

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. Блоцкая, О.Ф. Стандартизация та уніфікація оцінки якості тест-систем для діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії [Текст] / О. Ф. Блоцкая // Ветеринарна біотехнологія: бюлетень. – 2008. – № 12. – С. 34–41. – Бібліогр.: С. 39–40 (12 назв.). 7. Блоцкая, О.Ф. Гармонізація та 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. Блоцкая; 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. Блоцкая, 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. Блоцкая, О. Ф. Оцінка показників якості діагностичних наборів для виявлення антитіл до вірусу лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії [Текст] / О. Ф. Блоцкая; Мін-во агр. політики України, ПДАТУ, Ф-т вет. медицини // 36. наук. пр. Міжнар. наук.-практ. конф. «Сучасні проблеми вет. медицини» присвяч. 25-річчю ф-ту вет. медицини ПДАТУ. – Кам'янець-Подільський, 2008. – Вип. 3. – С. 106–109. – Бібліогр.: С. 109 (9 назв.). 10. Набор сывороток крови для стандартизації антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД) [Текст]: ТУУ 24.4.19024865-722-2004. – 12 с. 11. 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.

DEVELOPMENT, INTERNATIONAL VALIDATION AND INTRODUCTION OF THE NATIONAL LEUKEMIC STANDARD

Blotska O.F.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv

In the State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms was developed the National standard of leukemic sera that got positive assessment at its probation in reference-laboratory of OIE and at interlaboratory tests in leading producer of diagnostic test-systems the company IDEXX. Its standard gives an opportunity to realize the control of quality of test-systems intended for diagnostics of cattle enzootic leucosis in accordance with international requirements.

УДК 619:616.98:578.828.11:636.22:616-07

РАЗРАБОТКА НАЦИОНАЛЬНОГО СТАНДАРТА – ПОЗИТИВНОЙ ЛЕЙКОЗНОЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Горбатенко С.К., Шаповалова О.В., Мягких Н.В., Зданевич П.П., Корнейков А.Н., Коровин И.В.

Национальный Научный Центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

Ковалев С.К., Козырев А.В., Калесниченко Е.И., Бондаренко А.В.

Харьковская Региональная государственная лаборатория ветеринарной медицины

В соответствии с требованиями нормативных документов МЭБ основными серологическими тестами для диагностики лейкоза крупного рогатого скота являются реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) и метод иммуноферментного анализа (ИФА). Применение этих тестов предполагает использование в качестве рабочих компонентов негативную, позитивную и слабопозитивную сыворотку, откалиброванную на уровне национальных стандартных реагентов [1].

Национальные стандартные сыворотки, предназначенные для контроля диагностических наборов, которые применяются для серологической диагностики лейкоза, должны быть оттитрованы относительно международной референтной сыворотки.

Международной позитивной референтной сывороткой для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в РИД и ИФА является сыворотка E05. Она производится и распространяется референс-лабораторией МЭБ, Friedrich-Loeffler-Institute (Германия). Также применяются референтные позитивные сыворотки A2 для РИД и P9 для ИФА производства референтной лаборатории МЭБ при Государственном ветеринарном институте (Польша).

В Украине диагностика лейкоза осуществляется согласно Инструкции по профилактике и оздоровлению крупного рогатого скота от лейкоза [2], которая постулирует применение РИД и ИФА в качестве основных методов прижизненной диагностики лейкоза КРС. В настоящее время в Украине не существует национальной стандартной позитивной сыворотки, откалиброванной относительно международных референтных сывороток. Разработка и внедрение такой сыворотки в практику контроля серологических исследований на лейкоз будет способствовать повышению уровня национальных нормативных требований в отношении качества ветеринарных диагностических препаратов, а также их гармонизации с международными стандартами. В этой связи целью проведенных нами исследований было получение сыворотки крови с высоким титром антител против вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) и ее калибровка до уровня международных референтных позитивных сывороток. Такая сыворотка может служить национальным стандартом позитивной сыворотки крови для контроля диагностических наборов, используемых при серологической диагностике лейкоза в РИД и ИФА.

Материалы и методы. Позитивная сыворотка для диагностики лейкоза была получена из крови крупного рогатого скота, гипериммунизированного инактивированными лейкозоспецифичными иммуногенными препаратами, согласно разработанной нами методике [3].

