

11. Anton, M., Nau, F., & Nys, Y. (2006). Bioactive egg components and their potential uses. *World's Poultry Science Journal*, 62, 237-244.

12. Li-Min, Y., Liang-Zhen, Zh., Rong-Liang, Hu, Zhen-Sheng, Shi, & Wen-Jun, Liu (2006). A Novel Double-Antigen Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of Antibodies against Rabies Virus. *Clinical And Vaccine Immunology*, 13, 966-968.

13. Hodek, P., Trefil, P., Simunek, J., Hudecek, J., & Stiborova, M. (2013). Optimized Protocol of Chicken Antibody (IgY) Purification Providing Electrophoretically Homogenous Preparations. *Int. J. Electrochem. Sci*, 8, 113-124.

УДК 636.09:57.083.3:616.155.392:615.373:636.2

ПЕТРЕНКО О.С., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: alexvet2007@ukr.net,
АЛЄКСЕЄВА Г.Б., канд. вет. наук, e-mail: serolog@i.ua,

ПРИСКОКА В.А., д-р вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: priskokaviktor@ukr.net
Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

ГОЛОВАХА В.І., д-р вет. наук, проф., e-mail: naukafutbol@i.ua
Білоцерківський національний аграрний університет

КІЇВСЬКА Г.В., канд. вет. наук, e-mail: vcheny.secretar@gmail.com
Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЧУТЛИВОСТІ ТЕСТ-СИСТЕМ ІФА РІЗНИХ ВИРОБНИКІВ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ

Використання об'єднаних зразків молока як об'єкта імунологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби імуноферментним методом вимагає достовірної оцінки чутливості тест-систем ІФА, оскільки недостовірна діагностика становить загрозу епізоотичному благополуччю.

Робочі характеристики використаних діагностикумів були враховані за допомогою внутрішньолaboratorного контрольного матеріалу, що гарантує зменшення собівартості досліджень (за рахунок використання вторинного еталону замість міжнародної стандартної сироватки E05) та якісну діагностику лейкозу великої рогатої худоби, навіть за істотних розведень окремого зразка.

Ключові слова: лейкоз, велика рогата худоба, ІФА, молоко, імунологічні дослідження, валідація, методологія, характеристика, аналіз, зразок, якість.

Вступ. Основою забезпечення благополуччя тваринництва щодо лейкозу великої рогатої худоби є якісна діагностика захворювання. Відповідно до вимог чинної «Інструкції з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу», основними методами прижиттєвої діагностики лейкозу є реакція імунодифузії та імуноферментний аналіз. Крім того, вона рекомендує застосування ІФА у благополучних стадах для дослідження об'єднаної проби молока від групи тварин [1].

Молоко як досліджуваний об'єкт може забезпечити простий, точний спосіб скринінгу захворювання, оскільки антитіла проти вірусу лейкозу в

продромальній стадії розвитку хвороби містяться як в крові, так і в молоці інфікованих тварин [2, 3].

У фахових вітчизняних джерелах є пропозиції виробництву щодо використання збірного молока в системі епізоотичного моніторингу ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби [3, 4], проте методична база використання молока як об'єкта імунологічної діагностики імуноферментним методом потребує стандартизації відповідно з міжнародними вимогами [5, 6].

ІФА тест-системи (країна виробник – Франція) для діагностики лейкозу в збірних пробах молока (*ELISA BLV Milch-S*, INSTITUT POURQUIER та *Leukosis Milk Screening*, IDEXX Montpellier SAS) стандартизовані виробником виявляти позитивний результат при дослідженні стандартної сироватки ІОЕ E05 (International Standard Sera for Enzootic bovine leucosis), яка розведена негативним молоком у 250 разів більше, ніж число окремих зразків молока у пулі. Наприклад, для пулів із 100 зразків молока, позитивну ІОЕ стандартну сироватку E05 слід розвести із розрахунку $1/250 \times 100 = 1/25000$. Для індивідуальних зразків молока позитивна ІОЕ стандартна сироватка E05 в розведенні 1/250 негативним молоком повинна бути позитивною [5, 6].

