

3. СТАНДАРТИЗАЦІЯ І СЕРТИФІКАЦІЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ПРОДУКЦІЇ

УДК 636.09:616.4:616.9

БЛОЦЬКА О.Ф., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: blotskaya@ua.fm

ГОЛОВКО А.М., д-р вет. наук, проф., академік НААН, e-mail: anatolii.golovko@gmail.com

РОДІНА Я.А., e-mail: iana.rodina78@gmail.com

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Україна,

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ЗАСОБІВ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЕНЗООТИЧНОГО ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

В статті викладено результати роботи по стандартизації підходів до контролю показників якості тест-систем призначених для серологічної діагностики Ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби. В Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів у відповідності до міжнародних норм та регламентів розроблено Національний стандарт лейкозних сироваток, що використовується при контролюванні якості діагностичних тест-систем.

Ключові слова: Ензоотичний лейкоз великої рогатої худоби, лабораторна діагностика, стандартизація, контроль якості, реакція імунодифузії.

Вступ. Лейкоз великої рогатої худоби (ЛВРХ) – інфекційне хронічне захворювання пухлинної природи, що характеризується злоякісним ростом кровотворних тканин, порушенням дозрівання кровотворних клітин, інфільтрацією органів цими клітинами і утворенням в них злоякісних пухлин [1-5].

Збудником ЛВРХ є онкогенний РНК-вміщуючий вірус з родини ретровірусів, який має близьку генетичну й антигенну спорідненість з вірусом Т-клітинного лейкозу людини типів 1 і 2 та Т-клітинного лейкозу мавп [2].

Розрізняють чотири форми лейкозу, три з яких спорадичні і не є контагіозними. Четверта форма - Ензоотичний лейкоз великої рогатої худоби (Enzootic Bovine Leukosis, EBL, ЕЛВРХ) - злоякісна лімфома, причиною якої є інфікування вірусом, що локалізується в лімфоцитах, де не може бути нейтралізований антитілами. Провірусна ДНК, що синтезується з матриці вірусної РНК, включається в клітинний геном інфікованого господаря, тому заражені тварини залишаються інфікованими пожиттєво. Лікування хворих на лейкоз тварин не проводять, їх піддають вимушеному забою [1-5].

Система діагностики ЕЛВРХ в країнах Євросоюзу функціонує з урахуванням положень Директиви 64/432/ЕЕС та усіх змін і доповнень до неї.

Основним методом прижиттєвої діагностики ЕЛВРХ на сьогодні в усьому світі є серологічний, тобто виявлення антитіл в сироватці крові тварин [1-5]. З цією метою використовують реакцію імунодифузії в агаровому гелі (РІД, АГІТ) та імуоферментний аналіз (ІФА, ELISA). Крім того, ІФА застосовують у благополучних стадах для дослідження об'єднаних проб молока від групи тварин [1]. Полімеразна ланцюгова реакція підтверджує наявність вірусу в лімфоцитах крові, але є кошторисним методом, тому долучається до

постановки діагнозу у особливо цінних тварин та для отримання арбітражних висновків. Клініко-гематологічний, патолого-анатомічний та гістологічний методи застосовують для визначення стадії розвитку хвороби та морфологічної природи лейкозу у серопозитивних тварин [2].

На основі методів РІД та ІФА розроблені комерційні тест-набори, що успішно використовуються у розвинутих країнах Європи, Азії та Америки як надійний інструмент для успішного виконання Програм з викорінення ЕЛВРХ. В останні роки в Україні завдяки зусиллям ветеринарної служби оздоровлено ряд регіонів від цього небезпечного захворювання, проте, залишається декілька областей (Харківська, Київська, Херсонська, Дніпропетровська), де за даними Держспоживслужби ЕЛВРХ реєструється, а тому залишається актуальною проблемою.

