

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ИЗГОТОВЛЕНИЯ РИД ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Маманова С.Б.[✉], Башенова Э.Е.*[✉], Каймолдина С.Е.[✉], Нисанова Р.К.[✉], Кирпиченко В.В.[✉], Акшалова П.Б.[✉], Карабасова А.С.[✉], Касен А.Ж.[✉], Юсупов М.Р.[✉], Абай Ж.С.[✉], Нурпейсова А.С.[✉], Касенов М.М.[✉]

ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт», г. Алматы, пр-т Райымбека 223, 050016, Республика Казахстан

*Автор для корреспонденции: eralievna86@mail.ru

АБСТРАКТ

Энзоотический лейкоз КРС остаётся значимой проблемой животноводства; для скрининга широко применяется РИД (AGID), однако диагностические характеристики зависят от условий изготовления набора.

Цель - разработать и оптимизировать условия изготовления РИД-тест-системы для серологической диагностики ЛКРС, обеспечив воспроизводимость и соответствие рекомендациям ВОАН.

Методы. Антиген ВЛКРС получали на персистентно инфицированной линии FLK и стандартизовали по gp51 с применением референсной сыворотки ВОАН Е05. Подбирали концентрацию агарозы (0,8 - 2,0% в 0,2 М Tris, pH 7,2 - 8,5% NaCl), разведения антигена (1:2–1:64) и контрольных сывороток; инкубация в увлажнённой камере при 20–27 °С, учёт через 24–72 ч. Валидировали на сыворотках КРС (положительные/слабоположительные/отрицательные), сопоставляя с коммерческими наборами.

Результаты. Оптимальная концентрация агарозы – 1,0–1,2%: обеспечены чёткие и стабильные линии преципитации в течение 24–72 ч при хорошем балансе скорости диффузии и качества линий. Для антигена оптимальны разведения 1:4 (отсутствие неспецифических линий с отрицательной сывороткой при сохранении высокой чувствительности) и 1:8; для положительной контрольной сыворотки – 1:4–1:8; для слабоположительной – 1:32 (воспроизводимая слабая линия, пригодная для оценки чувствительности). Отрицательная сыворотка линий не давала. Получены устойчивые результаты при соблюдении условий хранения и эксплуатации; диагностические характеристики сопоставимы с коммерческими тестами.

Закключение. Оптимизированная РИД-тест-система демонстрирует высокую воспроизводимость, специфичность и достаточную чувствительность, соответствует международным требованиям и пригодна для широкого применения в ветеринарных лабораториях Казахстана; учёт региональных особенностей повышает её практическую ценность.

Ключевые слова: энзоотический лейкоз, реакция иммунодиффузии, серология, иммуноферментный анализ, крупный рогатый скот.

ВВЕДЕНИЕ

Лейкоз крупного рогатого скота (ЛКРС) – хроническая инфекционная болезнь, вызываемая вирусом лейкоза крупного рогатого скота (Bovine Leukemia Virus, BLV, ВЛКРС) из семейства Retroviridae [1, 2]. Энзоотическая форма поражает иммунную систему животных и приводит к опухолевым новообразованиям в лимфатических узлах и других органах, что вызывает значительные экономические потери из-за выбраковки, снижения продуктивности, уменьшения продолжительности жизни и повышения восприимчивости к сопутствующим инфекциям [3, 4]. Передача осуществляется при контактах между животными, а также через контаминированные ветеринарные инструменты и оборудование [5, 6, 7]. Возможна вертикальная передача с молоком и внутриутробное инфицирование, что дополнительно усложняет контроль распространения вируса [8].

Диагностика базируется на серологических и молекулярных методах, среди которых полимеразная цепная реакция (ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА) и реакция иммунодиффузии в агарозном геле (РИД) [9, 10, 11]. Каждый метод имеет специфические преимущества и ограничения. ПЦР обеспечивает высокую точность выявления вирусного генома, но требует дорогостоящего оборудования и квалифицированного персонала [12]. ИФА

характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, однако предполагает более сложные лабораторные протоколы [13]. РИД выделяется доступностью, экономичностью, простотой исполнения и низкой себестоимостью, поэтому широко применяется для серологического скрининга стада и эпизоотологического мониторинга [14, 15, 16]. Вместе с тем стандартные РИД-тесты могут ограничиваться по чувствительности, специфичности и стабильности компонентов [17], что актуализирует задачу оптимизации условий изготовления для повышения диагностической эффективности.

Метод радиальной иммунодиффузии основан на диффузии антигена или антител в агарозном геле с образованием видимых иммунных преципитатов. На результат существенно влияют качество реагентов, температурно-временной режим инкубации и продолжительность реакции. Описаны многочисленные модификации иммунодиффузии в геле; в РИД антиген вводится в гель до полной полимеризации. Критичным ограничением выступает риск денатурации белков при отклонении температуры в момент смешивания геля с антигеном, что способно значительно снизить чувствительность.

За последние годы выполнен ряд исследований по улучшению характеристик РИД-тестов: оптимизация концентраций антигенов и антител, применение стабилиза-

торов для продления срока хранения компонентов, унификация протоколов с целью снижения вариативности результатов. Такие подходы создают основу для дальнейшего совершенствования метода и его широкого внедрения в ветеринарной практике.

