС” возможно проводить скрининг большого количества животных на наличие антител против лептоспир, а потом в отобранных положительных пробах идентифицировать возбудителя при помощи других методов, например РМА.

### **Оценка качества иммуноферментной тест-системы**

При проведении лабораторных исследований необходимо решить вопрос о выборе тест-системы. По современным представлениям, для оценки качества и пригодности тест-системы используют научные, медицинские и экономические критерии. Научные критерии выбора метода включают в себя определение чувствительности, специфичности и воспроизводимости диагностикумов.

Чувствительность – показатель, характеризующий способность тест-системы выявлять максимальное количество истинно положительных сывороток, отображает количество

инфицированных лиц, которые могут быть выявлены при использовании данной тест-системы. Чувствительность определяется по формуле:

$$\text{Чувствительность} = \frac{П}{П + ЛО} \times 100 \%,$$

где П – количество положительных результатов анализа, ЛО – количество ложноотрицательных результатов анализа.

Специфичность – способность тест-системы определять лишь тот компонент, для определения которого она предназначена, т.е. показатель, характеризующий способность диагностикума регистрировать минимальное количество ложноположительных результатов. Специфичность определяется по формуле:

$$\text{Специфичность} = \frac{О}{О + ЛП} \times 100 \%,$$

где О – количество отрицательных результатов анализа, ЛП – количество ложноположительных результатов анализа.

Таким образом, более чувствительной будет та тест-система, которая дает меньшее количество ложноотрицательных результатов, а более специфической – та, что дает меньшее количество ложноположительных результатов.

Понятия о “чувствительности” и “специфичности” тесно связаны с понятиями о “ложноположительном ” и “ложноотрицательном результате”.

Ложноотрицательный результат– это отрицательный результат, полученный в данной тест-системе для пробы, которая в действительности положительна.

Ложноположительный результат – це положительный результат, полученный в данной тест-системе для пробы, которая в действительности отрицательна.

Таким образом, более чувствительной будет та тест-система, которая дает меньшее количество ложно-отрицательных

результатов, а более специфичной – та, которая дает меньшее количество ложно-положительных результатов.

Метод ИФА ценен прежде всего из-за его высокой чувствительности (отдельные его модификации позволяют определять до  $10^{-18}$  моль/л антигена) и высокой специфичности (около 100 % для новейших модификаций метода).

Согласно рекомендациям ВОЗ, CDC (USA, Centers for Disease Control and Prevention), FDA (USA, Food and Drug Administration), чувствительность и специфичность определяется на основании результатов, полученных при тестировании заведомо положительных или отрицательных сывороток стандартных контрольных панелей с последующим вычислением показателей. При этом сыворотки положительных контрольных панелей должны быть охарактеризованы и представлять диапазон от ранней сероконверсии до проявления заболевания, т.е. должны присутствовать как низкотитражные сыворотки, так и сыворотки, содержащие антитела в различных титрах.

Показатель специфичности ветеринарных тест-систем определяют при исследовании рандомизированной выборки сывороток животных, сывороток особей из групп высокого риска заражения данным возбудителем и особей из группы с другими патологиями. При этом принимаются во внимание показатели первичной (IR – initial reactive) и повторной (RR – repeat reactive) реактивности положительных образцов, полученных на этой тест-системе, с последующей верификацией результатов.

Оценивая специфичность иммуноферментных тест-систем, необходимо учитывать их высокую чувствительность. Если при тестировании проб, входящих в «отрицательную выборку», для какой-то пробы получен положительный результат, то прежде чем считать его ложно-положительным, следует провести дополнительные исследования.

Достаточно часто при использовании стандартных охарактеризованных панелей сывороток чувствительность и специфичность иммунодиагностикомов приближаются или равны 100 %, но достичь таких показателей в условиях повседневной лабораторной работы практически невозможно. Взаемосвязь между чувствительностью и специфичностью такова, что улучшение одного из этих показателей сопровождается

ухудшением другого. Таким образом, не существует диагностикумов, гарантирующих абсолютную чувствительность и специфичность при проведении массовых обследований.