Висока чутливість сучасних тест-систем обумовлена здатністю виявляти всі класи антитіл проти вірусу лейкозу великої рогатої худоби за рахунок використання ультрачистого лізату вірусного антигену, що дозволяє досліджувати як індивідуальні зразки, так і збірні проби молока [7, 8].

При використанні збірних проб молока для імунологічної діагностики ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби ІФА важливим аспектом є припустима величина розведення окремого зразку молока.

Тому, актуальним є порівняльний аналіз характеристик сучасних тест-систем ІФА в разі використання внутрішньолабораторного контрольного матеріалу із різним вмістом імунологічного маркера для діагностики лейкозу.

Мета роботи. Визначити та порівняти чутливість тест-систем ELISA для діагностики лейкозу великої рогатої худоби різних виробників, використовуючи послідовні розведення позитивного зразку молока – як вторинного внутрішньолабораторного еталонного зразку.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом досліджень було знежирене молоко. Контрольний зразок був виготовлений безпосередньо у НДВ імунологічних досліджень ДНДІЛДВСЕ з архівного зразку позитивного молока, отриманого від хворої на лейкоз корови, що було встановлено дослідженням сироватки крові (РІД та ІФА). Контроль специфічності здійснювали, досліджуючи матеріал, що не містить антитіл проти вірусу лейкозу великої рогатої худоби.

З метою визначення чутливості тест-систем ІФА використовували контрольні зразки з різним вмістом цільового імунологічного маркера, отримані шляхом двократних розведень позитивного зразку молока негативним ($\log_2 1:2-1:512$). Для аналізу чутливості тест-систем ІФА використовували критичну оптичну щільність (OD крит.) – критерій відмежування позитивних

результатів від негативних та коефіцієнт позитивності (КП) – відношення OD зразка до OD крит. [9].

Результати досліджень та їх обговорення. Спеціалізовані тест-системи для діагностики ензоотичного лейкозу в збірних пробах молока (*ELISA Leukosis Milk Screening / BLV Milch-S*, Institut Pourquier SAS та *Leukosis Milk Screening*, IDEXX Montpellier SAS) ґрунтуються на використанні непрямого твердофазного імуноферментного аналізу [7, 8].

Для тест-систем *ELISA Leukosis Milk Screening*, Institut Pourquier SAS та *Leukosis Milk Screening*, IDEXX Montpellier SAS тест вважався достовірним, якщо OD₄₅₀ позитивного контролю був $\geq 0,300$. Співвідношення між значенням OD₄₅₀ позитивного та негативного контролів повинно бути $\geq 2,00$. Розрахунок процентного співвідношення зразок/позитивний контроль (S/P, %) обчислюють за формулою 1:

$$S/P (\%) = 100 \times \frac{\text{ОЩ}_{450} \text{ зразку} - \text{ОЩ}_{450} \text{ негативного контролю}}{\text{ОЩ}_{450} \text{ позитивного контролю} - \text{ОЩ}_{450} \text{ негативного контролю}} \quad (1)$$

Значення OD₄₅₀ позитивного контролю розраховується, як середнє арифметичне двох фактичних значень OD₄₅₀ позитивного контролю відповідної тест-системи.

Інтерпретація результатів. Зразки зі співвідношенням S/P (%): $\leq 60\%$ – негативні; більшим, ніж 60%, але меншим, ніж 70% – сумнівні; $\geq 70\%$ – позитивні.

За використання тест-системи *BLV Milch-S* (Institut Pourquier) КП нативного позитивного молока становив 5,8, а його оптична щільність становила 509 % від значення позитивного контрольного зразку виробника тест-системи. Істотне зменшення коефіцієнту позитивності починається з розведення 1:32 (табл. 1). Найбільше розведення контрольного зразку молока з позитивним результатом становило 1:128 (коефіцієнт позитивності – 1,8), що, напевне, не є граничним значенням чутливості діагностичному. Розведення 1:256 та 1:512 контрольного зразку молока не досліджувалося.

