

7. Filatov, A.S. Sostoyanie i perspektivy razvitiya ovcevodstva v Volgogradskoj oblasti / A.S. Filatov, N.G. Chamurliiev, S.V. Anoprienko // Ovcy, kozy, sherstyanoie delo. – 2017. – № 4. – S. 10-11.
8. Filatov, A.S. Sostoyanie i perspektivy razvitiya plemennogo ovcevodstva v Volgogradskoj oblasti / A.S. Filatov, N.G. Chamurliiev, N.I. Kovzalov // Izvestiya Nizhnevolzhskogo agrouniversitetskogo kompleksa: nauka i vysshee professional'noe obrazovanie. – 2014. – № 2 (34). – S. 105-110.
9. Hatataev, S.A. Ovcevodstvo Rossii i ego plemennaya baza / S.A. Hatataev, L.N. Grigoryan // Sel'skohozyajstvennyj zhurnal. – 2017. – № 10. – S. 307-310.
10. Shajdullin, I.N. Produktivnye kachestva ovec volgogradskoj porody raznyh konstitucional'nyh tipov / I.N. Shajdullin, F.R. Fejzullaev, E.K. Kirillova, A.A. Shujmanova, Yu.I. Timoshenko // Sel'skohozyajstvennyj zhurnal. – 2012. – № 1. – S. 102-107.
11. Gorlov, I.F. Meat productivity of Volgograd breed ram hogs of different genotypes / I.F. Gorlov, A.S. Filatov, A.K. Natyrov, N.I. Mosolova, D.V. Nikolaev, Y.N. Neleпов, A.N. Sivko, N.G. Chamurliiev, K.V. Ezergayl, I.V. Vladimtseva, E.Y. Zlobina // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2018. – T.9. – No 5. – P. 2152-2161.

E-mail: niimmp@mail.ru; artem.mag7@mail.ru

Получено / *Received*: 12-03-2020

Принято после исправлений / *Accepted after corrections*: 24-03-2020

УДК 619.616-097.3

DOI: 10.31208/2618-7353-2020-9-24-29

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ТЕЛЯТ И МОЛОЗИВЕ КОРОВ

IMMUNOCHEMICAL METHODS FOR QUANTIFICATION OF IgG IN CALF SERA AND BOVINE COLOSTRUM

Федоров Ю.Н., доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН

Клюкина В.И., доктор биологических наук, профессор

Богомолова О.А., кандидат биологических наук

Романенко М.Н., кандидат биологических наук

Царькова К.Н., научный сотрудник

Fedorov Yu.N., doctor of biological sciences, professor, correspondent member of RAS

Klukina V.I., doctor of biological science, professor

Bogomolova O.A., candidate of biological sciences

Romanenko M.N., candidate of biological sciences

Tsar'kova K.N., researcher

Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности, Москва

All-Russian Research and Technological Institute of the Biological Industry, Moscow

Необходимыми условиями формирования колострального иммунитета и его эффективности у новорожденных животных является оценка их иммунного статуса и определение

адекватности и своевременности получения молозива. Важнейший иммунобиологический показатель качества молозива – концентрация иммуноглобулинов. Универсальным носителем пассивного иммунитета является IgG. В сыворотке крови новорожденных телят уровень Ig определяет их иммунный статус и степень защиты от патогенов и неблагоприятных факторов окружающей среды. Нарушения передачи материнских антител с молозивом после рождения наносят большой экономический ущерб.

В настоящем сообщении представлены результаты сравнительной оценки иммунохимических методов определения концентрации IgG в сыворотке крови телят и молозиве коров с использованием метода радиальной иммунодиффузии – РИД («золотой стандарт») и иммуноферментного анализа (ИФА) – «сэндвич»-вариант. Метод радиальной иммунодиффузии представлен в классическом варианте с использованием некоммерческих реагентов: охарактеризованной моноспецифической антисыворотки к IgG крупного рогатого скота и референсной сыворотки с известным содержанием IgG. Метод ИФА выполнен в «сэндвич»-варианте. Методы радиальной иммунодиффузии и ИФА являются тестами, которые непосредственно определяют концентрацию IgG – основного иммуноглобулина, который обладает защитными свойствами и является индикатором эффективности передачи пассивного иммунитета и показателем иммунобиологической полноценности молозива. Все другие непрямые методы определения концентрации IgG, используемые в производственных условиях, основаны на определении содержания общих глобулинов и других белков, пассивная передача которых ассоциируется с IgG. Показана корреляция и эффективность применения указанных тестов для определения концентрации IgG в биологических жидкостях, оценки иммунного статуса новорожденных телят и иммунобиологической полноценности молозива коров.

