

УДК 636.09:616.155.392

OKSANA F. BLOTSKA, Candidate of Veterinary Sciences
State Science-Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms (SSCIBSM), Ukraine, Kyiv

RESULTS OF STANDARDIZATION AND VALIDATION OF DIAGNOSTIC TEST-KITS FOR ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS

У Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів розроблено Національний стандарт сироваток для контролювання відповідності тест-систем, що призначені для діагностики лейкозу великої рогатої худоби. Розроблений Національний стандарт отримав позитивну оцінку в рефернс лабораторії Міжнародного Епізоотичного Бюро з вивчення Ензоотичного лейкозу та використовується при контролюванні якості діагностичних тест-систем.

Key words: Enzootic bovine leucosis, diagnosis, agar gel immunodiffusion test, enzyme immunoassay, standardization.

Enzootic bovine leucosis (EBL) – is a chronic contagious disease of tumor origin, caused by the RNA-genomic oncogenic virus that belongs to the family Retroviridae [1-4, 10].

EBL is registered in Central and Eastern Europe, Asia, Scandinavia, Middle East, Africa, Australia and some states of USA [3, 4]. Ukraine is also at a risk to this disease [11].

In order to adapt national legislation to the EU legislation in Ukraine updated "Instructions for the prevention and recovery of Enzootic bovine leucosis" from 21.12.2007, №21 was developed and approved [10]. Methodological approaches to the study of the epizootic situation of EBL provide in vivo diagnosis, based on the detection of antibodies in agar gel immunodiffusion test (AGIT) and by enzyme immunoassay (ELISA) [1, 2, 10].

Three Ukrainian are registered and made four AGIT test systems for the detection of antibodies to the virus of EBL [5-8]. In order to do diagnostic work accurately and objectively it is obligatory to have qualitative specific and sensitive diagnostic agents. SSCIBSM is responsible to develop the quality of veterinary biological, harmonization and standardization of methods for diagnostic testing. World practice of diagnostic products and quality control foresee the obligatory use of International or National Standards [1, 2].

Goal

In order to harmonize methods of quality control of EBL - kits for AGID and ELISA we set the goal: to develop the technology of making of the National Reference Standards which are calibrated against International Standard Reagents.

Methods / materials

From the International Reference Laboratory of EBL (Germany, Dr.Dagmar Beier) we kindly received panel of 16 lyophilized samples of blood serums. The panel included: positive, weakly positive, negative, false positive and false negative test samples of blood and serum reference standard positive serum (E 4). Reactions were conducted according to the classic methods.

The positive serum for manufacturing the National Reference Standard Serum comes from the naturally infected cattle. The negative serum comes from the healthy cattle. The dilution of the positive serum, that gives the weak positive result in AGID test, was an indicator of its sensitivity.

Validation of National Reference Standards were conducted in OIE Reference Laboratory for EBL (Poland, Pulawy, PIWet) together with experts from OIE and specialist diagnostic services company IDEXX, Switzerland.

AGID test was employed for titration of Ukrainian Standard Antigen (USA) using different dilutions (1:2, 1:5, and 1:10) of Ukrainian positive Serum (UPS) in 1,6% agar gel medium and different dilutions (1:2, 1:4, 1:8) of the Reference Standard Antigens (Pourquier and Synbiotic). The results were analysed after 48 h and respected diameters were measured.

Serial dilutions of UPS as well as International Positive Standard Serum (IPSS) were prepared using negative control serum. IPSS is equivalent to the European E5 serum. These dilutions were tested by Blocking ELISA, PO2140, Bach nr 733 (Institute Pourquier, Montpellier, France), according to manufactures recommendation.

Results

According to the results of a parallel study of multiple series of leucosis antigen, using the abovementioned panel of sera - examples of antigen of leucosis virus were selected, which comply with international requirements in terms of activity and specificity. This sample of antigen was used by us as a National Standard Antigen in the development, manufacture and testing of National Standard Serums.