Застосовані контрольні зразки не дозволили встановити мінімальну концентрацію імунологічного маркеру як міру позитивності зразку, оскільки не охопили весь діапазон лінійності застосованої тест-системи ELISA. Для подальших досліджень використовували контрольні зразки позитивного молока з найбільшим розведенням 1:512.

Таблиця 1
 Порівняльна характеристика чутливості тест-систем ІФА для діагностики ензоотичного лейкозу за використанням позитивного зразку молока як внутрішньолaboratorного контрольного матеріалу

№	Тест-система	ELISA BLV Milch-S, POURQUIER			Leukosis Milk Screening, IDEXX			INGEZIM BLV COMPAC 2.0, INGENASA		Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit, VMRD		
		OD, 450 нм	Результат		OD, 450 нм	Результат		OD, 450 нм	Результат	OD, 650 нм	Результат	
Зразок			%	КП		%	КП		КП		КП	
1.	Нативне позитивне молоко	3,764	509	5,8	3,792	342	4,0	0,157	4,3	0,574	1,1	
2.	Розведення позитивного молока	3,651	493	5,6	3,786	341	4,0	0,443	1,5	0,388	-	
3.		3,853	521	5,9	3,905	352	4,2	0,836	-	0,235	-	
4.		3,627	490	5,6	3,673	330	3,9	1,359	-	0,157	-	
5.		3,428	461	5,3	3,755	338	4,0	1,856	-	0,115	-	
6.		2,774	369	4,3	3,519	316	3,8	2,077	-	0,092	-	
7.		1,924	249	2,9	2,362	206	2,5	2,230	-	0,084	-	
8.		1,163	142	1,8	1,481	122	1,6	2,284	-	0,078	-	
9.		н/д			1,038	80	1,1	н/д	н/д	н/д	н/д	
10.		н/д			0,628	41	-	н/д	н/д	н/д	н/д	
11.		Негативний контроль	0,156			0,197			1,201		0,076	
12.	Позитивний контроль	0,865			1,249			0,160		0,512		
	Оптична щільність критична	0,651 ↑	70 ↑	+	0,934 ↑	70 ↑	+	0,681 ↓	+	0,512 ↑	+	
	Сумнівно	0,585- 0,650	60,5- 69,7	+/-	0,835- 0,933	60,6- 69,9	+/-	0,680- 0,784	+/-	0,485- 0,511	+/-	
	Негативно	0,584 ↓	60,4	-	0,834↓	60,5	-	0,785↑	-	0,484	-	

Примітки: OD – оптична щільність; н/д – не досліджували; КП – коефіцієнт позитивності; ↑ – числові значення більші та ↓ – менші критичної OD.

При роботі з тест-системою *Leukosis Milk Screening* (IDEXX Montpellier SAS) оптична щільність нативного позитивного молока становила 342% від значення позитивного контрольного зразку виробника. Мінімальні розведення контрольного матеріалу (1:2–1:32) внаслідок високої концентрації імунологічного маркера та надмірної позитивності зразку (КП 5,8–4,3) не відображають граничні значення чутливості тест-системи ІФА (рис. 1).

