DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-5-15
УДК 619.616-097.3

Сравнительная оценка лабораторных методов определения концентрации IgG в сыворотке крови телят и молозиве коров

Федоров Ю.Н.
Fedorov Yu.N.

Федоров Ю.Н., член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии

Клюкина В.И., доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом иммунологии

Богомолова О.А., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунологии

Романенко М.Н., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунологии

Царькова К.Н., научный сотрудник отдела иммунологии

ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности" (ФГБНУ ВНИТИБП),
e-mail: vnitibp@mail.ru

Ключевые слова: лабораторные тесты, пассивный иммунитет, телята, молозиво

Резюме. В настоящем сообщении представлены результаты сравнительной оценки лабораторных тестов определения концентрации IgG в сыворотке крови телят и молозиве коров с использованием метода радиальной иммунодиффузии – "золотой стандарт", реакции латекс-агглютинации и иммуноферментного анализа. Исторически, радиальная иммунодиффузия рассматривалась как единственный метод непосредственного определения IgG, однако появились сообщения об определении концентрации IgG в молозиве, молоке и плазме крови с использованием иммуноферментного анализа. Практически отсутствуют масштабные исследования по сравнительной оценке этих методов применительно к сыворотке крови телят и молозиву коров. Целью настоящих исследований явилась сравнительная оценка этих методов и реакции латекс-агглютинации при определении концентрации IgG в сыворотке крови телят и молозиве коров с использованием некоммерческих реагентов: моноспецифической антисыворотки к IgG крупного рогатого скота и референсной сыворотки крови с известным содержанием иммуноглобулинов этого класса. Исследованию подвергнуты 110 проб сыворотки крови телят до и после приема молозива, а также 50 проб молозива коров первого удоя. Сопоставимые результаты между ИФА и РИД получены при определении IgG в сыворотке крови телят и сопоставимые результаты трех методов с при

Comparison of laboratory tests for the quantification of IgG in blood serum of calves and colostrum of cows

Fedorov Yu.N., Klukina V.I., Bogomolova O.A.,
Romanenko M.N., Tsar'kova K. N.

All-Russian Research and Technological Institute of the
Biological Industry

Key words: laboratory tests, passive immunity, calves, colostrum

Abstract. The objective of this study was to measure IgG concentration in samples serum of calves and also in bovine colostrum using radial immunodiffusion ("gold test"), ELISA and latex-agglutination test and to compare results from each method. Historically, radial immunodiffusion has been the only method that directly measures IgG. However recent studies have reported IgG concentration in colostrum, milk, and plasma as measured using an ELISA. The objective of this study was to compare IgG concentrations by both methods and addition by latex-agglutination test in samples of calves (n=110) and bovine colostrum (n=50). Concentration of IgG was quantified using noncommercial reagents: monospecific antiserum to bovine IgG and reference serum with known content IgG. The agreement between ELISA and RID when measuring serum of calves and agreement both methods and latex-agglutination test when measuring of bovine colostrum. We hypothesized that results from each methods would be positively correlated and that the ELISA and latex-agglutination test procedure would give more precise estimates of IgG concentration in biological fluids and immune status of calves and immunologic quality of cow colostrum.

определении концентрации IgG в молозиве. Показана корреляция и эффективность применения указанных тестов для определения концентрации IgG в биологических жидкостях, оценки иммунного статуса новорожденных телят и иммунобиологической полноценности молозива коров.

Введение

Эффективность передачи иммунитета от матери потомству зависит от абсорбции иммуноглобулинов молозива, получаемого телятами после рождения. Эта передача иммуноглобулинов называется пассивной и нарушения пассивной передачи у новорожденных ассоциируется с развитием заболеваний. Адекватное по времени и по количеству получение полноценного молозива является критическим фактором формирования иммунитета у новорожденных телят и снижения заболеваемости и смертности в ранний постнатальный период. Оценка иммунного статуса у новорожденных животных является необходимым звеном в определении адекватности и своевременности получения молозива, формирования колострального иммунитета и его эффективности. Нарушения в технологии получения молозива новорожденными животными, являющегося единственным источником иммунологически активных защитных белков, приводят к формированию вторичной иммунологической недостаточности (иммунодефицита) и, как следствие, к высокому уровню заболеваемости и смертности в ранний постнатальный период [2,5,10,13,16]. Наибольший экономический ущерб в странах с развитым промышленным животноводством приносят нарушения передачи материнских антител с молозивом после рождения, обуславливающие высокую заболеваемость и смертность телят в ранний постнатальный период. Нарушение пассивной пе-