Мета роботи. З метою уніфікації та гармонізації методів контролювання діагностичних засобів у відповідності з міжнародними регламентами та нормами - розробити та запровадити Національний стандарт лейкозних сироваток, призначений для стандартизації засобів серологічної діагностики ЕЛВРХ.

Матеріали і методи. Із міжнародної референс лабораторії з вивчення EBL нами була одержана панель сироваток крові великої рогатої худоби, що використовується як референтна в міжнародній практиці при оцінюванні якості лейкозних тест-систем. До складу панелі із 16 сироваток увійшли позитивні, слабопозитивні, негативні, хибнопозитивні та хибнонегативні зразки.

З використанням панелі сироваток нами було досліджено декілька серій лейкозного антигену (ЛА) та відібрано зразок, що повністю відповідав міжнародним вимогам за показниками активності та специфічності. Цей зразок ЛА був використаний нами як Національний стандарт антигену при розробці, виготовленні та тестуванні Національного стандарту сироваток - «Набору сироваток для стандартизації антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)». До складу набору увійшли: позитивна до ВЛВРХ сироватка крові великої рогатої худоби, яка в розведенні її 1:10 є слабопозитивною та негативна сироватка.

«Набір сироваток крові для стандартизації антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)» пройшов процедуру незалежного оцінювання в референс-лабораторії МЕБ з вивчення Ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби (Польща, Пулави) та в компанії IDEXX, Швейцарія. Валідація Національного стандарту лейкозних сироваток була здійснена з використання референтних стандартних антигенів виробництва компаній «Pourquier» та «Synbiotic».

Продовженням міжнародного співробітництва стала наша участь в раундах з дослідження зашифрованих зразків сироваток крові, що надходили із референс-лабораторії МЕБ з вивчення EBL. В кожному випадку це була панель, до складу якої входило по 10 ліофілізованих зразків сироваток крові, що мали різну активність, із них 2-3 зразки були ідентичними.

Результати досліджень та обговорення. Міжнародну валідацію Національного стандарту лейкозних сироваток було проведено в референс-лабораторії МЕБ з вивчення EBL (Польща, Пулави) та фахівцями діагностичної служби компанії IDEXX, Швейцарія, де одержав позитивну оцінку по результатах лабораторних досліджень, що були проведені з урахуванням міжнародних вимог, зазначених у відповідних Директивах ЄС.

За результатами проведених незалежних досліджень український Національний стандарт лейкозних сироваток було кваліфіковано як такий, що відповідає міжнародним вимогам та показує відчутно хороші результати при його тестуванні (рис.).

Так, на рисунку видно, що позитивні зразки сироваток крові (позитивний контроль МЕБ та позитивний національний стандарт) утворюють чітку лінію преципітації з лейкозним антигеном, що знаходиться в центральній лунці, слабо-позитивна сироватка утворює «вигин», а зразок негативної стандартної сироватки не реагує з ЛА.

Щодо обліку результатів постановки реакції імунодифузії, МЕБ надає рекомендації [1], що співпадають з вимогами як до вітчизняних, так і до імпортованих тест-систем. Так, досліджувану сироватку слід вважати позитивною, якщо вона утворює з антигеном ВЛВРХ специфічну, чітку лінію преципітації ідентичну до контрольної сироватки. Досліджувана сироватка вважається слабопозитивною, якщо вона утворює «вигин» з контрольною позитивною сироваткою у напрямку луночок з антигеном ВЛВРХ. Сироватка вважається негативною, якщо вона не утворює специфічної лінії преципітації з антигеном ВЛВРХ, а також у випадках, коли контрольна сироватка не утворює «вигин».

Як вже було зазначено, джерелом збудника інфекції є інфіковані вірусом лейкозу тварини на всіх стадіях інфекційного процесу. Згідно діючої в Україні «Інструкції з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу» щоб своєчасно виявити та ізолювати інфікованих тварин необхідно, починаючи з 6-місячного віку, регулярно проводити серологічні діагностичні дослідження [2]. З цією метою застосовують діагностичні набори для виявлення антитіл до вірусу лейкозу.