На рынке доступны коммерческие тест-наборы для молекулярно-генетической и серологической диагностики, однако ПЦР- и ИФА-системы часто остаются дорогостоящими. Разработка набора на базе эталонных образцов, подобранных с учётом региональных особенностей, способна повысить точность диагностики и сделать тестирование более доступным для фермерских хозяйств Казахстана, где ЛКРС сохраняет высокую значимость.

Цель исследования – разработать и усовершенствовать методологию изготовления РИД-тест-системы для диагностики ВЛКРС и оценить влияние ключевых факторов (концентрации антигенов и антител, условия инкубации) на диагностические характеристики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе разработки тест-системы был проведён подбор оптимальных реагентов, обеспечивающих высокую чувствительность и специфичность. В ходе анализа существующих аналогов для диагностики лейкоза КРС, выбраны специфический антиген из циркулирующего в Казахстане вируса ЛКРС, антитела из сертифицированных сывороток, а также буферные системы, поддерживающие стабильность реакции.

Антиген. Антиген получен в перманентно инфицированной клеточной культуре FLK (рисунок 1).

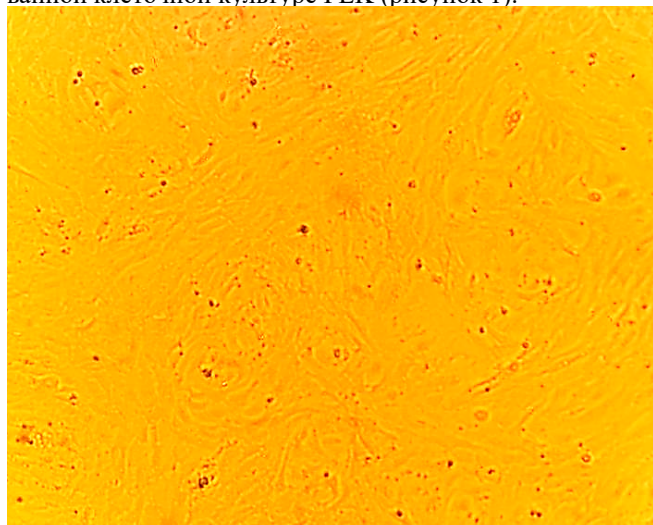


Рисунок 1. 3-суточный монослой клеток FLK, персистентно инфицированных вирусом лейкоза КРС.

В результате исследований наработаны клетки FLK, использованные для производства антигена ВЛКРС, свободные от нецитопатогенного вируса диареи крупного рогатого скота, инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Через 3–4 дня культивирования при 37°C была проведена замена ростовой среды на поддерживающую. Сбор клеток осуществлён через 7 дней с использованием стандартного раствора трипсин/версен.

Антиген стандартизовали по содержанию гликопротеина gp51 методом титрования с использованием рефе-

ренсной сыворотки ВОЗЖ «Е05». В ТОО «КазНИВИ» имеется сертифицированная для лейкоза КРС сыворотка крови КРС, идентичная ВОЗЖ «Е05», при разработке тест-системы использована данная сыворотка Q-1/19 (рисунок 2).



Рисунок 2. Испытание стандартной сыворотки Q-1/19 с экспериментальным антигеном.

Примечание: Л.П. – линии преципитации антител из позитивной сыворотки и антигена ВЛКРС

Контрольные сыворотки. Положительная контрольная преципитирующая сыворотка получена от естественно инфицированного животного и стандартизирована методом титрования. На положительную контрольную преципитирующую сыворотку получен международный сертификат соответствия международному эталону E05 разработанному в институте Фридриха Лёффлера (Германия). Сличительные испытания по стандартизации сыворотки были проведены в референтной лаборатории ВОЗЖ по лейкозу «Пивет» (Польша).

Компоновка набора включала разработку структуры, в которую вошли основные компоненты: антиген, антитела и буферные растворы. Для повышения эффективности диагностики оптимизированы условия проведения РИД, включая концентрацию реагентов, время инкубации, а также температурные режимы, влажность, обеспечивающие максимальную эффективность реакции.

Для оценки качества разработанной тест-системы проведена её валидация на сыворотках от инфицированных и здоровых животных, отобранных во время мониторинговых исследований в 2024 году из 17 областей Казахстана. Сравнение с коммерческими наборами проводили для определения специфичности и чувствительности. Антигены ВЛКРС, полученные методом субкультивирования, а также стандартные позитивные и негативные сыворотки, рекомендованные ВОЗЖ. Агарозный гель с различной концентрацией и буферные растворы подбирались для обеспечения оптимальных условий реакции.

Оптимизация концентрации антигенов и антител проводилась тестированием различных концентраций антигена (от 1:2 до 1:64) и антител (от 1:2 до 1:128). Условия инкубации изучались под влиянием темпера-

туры (от 4°C до 37°C) и времени инкубации (от 1 до 24 часов) на формирование преципитатов. Для сравнительной валидации разработанные тест-системы сравнивали с коммерчески доступными аналогами по чувствительности и специфичности.

Метод оценки стабильности. Цель – оценить стабильность и воспроизводимость колец при разных концентрациях агарозы, когда сыворотка (антитела к ВЛКРС) включена в гель, а антиген вносится в лунки. Материалы и условия. Агароза 0,8–2,0% в 0,2 М Tris, pH 7,2, с 8,5% NaCl; антиген ВЛКРС, стандартизованный по gr51 (рабочие разведения 1:4 и 1:8); контрольные сыворотки (положительная, слабоположительная, отрицательная); пластины/стёкла, пробойник Ø3 мм, влажная камера, термостат 20–27 °C; толщина геля 3,0±0,2 мм, объём загрузки в лунку 10–15 мкл.