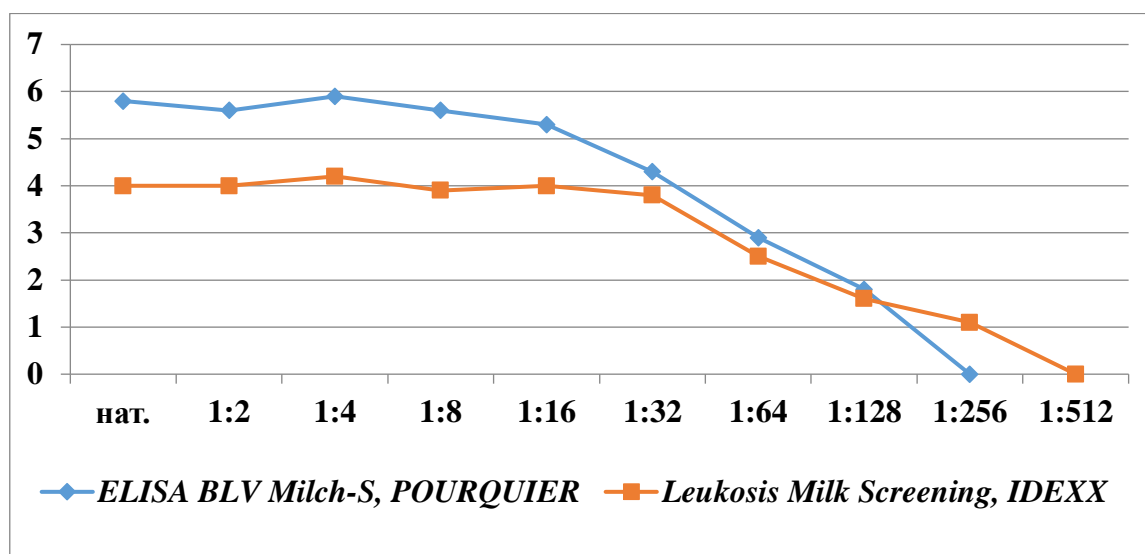


Рис. 1. Коефіцієнт позитивності контрольного матеріалу.

Значення оптичної щільності контрольного зразку повинно знаходитись у межах лінійної залежності оптичної щільності (D) від концентрації (C) імунологічного маркера ($\approx 0,5-1,5 B$) [6]. Крім того, оптимальна точність виміру оптичної щільності імуоферментним аналізатором Sunrise (Tecan), що використовувався для обліку результатів, враховуючи технічні властивості приладу, досягається при значеннях D зразку, що не перевищують 2,5 Б.

Істотне зменшення коефіцієнту позитивності до 2,5 встановлено лише у разі розведення позитивного контрольного зразку до 1:64. Найбільше розведення контрольного зразку молока, за якого результат залишався позитивним, становило 1:256 (КП – 1,1).

Ingezim BLV COMPAC 2.0 (INGENASA) – тест-система, що ґрунтується на використанні блокувального твердофазного імуоферментного аналізу на основі двох моноклональних антитіл проти вірусного глікопротеїну *gp51* [10]. Інструкцією виробника передбачається можливість дослідження як індивідуальних (сироватка або молоко) так і об'єднаних (до 10 зразків сироватки) зразків.

Лунки мікропланшету вкриті *gp51* (BLV), що зв'язаний із планшетом завдяки двом специфічним моноклональним антитілам. Після додавання зразку, що містить специфічні антитіла проти вірусу лейкозу, вони зв'язуються з антигеном, адсорбованим на платі. Якщо зразок не містить специфічних антитіл, імунний комплекс не утворюється. Специфічний комплекс антиген-антитіло виявляють за допомогою специфічного міченого моноклонального антитіла проти вірусного антигену (кон'югованого з пероксидазою). Якщо

зразок сироватки містить специфічні антитіла, вони блокують зв'язування міченого моноклонального антитіла з антигеном. В тому випадку, коли зразок не містить специфічних антитіл, моноклональні антитіла утворюють комплекс з антигеном. Після відмивання для видалення вільних компонентів визначається наявність чи відсутність мічених моноклональних антитіл додаванням субстрату (ТМВ). За наявності пероксидази утворюється забарвлення, що вимірюється колориметрично.

Критерії валідації. Значення OD_{450} негативного контролю повинно бути більше, ніж у 5 разів, ніж OD_{450} позитивного контролю. OD_{450} негативного контролю повинно бути >1 .

Інтерпретація результатів. Негативний поріг розмежування (cutt off) = OD_{450} негативного контролю – $[(OD_{450}$ негативного контролю – OD_{450} позитивного контролю) $\times 0,4]$ = $1,201 - [(1,201 - 0,160) \times 0,4]$ = 0,785.

Позитивний поріг розмежування (cutt off) = OD_{450} негативного контролю – $[(OD_{450}$ негативного контролю – OD_{450} позитивного контролю) $\times 0,5]$ = $1,201 - [(1,201 - 0,160) \times 0,5]$ = 0,680.

Зразки з $OD_{450} \geq$ значенню негативного порогу розмежування – негативні. Зразки з $OD_{450} \leq$ значенню позитивного порогу розмежування – позитивні. Зразки зі значенням OD_{450} між негативним і позитивним порогоми розмежування – сумнівні.