Количество ложноположительных результатов при выявлении антител против некоторых возбудителей может колебаться в пределах от 0,02-0,5 % до 2-40 % всех положительных результатов обследований. Так, по сборным данным, существует около 70 заболеваний или других факторов, которые приводят к ложно-положительным результатам при проведении серологических исследований (не обязательно только при использовании ИФА). Это могут быть перекрестные реакции с аутоантителами, антителами против ревматоидного фактора, кратковременная сероконверсия (после вакцинации, введения иммуноглобулиновых препаратов), наличие инфекционной патологии, опухолей, иммунодефицитных состояний и т.д.

Обсуждая вопрос о специфичности серологических тестов вообще, следует указать, что клеточные оболочки лептоспир содержат также антигены, общие с некоторыми другими возбудителями. Ложноположительную реакцию на лептоспироз обнаружили при работе с сыворотками здоровых людей (в одном исследовании в 7 % контрольных сывороток, полученных от практически здоровых людей, нашли «противолептоспирные» антитела), а также с сыворотками лиц, содержащих антитела против возбудителей болезни Лайма<sup>4</sup>, возвратного тифа, фрамбезии<sup>5</sup>, сифилиса, клеточные оболочки которых имеют общие антигены с клеточными оболочками лептоспир. Поэтому только достаточная очистка иммунодоминантных лептоспирных антигенов, тщательная их идентификация обеспечат надлежащую информативность реакции и позволят проводить ее при удовлетворительных фоновых значениях оптической плотности в ИФА.

---

<sup>4</sup> Иначе его называют клещевым боррелиозом или клещевым спирохетозом.

<sup>5</sup> Тропический сифилис (“yaw”), вызываемый возбудителем, принадлежащим к роду *Treponema*.

Для определения чувствительности и специфичности тест-системы “ИФА-лептоспироз-КРС” исследовали 955 образцов сывороток, положительных к разным серовариантам лептоспир, которые были охарактеризованы в РМА как положительные, а также 1414 образцов, оказавшихся в РМА отрицательными. Все сыворотки, положительные РМА, были положительны также и в ИФА. В то же время среди отрицательных сывороток в РМА 154 образца оказались положительными в тест-системе “ИФА-лептоспироз-КРС”; далее это подтвердилось в РМА в 120 случаях при повторном обследовании через 14-28 дней.

### **Основные особенности и преимущества тест-системы “ИФА-лептоспироз-КРС”**

- Высокая чувствительность и специфичность.
- Использование высокоспецифичных антигенов в составе иммуносорбента; эти антигены получены из патогенных штаммов лептоспир, распространенных в Украине.
- Возможность обнаруживать антитела против всех штаммов лептоспир, патогенных для КРС.
- Длительность анализа – 2 ч.
- Система легко адаптируется к условиям рутинного серологического тестирования.
- Общепризнанная стандартизация учета результатов.
- Разные варианты комплектации наборов по выбору заказчика: стриповый или монолитный планшет, хромоген – ТМБ або ОФД.
- Один набор предназначен для 192 анализов.
- Срок годности — 6 месяцев.



## ПРОБЛЕМЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКАТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

Возникающие проблемы	Возможные причины	Способы устранения проблем
1. Высокий фон в лунках всего планшета.	1.1. Низкое качество дистиллированной воды	1.1.1. Промыть дистиллятор 10 %-ным раствором соляной кислоты, а потом 5 раз дистиллированной водой 1.1.2. Прокипятить дистиллированную воду в открытом сосуде в течение 10-15 мин, остудить перед использованием. 1.1.3. Использовать бидистиллированную воду
	1.2. Бактериальное загрязнение воды	1.2.1. Хранить дистиллированную воду в закрытой посуде. 1.2.2. Дистиллированную воду использовать в течение дня
	1.3. Загрязненный промыватель (вошер).	1.3.1 Почистить головку промывателя с помощью иголки и промыть его 30 %-ным этиловым спиртом, а потом 5 раз дистиллированной водой
	1.4. Использование одной и той же посуды для разных реагентов.	1.4.1. Использовать для каждого реагента отдельную посуду.