Процедура. При 96–98 °C растворяли агарозу, охлаждали до 52–55 °C и медленно вводили рабочее разведение сыворотки (для стресс-оценки – сыворотка «Q-1/19», с титром 1:16), без пузырей. После застывания геля пробивали лунки Ø3 мм с межцентровым расстоянием 8–10 мм; вносили антиген (разведение от основного 1:4 и 1:8), а в контрольные лунки – буфер.

Инкубировали во влажной камере при 25–35°C; учитывали результат через 24, 48 и 72 ч. Фотографировали при одинаковых условиях; измеряли диаметр колец по 4 осям; фиксировали чёткость края.

Рассчитывали индекс стабильности (0–1) как среднее из: (а) воспроизводимости диаметра между повторностями и (б) экспертной оценки резкости края линии (дуги/кольца) преципитации; представляли результаты как среднее значение ± стандартное отклонение от среднего по n=3 независимым постановкам. Прогоны считались валидными при корректных контролях (негатив – без кольца; позитив – ожидаемая динамика).

Стандартизация антигена и титрование по референсной сыворотке. Активность антигена стандартизовали по оболочечному антигену gr51 с применением стандартной сыворотки разработанной в ТОО «КазНИВИ» Q-1/19. Проводили двумерную «шахматную» титровку (антиген: двукратные разведения 1:2–1:64; сыворотка Q-1/19 — фиксированное разведение 1:8 и, для контроля зоны чувствительности, 1:16). Постановку выполняли в формате РИД при 25–35 °C с учётом через 48 ч (дополнительно 24 и 72 ч). Титр антигена определяли, как наибольшее разведение антигена, при котором с Q-1/19 (1:8) формировалась чёткая, равномерная линия преципитации при отсутствии линий с отрицательными контролями. По ре-

зультатам стандартизации титр антигена составил 1:2 (по Q-1/19 при 1:4), что использовали для выбора рабочих разведений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведён подбор реагентов, разработана компоновка диагностического набора, а также проведена оптимизация условий проведения анализа с целью повышения точности, чувствительности и специфичности метода РИД.

В соответствии с внешнеполитической стратегией Республики Казахстан и членством во ВОЗЖ, уполномоченные органы, включая ветеринарные лаборатории, референтные центры и научно-исследовательские институты, обязаны использовать «Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных», 13-е издание, 2024 года, как базовый документ для разработки диагностических тестов и вакцин. В этом контексте изучены следующие главы руководства: Глава 2.2.1: «Разработка и оптимизация анализов для обнаружения антител»; Глава 2.2.6: «Выбор и использование эталонных образцов и панелей»;

Глава 3.4.9: «Энзоотический лейкоз КРС», раздел 2.2 «Иммунодиффузия в агаровом геле» [18, 19].

Дополнительно рассмотрены положения, касающиеся валидации методов, оценки погрешностей измерений и других аспектов, обеспечивающих научную и техническую обоснованность тест-систем. Особое внимание уделено валидации диагностических тестов, включая оценку чувствительности, специфичности, воспроизводимости и надёжности, а также минимизации систематических и случайных ошибок для гарантии высокого качества разработок.

Таким образом, были определены ключевые требования к разрабатываемой тест-системе:

1. Чувствительность – не менее 85%
2. Специфичность – 100% (в реакции РИД с другими антигенами вирусов)
3. Воспроизводимость – идентичные результаты при 3 кратной постановке реакции.

С учетом эпизоотологических особенностей Республики Казахстан, что обусловило необходимость специфического подхода при создании диагностического инструмента.

Подбор реагентов набора, компоновка и оптимизация условий проведения анализа

На данном этапе были исследованы различные кон-

Таблица 1. Подбор концентрации агарозы для реакции радиальной иммунодиффузии

n=3

Концентрация агарозы (%)	Четкость линий преципитации	Интенсивность линий преципитации	Наличие неспецифических реакций
0,8	Средняя	Средняя	Присутствуют
1,0	Высокая	Высокая	Отсутствуют
1,2	Высокая	Высокая	Отсутствуют
1,5	Низкая	Средняя	Присутствуют
2,0	Очень низкая	Низкая	Присутствуют

центрации агарозы для оптимизации условий РИД при диагностике ВЛКРС. Были приготовлены растворы агарозы с концентрациями 0,8%, 1,0%, 1,2%, 1,5% и 2,0%, и проведена визуальная оценка качества линий преципитации при каждой концентрации. Характеристики линий, такие как четкость, интенсивность и наличие неспецифических реакций, представлены в таблице 1.

Как показано в таблице 1, наилучшие результаты наблюдались при концентрациях агарозы 1,0% и 1,2%, при которых линии преципитации были четкими, интенсивными и равномерными, без неспецифических реакций. В то же время, концентрации 0,8%, 1,5% и 2,0% либо не обеспечивали достаточной четкости, либо приводили к нежелательным реакциям.