Иммуногенные препараты содержали инактивированные антигены ВЛКРС, полученные из культуральной жидкости перевиваемой культуры клеток FLK-BLV и лейкоцитов периферической крови больной хроническим лимфолейкозом коровы. Проведено 3-кратную, с интервалом 14 дней, подкожную инокуляцию препарата с последующей реиммунизацией через месяц. Реиммунизация, в свою очередь, предусматривала двукратную инокуляцию препарата с тем же интервалом. Завершили процедуру получения гипериммунной сыворотки стимуляцией иммунного ответа лимфоцитами инфицированной вирусом лейкоза коровы с лейкоцитозом 27,4 тыс./мкл, лимфоцитозом – 26,7 тыс./мкл (94 %).

Контроль иммуногенных препаратов на полноту инактивации вируса лейкоза проводили на здоровых овцах 8-12 месячного возраста (3 гол.), безреактивность и нереактогенность препаратов проверяли на здоровых взрослых кролях массой 1,5–2,0 кг (6 гол.).

Реципиентами иммуногенных препаратов были свободные от инфекции ВЛКРС бычки 16-18 месячного возраста (2 гол.).

Контроль активности полученной сыворотки крови проводили в РИД с использованием «Набора компонентов для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота в реакции иммунодиффузии (РИД)» согласно ТУУ 24.4. – 00497087-647-2002, сер. 1, изд. 01.2010 г. ООО «НИП «Ветеринарная медицина». Для исследования методом ИФА применяли тест-систему фирмы VMRD (Bovine Leukemia virus Antibody Test kit, Lot № P090514002A, VMRD, Inc.), США. Постановку и учет результатов серологических реакций осуществляли согласно инструкций производителей диагностических систем.

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунобіологічних препаратів

В процессе работы использовали гематологические (определение содержания лейкоцитов, лимфоцитов, лейкограмма периферической крови), серологические (РИД и ИФА), молекулярно-генетические (ПЦР), культуральные, бактериологические, биологические (биопроба), физико-химические методы исследований. В технологическом процессе изготовления сыворотки применяли методы стерилизующей фильтрации и лиофилизации.

Результаты исследований. В результате проведенных исследований было установлено, что максимальный титр лейкозоспецифических антител в сыворотке крови опытных животных составлял 1:64 в РИД. Полученная сыворотка крови была проверена на стерильность бактериологическими методами [4, 5]. Методом ПЦР с использованием тест-систем производства ННЦ «ИЭКВМ» была исключена вирусная контаминация.

На первом этапе активность и специфичность полученной сыворотки определяли в РИД с антигеном коммерческого набора производства ООО «НИП «Ветеринарная медицина», г. Харьков, с.1, с.3, с.4 в сравнении с позитивными референтными сыворотками E05 (Германия) и A2 (Польша). Исследовали неразведенные и разведенные до титров 1:2; 1:2,5; 1:3; 1:3,5; 1:4; 1:4,5; 1:5; 1:5,5; 1:6; 1:6,5; 1:7; 1:7,5; 1:8; 1:8,5; 1:9; 1:9,5; 1:10; 1:11; 1:12; 1:13 сыворотки. Разведения исследуемой сыворотки и позитивных референтных сывороток для определения их конечного титра проводили коммерческой сывороткой крови крупного рогатого скота, не содержащей антитела против ВЛКРС (производства ООО «НИП «Ветеринарная медицина», г. Харьков, сер. 10, 16.09. 2010 г.). По завершению этих исследований для проведения лиофилизации был выбран титр исследуемой сыворотки, совпадающий с титрами международных референтных сывороток.

Соблюдая правила асептики, сыворотку расфасовывали по 1,0 см³ в стерильные флаконы емкостью 10 см³ и подвергали лиофилизации в экспериментально подобранном режиме. После лиофилизации контроль сыворотки проводили по следующим показателям: внешний вид, цвет, наличие трещин флаконов, герметичность укупорки, влажность, растворимость, стерильность.