За роботи тест-системою *Ingezim BLV COMPAC 2.0* з контрольним зразком молока позитивні результати були отримані лише з нативним молоком (КП 4,3) та його розведенням негативним до 1:2 (КП 1,5). Тому, використання цієї тест-системи для дослідження об'єднаних зразків молока, згідно наших досліджень не доцільно.

Bovine leukemia virus antibody test kit (VMRD) – тест-система для твердофазного імуноферментного аналізу для виявлення антитіл до глікопротеїну gp 51 (BLV) у сироватці великої рогатої худоби. Антитіла сироватки зразку зв'язують молекули gp 51, адсорбовані на пластикових лунках мікропланшету. Зв'язування цих сироваткових антитіл виявляється реакцією з пероксидазою хрому, міченими афінноочищеними козиними антитілами до імуноглобулінів великої рогатої худоби. Зв'язані мічені пероксидазою хрому антитіла виявляють додаванням субстрату та утворенням продукту реакції синього забарвлення [11].

Критерії валідації. Значення оптичної щільності позитивного контролю $0,250 \leq OD_{650} < 2,000$. Негативний контроль $OD_{650} < 0,200$.

Інтерпретація. Зразки із оптичною щільністю $\geq OD_{650}$ позитивного контролю – позитивні, меншою оптичною щільністю – негативні.

Bovine leukemia virus antibody test kit (VMRD) характеризувалася найменшою чутливістю порівняно з іншими тест-системами ІФА. Позитивний результат був отриманий лише за використання нативного позитивного молока (КП 1,1). Тому використання не за призначенням виробника VMRD тест-системи *Bovine leukemia virus antibody test kit* для дослідження об'єднаних

зразків молока на наявність антитіл до вірусу лейкозу великої рогатої худоби недоцільне.

Слабопозитивний еталонний зразок є критичним фактором, що забезпечує гарантії діагностичної чутливості дослідження. Лише за його використання можна гарантувати, що застосований імунологічний метод може використовуватись для детекції певного рівня специфічних антитіл [9].

Найбільше розведення контрольного зразку при роботі з тест-системою *Leukosis Milk Screening* (IDEXX) з позитивним результатом становить 1:256 (коефіцієнт позитивності – 1,1), проте об'єднання великої кількості зразків в один (>75–100) може зумовити отримання хибно-негативних результатів, унаслідок невідповідності коефіцієнту позитивності дослідного матеріалу аналітичній чутливості застосованого імунологічного діагностикуму [12].

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Спеціалізовані тест-системи *BLV Milch-S* (Institut Pourquier SAS) та *Leukosis Milk Screening* (IDEXX Montpellier SAS) характеризуються високою чутливістю та можуть бути використані як засіб якісної діагностики лейкозу, навіть за великих розведень окремого зразку в збірній пробі молока (матеріал не більше ніж від 75–100 корів).

2. Використання збірних проб молока в разі використання тест-систем *Ingezim BLV COMPAC 2.0* (INGENASA) та *Bovine leukemia virus antibody test kit* (VMRD) не доцільно, оскільки вони не володіють достатньою чутливістю, а їх застосування може зумовити хибно-негативні результати.

Перспективою подальших досліджень є розробка вторинних еталонних зразків, шляхом порівняльних досліджень із міжнародною стандартною сироваткою E05 (International Standard Sera for Enzootic bovine leucosis), впровадження у практику мережі державних регіональних та районних ветеринарних лабораторій стандартизованих слабопозитивних зразків для постійного моніторингу аналітичних характеристик (чутливості та специфічності) імунологічних методів досліджень (РІД, ІФА) за лейкозу великої рогатої худоби згідно вимог ДСТУ ISO/IEC 17025:2006 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій».