Для цитирования / For citation

Федоров Ю.Н. Сравнительная оценка лабораторных методов определения концентрации IgG в сыворотке крови телят и молозиве коров / Федоров Ю.Н. [и др.] // Ветеринария и кормление. - 2019. - №5 - С. 38-40

Fedorov Yu.N. Comparison of laboratory tests for the quantification of IgG in blood serum of calves and colostrum of cows / Veterinaria i kormlenie. - 2019. - №5 - P. 38-40

редачи диагностируется, когда телята имеют содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови менее 10 мг/мл через 24 часа после рождения [5, 16]. Несмотря на широкий спектр знаний в этой области, создание соответствующих тест-систем, нарушения пассивной передачи остаются сравнительно высокими на молочных фермах во многих странах мира и составляют: 19,25% – в США, 24,8% – в Новой Зеландии, 26% – в Англии, 38% – в Австралии, 43,5% – в Швейцарии. С использованием критерия IgG <10 мг/мл в Чешской Республике установлено распространение нарушений пассивной передачи – 34,6% [15]. В связи с этим, тестирование образцов крови у новорожденных телят для определения нарушений пассивной передачи является важной частью в исследованиях по оценке их состояния здоровья [5, 8].

Для своевременного контроля иммунобиологического статуса, диагностики нарушений пассивной передачи иммунитета предложен широкий перечень диагностических тест-систем, которые позволяют быстро и эффективно оценивать иммунный статус у новорожденных животных и принимать адекватные решения по иммунокоррекции при установлении иммунодефицита [2, 3].

Стандартным методом определения концентрации IgG и оценки пассивной передачи иммунитета у телят через 24–48 часов после рождения исторически является радиальная иммунодиффузия ("золотой стандарт") [14]. Для обеспечения получения теленком адекватного количества IgG, необходимо получение в первые часы после рождения 4 л молозива, содержащего, по крайней мере, не менее 50 мг/мл IgG [9]. В качестве альтернативных методов применяются иммуноферментный анализ, реакция латекс-агглютинации, рефрактометрия, турбидиметрические тесты с сульфитом натрия, сульфатом цинка, глутаровым альдегидом, оценка активности фермента гамма-глутамилтрансферазы [4, 6, 7, 11, 12, 17, 18].

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка методов оценки иммунного статуса телят и иммунобиологической полноценности молозива коров на основании определения уровня иммуноглобулинов G-класса в сыворотке крови телят и в молозиве коров методом радиальной иммунодиффузии, реакции латекс-агглютинации и иммуноферментного анализа.

Материалы и методы

В исследованиях использовали сыворотку крови телят (n=110) и молозиво коров (n=50), полученных из хозяйств Московской области. Молозиво освобождали от жира и казеина и использовали в разведении 1:10.

Содержание IgG в сыворотке крови и молозиве определяли в латекс-агглютинации с использованием нативных или лиофилизированных латекс-препаратов. Для реакции латекс-агглютинации полиакролеиновый латекс сенсibilizировали в 0,05 М фосфатно-буферном растворе анти-телами к IgG крупного рогатого скота, выделенными из кроличьей моноспецифической антисыворотки. Постановку реакции осуществляли в микротитровальных пластинках с U-образными лунками, результаты которой учитывали по форме оседания латексных частиц через 1,5–2 часа. Активность и специфичность приготовленных латекс-препаратов оценивали по взаимодействию их с иммунохимически чистыми иммуноглобулинами G-, M- и A-классов, а также в реакции торможения латекс-агглютинации [3]. В качестве референсного теста в исследованиях по количественному определению IgG использовали метод радиальной иммунодиффузии ("золотой стандарт") с применением

некоммерческой охарактеризованной моноспецифической антисыворотки в классическом варианте [14]. В иммуноферментном анализе использован "сэндвич" – вариант [1]. Во всех исследованиях использована референсная сыворотка крови крупного рогатого скота с известным содержанием IgG.

