

УДК 636.09:616.98:636.2:57.087

ЛОЖКІНА О.В., канд. вет. наук, e-mail: pat.lab@mail.ru

МАРЧУК О.Т., e-mail: pat1@vetlabresearch.gov.ua

ПАВЛУНЬКО В.Г., e-mail: pat1@vetlabresearch.gov.ua

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

ВЕРИФІКАЦІЯ МЕТОДУ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ ІМУНОАДСОРБЦІЇ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ГУБЧАСТОПОДІБНОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Проведено аналіз ситуації в світі щодо кількості позитивних випадків захворювання великої рогатої худоби на губчастоподібну енцефалопатію за останні шість років. Наведено дані по кількості поголів'я великої рогатої худоби, імпортованого з країн Європи на територію України. У статті наведені результати верифікації методу ферментативної імуноадсорбції для діагностики губчастоподібної енцефалопатії великої рогатої худоби. Представлено інформацію щодо чутливості, специфічності та відтворюваності методу, що вказує на можливість його застосування з метою діагностики губчастоподібної енцефалопатії великої рогатої худоби в умовах лабораторії.

Ключові слова: губчастоподібна енцефалопатія, велика рогата худоба, метод ферментативної імуноадсорбції, верифікація.

Вступ. Наприкінці минулого століття перед людством постала проблема пріонних інфекцій. Губчастоподібна енцефалопатія (ГЕ) великої рогатої худоби (ВРХ), яка з 1985 року почала масово поширюватися у Великій Британії, а потім і в країнах Європи, завдала значних економічних збитків і соціальних потрясінь [1].

У 1996 році було встановлено, що збудник ГЕ ВРХ може вражати людей, викликаючи у них новий варіант хвороби Крейтцфельдта-Якоба. Люди були інфіковані при споживанні м'ясних продуктів від субклінічно хворих тварин [2].

На сьогоднішній день у світі спостерігається тенденція до зменшення кількості випадків захворювання на ГЕ ВРХ (табл. 1).

Так, у 2015 році зареєстровано 6 випадків ГЕ ВРХ: 2 у Великобританії та по одному випадку в Канаді, Ірландії, Норвегії та Словенії [3, 4].

Станом на 01.01.2016 року на території 16 областей України утримується імпортоване поголів'я великої рогатої худоби та його приплід з Угорщини, Німеччини, Данії, Голландії, Австрії, Литви в кількості 18026 голів. Тварини цієї категорії старше 24-х місячного віку після забою (загибелі) підлягають дослідженню на ГЕ [5].

Крім того, відповідно до Плану протиепізоотичних заходів по профілактиці основних заразних хвороб тварин, в Україні щорічно проводяться моніторингові дослідження на ГЕ ВРХ.

Для досліджень на ГЕ ВРХ в Україні було закуплено тест-набір HerdChek BSE-Scrapie Antigene – для проведення імуноферментного аналізу з метою

виявлення антигену губчастоподібної енцефалопатії ВРХ (BSE)-Скрепі (EIA). Тест-набір валідовано в лабораторії фірми IDEXX.

Таблиця 1

Кількість випадків захворювання на GE ВРХ у світі за 2010–2015 роки

№ п/п	Країна	Рік					
		2010	2011	2012	2013	2014	2015
1	Великобританія	11	5	2	3	1	2
2	Північна Ірландія	-	2	1	-	-	-
3	Австрія	2	-	-	-	-	-
4	Бразилія	-	-	1	-	1	-
5	Канада	1	1	-	-	-	1
6	Франція	5	3	1	2	-	-
7	Німеччина	-	-	-	-	2	-
8	Ірландія	2	3	3	1	-	1
9	Нідерланди	2	1	-	-	-	-
10	Польща	2	1	3	1	-	-
11	Португалія	6	5	2	-	1	-
12	Румунія	-	-	-	-	2	-
13	Словакія	1	-	-	-	-	-
14	Іспанія	13	6	6	-	-	-
15	Швейцарія	-	2	1	-	-	-
16	США	-	-	1	-	-	-
17	Норвегія	-	-	-	-	-	1
18	Словенія	-	-	-	-	-	1
Всього		45	29	21	7	7	6

Для встановлення можливості використання цієї тест-системи в умовах науково-дослідного патоморфологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ) виникла необхідність проведення верифікації методу з використанням зазначеного тест-набору [6, 7].

Мета роботи. Верифікація методу ферментативної імуноадсорбції для діагностики губчастоподібної енцефалопатії ВРХ.

Матеріали та методи досліджень. Робота проводилась на базі науково-дослідного патоморфологічного відділу ДНДІЛДВСЕ.

Для верифікації методу використовували:

– 50 зразків мозку великої рогатої худоби (ділянка затулки), імпортованої з країн Європи, які надходили до ДНДІЛДВСЕ для діагностичних досліджень відповідно до п. 7.8. Інструкції щодо діагностики, профілактики та боротьби з губчастоподібною енцефалопатією великої рогатої худоби;

– завідомо негативні проби – 10 зразків мозку великої рогатої худоби (ділянка затулки), які були попередньо протестовані на базі науково-дослідного патоморфологічного відділу імунохроматографічним методом;

– завідомо позитивні проби (референс-матеріал) – гомогенат мозку великої рогатої худоби, позитивний на ГЕ, наданий Національною ветеринарною лабораторією Литви, м. Вільнюс.