Скорость диффузии антигена ВЛКРС для каждой концентрации агарозы была измерена визуально, с использованием цифрового микрометра с ценой деления 0,01 мм фиксируя продвижение линий преципитации от лунок с антигеном каждые 6 часов. Итоговый учет результатов проводился через 72 часа. Данные для разных концентра-

n=3

Концентрация агарозы (%)	Скорость диффузии (мм/час)	Четкость диффузии
0,8	5,2±0,4	Средняя
1,0	4,8±0,2	Высокая
1,2	4,3±0,2	Высокая
1,5	3,7±0,7	Средняя
2,0	2,5±0,3	Низкая

ций агарозы представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, наиболее высокая скорость диффузии антигена ВЛКРС наблюдалась при концентрации 0,8%, но качество линий было неудовлетворительным. Оптимальной по скорости и качеству диффузии антигена ВЛКРС оказалась концентрация 1,0%, при которой достигались четкие линии без появления неспецифических реакций. Концентрация 1,2% также показала приемлемые результаты, обеспечивая высокий уровень четкости и стабильность линии преципитации.

Стабильность линий преципитации при различных концентрациях агарозы была оценена через 24, 48 и 72 часа. Статистическая обработка данных для стабильности линий в каждом временном интервале наблюдения проводилась с использованием трёх измерений (n=3), чтобы

оценить воспроизводимость результатов (Таблица 3).

Как показано в таблице 3, концентрации 1,0% и 1,2% обеспечивали высокую стабильность линий преципитации в течение всего периода наблюдений. Концентрации 0,8% и 2,0% показали нестабильные результаты, где линии либо становились нечеткими, либо теряли стабильность на более поздних стадиях, что снижает точность интерпретации.

На основе проведённого исследования рекомендуется использовать концентрации агарозы в диапазоне 1,0% - 1,2% для обеспечения четких, стабильных и воспроизводимых линий преципитации. Эти концентрации поддерживают оптимальную скорость диффузии и качество линий, что является ключевым для точности и воспроизводимости реакции иммунодиффузии.

Подготовка и определение оптимального разведения антигена

Стабильность линий преципитации – это сохранность линий во времени без ухудшения контура и с минимальными колебаниями диаметра: линия должна присутствовать и оставаться читаемой на 24, 48 и 72 ч, без расплывания, раздвоений, «хвостов» диффузии и вторичных дуг; диаметр и контраст — воспроизводимы между повторностями.

Стабильность линии преципитации при подготовке разведений антигена оценивали по следующим критериям указанным в таблице 4.

Для определения оптимальной концентрации антигена ВЛКРС были проведены тесты с различными разведениями, включая 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 и 1:64. Каждое разведение оценивалось по трем критериям: четкость, интенсивность и стабильность линий преципитации (Таблица 5).

Как показано в таблице 5, оптимальными концентрациями для антигена являются разведения 1:2 и 1:4, поскольку при этих разведениях наблюдаются четкие и стабильные линии преципитации.

Оценка специфичности и чувствительности теста

Для оценки специфичности и чувствительности теста были проведены реакции с положительной, слабоположительной и отрицательной сыворотками при различных концентрациях антигена. Таблица 6 демонстрирует, влияние разных концентраций антигена на появление или отсутствие линий преципитации в реакции с отрицательной сывороткой, а также на формирование четкой линии при использовании слабоположительной сыворотки, что важно для определения чувствительности теста.

n=3

Концентрация агарозы, %	Стабильность через 24 часа	Стабильность через 48 часов	Стабильность через 72 часа
0,8	0,62 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,59 ± 0,04
1,0	0,78 ± 0,02	0,86 ± 0,02	0,84 ± 0,03
1,2	0,80 ± 0,02	0,88 ± 0,02	0,86 ± 0,02
1,5	0,74 ± 0,03	0,83 ± 0,02	0,81 ± 0,03
2,0	0,68 ± 0,03	0,76 ± 0,03	0,78 ± 0,02

Таблица 4. Пороговые значения для классификации (применять «по худшему» показателю)

Класс	Дрейф диаметра (24–72 ч)	Межповторный CV	Контур/артефакты	Сохраняемость
Высокая	≤ 5%	≤ 5%	Резкий, ровный край; нет «хвостов»/вторичных дуг	Линия читаема на 24/48/72 ч
Средняя	6–10%	6–10%	Незначительное размытие края без артефактов	Линия читаема до 72 ч
Низкая	> 10%	> 10%	Размытый/неровный контур, возможны локальные артефакты	Линия заметно деградирует к 48–72 ч
Не выявлена	—	—	—	Линии нет на любом из учётов или появлялась и исчезла

Таблица 5. Четкость и стабильность линий преципитации при различных концентрациях антигена

n=3

Разведение антигена	Четкость линии преципитации	Интенсивность линии преципитации	Стабильность линии
1:2	Высокая	Высокая	Высокая
1:4	Высокая	Высокая	Высокая
1:8	Средняя	Средняя	Высокая
1:16	Средняя	Средняя	Средняя
1:32	Низкая	Низкая	Низкая
1:64	Не выявлена	Не выявлена	Не выявлена

Таблица 6. Специфичность и чувствительность при различных концентрациях антигена

Разведение антигена	Отрицательная сыворотка	Слабоположительная сыворотка
1:2	Нет (0/3)	Да (3/3)
1:4	Нет (0/3)	Да (3/3)
1:8	Нет (0/3)	Да (2/3) – линия слабая
1:16	Нет (0/3)	Нет (0/3)

Учёт выполнялся при 48 ч (контроль на 24 и 72 ч): «Да/Нет» означает наличие/отсутствие чёткой эквивалентной линии; в скобках — число повторностей с тем же исходом из трёх независимых постановок.