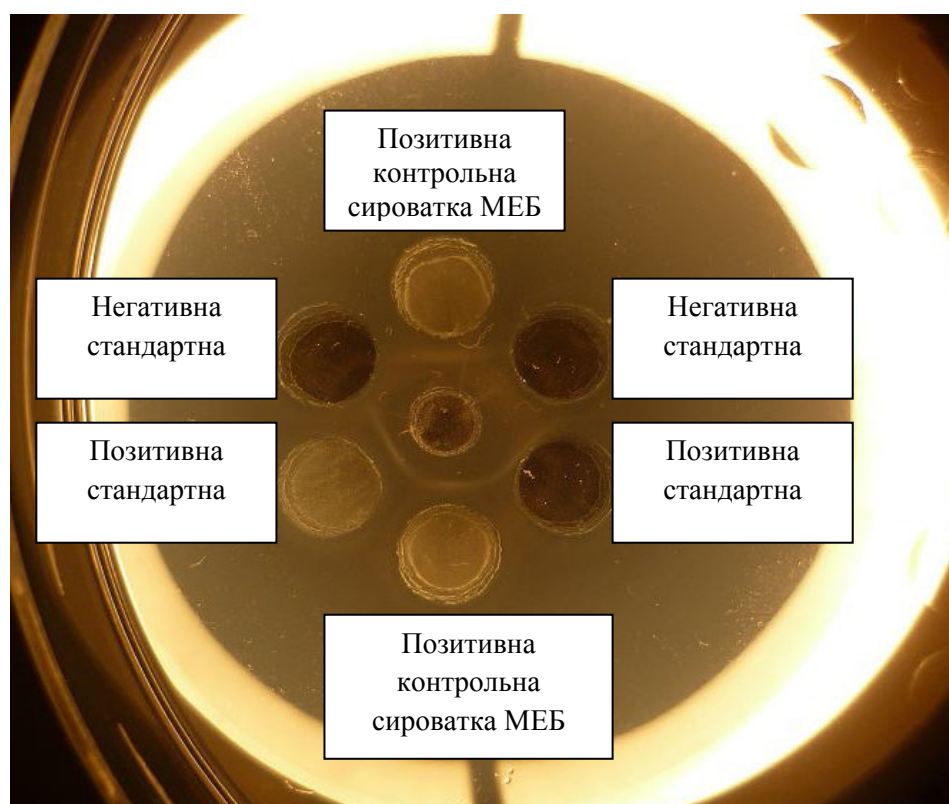


Рис. Реакція імунодифузії з Національними стандартними зразками сироваток крові (позитивний, слабопозитивний, негативний) та позитивним контролем МЕБ.

Вітчизняними науковцями були розроблені та забезпечують діагностичні потреби українських споживачів наступні тест-системи з використанням методу РІД: - «Набір компонентів сухих для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії», ІЕКВМ, ДП "Ветмедицина", м. Харків, реєстраційне посвідчення № ВВ-00554-06-13; - «Набір компонентів рідких стабілізованих для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії», ІЕКВМ, ДП "Ветмедицина", м. Харків, реєстраційне посвідчення № ВВ-00555-06-13; - «Діагностичний набір "ЛЕЙКОПОЛ" (набір компонентів для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії), НВ ТОВ "Лейконад", м. Полтава, реєстраційне посвідчення № ВВ-00255-06-10.

Оскільки світова практика виробництва діагностичних препаратів та контролю їх якості передбачає обов'язкове застосування Міжнародних або Національних стандартів, ціллю нашої роботи було привести у відповідність до міжнародних вимог методи контролю тест-систем, призначених для діагностики лейкозу великої рогатої худоби. Так, Національний стандарт лейкозних сироваток крові [6] постійно використовується нами при посерійному контролі якості наборів, що призначені для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії, що дає змогу оцінювати їх специфічність та чутливість у відповідності до міжнародних вимог. Слід зазначити, що якість препаратів вітчизняного виробництва, придатних до застосування в практичній роботі з лабораторної діагностики ЕЛВРХ, значно зросла за останні десять років і наближається до 100 % відповідності.