Результаты исследований

Для изучения возможности применения изготовленных серий латекс-препаратов для определения концентрации IgG и экспресс-оценки иммунного статуса новорожденных телят и иммунобиологической полноценности молозива коров, были проведены сравнительные исследования 110 проб сыворотки крови телят и 50 проб сыворотки молозива коров в реакции латекс-агглютинации (РЛА), радиальной иммунодиффузии (РИД) и иммуноферментного анализа (ИФА). Результаты исследований представлены в таблице.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют об эффективности использованных тест-систем для определения содержания IgG (универсального носителя защитных функций) в сыворотке крови новорожденных телят и в молозиве коров. В сравнительных исследованиях показана различная степень корреляции результатов, полученных в испытанных тест-системах. Полученные результаты согласуются с данными исследователей по сравнительной оценке метода радиальной иммунодиффузии и иммуноферментного анализа, которые провели масштабные исследования в этом направлении [7, 9]. В других исследованиях дана сравнительная оценка иммунологических методов, позволяющих непосредственно количественно оценивать содержание IgG и непрямых методов, выявляющих общий уровень иммуноглобулинов [11, 12, 17, 18]. Прямые и непрямые методы обладают различной степенью эффективности и диагностической ценности, однако все они позволяют контролировать получение молозива новорожденными телятами, оценивать их иммунный статус и уровень пассивной передачи иммуноглобулинов, диагностировать иммунодефицитные состояния в ранний постнатальный период и оценивать иммунобиологическую полноценность молозива коров. Арбитражным тестом в сложных иммунологических исследованиях по количественной оценке уровня иммуноглобулинов остается метод радиальной иммунодиффузии, как "золотой стандарт".

Заключение

Проведенные исследования показали корреляцию уровня IgG, выявляемого методом радиальной иммунодиффузии, иммуноферментного анализа и в реакции латекс-агглютинации, что позволяет рекомендовать последние как экспресс-методы оценки иммунного статуса новорожденных животных, диагностики нарушений пассивной передачи и контроля иммунобиологической полноценности молозива.

Литература

1. Борзенко Е.В. Сравнительная оценка эффективности "сэндвич"-ИФА и РИД по определению уровня IgA в биологических жидкостях крупного рогатого скота. / Е.В. Борзенко, Т.А. Чеботарева, Ю.Н. Федоров // Материалы Международной научно-практической конференции: "Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных". М.-2006.-стр.442-444.
2. Федоров Ю.Н. Молозиво и пассивный иммунитет у новорожденных телят: обзор. / Ю.Н. Федоров, В.И. Ключкина, О.А. Богомолова, М.Н. Романенко //Российский ветеринарный журнал. - 2018. - № 6. - С. 20-24.
3. Федоров Ю.Н.. Методы оценки иммунного статуса новорожденных телят. / Ю.Н. Федоров, В.И. Ключкина, О.А. Богомолова //Материалы международной научно-практической конференции: "Инновации и интенсификации производства и переработки с.-х. продук-

Таблица. Концентрация IgG в сыворотке крови новорожденных телят и в молозиве коров

Table. Ig G concentration in serum of neu born calves and in colostrum of cows

Исследуемый материал	n	Уровень IgG мг/мл ($\bar{X} \pm m$)		
		РИД	РЛА	ИФА
Сыворотка крови телят до приема молозива	10	0	0	0
Сыворотка крови 1-2-дн. телят с выраженным иммунодефицитом	50	6,64±1,28	7,15±1,35	6,98±0,52
Сыворотка крови 1-2-дн. телят с нормальным иммунным статусом	50	19,80±0,92	20,35±1,89	21,0±0,27
Сыворотка молозива коров первого удоя	50	61,59±2,15	61,20±2,90	60,98±1,80

ции". - Волгоград. 17-18 июня 2015 г.- С.8-14.