Как видно из таблицы 6, 1:2 и 1:4 дают оптимальный баланс специфичности и чувствительности: при отрицательной сыворотке линия отсутствует (высокая специфичность), при слабоположительной формируется чёткая устойчивая линия (высокая чувствительность). Разведение 1:8 сопровождается частичной потерей чувствительности (слабая/не во всех повторностях), при 1:16 чувствительность неприемлема.

Для подбора концентрации положительной контрольной сыворотки на первом этапе была проведена серия разведений положительной контрольной сыворотки (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 и т.д.) с использованием 0.9% физиологического раствора. Для каждой концентрации сыворотки

была проведена реакция иммунодиффузии: в центральную лунку добавлен антиген ВЛКРС (с предварительно определённой оптимальной концентрацией полученного антигена и дополнительно антигена из коммерческого набора), а в окружающие лунки – различные разведения положительной сыворотки. Инкубация проводилась при комнатной температуре (20–27°C) в закрытой влажной камере; результаты фиксировались через 24, 48 и 72 часа. Оценивались четкость, интенсивность и стабильность линий преципитации при каждом разведении (Таблица 7).

Таблица 7. Подбор концентрации положительной контрольной сыворотки

Разведение сыворотки	Четкость линий	Интенсивность линий	Стабильность линий
1:2	Высокая	Высокая	Высокая
1:4	Высокая	Высокая	Высокая
1:8	Средняя	Средняя	Высокая
1:16	Средняя	Средняя	Средняя
1:32	Низкая	Низкая	Низкая

Как показано в таблице 6, оптимальными разведениями для положительной сыворотки являются 1:2 и 1:4, так как они обеспечивают четкие и стабильные линии преципитации.

Тестирование отрицательной контрольной сыворотки проводилось при тех же условиях, что и для положитель-

ных сывороток. При всех разведениях отрицательной сыворотки не наблюдалось линии преципитации, что подтверждает отсутствие неспецифической реакции.

На основе полученных данных оптимальной концентрацией для положительной сыворотки являются разведения 1:2 и 1:4, а отрицательная сыворотка не вызывает неспецифических реакций. Тест демонстрирует высокую чувствительность и воспроизводимость при данных условиях.

Экспериментальный образец набора содержал следующие компоненты:

Агарозный гель для РИД: концентрация агарозы: 1,0% – 1,2%, растворяется в 0,2 М буферном растворе Трис с pH 7,2 и 8,5% NaCl.

Контрольные сыворотки: положительная контрольная сыворотка в разведении 1:2 или 1:4, дающие чёткие и стабильные линии преципитации с антигеном ВЛКРС; отрицательная контрольная сыворотка.

Антиген ВЛКРС - оптимальные разведения: 1:2 и 1:4 для теста с положительными и слабоположительными сыворотками.

Разработанный образец экспериментального набора для РИД диагностики лейкоза крупного рогатого скота представляет собой комплекс компонентов, обеспечивающих воспроизводимость и точность теста.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты напрямую отвечают цели — разработать и оптимизировать методологию изготовления РИД-тест-системы (антитела в агарозе, антиген в лунках) и оценить влияние ключевых факторов на воспроизводимость и диагностические характеристики. Введение антител в гель при температуре не выше 52–55 °C оказалось критичным: сохранение активности антител обеспечило формирование чёткой эквивалентной дуги/колец преципитации и позволило объективно сравнить режимы диффузии антигена. При толщине геля $3,0 \pm 0,2$ мм и инкубации при 25–35 °C наблюдалось устойчивое формирование преципитационных дуг/колец (или линий) в интервале 24–72 ч, при этом оптимальной точкой учёта выступили 48 часов: контур к этому времени максимально резкий, а межповторная вариабельность минимальна.

Подбор концентрации агарозы показал, что диапазон 1,0–1,2% обеспечивает наилучший баланс скорости диффузии и качества линий: индекс стабильности по трём независимым постановкам был устойчиво выше, чем при 0,8% (склонность к «расплыванию» контура к 72 ч) и чем при 1,5–2,0% (замедление формирования эквивалентной зоны к 24 ч без выигрыша в чёткости к 48 ч). Эти параметры рациональны для серийного изготовления: они технологичны, воспроизводимы и чувствительны к изменениям концентрации антигена, что важно для последующей стандартизации.

Стандартизация антигена по сыворотке Q-1/19 позволила выбрать рабочие разведения антигена 1:2 и 1:4. В условиях настоящего исследования оба разведения обеспечивали отсутствие линий с отрицательной сывороткой и устойчивое формирование чёткой линии со слабоположительной сывороткой (разведение 1:2 – 1:4) (наличие в 3/3

повторностей), тогда как 1:8 давало частичную потерю сигнала, а 1:16 — отсутствие линии. Следовательно, 1:2 целесообразно использовать как основное рабочее разведение антигена, 1:4 — как альтернативное для режимов, где необходим дополнительный запас по специфичности без заметной потери чувствительности.

Сформированная методология — диапазон агарозы, рабочие разведения антигена, толщина слоя, режимы инкубации и единые критерии чтения — создаёт воспроизводимую технологическую основу и обеспечивает требуемую аналитическую результативность (чёткость, стабильность и повторяемость колец). Вместе с тем формальные диагностические показатели (DSe/DSp) пока не заявляются: их оценка требует слепого испытания на репрезентативной панели сывороток с референсным статусом и расчётом 95% доверительных интервалов. Такой этап предусмотрен планом валидации и необходим для подтверждения клинко-диагностической применимости методики и для сопоставления с альтернативными тест-системами.