1. Высокий фон в лунках всего планшета.	1.5.Наличие и использование на рабочем месте дезрастворов с хлором.	1.5.1.Не использовать и не хранить дезрастворы с хлором в помещениях, где проводятся исследования методом ИФА.
	1.6.Повторное использование наконечников.	1.6.1.Наконечники использовать однократно.
	1.7.Контакт хромогена с металлами (пинцет, скальпель и др.)	1.7.1.Избегать контакта хромогена с металлами.
	1.8.Уменьшено количество циклов промывок планшета.	1.8.1.Промывать планшет согласно требованиям "Инструкции".
	1.9.Закончился срок хранения (пригодности) тест-системы.	1.9.1.Запретить использование тест-системы.
	1.10.Грязная посуда.	1.10.1.Мыть посуду согласно инструкции
	1.11.Увеличена температура или время инкубации	1.11.1.Придерживаться режима инкубации.
2. Высокий фон в отдельных лунках.	2.1.Переливание промывочного раствора из лунок планшета при промывании на промывателе (вошере).	Отрегулировать вошер, исключить возможные нарушения.
	2.2.Использование для анализа гемолизованных образцов.	2.2.1. Повторно взять кровь.

	2.3.Использование цельной крови.	2.3.1. Получить сыворотку. Повторно взять пробу крови.
	2.4.Бактериальное загрязнение пробы.	2.4.1. Повторно взять кровь.
	2.5.Использование одного и того же наконечника для нескольких проб.	2.5.1. Использовать отдельные наконечники для каждой сыворотки.
3. Высокий фон в отдельных рядах	3.1.Повторное внесение проявителя.	3.1.1. Раствор проявителя вносить один раз.
	3.2.Повторное использование наконечников.	3.2.1. Наконечники использовать <u>однократно</u> .
	3.3.Переливание жидкости из одного ряда во второй во время промывания.	3.3.1. Отрегулировать подачу промывочного раствора.
	3.4.Загрязнение конуса автоматической пипетки раствором конъюгата.	3.4.1. Для внесения конъюгата и проявителя иметь <u>отдельные</u> микропипетки. При отсутствии достаточного количества микропипеток нужно после внесения конъюгата и снятия наконечников, освободить пипетку от возможных остатков конъюгата и протереть ее фильтровальной бумагой.

4. После внесения проявителя и окончания срока инкубации нет окрашивания в лунках всего планшета	4.1. Не внесен один из реагентов – конъюгат или проявитель.	4.1.1. Переставить анализ. Внести, в соответствии с Инструкцией, необходимые реагенты.
Нет окрашивания в отдельных лунках планшета (рядов).	4.2. Не внесен один из реагентов – сыворотка, конъюгат или проявитель.	4.2.1. Переставить эти пробы. Внести, соответственно "Инструкции", необходимые реагенты.
5. Слабое окрашивание всего планшета. Значение ОП контрольных образцов не отвечают требованиям инструкции к тест-набору	5.1. Уменьшено время инкубации.	5.1.1. Инкубацию проводить согласно "Инструкции".
	5.2. Срок пригодности тест-системы закончился	5.2.1. Проверить результаты на тест-системе с надлежащим сроком годности.