We have developed the technology of manufacturing and have prepared the Set of National Standard Serums that consists of freeze-dried positive (weak-positive in dilution 1:10 in AGID) and negative serums [9].

As was showed on Fig.1, 2, 3 different antigens reacted with of UPS and gave fully acceptable results. It is recommended that UPS **can be use as National Standard for AGIT.**

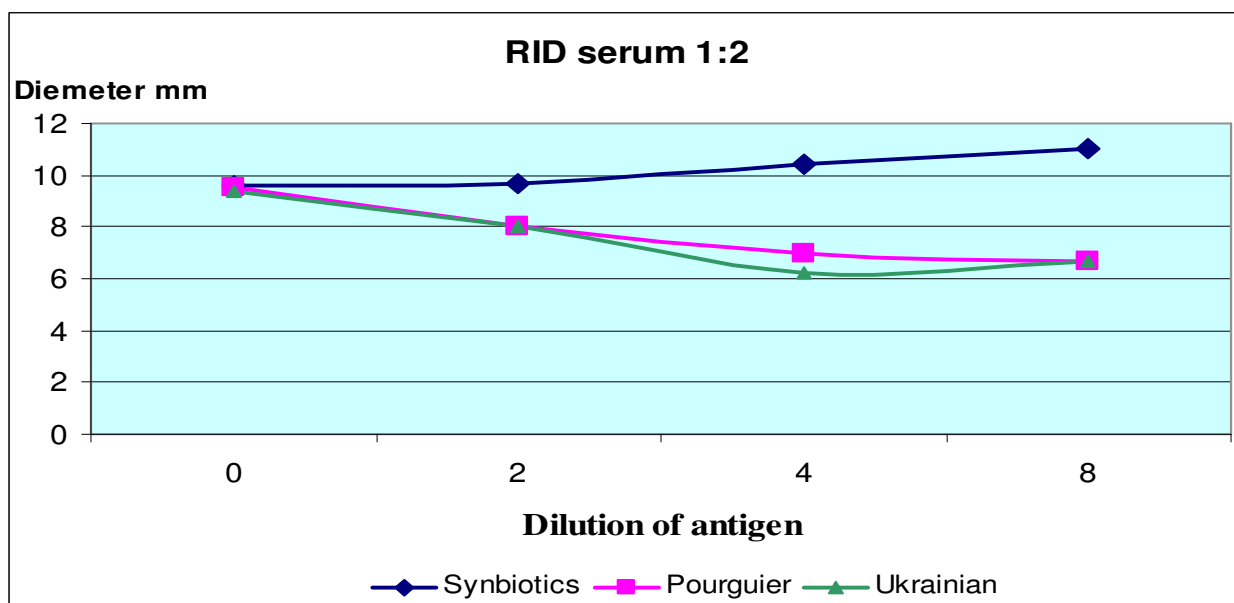