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Інструкція з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу [Електронний ресурс]. – Електрон. дан. – Державний комітет ветеринарної медицини України. – Режим доступу: <http://old.vet.gov.ua>, вільний. Назва з екрану.
2. Лейкоз великої рогатої худоби / О.Б. Домбровський, Л.Є. Корнієнко, Б.М. Ярчук та ін.; За ред. О.Б. Домбровського. – Біла Церква, 2003. – С. 105–121.
3. Методичні рекомендації щодо пулування сироваток крові великої рогатої худоби і молока при дослідженні на лейкоз (BLV) методом імуноферментного аналізу (ІФА) / Абрамов А.В., Меженський А.О., Резуненко Є.В., Алексєєва Г.Б. – К., 2009. – 26 с.
4. Данько І.О. Епізоотологічний моніторинг лейкозу великої рогатої худоби та удосконалення оздоровчих протилейкозних заходів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук : спец. 16.00.03 – «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби» / І.О. Данько. – К., 2013. – 20 с.
5. Enzootic bovine leucosis / Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. – Terrestrial Manual 7th edition, 2012. – P. 729–738.

6. Council Directive 88/406/EEC amending Directive 64/432/EEC on animal health problems affecting intra-community trade in bovine and swine as regards enzootic bovine leukosis.
7. Настанова по застосуванню тест-набору ELISA Leukosis Milk Screening /BLV Milch-S (P02210-10) Institut Pourquier SAS, Франція.
8. Настанова по застосуванню тест-набору Leukosis Milk Screening (REF: P02210-5) IDEXX Montpellier SAS, Франція.
9. Нетесова И.Г. Внутривлабораторный контроль качества неколичественных методов ИФА: информационно-методическое пособие / И.Г. Нетесова, М.Р. Бобкова. – Новосибирск: Вектор-Бест, 2011. – 20 с.
10. Настанова по застосуванню тест-набору Ingezim BLV Compac 2.0 (REF: 1.2.BLV.K.3) INGENASA, Іспанія.
11. Настанова по застосуванню тест-набору Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit (VMRD), США.
12. Загребельний В.О. Оцінка чутливості імуноферментного аналізу для діагностики ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби / В.О. Загребельний, О.С. Петренко, Г.Б. Алексеева // Ветеринарна медицина України. – 2015. – № 3. – С. 9–12.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ТЕСТ-СИСТЕМ ИФА РАЗЛИЧНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗА / Петренко А.С., Алексеева Г.Б., Прискока В.А., Головаха В.И., Киевская А.В.

Использование объединенных образцов молока, как объекта иммунологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота иммуноферментным методом требует достоверной оценки чувствительности тест-системы ИФА, поскольку недостоверная диагностика представляет угрозу эпизоотическому благополучию.

Рабочие характеристики использованных диагностикумов были учтены с помощью внутривлабораторного контрольного материала, что гарантирует уменьшение себестоимости исследований (за счет использования вторичного эталона вместо международной стандартной сыворотки E05) и качественную диагностику лейкоза крупного рогатого скота, даже при существенных разведениях отдельного образца.

Ключевые слова: лейкоз, крупный рогатый скот, ИФА, молоко, иммунологические исследования, валидация, методология, характеристика, анализ, образец, качество.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE SENSITIVITY OF THE ELISA TEST SYSTEMS OF DIFFERENT MANUFACTURERS FOR DIAGNOSIS OF ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS / Petrenko O.S., Alekseeva H.B., Priskoka V.A., Golovaha V.I., Kyivska G.V.

Introduction. *Using pooled milk samples, as an object of immunological diagnosis of bovine leukemia ELISA requires a reliable assessment of the sensitivity of the ELISA test system as unreliable diagnosis poses a threat to the welfare of epizootic.*

The goal of the work *was to determine and compare the sensitivity of ELISA test kits for the diagnosis of bovine leukosis of different manufacturers with using serial dilutions of a positive sample of milk as a secondary intralaboratory reference sample.*

Result of research and discussion. *Low positive reference sample is the critical factor that contributes to guarantee the diagnostic sensitivity of the investigation. Only when it is used it can be ensured that suitable immunological method is used to detect a certain level of specific antibodies.*

Using a prefabricated milk sample as the object of immunological diagnosis of bovine leukosis, even substantial dilutions a separate sample in a pool of milk, is cost-effective in prosperous farms and ensures high-quality diagnosis of the disease and reducing the cost of

monitoring studies (through the use of a secondary standard instead of an international standard serum E05).