Нами розроблено ДСТУ 8671:2016 «Ветеринарна медицина. Методи лабораторної діагностики лейкозу великої рогатої худоби», дата введення в дію: 01.10.2017 року, надання чинності/наказ: 2016-08-11 № 238. Згідно вказаного ДСТУ контроль специфічної активності антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби слід здійснювати з використанням Національного стандарту лейкозних сироваток. Такий підхід до оцінювання якості діагностичних засобів дає змогу використовувати в лабораторній практиці лише чутливі та специфічні тест-набори, що надає можливість своєчасно виявляти інфікованих вірусом ЛВРХ тварин та сприяє забезпеченню благополуччя тваринництва України щодо лейкозу.

Перспективою подальшої роботи вбачаємо продовження запланованих робіт по наданню ДНКІБШМ статусу Національної референс лабораторії з вивчення Ензоотчного лейкозу великої рогатої худоби та запровадження національної програми контролю за ЕЛВРХ.

Висновки та перспективи подальших досліджень

1. З метою гармонізації методів контролю якості тест-систем, призначених для діагностики лейкозу великої рогатої худоби, нами було розроблено, апробовано та зареєстровано в установленому порядку Національний стандарт лейкозних сироваток крові – «Набір сироваток крові для стандартизації антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)», реєстраційне посвідчення № ВВ-00664-06-13.

2. Здійснено міжнародну валідацію Національного стандарту лейкозних сироваток, за результатами якої вітчизняний стандарт лейкозних сироваток було кваліфіковано як такий, що відповідає міжнародним вимогам.

3. Застосування «Набору сироваток крові для стандартизації антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)» - Національного стандарту лейкозних сироваток - дає змогу точно та об'єктивно оцінювати якість діагностичних засобів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. OIE (2008). Enzootic bovine leukosis. In Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, – Paris, France. – ch. 2.4.11. – pp. 729–738: World Organisation for Animal Health.
2. 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. [Електронний ресурс] – http://uazakon.com/documents/date_bq/pg_gxnjsx.htm
3. Инфекционные болезни животных: учебник / Б. Ф.Бессарабов, А.А.Вашутин, Е. С.Воронин и др.; под ред. А. А.Сидорчука. – М. : Колос, 2007. – С. 311–318.
4. Сюрин В.Н., Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв, Н.В. Фомина. – Москва: ВНИТИБП, 2001. - 928 с.
5. Инфекционная патология животных: в 2-х т. / Под ред. А. Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е. А. Непоклонова, Е. С. Воронина. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т. 1. – 2006. – С. 430–447.
6. Набір сироваток крові для стандартизації антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД) [Текст]: ТУУ 24.4.19024865–722–2004. – 12 с..

СТАНДАРТИЗАЦИЯ СРЕДСТВ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭНЗООТИЧЕСКОГО ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА / Блоцкая О.Ф., Головкин А.Н., Родина Я.А.

В статье изложены результаты работы по стандартизации подходов к контролю показателей качества тест-систем предназначенных для серологической диагностики Энзоотического лейкоза крупного рогатого скота. В Государственном научно-контрольном институте биотехнологии и штаммов микроорганизмов в соответствии с международными нормами и регламентами разработан Национальный стандарт лейкозных сывороток, который используется при контроле качества диагностических тест-систем.

Ключевые слова: Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота, лабораторная диагностика, стандартизация, контроль качества, реакция иммунодиффузии.

STANDARDIZATION OF MEANS FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS / O.Blotska, A.Golovko, Y.Rodina.