4. Bartens M.C. Assessment of different methods to estimate bovine colostrum quality on farm. / M.C. Bartens, M. Drillich, K. Rychli [et al.]. //New Zealand Vet.J.-2016.-64.-5.-P.263-267.
5. Beam A.L. Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on us dairy operations/A.L. Beam, J.E. Lombard, C.A. Kopral [et al.]. //J.Dairy Sci.-2009.-92.- P.3973-3980.
6. Cuttance E.L. Comparison of diagnostic tests for determining the prevalence of failure of passive transfer in New Zealand dairy calves./ E.L. Cuttance, W.A. Mason, K.S. Denholm, R.A. Laven // New Zealand Vet.J.-2017.- 65.-1.-P.6-13.
7. Dunn A. Comparison of single radial immunodiffusion and ELISA for the quantification of immunoglobulin G in bovine colostrum, milk and calf sera./ C. Duffy, A. Gordon [et al.]. //J.Appl.Animal Research.-2018.-46(1).- P.758-765.
8. Garry F. Role of colostral transfer in neonatal calf management: current concepts in diagnosis / F.Garry, R. Adams //Comp.Cont.Educ. Pract.-1993.-15.-P.1167-1175.
9. Gelsinger S.L. Technical note: Comparison of radial immunodiffusion and ELISA for quantification of bovine immunoglobulin G in colostrum and plasma / S.L. Gelsinger, A.M. Smith, C.M. Jones, A.J. Heinrichs / J.Dairy Sci.-2014.-98.- P.4084-4089.
10. Godden S. Colostrum management for dairy calves / S. Godden / Vet.Clin. North Am.Food Anim.-2008.-24.-P.19-39.
11. Hogan I. Comparison of rapid laboratory tests for failure of passive transfer in the bovine / I. Hogan, M. Doherty, J. Fagan et al. //Ir.Vet.J.-2015.-68(1).-18.
12. Lee S.H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Single Radial Immunodiffusion, and Indirect Methods for the detection of Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves / S.H. Lee, Jaekal., C.S. Bae, B.H. Chung, S.C. Yun, M.J. Gwak, G.J. Noh, D.H. Lee // J.Vet.Intern.Med.-2008.-v.22.-P.212-218.
13. Lora I. Association between passive immunity and health status of dairy calves under 30 days of age./ I. Lora, F. Gottardo, B. Contiero [et al.]. //Prev.Vet.Med.-2018.-152.- P. 12-15.
14. Mancini, G. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion /G.Mancini, O.Carbonara and J.F.Heremans / Immunochem. - 1965.- N.2. - p.235-254.
15. Stanek S. Prevalence of Failure of Passive Transfer of Immunity in dairy calves in the Czech Republic / E. Nejedly, P. Fleischer, A. Pechova, S. Slosarkova // Acta Univ.Agr. et Silviculture Mendeliane Brunensis.-2019.-67.-16.-P.163-172.
16. Tyler J.W. Evaluation of 3 assays for failure of passive transfer in calves/J.W. Tyler, D.D. Hancock, S.M. Parish [et al.]. //J.Vet.Intern.Med.-1996.-10.-P.304-307.
17. Topal O. Comparison of IgG and semiquantitative test for evaluation of passive transfer immunity in calves / O. Topal, H. Batmaz, Z. Mecitogly, E. Uzabact //Turkish J.Vet.Animal Sci.-2018.-42.-P.302-309.
18. Weaver D.M. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves / D.M. Weaver, J.W. Tyler, D.C. Vanmetre [et al.].// J.Vet.Intern.Med.-2000.-v.14.- N6.- P.569-577.
2. Fedorov YU.N. Molozivo i passivnyj immunitet u novorozhdennyh telyat: obzor. / YU.N. Fedorov, V.I. Klyukina, O.A. Bogomolova, M.N. Romanenko //Rossijskij veterinarnyj zhurnal. - 2018. - № 6. - S. 20-24.
3. Fedorov YU.N.. Metody ocenki immunnogo statusa novorozhdennyh telyat./ YU.N. Fedorov, V.I. Klyukina, O.A. Bogomolova //Materialy mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii: "Innovacii i intensivizatsii proizvodstva i pererabotki s.-h. produkcii".- Volgograd. 17-18 iyunya 2015 g.- S.8-14.