Ограничениями текущего этапа являются одноценный характер работ и ограниченное число повторностей для отдельных комбинаций параметров ($n=3$), а также использование интегрального индекса стабильности, который, хотя и хорошо отражает тренды, требует подтверждения на расширенной выборке и в межлабораторном формате. Дальнейшие исследования включают: расширение панели образцов, межоператорную и межпартийную воспроизводимость, а также слепое сравнение с коммерческими наборами.

В целом оптимизация ключевых параметров — агароза 1,0–1,2%, антиген 1:2–1:4, учёт к 48–72 ч — соответствует цели работы: повышает воспроизводимость постановки и обеспечивает основу для последующей оценки диагностической чувствительности и специфичности на панели сывороток. Эта база необходима для переносимой, технологичной и масштабируемой РИД-системы диагностики ВЛКРС с перспективой внедрения в рутинную ветеринарную практику.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поставленная цель достигнута: разработана и оптимизирована методология изготовления РИД-тест-системы (антитела в агарозе, антиген в лунках) и показано влияние ключевых параметров на воспроизводимость и аналитические характеристики. Внесение сыворотки в гель при 52–55 °C обеспечивает сохранность активности антител и формирование чёткой эквивалентной зоны; при толщине геля $3,0 \pm 0,2$ мм и инкубации при 25–35 °C преципитационные дуги/кольца стабильно формируются в интервале 24–72 ч с оптимальной точкой учёта к 48 ч. Подбор концентрации агарозы подтвердил преимущество диапазона 1,0–1,2% по индексу стабильности и чёткости контура по сравнению с 0,8% и 1,5–2,0%. Стандартизация антигена по сыворотке Q-1/19 позволила определить рабочие разведения 1:2 (основное) и 1:4 (альтернативное), при которых линии с отрицательной сывороткой отсутствуют, а со слабоположительной формируются устойчиво во всех повторностях. Сформированная технологическая схема (агароза 1,0–1,2%, антиген 1:2–1:4, учёт

48–72 ч) обеспечивает воспроизводимую постановку и требуемую аналитическую результативность, создавая основу для серийного изготовления и последующей клинико-диагностической валидации. Количественные показатели диагностической чувствительности и специфичности намеренно не заявляются на данном этапе и будут определены в ходе слепых испытаний на репрезентативной панели сывороток с расчётом 95% доверительных интервалов и сравнением с альтернативными системами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена в рамках НТП ИРН BR24992948 «Разработка новых диагностических тест-систем для особо опасных вирусных инфекций» на 2024–2026 гг. при поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barez P.Y., De Brogniez A., Carpentier A., Gazon H., Gillet N., Gutiérrez G. Recent Advances in BLV Research // *Viruses*. – 2015. – Т. 7, № 11. – С. 6080–6088.
2. Lv G., Wang J., Lian, S., Wang H., Wu R. The Global Epidemiology of Bovine Leukemia Virus: Current Trends and Future Implications // *Animals*. – 2024. – № 14 (2). – С. 290–297. <https://doi.org/10.3390/ani14020297>.
3. Sajiki Y., Horii Y., Nagano M. Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2017. – Т. 79, № 12. – С. 2036–2039.
4. Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Василенко В.Н. Межвидовая передача вируса лейкоза крупного рогатого скота в эксперименте // *Вопросы вирусологии*. – 2015. – Т. 60, №. 5. – С. 32–37.
5. Thompson K. Risk assessment of Bovine Leukemia Virus in dairy consumption // *Food and Environmental Virology*. – 2021. – Т. 13, № 2. – С. 180–190.
6. Gulyukin M.I., Kapustina O.V., Ezdakova I.Yu., Valtsiferova S.V., Stepanova T.V., Anoyatbekov M. Detection of specific antibodies of classes g and m to bovine leukemia virus in the blood serum // *Problems of Virology*. – 2019. – №64 (4).
7. Kobayashi S., Yamamoto T., Hayama Y. The role of neighboring infected cattle in bovine leukemia virus transmission risk // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2015. – Т. 77, № 7. – С. 861–863.
8. Martin D., Arjona A., Soto I., Barquero N., Viana M., Gómez-Lucía E. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus // *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. – 2001. – № 48 (2). – С. 97–106.
9. Каймолдина С. Е., Мырзахметова Б. Ш., Маманова С. Б., Башенова Э. Е. Сравнительные исследования наборов для диагностики лейкоза КРС в РИД и ИФА // *Труды КазНИВИ*. – 2019. – Т. 65. – С. 207–214.
10. Tirziu E., Cumpanasoiu C., Nichita I. Performance assessment of three tests applied in enzootic bovine leukosis diagnosis // *Romanian Biotechnological Letters*. – 2014. – Т. 19, № 5. – С. 9666–9677.