Лиофилированная сыворотка представляла собой сухую аморфную массу светло-желтого цвета, влажность была 0,01±0,00 %. Растворимость сыворотки после добавления 1 см³ бидистиллированной воды составляла 3 мин. После растворения сыворотка представляла собой стерильную соломенно-желтую жидкость, без посторонних примесей и нерастворимого осадка.

Активность и специфичность разведенной после лиофилизации сыворотки определяли в РИД в сравнении с позитивными референтными сыворотками E05 и A2 в вышеуказанных титрах, а также с набором полевых отрицательных, положительных и слабоположительных сывороток крови крупного рогатого скота. В результате проведенных исследований установлено, что полученная сыворотка была активной и специфичной. Она образовывала с контрольным антигеном специфическую, четкую линию преципитации, идентичную международной позитивной референтной сыворотке по длине, размещению относительно антигена, образованию угла в постановке с полевыми положительными и слабоположительными сыворотками, не образовывала неспецифических линий преципитации с полевыми сыворотками (рис.). Титр исследуемой сыворотки в РИД совпадал с титрами международных позитивных референтных сывороток.

Исследования активности полученной сыворотки в ИФА проводили в сравнении с референтной позитивной сывороткой P9 (Польша). Установлено, что в тест-системе VMRD результаты раститровки сыворотки P9 и исследуемой сыворотки совпадали, их титры составляли 1:2560.

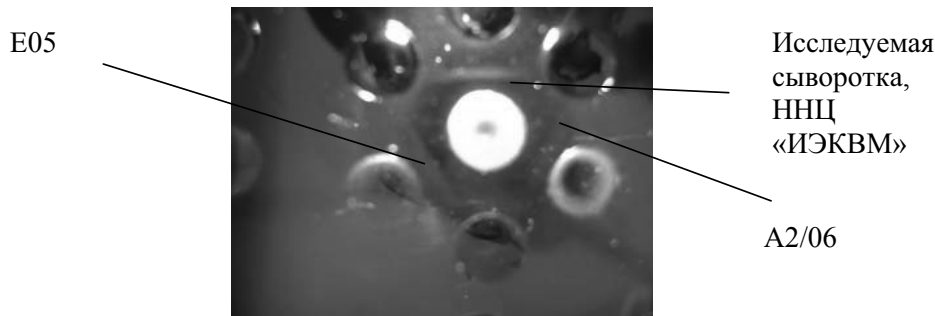


Рис. Результаты РИД с исследуемой и международными референтными позитивными сыворотками E05 и A2

Вывод. По активности и специфичности полученная позитивная сыворотка крови КРС соответствует международным позитивным референтным сывороткам для диагностики лейкоза КРС в РИД и ИФА. Она может быть использована как национальный стандарт при контроле качества производимых тест-систем для серологической диагностики лейкоза КРС.

Список литературы

1. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. – 2008. – ch. 2.4.11 Enzootic Bovine Leukosis. – P. 729-738.
2. «Інструкція з профілактики та оздоровлення ВРХ від лейкозу», затв. Наказом Державного Комітету ветеринарної медицини України 21.12.2007 № 21.
3. Спосіб одержання високоактивних преципітуючих протилейкозних сироваток / Бусол В.О., Шаповалова О.В., М'яких Н.В., Зданевич П.П., Цимбал В.І., Тертишнік О.В. // Патент на винахід № 35438 А 61К39/08, 39/395 від 16.02.2004, бюл. №2. 4. ДСТУ 4483:2005 Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначення бактеріальної і грибної контамінації. 5. ДСТУ 4613:2006 Препарати біологічні для ветеринарної медицини. Метод визначення контамінації мікоплазмами.

DEVELOPMENT OF NATIONAL STANDARD – CATTLE POSITIVE LEUKEMIC BLOOD SERUM

Gorbatenko S.K., Shapovalova O.V., Myagkih N.V., Zdanevich P.P., Korneykov A.N., Korovin I.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkov,

Kovalyov S.K., Kozuryev A.V., Kalesnichenko Ye.I., Bondarenko A.V.

Kharkov Regional State Laboratory of Veterinary Medicine

Cattle positive referent leukemic blood serum is developed in this article. Its activity and specificity in immunodiffusion test and immune-enzyme analysis are met with international samples. The serum is assigned for control of domestic test-systems as a national standard.