4. Bartens M.C. Assessment of different methods to estimate bovine colostrum quality on farm. / M.C. Bartens, M. Drillich, K. Rychli [et al.]. //New Zealand Vet.J.-2016.-64.-5.-P.263-267.
5. Beam A.L. Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on us dairy operations/A.L. Beam, J.E. Lombard, C.A. Kopral [et al.]. //J.Dairy Sci.-2009.-92.- P.3973-3980.
6. Cuttance E.L. Comparison of diagnostic tests for determining the prevalence of failure of passive transfer in New Zealand dairy calves./ E.L. Cuttance, W.A. Mason, K.S. Denholm, R.A. Laven // New Zealand Vet.J.-2017.- 65.-1.-P.6-13.
7. Dunn A. Comparison of single radial immunodiffusion and ELISA for the quantification of immunoglobulin G in bovine colostrum, milk and calf sera./ C. Duffy, A. Gordon [et al.]. //J.Appl.Animal Research.-2018.-46(1).- P.758-765.
8. Garry F. Role of colostral transfer in neonatal calf management: current concepts in diagnosis / F.Garry, R. Adams //Comp.Cont.Educ. Pract.-1993.-15.-P.1167-1175.
9. Gelsinger S.L. Technical note: Comparison of radial immunodiffusion and ELISA for quantification of bovine immunoglobulin G in colostrum and plasma / S.L. Gelsinger, A.M. Smith, C.M. Jones, A.J. Heinrichs / J.Dairy Sci.-2014.-98.- P.4084-4089.
10. Godden S. Colostrum management for dairy calves / S. Godden / Vet.Clin. North Am.Food Anim.-2008.-24.-P.19-39.
11. Hogan I. Comparison of rapid laboratory tests for failure of passive transfer in the bovine / I. Hogan, M. Doherty, J. Fagan et al. //Ir.Vet.J.-2015.-68(1).-18.
12. Lee S.H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Single Radial Immunodiffusion, and Indirect Methods for the detection of Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves / S.H. Lee, Jaekal., C.S. Bae, B.H. Chung, S.C. Yun, M.J. Gwak, G.J. Noh, D.H. Lee // J.Vet.Intern.Med.-2008.-v.22.-P.212-218.
13. Lora I. Association between passive immunity and health status of dairy calves under 30 days of age./ I. Lora, F. Gottardo, B. Contiero [et al.]. //Prev.Vet.Med.-2018.-152.- P. 12-15.
14. Mancini, G. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion /G.Mancini, O.Carbonara and J.F.Heremans / Immunochem. - 1965.- N.2. - p.235-254.
15. Stanek S. Prevalence of Failure of Passive Transfer of Immunity in dairy calves in the Czech Republic / E. Nejedly, P. Fleischer, A. Pechova, S. Slosarkova // Acta Univ.Agr. et Silviculture Mendeliane Brunensis.-2019.-67.-16.-P.163-172.
16. Tyler J.W. Evaluation of 3 assays for failure of passive transfer in calves/J.W. Tyler, D.D. Hancock, S.M. Parish [et al.]. //J.Vet.Intern.Med.-1996.-10.-P.304-307.
17. Topal O. Comparison of IgG and semiquantitative test for evaluation of passive transfer immunity in calves / O. Topal, H. Batmaz, Z. Mecitogly, E. Uzabact //Turkish J.Vet.Animal Sci.-2018.-42.-P.302-309.
18. Weaver D.M. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves / D.M. Weaver, J.W. Tyler, D.C. Vanmetre [et al.].// J.Vet.Intern.Med.-2000.-v.14.- N6.- P.569-577.

References

1. Borzenko E.V. Sravnitel'naya ocenka effektivnosti "sendvich"-IFA i RID po opredeleniyu urovnya IgA v biologicheskikh zhidkostyah krupnogo rogatogo skota. / E.V. Borzenko, T.A. Chebotareva, YU.N. Fedorov // Materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii: "Aktual'nye problemy infekcionnoj patologii i imunologii zhivotnyh". M.-2006.-str.442-444.