The necessary conditions for the formation of colostrum immunity and its effectiveness in newborn animals is to assess their immune status and determine the adequacy and timeliness of receiving milk. The most important immunobiological indicator of colostrum quality is the concentration of immunoglobulins. The universal carrier of passive immunity is IgG. In the blood serum of newborn calves, the Ig level determines their immune status and the degree of protection from pathogens and adverse environmental factors. Violations of the transmission of maternal antibodies with colostrum after birth cause great economic damage.

The objective of this study was measure IgG concentration in samples serum of calves and also in bovine colostrum using single radial immunodiffusion – sRID («gold test») and sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and to compare results from each immunochemical method. Single radial immunodiffusion (sRID) was performed accordance with classical variant using noncommercial reagents: antiserum raised against bovine IgG and reference bovine serum with known content IgG. The ELISA method used to quantify calf serum and colostrum Ig concentration was performed according classical two-site sandwich-variant. The radial immunodiffusion and the enzyme-linked immunosorbent assay are tests that directly measure IgG concentration. It is the most abundant isotype found in serum and bovine colostrum. All other available indirect tests estimate IgG concentration based on concentration of total globulins or other protein whose passive transfer is statistically associated with IgG. The results from each methods was shown positively correlated and that the ELISA test procedure give more precise estimates of IgG concentration in biological fluids and immune status of calves and immunologic quality of cow colostrum.

Ключевые слова: иммунохимические методы, иммуноглобулин G (IgG), радиальная иммунодиффузия, ИФА, сыворотка крови, молозиво, телята.

Key words: *immunochemical methods, immunoglobulin G (IgG), sRID, sandwich ELISA, serum, colostrum, calf.*

Введение. У телят, которые рождаются без иммуноглобулинов, пассивный иммунитет формируется исключительно за счет потребления молозива. Молозиво представляет собой важнейший фактор выживания новорожденных в ранний постнатальный период, а его роль против возбудителей инфекционных болезней ассоциируется с содержанием в нем защитных белков – иммуноглобулинов, которые осуществляют иммунологическую защиту. Концентрация иммуноглобулинов – важнейший иммунобиологический показатель качества молозива, которая составляет 85-90% общего количества иммуноглобулинов. IgG1 – преобладающий изотип в молозиве коров: он составляет 85...90% общего количества Ig. Универсальным носителем пассивного иммунитета является IgG. Уровень Ig в сыворотке крови новорожденных телят определяет их иммунный статус и степень защиты против патогенов и неблагоприятных факторов окружающей среды [2, 3, 5].

Диагностика нарушения пассивной передачи иммунитета основана на определении концентрации IgG. Это референсный информативный показатель иммунного статуса новорожденных телят, индикатор эффективности передачи Ig через молозиво. Для оценки эффективности пассивной передачи иммунитета используют широкий спектр различных качественных и количественных методов определения концентрации IgG в сыворотке крови телят в течение 24...48 ч после рождения. Своевременная диагностика иммунодефицитного состояния у новорожденных телят, обусловленного несвоевременным и неадекватным получением молозива после рождения, является решающим фактором снижения риска заболеваемости и смертности телят. Наиболее информативными и специфическими методами количественной оценки содержания IgG в сыворотке крови и иммунного статуса новорожденных телят являются ИФА, РИД (по IgG-изотипу). Предпочтение следует отдавать тест-системам на основе различных вариантов ИФА, которые являются экспресс-методами, и их результаты коррелируют (92-98%) с результатами РИД – референсного метода количественного определения содержания Ig. Стандартным методом определения концентрации IgG и оценки пассивной передачи иммунитета у телят через 24-48 часов после рождения является радиальная иммунодиффузия («золотой стандарт») [9]. Для оценки иммунного статуса телят в производственных условиях, наряду с указанными иммунологическими методами, широко применяют не прямые методы, такие как: пробирочный тест с сульфитом натрия (наиболее простой и информативный), турбидиметрические тесты с сульфатом цинка, глютаральдегидовый тест, другие тесты, которые выявляют общий уровень глобулинов и других белков [8]. Для определения иммунобиологической полноценности молозива коров, связанной с содержанием в нем иммуноглобулинов, применяются как физические (по удельной плотности), так и иммунологические методы оценки: радиальная иммунодиффузия (РИД)-«золотой стандарт», различные варианты иммуноферментного анализа (ИФА). Эти тесты направлены на определение уровня IgG – основного изотипа иммуноглобулинов в молозиве, обладающего выраженными защитными функциями [3, 8, 11]. 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, 6, 8]. Наибольший экономический ущерб в странах с развитым промышленным