### Литература

1. Малахов Ю.А. Лептоспироз животных // Москва ВО, Агропромиздат, 1992, 267 с.
2. Бобильова О.О., Бережнов С.П., Мухарська Л.М., Падченко А.Г., Некрасова Л.С. Профілактика інфекційної захворюваності залишається актуальною проблемою системи охорони здоров'я та держави. – Сучасна інфекція, 2001, № 1, 4-10.
3. Дикий Б.М., Пришляк О.Я., Пюрик В.Ф. Діагностичні помилки при лептоспірозі на догоспітальному рівні. В кн.: «Інфекційні хвороби. Збірник наукових робіт», в. V, Львів, «Ескулап», 1997, с.31-32
4. Голубятников Н.И., Редько Е.Д. Особенности дератизационных мероприятий в Ильичевском рыбном морском порту //Санитарная охрана территории Украины и профилактика особо опасных инфекций. Сб. к 60-летию Украинской государственной противочумной станции (Одесса, 30-31 окт. 1997 г.). С. 78-79.
5. Баздирева Н.Г., Ігнатенко В.О., Крамаренко С.С., Немцев Ф.І., Федорченко І.Д. Спалах лептоспірозу в Миколаївській області //Санитарная охрана территории Украины и профилактика особо опасных инфекций. Сб. к 60-летию Украинской государственной противочумной станции (Одесса, 30-31 окт. 1997 г.). С.16.
6. Близнюк В.Д., Кузнецов В.Л. Некоторые аспекты эпидемиологии и эпизоотологии лептоспирозов в Луганской области//Санитарная охрана территории Украины и профилактика особо опасных инфекций. Сб. к 60-летию Украинской государственной противочумной станции (Одесса, 30-31 окт. 1997 г.). С.17-18.
7. Методические рекомендации МЗ РСФСР. Эпидемиология, диагностика, клиника и профилактика лептоспироза». – М., 1987.
8. Коршенко В.А. Состояние заболеваемости и основные эпидемиологические особенности лептоспирозной инфекции Северо-Востока Украины. - Там же, 118-121.
9. Пупкевич-Диамант Я.С. Некоторые итоги изучения патогенеза и патофизиологии лептоспирозного

инфекционного процесса и его клинических проявлений.- ЖМЭИ – 1996. - № 1. - 100-104.

10. Настанова з лабораторної діагностики лептоспірозу // Київ, МЗ
11. Волина Е.Г., Дас Чандра, Шкарлат П. Методические аспекты серологической диагностики лептоспироза. – ЖМЭИ. – 2001. - № 4. – С.52-53.
12. Ellis W.A. Leptospirosis. In the: OIE (Office International des Epizooties) Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 1996, 198-204.
13. V.Pope, Larsen S.A, Schriefer M. Immunologic methods for diagnosis of spirochetal diseases//In the: Manual of Clinical Laboratory Immunology (eds: N.R.Rose, E.C. de Macario, J.D.Folds, H.C.Lane, R.M.Nakamura), ASM Press, Washington (D.C.), 1997, 510-525 {Національна медична бібліотека, шифри 616-092, 616-097 (075), 616-078.7, Z-907}
14. Коршенко В.А. Иммунологическая структура населения в отношении лептоспирозной инфекции. В кн.: Актуальные проблемы теоретической и прикладной эпидемиологии (материалы юбилейной конференции, посвященной 60-летию кафедры эпидемиологии и медицинской паразитологии Харьковского института усовершенствования врачей, ноябрь 1997г.) - Харьков, 1997, 115-118.
15. Шесточенко М.А., Кузьмин Н.А. Люминесцентный анализ в ветеринарии. М., «Колос», 1979, 344 с. (см.с.с.104-109).
16. Самсонова А.П., Лю Чжун-Фу, Петров Е.М., Аляпкина Ю.С., Ли Епон, Гинцбург А.Л., Ананьина Ю.В. Разработка тест-системы на основе полимеразной цепной реакции для индикации лептоспир в политипических очагах лептоспирозов. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1997, № 4, С.С.15- (И-т эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи РАМН).

17. Резуненко Є.В., Кучерявенко О-й, О., Еверт В.В. Спосіб концентрування лептоспірозного антигену // Патент України № 2001031538. Бюл. № 7, 2001.
18. Кучерявенко О.О., Еверт В.В. Спосіб інактивації лептоспірозного антигену // Патент України № 2002010385, 2002.

## Содержание

Сокращения, использованные в тексте пособия	
Вступление	
Клиническая картина заболевания	
Диагностика лептоспирозов	
Антигенная структура лептоспир	
Диагностические наборы для определения лептоспир и антител против них	
Схема проведения ИФА	
Методика проведения иммуноферментного анализа при использовании тест-системы «ИФА-лептоспироз-КРС»	
Учет результатов анализа	
Обсуждение результатов анализа	
Оценка качества иммуноферментной тест-системы	
Основные особенности и преимущества тест-системы «ИФА-лептоспироз-КРС»	
Проблемы, которые могут возникнуть при проведении ИФА	
Литература	