The article presents the results of work on the standardization of approaches to quality control of test systems designed for serological diagnosis of Enzootic Bovine Leukosis. In the State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, in accordance with international norms and regulations, a National Standard of serums has been developed, which is used in controlling the quality of diagnostic test kits.

Introduction. Enzootic Bovine Leucosis (EBL) – is a chronic contagious disease of tumor origin, caused by the RNA-genomic oncogenic virus. EBL is registered in many countries of the world, also in Ukraine. Methodological approaches to the study of the epizootic situation of EBL provide in vivo diagnosis, based on the detection of antibodies. In order to do diagnostic work accurately and objectively it is obligatory to have qualitative specific and sensitive diagnostic kits. World practice of diagnostic products and quality control foresee the obligatory use of International or National Standards (NS).

The purpose of the work. Develop and implement the NS of serums, intended to standardize the means of serological diagnostics of the EBL, in order to unify and harmonize the methods for controlling in accordance with international regulations and norms.

Materials and methods of research. We used panel of 16 lyophilized samples of blood serums from the International Reference Laboratory of EBL, which included: positive, weakly positive, negative, false positive and false negative samples of blood serum and reference standard of positive serum. Reactions were

conducted according to the classic methods. The validations of NS were conducted in OIE Reference Laboratory for EBL.

Results of research and discussion. We have developed the technology of manufacturing and have prepared NS for EBL, that consists of freeze-dried positive (weak-positive in dilution 1:10 in AGID) and negative serums. We have examined NS for EBL and obtained positive assessment in OIE Reference Laboratory, that was classified as being fully in line with International requirements. Now in order to verification the quality of commercial EBL test kits we are always using the National Standard serums. This allows to accurately and objectively assessing the quality of diagnostic means.

Conclusions. In accordance with international norms and regulations has been developed National Standard of serums, which is used in controlling the quality of diagnostic test kits.

Key words: *Enzootic Bovine Leukosis, laboratory diagnosis, standardization, quality control, agar gel immunodiffusion test.*

REFERENCES

1. OIE (2008). Enzootic bovine leukosis. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (ch. 2.4.11.) Paris, France. [in English]
2. Instrukcija z profilaktyky ta ozdorovlennja velykoi' rogatoi' hudoby vid lejkozu [Tekst]: Nakaz Derzhavnogo komitetu veterynarnoi' medycyny Ukrai'ny 21.12.2007 № 21. - Zarejestrovano v Ministerstvi justycii' Ukrai'ny 11 sichnja 2008 r. za № 12/14703. [Instructions for prevention and rehabilitation of bovine leukemia: State Committee of Veterinary Medicine of Ukraine 21.12.2007 № 21. - Registered in the Ministry of Justice of Ukraine on 11 January 2008 by the №12/14703]. *uazakon.com*. Retrieved from: http://uazakon.com/documents/date_bq/pg_gxnjsx.htm [in Ukrainian]
3. Bessarabov B. F., Vashutin A.A., Voronin E. S. et al. (2007) *Infekcionnye bolezni zhivotnyh* [Infectious diseases of animals]. M.: Kolos [in Russian].
4. Syurin V.N., Samuylenko A.Ya., Solovyov B.V., Fomina N.V. (2001). *Virusnye bolezni zhivotnyh* [Viral diseases of animals]. Moscow: VNITIBP [in Russian].
5. Samuylenko A. Ya., Solovyov B.V., Nepoklonov E.A., Voronina E.S. (2006) *Infekcionnaja patologija zhivotnyh* [Infectious pathology of animals] Vol 1 (Vols 1-2). M. : ICC "Akademkniga" [in Russian].
6. Nabir syrovatok krovi dlja standartyzacii' antygeny virusu lejkozu velykoi' rogatoi' hudoby v reakcii' imunodyfuzii' (RID) [Tekst]: TUU 24.4.19024865–722–2004. (2004) [A set of blood serums to standardize the antigen of the Bovine Leukosis virus in the Agar gel immunodiffusion test (AGID)] [in Ukrainian]