Fig.1

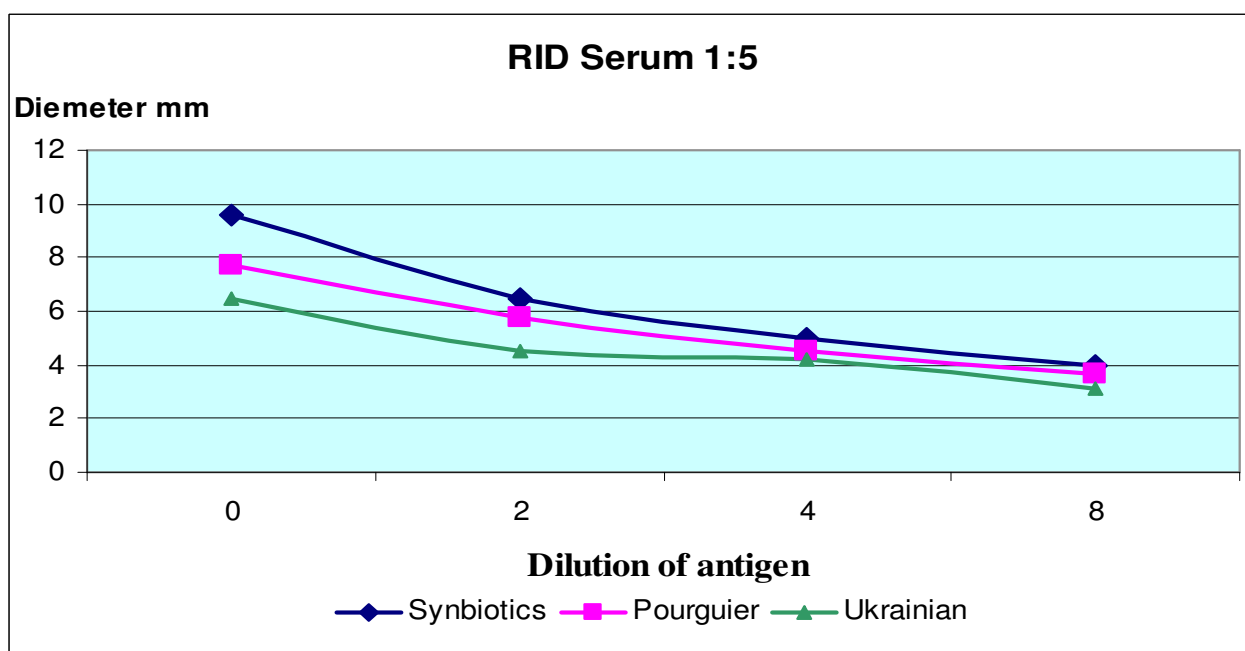


Fig.2

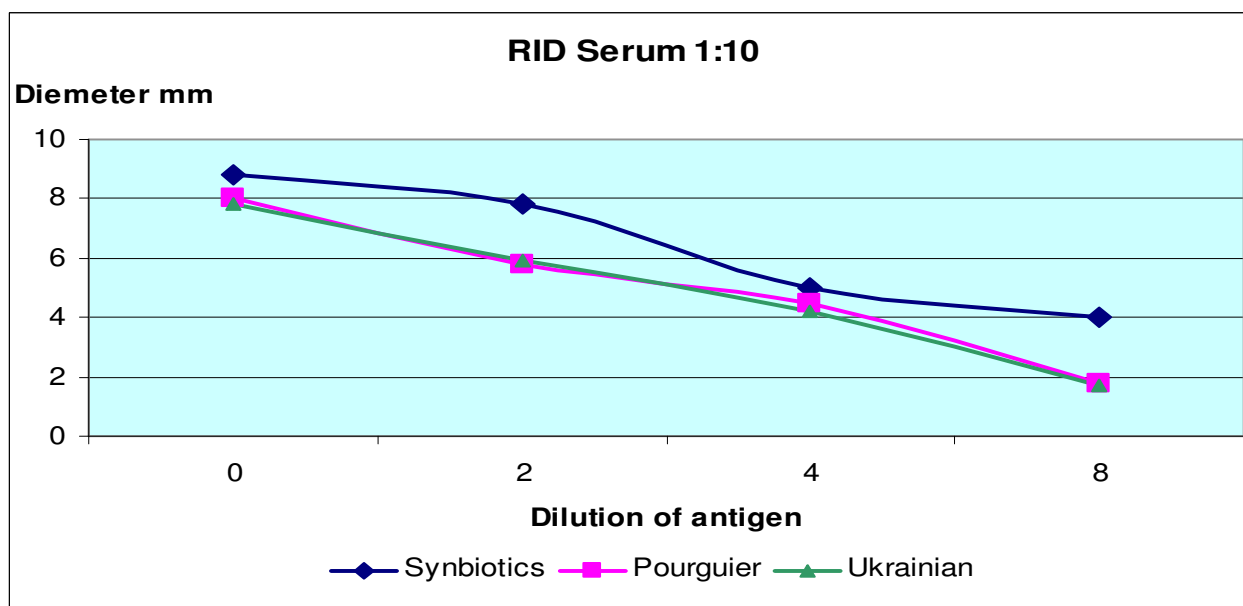
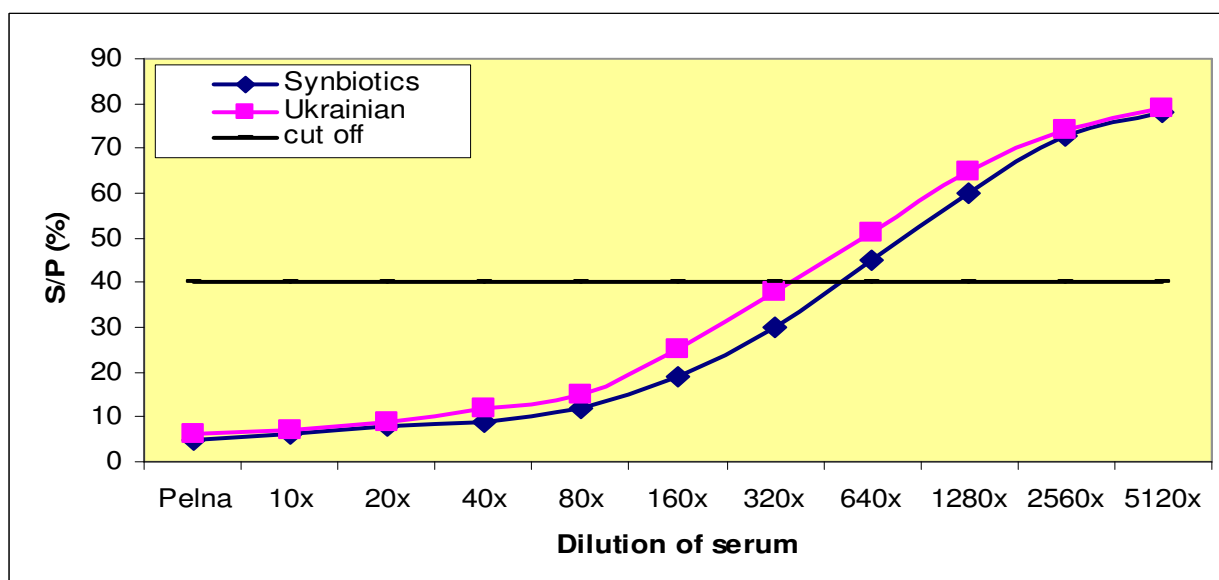


Fig.3

As was showed on Fig.4 UPS (red) showed exactly the same titer, when tested by ELISA and when compared to CPSS (blue). It is recommended that UPS **can be use as National Standard for ELISA**.



We have examining our National Reference Standards of Serums for EBL and obtained positive assessment for their sensitivity and specificity. The results of independent research Ukrainian Standard of Leucosis Sera was classified as being fully in line with International requirements.

Now in order to verification the quality of commercial EBL - kits we are always using the National Standard Reagents. This allows to accurately and objectively assessing the quality of diagnostic test kits (Fig. 5).