11. Rusenova N., Chervenkov M., Sirakov I. Comparison Between Four Laboratory Tests for Routine Diagnosis of Enzootic Bovine Leukosis // *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. – 2022. – № 28. – С. 425–440.
12. De Brun M.L., Cosme B., Petersen M. Development of a droplet digital PCR assay for quantification of the proviral load of bovine leukemia virus // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2022. – № 34(3). – С. 439–447.
13. Wright E. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis // *Rev Sci Tech*. – 1993. – Т. 12, № 2. – С. 435–450.
14. Buzala E., Dereń W. Comparison of PLA with AGID and ELISA results in serology diagnosis of bovine leucosis // *Pol J Vet Sci*. – 2003. – № 6(3). – С. 9–11.
15. Каймолдина С., Маманова С., Башенова Э. и др. Эпизоотическое состояние Республики Казахстан по лейкозу крупного рогатого скота в 2024 году // *Ғылым және білім*. – 2025. – Т. 1, № 1 (78). – С. 111–121.
16. Маманова С., Башенова Э., Мустафин Б. Результаты стандартизации тест-систем для диагностики лейкоза крупного рогатого скота // *Исследования. Результаты*. – 2020. – № 4 (88). – С. 55–61. <https://journal.kaznaru.edu.kz/index.php/research/issue/view/3/8>
17. Guidelines of the Office International des Epizooties for laboratory quality evaluation, for international reference standards for antibody assays and for laboratory proficiency testing. – World Organisation for Animal Health (OIE). – 2012.
18. World Organisation for Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.4.10. Enzootic Bovine Leukosis. – 2021.

REFERENCES

1. Barez P.Y., De Brogniez A., Carpentier A., Gazon H., Gillet N., Gutiérrez G. Recent Advances in BLV Research // *Viruses*. – 2015. – Т. 7, № 11. – P. 6080–6088.
2. Lv G., Wang J., Lian, S., Wang H., Wu R. The Global Epidemiology of Bovine Leukemia Virus: Current Trends and Future Implications // *Animals*. – 2024. – № 14. – P. 290– 297. <https://doi.org/10.3390/ani14020297>.
3. Sajiki Y., Horii Y., Nagano M. Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2017. – Vol. 79, № 12. – P. 2036–2039.
4. Guljukin M.I., Kozyreva N.G., Ivanova L.A. i dr. and Vasilenko V.N. Mezhhvidovaya peredacha virusa lejkoza krupnogo rogatogo skota v jeksperimente // *Voprosy virusologii*. – 2015. – Vol. 60, №. 5. – P. 32–37.
5. Thompson K. Risk assessment of Bovine Leukemia Virus in dairy consumption // *Food and Environmental Virology*. – 2021. – Vol. 13, № 2. – P. 180–190.
6. Gulyukin M.I., Kapustina O.V., Ezdakova I.Yu., Valtsiferova S.V., Stepanova T.V., Anoyatbekov M. Detection of specific antibodies of classes g and m to bovine leukemia virus in the blood serum *Problems of Virology*. – 2019. – Vol. 64(4).
7. Kobayashi S., Yamamoto T., Hayama Y. The role

of neighboring infected cattle in bovine leukemia virus transmission risk // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2015. – Vol. 77, № 7. – P. 861–863.

8. Martin D., Arjona A., Soto I., Barquero N., Viana M., Gómez-Lucía E. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus // *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. – 2001. – Vol. 48 (2). – P 97-106.

9. Kajmoldina S. E., Myrzahmetova B. Sh., Mamanova S. B., Bashenova E. E. Sravnitel'nye issledovanija naborov dlja diagnostiki lejkoza KRS v RID i IFA // *Trudy KazNIVI*. – 2019. – Vol. 65. – P. 207–214.

10. Tirziu E., Cumanasoiu C., Nichita I. Performance assessment of three tests applied in enzootic bovine leukosis diagnosis // *Romanian Biotechnological Letters*. – 2014. – Vol. 19, № 5. – P. 9666–9677.

11. Rusenova N., Chervenkov M., Sirakov I. Comparison Between Four Laboratory Tests for Routine Diagnosis of Enzootic Bovine Leukosis // *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. – 2022. – Vol. 28. – P. 425–440.

12. De Brun M.L., Cosme B., Petersen M. Development of a droplet digital PCR assay for quantification of the proviral load of bovine leukemia virus // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2022. – Vol. 34(3). – P. 439-447.

13. Wright E. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis // *Rev Sci Tech*. – 1993. – Vol. 12., № 2. – P. 435–450.

14. Buzala E, Dereń W. Comparison of PLA with AGID and ELISA results in serology diagnosis of bovine leucosis // *Pol J Vet Sci*. – 2003. – Vol. 6., № 3. – P. 9-11.

15. Kajmoldina S., Mamanova S., Bashenova Je. i dr. Jepizooticheskoe sostojanie Respubliki Kazahstan po lejkozu krupnogo rogatogo skota v 2024 godu // *Gylym zhane bilim*. – 2025. – T. 1, № 1 (78). – S. 111–121.

16. Mamanova S., Bashenova Je., Mustafin B. Rezul'taty standartizacii test-sistem dlja diagnostiki lejkoza krupnogo rogatogo skota // *Issledovanija. Rezul'taty*. – 2020. – № (88). – C. 55–61. <https://journal.kaznaru.edu.kz/index.php/research/issue/view/3/8>

17. Guidelines of the Office International des Epizooties for laboratory quality evaluation, for international reference standards for antibody assays and for laboratory proficiency testing. World Organisation for Animal Health (OIE). – 2012.