животноводством наносят нарушения передачи материнских антител с молозивом после рождения. Нарушение пассивной передачи диагностируется, когда телята имеют содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови менее 10 мг/мл через 24 часа после рождения. Несмотря на широкий спектр знаний в этой области, создание соответствующих тест-систем, нарушения пассивной передачи с использованием критерия IgG <10 мг/мл 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, 34,6% – в Чешской Республике [10]. 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].

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

Материалы и методы. Исследования проводились во Всероссийском научно-исследовательском и технологическом институте биологической промышленности. В исследованиях использовали сыворотку крови телят (n=100) и молозиво коров (n=50), полученные из хозяйств Московской области. Молозиво освобождали от жира и казеина и использовали в разведении 1:10.

В качестве референсного теста в исследованиях по количественному определению IgG использовали метод радиальной иммунодиффузии с применением некоммерческой охарактеризованной моноспецифической антисыворотки к IgG крупного рогатого скота в классическом варианте [9]. В высокочувствительном двухступенчатом иммуноферментном анализе использован «сэндвич»-вариант с применением аффинно очищенных кроличьих антител к IgG крупного рогатого скота. В этом исследовании IgG, присутствующий в испытуемых пробах, реагирует с анти-IgG – антителами, которые абсорбированы на поверхности полистереновых микротитровальных лунок [1]. Во всех исследованиях использована референсная сыворотка крови крупного рогатого скота с известным содержанием IgG.

Результаты и обсуждение. Для определения концентрации IgG и экспресс-оценки иммунного статуса новорожденных телят и иммунобиологической полноценности молозива коров были проведены сравнительные исследования 100 проб сыворотки крови телят и 50 проб сыворотки молозива коров с использованием иммунохимических методов – радиальной иммунодиффузии (РИД) и «сэндвич»-варианта ИФА. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Концентрация IgG в сыворотке крови телят и в молозиве коров
Table 1 – IgG concentration in the blood serum of calves and in cow colostrum

Исследуемый материал <i>Research material</i>	n	Уровень IgG мг/мл (X±m) <i>The level of IgG mg/ml (X±m)</i>	
		РИД	ИФА
Сыворотка крови 1-2-дн. телят с выраженным иммунодефицитом <i>Blood serum of 1-2-day-old calves with severe immunodeficiency</i>	50	6,64±1,28	6,98±0,52
Сыворотка крови 1-2-дн. телят с нормальным иммунным статусом <i>Blood serum of 1-2-day-old calves with normal immune status</i>	50	19,80±0,92	21,0±0,27
Сыворотка молозива коров первого удоя <i>Colostrum serum of cows of the first milk yield</i>	50	61,59±2,15	60,98±1,80

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 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. В других исследованиях дана сравнительная оценка иммунологических методов, позволяющих непосредственно количественно оценивать содержание IgG, и непрямых методов, выявляющих общий уровень иммуноглобулинов [4, 5, 7, 8, 11]. 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 и иммуноферментного анализа, что позволяет рекомендовать последний как экспресс-метод оценки иммунного статуса новорожденных животных и контроля иммунобиологической полноценности молозива.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Библиографический список