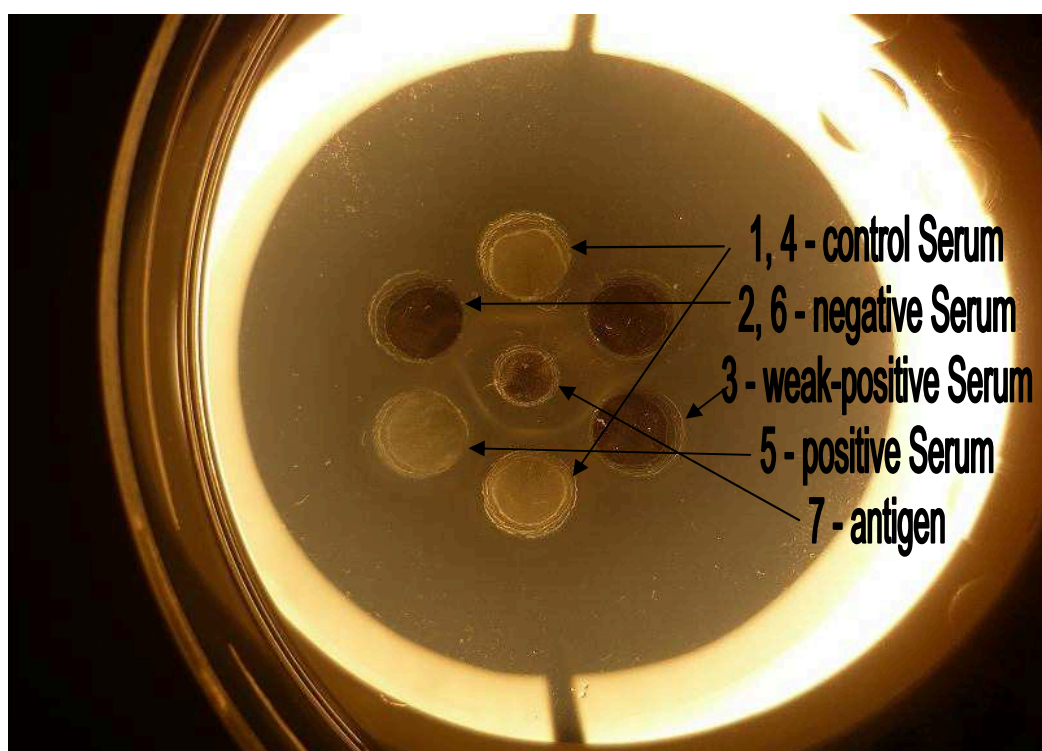


Fig. 5

The results of our study indicate that the quality of products manufactured by national producers is improving each year (Fig. 6).