Conclusion and prospects for further research. Specialized test system BLV Milch-S (Institut Pourquier SAS) and Leukosis Milk Screening (IDEXX Montpellier SAS) are highly sensitive and can be used as a means of qualitative diagnosis of leukosis, even at high dilutions of a single sample. Prospect for further research is the development of secondary reference sample by comparative research of international standard serum E05, and implementation of regional network of state and regional veterinary laboratories weakly positive standardized samples for continuous monitoring of the analytical performance of immunological research methods (RID and ELISA) on bovine leukosis.

Keywords: leukosis, cattle, ELISA, milk, immunological studies, validation, methodologies, characterization, analysis, sample, quality.

REFERENCES

1. Sait Derzhavnoi' veterynarnoi' ta fito-sanitarnoi' sluzhby Ukrainy [Site of State Veterinary and Phytosanitary Service of Ukraine]. *old.vet.gov.ua*. Retrieved from <http://old.vet.gov.ua> [in Ukrainian].
2. Dombrovs'kyj, O.B., Kornijenko, L.Je. & Jarchuk, B.M. (2003). *Lejkoz velykoi' rogatoi' hudoby [Enzootic bovine leukosis]*. Bila Tserkva [in Ukrainian].
3. Abramov, A.V., Mezhens'kyj, A.O. & Rezenenko, Je.V. (2009). *Metodychni rekomendacii' shhodo puluvannja syrovatok krovi velykoi' rogatoi' hudoby i moloka pry doslidzhenni na lejkoz (BLV) metodom imunofermentnogo analizu (IFA) [Guidelines concerning the association of blood serum of cattle and milk in the study of leukosis (BLV) by enzyme immunoassay (ELISA)]*. Kyiv [in Ukrainian].
4. Dan'ko, I.O. (2013) Epizootologichnyj monitoryng lejkozu velykoi' rogatoi' hudoby ta udoskonalennja ozdorovchyh protylejkoznyh zahodiv [Epizootological monitoring enzootic bovine leukosis and improvement of health measures]. *Extended abstract of candidate's thesis*. Kyiv [in Ukrainian].
5. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. (7th ed.). (2012). Terrestrial Manual.
6. Council Directive 88/406/EEC amending Directive 64/432/EEC «On animal health problems affecting intra-community trade in bovine and swine as regards enzootic bovine leukosis» (1988).
7. Nastanova po zastosuvannju test-naboru ELISA Leukosis Milk Screening / BLV Milch – S [Guidelines for use of the test set ELISA Leukosis Milk Screening /BLV Milch-S]. Institut Pourquier SAS, Francija [in Ukrainian].
8. Nastanova po zastosuvannju test-naboru Leukosis Milk Screening [Guidelines for use of the test set Leukosis Milk Screening] IDEXX Montpellier SAS, Francija [in Ukrainian].
9. Netesova, I.G. & Bobkova, M.R. (2011). *Vnutrilaboratornyj kontrol' kachestva nekolichestvennyh metodov IFA: informacionno-metodicheskoe posobie [Intralaboratory quality control of non-quantitative ELISA: information handbook]*. Novosibirsk [in Russian].
10. Nastanova po zastosuvannju test-naboru Ingezim BLV Compac 2.0 [Guidelines for use of the test set Ingezim BLV Compac 2.0] INGENASA, Ispanija [in Ukrainian].
11. Nastanova po zastosuvannju test-naboru Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit (VMRD) [Guidelines for use of the test set Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit] USA [in Ukrainian].
12. Zagrebel'nyj, V.O., Petrenko, O.S. & Aljeksejeva, H.B. (2015). Ocinka chutlyvosti imunofermentnogo analizu dlja diagnistyky enzootychnogo lejkozu velykoi' rogatoi' hudoby [Evaluation of the sensitivity of enzyme immunoassay for the diagnosis of enzootic bovine leukosis]. *Veterynarna medycyna Ukrainy. – Veterinary medicine of Ukraine*, 3, 9–12 [in Ukrainian].