18. World Organisation for Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.4.10. Enzootic Bovine Leukosis. – 2021.

ӘОЖ: 619:578.828.11

**ІРІ ҚАРА МАЛ ЛЕЙКОЗЫН ДИАГНОСТИКАЛАУҒА АРНАЛҒАН РИД ТЕСТ-ЖҮЙЕСІН
ДАЙЫНДАУ ШАРТТАРЫН ОҢТАЙЛАНДЫРУ****Маманова С.Б., Башенова Э.Е.*, Каймолдина С.Е., Нисанова Р.Қ., Кирпиченко В.В., Акшалова П.Б., Карабасова А.С., Касен А.Ж., Юсупов М.Р., Абай Ж.С., Нурпейсова А.С., Касенов М.М.***«Қазақ ғылыми-зерттеу ветеринариялық институты» ЖШС, Алматы қ., Райымбек даңғылы, 223, 050000, Қазақстан Республикасы***Корреспондент автор: eralievna86@mail.ru***ТҮЙІН**

Ірі қара малдың энзоотиялық лейкозы мал шаруашылығының маңызды проблемасы болып қала береді; скрининг үшін ИДР (AGID) кеңінен қолданылады, бірақ диагностикалық сипаттамалары жиынтықтың өндіріс жағдайларына байланысты.

Мақсаты - WOAH ұсынымдарының қайталануын және сәйкестігін қамтамасыз ете отырып, ІҚМЛ серологиялық диагностикасы үшін ИДР-тест жүйесін жасау шарттарын әзірлеу және оңтайландыру.

Әдістері. ІҚМЛВ антигені тұрақты жұқтырған FLK желісінде алынды және WOAH E05 анықтамалық сарысуымен gp51 стандартталған. Агарозаның концентрациясы (0,2 М Tris-те 0,8-2,0%, pH 7,2 - 8,5% NaCl), антигенді сұйылту (1:2-1:64) және бақылау сарысулары таңдалды; 20-27°C температурада ылғалданған камерада инкубация, есепке алу 24-72 сағаттан кейін ІҚМ сарысуларында (оң/әлсіз оң/теріс) салыстыра отырып коммерциялық жиынтықтармен тексерілді.

Нәтижелер. Агарозаның оңтайлы концентрациясы 1,0-1,2% құрайды: диффузия жылдамдығы мен сызық сапасының жақсы тепе-теңдігімен 24-72 сағат ішінде нақты және тұрақты тұндыру сызықтары қамтамасыз етілді. Антиген үшін 1:4 (жоғары сезімталдықты сақтай отырып, теріс сарысуы бар спецификалық емес сызықтардың болмауы) және 1:8; оң бақылау сарысуы үшін – 1:4-1:8; әлсіз оң үшін – 1:32 (сезімталдықты бағалауға жарамды қайталанатын әлсіз сызық) сұйылту оңтайлы. Теріс сарысу сызықтар бермеді. Сақтау және пайдалану шарттары сақталған жағдайда тұрақты нәтижелер алынды; диагностикалық сипаттамаларды коммерциялық сынақтармен салыстыруға болады.

Қорытынды. Оңтайландырылған РИД-тест-жүйесі жоғары репродуктивтілікті, ерекшелікті және жеткілікті сезімталдықты көрсетеді, халықаралық талаптарға сәйкес келеді және Қазақстанның ветеринариялық зертханаларында кеңінен қолдануға жарамды; өңірлік ерекшеліктерді есепке алу оның практикалық құндылығын арттырады.

Түйін сөздер: энзоотиялық лейкоз, иммунодиффузия реакциясы, серология, иммуноферменттік талдау, ірі қара малы.

UDC: 619:578.828.11

**OPTIMIZATION OF THE MANUFACTURING CONDITIONS OF AN AGID TEST SYSTEM FOR THE
DIAGNOSIS OF BOVINE LEUKEMIA****Mamanova S.B., Bashenova E.E.*, Kaimoldina S.E., Nisanova R.K., Kirpichenko V.V., Akshalova P.B., Karabasova A.S., Kasen A.Zh., Yusupov M.R., Abai Zh.S., Nurpeisova A.S., Kasenov M.M.***«Kazakh Scientific Research Veterinary Institute» LLP, 223 Rayymbek Avenue, Almaty, 050016, Republic of Kazakhstan***Corresponding author: eralievna86@mail.ru***ABSTRACT**

Background. Enzootic bovine leukosis (EBL) remains a significant problem in cattle production. Agar gel immunodiffusion (AGID) is widely used for screening; however, diagnostic performance depends on test-kit manufacturing parameters.

Aim. To develop and optimize manufacturing conditions for an AGID test system for serological diagnosis of EBL, ensuring reproducibility and compliance with World Organisation for Animal Health (WOAH) recommendations.

Methods. BLV antigen was produced on a persistently infected FLK cell line and standardized to gp51 using WOAH reference serum E05. We optimized agarose concentration (0.8–2.0% in 0.2 M Tris, pH 7.2, with 8.5% NaCl), antigen dilutions (1:2–1:64), and control sera dilutions. Plates were incubated in a humid chamber at 20–27 °C with readings at 24–72 h. Validation was performed on bovine sera (positive/weak-positive/negative) and compared with commercial kits.

Results. An agarose concentration of 1.0–1.2% provided clear, stable precipitin lines within 24–72 h, balancing diffusion rate and line quality. Optimal antigen dilutions were 1:4 (eliminating nonspecific lines with negative serum while maintaining high sensitivity) and 1:8. Positive control serum was optimal at 1:4–1:8; weak-positive control at 1:32 yielded a reproducible faint line suitable for sensitivity assessment. Negative serum produced no lines. Stable performance was achieved under specified storage and operating conditions; diagnostic characteristics were comparable to those of commercial tests.

Conclusions. The optimized AGID test system demonstrates high reproducibility, specificity, and adequate sensitivity, aligns with international requirements, and is suitable for broad implementation in veterinary laboratories in Kazakhstan. Accounting for regional features further enhances its practical value.