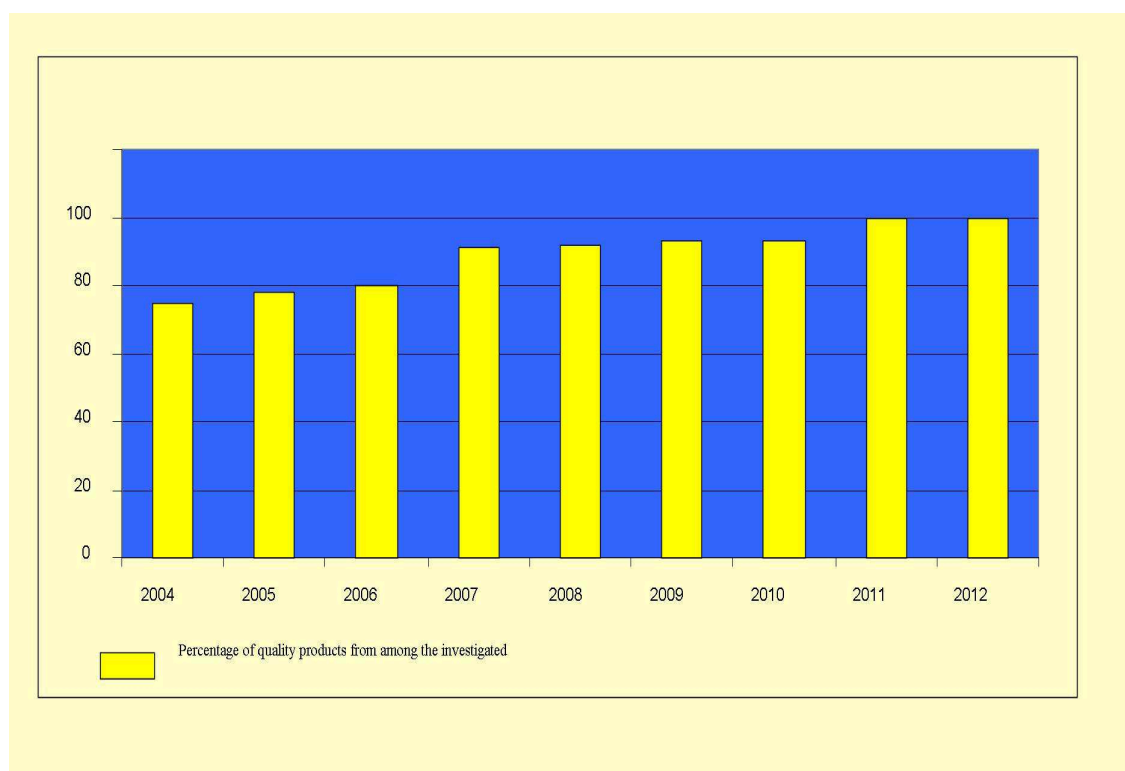


Fig. 6

Due to the complex work of prevention and rehabilitation of cattle from EBL, including the use of high-quality standardized and validated diagnostic kits, epizootic situation in respect of EBL in Ukraine significantly improved (Fig.7).

<i>Year</i>	<i>Disadvantaged in respect of EBL items</i>	<i>Sick animals</i>
2012	4	2316
2011	30	6079
2010	47	8117
2009	80	14467
2008	207	33743
2007	360	60229
2006	496	86886
2005	561	113174
2004	896	148296
2003	1247	214258
2002	1787	280950
2001	2454	283277
2000	3452	425109

Fig.7. Dynamics of households at a risk to this disease and animals with EBL in Ukraine 2000-2012 years (reference)