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 // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: материалы Международной научно-практической конференции. – М., 2006. – С. 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. Bartens, M.C. Assessment of different methods to estimate bovine colostrum quality on farm / M.C. Bartens, M. Drillich, K. Rychli [et al.] // New Zeland Vet. J. – 2016. – Vol. 64, No 5. – P. 263-267.
4. Dunn, A. Comparison of single radial immunodiffusion and ELISA for the quantification of immunoglobulin G in bovine colostrum, milk and calf sera / A. Dunn, C. Duffy, A. Gordon [et al.] // Appl. Animal Research. – 2018. – Vol. 46 (1). – P. 758-765.
5. 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. – Vol. 98. – P. 4084-4089.
6. Godden, S. Colostrum management for dairy calves / S. Godden // Vet. Clin. North Am. Food Anim. – 2008. – Vol. 24. – P.19-39.
7. 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. – Vol. 68 (1). – P. 18.
8. 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, J. Jaekal, C.S. Bae, B.H. Chung, S.C. Yun, M.J. Gwak, G.J. Noh, D.H. Lee // *Vet. Intern. Med.* – 2008. – V. 22. – P. 212-218.
9. Mancini, G. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion / G. Mancini, O. Carbonara and J.F. Heremans // *Immunochem.* – 1965. – No 2. – P. 235-254.
 10. Stanek, S. Prevalence of Failure of Passive Transfer of Immunity in dairy calves in the Czech Republic / S. Stanek, E. Nejedla, P. Fleischer, A. Pechova, S. Slosarkova // *Acta Univ. Agr. et Silviculture Mendeliane Brunensis.* –2019. – Vol. 67. – P. 163-172.
 11. 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. – Vol. 42. – P. 302-309.

Reference

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 // *Aktual'nye problemy infekcionnoj patologii i immunologii zhivotnyh: materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii.* – M., 2006. – S. 442-444.
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. Bartens, M.C. Assessment of different methods to estimate bovine colostrum quality on farm / M.C. Bartens, M. Drillich, K. Rychli [et al.] // *New Zeland Vet. J.* – 2016. – Vol. 64, No 5. – P. 263-267.
4. Dunn, A. Comparison of single radial immunodiffusion and ELISA for the quantification of immunoglobulin G in bovine colostrum, milk and calf sera / A. Dunn, C. Duffy, A. Gordon [et al.] // *Appl. Animal Research.* – 2018. – Vol. 46 (1). – P. 758-765.
5. Gelsinger, S.L. Technical note: Comparison of radial immunodiffusion and ELISA for quantification of bovine immunoglobulin G in colostrum and plas-ma / S.L. Gelsinger, A.M. Smith, C.M. Jones, A.J. Heinrichs // *J. Dairy Sci.* – 2014. – Vol. 98. – P. 4084-4089.
6. Godden, S. Colostrum management for dairy calves / S. Godden // *Vet. Clin. North Am. Food Anim.* – 2008. – Vol. 24. – P.19-39.
7. 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. – Vol. 68 (1). – P. 18.
8. Lee, S.H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Single Radial Immuno-diffusion, and Indirect Methods for the detection of Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves / S.H. Lee, J. Jaekal, C.S. Bae, B.H. Chung, S.C. Yun, M.J. Gwak, G.J. Noh, D.H. Lee // *Vet. Intern. Med.* – 2008. – V. 22. – P. 212-218.
9. Mancini, G. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion / G. Mancini, O. Carbonara and J.F. Heremans // *Immunochem.* – 1965. – No 2. – P. 235-254.
10. Stanek, S. Prevalence of Failure of Passive Transfer of Immunity in dairy calves in the Czech Republic / S. Stanek, E. Nejedla, P. Fleischer, A. Pechova, S. Slosarkova // *Acta Univ. Agr. et Silviculture Mendeliane Brunensis.* –2019. – Vol. 67. – P. 163-172.
11. 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. – Vol. 42. – P. 302-309.

E-mail: fun181@mail.ru

Получено / *Received*: 11-03-2020

Принято после исправлений / *Accepted after corrections*: 24-03-2020