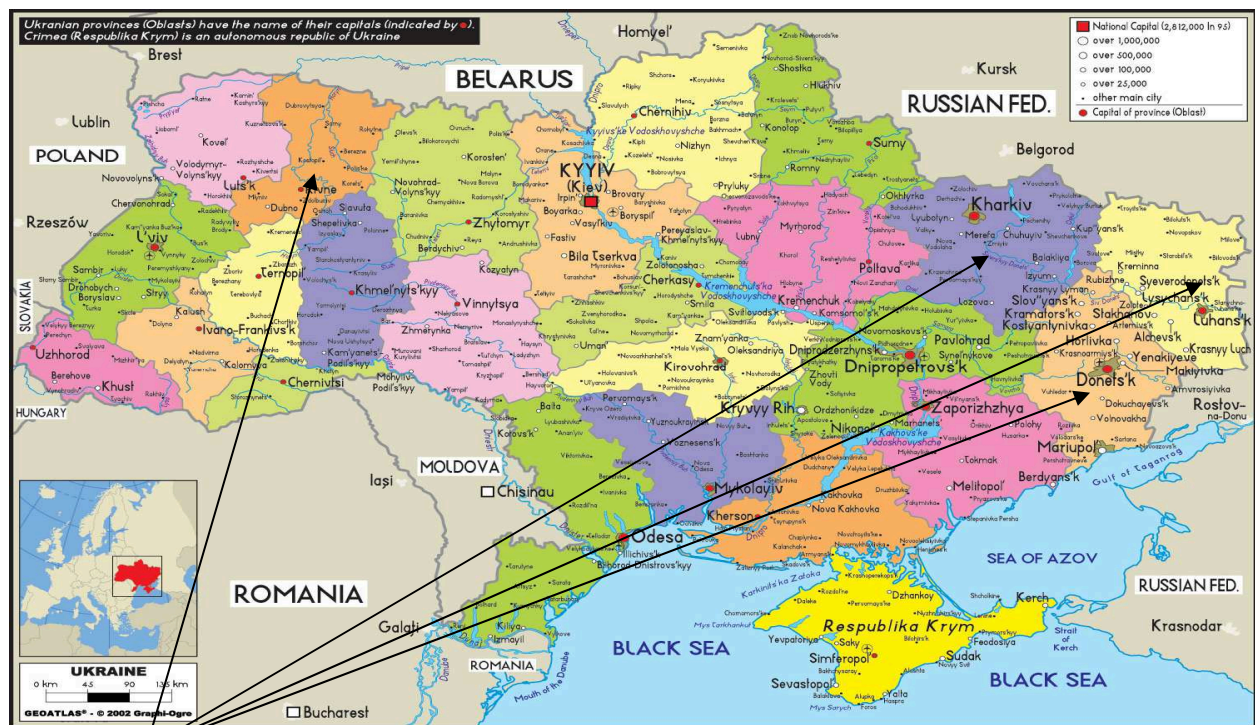


Fig.8

Households that are at a risk to EBL are located in four regions of Ukraine: Rivne, Kharkiv, Luhansk, Donetsk at the end of 2012 (Fig.8).

Conclusions

In Ukraine developed and have prepared the Set of National Reference Standards of Serums for EBL, which is available for standardization and validation of diagnostic Test-kits for EBL and check the quality of different commercial EBL - kits for AGID and ELISA.

The results of our work is part of the work, which has helped to improved the epizootic situation on EBL in Ukraine.

Список використаної літератури

1. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, – Paris.– 2008. – ch. 2.4.11. – P. 729–738.
2. Enzootic bovine leukosis (NB: Version adopted in May 2012), – Paris: OIE.- 2012.- Vol. 1. - Chapter 2.4.11.
3. Инфекционные болезни животных: учебник / Б. Ф.Бессарабов, А. А.Вашутин, Е. С.Воронин и др.; под ред. А. А.Сидорчука. – М. : КолосС, 2007. – С. 311–318.
4. Инфекционная патология животных: в 2-х т. / Ред. А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьева, Е. А. Непоклонова, Е. С. Воронина. – М. : ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т. 1. – 2006. – С. 430–447.
5. Блоцкая О. Ф. Разработка и внедрение Национального стандарта лейкозных сывороток для реакции иммунодиффузии [Текст] / О. Ф. Блоцкая // Материалы Международной науч.–практ. конф. «Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития» (20–22 мая 2008 года, г. Алматы). – Алматы : ДГП «НИИПББ». – С. 450–451.
6. Блоцька О. Ф. Стандартизація та уніфікація оцінки якості тест-систем для діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії [Текст] / О. Ф. Блоцька // Ветеринарна біотехнологія : бюлетень. – 2008. – № 12. – С. 34–41. – Бібліогр. : С. 39–40 (12 назв.).
7. Блоцька О. Ф. Гармонізація до міжнародних рекомендацій методів контролювання та оцінки показників якості діагностичних наборів для виявлення антитіл до вірусу лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії [Текст] / О. Ф. Блоцька ; Ін-т біології тварин, ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок // Наук.–техн. бюл. – 2009. – Вип. 10, № 3. – С. 125–129. – Бібліогр. : С. 129 (10 назв.).
8. Блоцька О.Ф. Оцінка показників якості діагностичних наборів для виявлення антитіл до вірусу лейкозу великої рогатої худоби // Матеріали наук.–практ. конф. [Текст] «Науково–технологічні пріоритети та їх вплив на розвиток української економіки». – К. – 2009. – С.167–172.
9. Набір сироваток крові для стандартизації антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД) [Текст]: ТУУ 24.4.19024865–722–2004. – 12 с.
10. Інструкція з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу [Текст] : Наказ Державного комітету ветеринарної медицини України 21.12.2007 № 21. - Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 11 січня 2008 р. за № 12/14703. - 8 с.

**РЕЗУЛЬТАТЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ И ВАЛИДАЦИИ ТЕСТ-СИСТЕМ
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА /
О. Блоцька**

В Государственном научно-контрольном институте биотехнологии и штаммов микроорганизмов разработан Национальный стандарт сывороток для контроля соответствия тест-систем, которые предназначены для диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Разработанный Национальный стандарт получил положительную оценку в рефернс лаборатории Международного эпизоотического бюро по изучению лейкоза крупного рогатого скота и используется при контроле качества диагностических тест-систем.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук, Л. М. Виговська

Рукопис надійшов 29.09.2013 р.