Верифікацію методу проводили з використанням тест-набору HerdChek BSE-Scrapie Antigen (IDEXX) та обладнання для проведення імуноферментного аналізу.

Інтерпретацію результатів здійснювали за допомогою програми «Magellan for F 50».

Дослідження проводили згідно настанови до тест-набору.

Після завершення випробування проводили розрахунки чутливості, специфічності та відтворюваності методу.

Чутливість методу визначали за формулою:

$$Ч = N_{ip} / (N_{ip} + N_{xn}) \times 100\%$$

де: Ч – чутливість системи, %;

N_{ip} – кількість істинно-позитивних значень в даній системі;

N_{xn} – кількість хибно-негативних значень.

Специфічність методу визначали за формулою:

$$С = N_{in} / (N_{in} + N_{xp}) \times 100\%$$

де: С – специфічність системи, %;

N_{in} – кількість істинно-негативних значень в даній системі;

N_{xp} – кількість хибно-позитивних значень.

Для обчислення відтворюваності проводили визначення середньоквадратичного відхилення σ за формулою:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{(n-1)}}, \quad d = X_i - X_{cp}$$

де: d – різниця між окремими показниками ОГ і середньою арифметичною величиною ($X_i - X_{cp}$);

n – кількість досліджуваних зразків;

X_i – значення ОГ окремого зразка;

X_{cp} – середнє арифметичне значення ОГ усіх досліджуваних зразків.

Визначення коефіцієнту варіації (CV) між лунками одного планшету проводили за формулою:

$$CV = \sigma / X_{cp} \times 100\%$$

де: σ – середньоквадратичне відхилення;

X_{cp} – середнє арифметичне значення ОГ всіх досліджуваних зразків.

При цьому коефіцієнт варіації (CV) стандартних відхилень від середнього значення негативних зразків не повинен перевищувати 20%.

Результати досліджень та їх обговорення. На першому етапі роботи проводили відбір зразків: за допомогою одноразового шприца відбирали 0,30 г ($\pm 0,05$ г) нервової тканини з лівого або правого боку стовбура мозку на рівні затулки (obex) (рис. 1 А, В). Відібрану тканину поміщали в пробірку для подрібнення тканин і проводили гомогенізацію.



Рис. 1. Місце та процедура відбору зразків мозку.

Після гомогенізації зразки вносили до плашки (табл. 2) і проводили випробування згідно настанови до тест-набору.

Таблиця 2

Схема розміщення зразків на плашці

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	004869/3	004869/10	004869/10	8	16	24	32	40	48		
B	N	004869/4	004869/10	1	9	17	25	33	41	49		
C	P	004869/5	004869/10	2	10	18	26	34	42	50		
D	P	004869/6	004869/10	3	11	19	27	35	43			
E	PM	004869/7	004869/10	4	12	20	28	36	44			
F	PM	004869/8	004869/10	5	13	21	29	37	45			
G	004869/1	004869/9	004869/10	6	14	22	30	38	46			
H	004869/2	004869/10	004869/10	7	15	23	31	39	47			

Примітки: 1) (N) Негативний контроль тест-набору HerdChek BSE-Scrapie Antigen (IDEXX) Lot: MJ 527 – 2 лунки (A1, B1);

2) (P) Позитивний контроль тест-набору HerdChek BSE-Scrapie Antigen (IDEXX) Lot: MJ 527 – 2 лунки (C1, D1);

3) (PM) Референс-матеріал – гомогенат мозку ВРХ позитивний на ГЕ, наданий Національною ветеринарною лабораторією Литви, м. Вільнюс – 2 лунки (E1, F1);

4) (004869/1-10) завідомо негативні проби (проби, попередньо протестовані імунохроматографічним методом) – 10 лунок (G1, H1, A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2);

5) (004869/10) повторний зразок – зразок, який протестовано 9 разів в одній плашці (проба попередньо протестована імунохроматографічним методом) – 9 лунок (A3, B3, C3, D3, E3, F3, G3, H3, A4);

6) (1-50) дослідний матеріал – 50 зразків (лунки B4 – C10).

За результатами верифікації методу отримали наступні показники:

- чутливість методу: $Ч = 2 / (2 + 0) \times 100\% = 100\%$;
- специфічність методу: $С = 10 / (10 + 0) \times 100\% = 100\%$;
- відтворюваність методу: $\sigma = \sqrt{0,00006806 / (9-1)} = 0,00291$;
- коефіцієнт варіації: $CV = 0,00291 / 0,045 \times 100\% = 6,47\%$.

З метою моніторингу ГЕ ВРХ в Україні упродовж 2012–2014 років в науково-дослідному патоморфологічному відділі ДНДІЛДВСЕ проведено

дослідження 20061 проби мозку ВРХ методом ферментативної імуoadсорбції з використанням тест-набору HerdChek BSE-Scrapie Antigen (IDEXX) (табл. 3).

Таблиця 3

Кількість досліджених зразків методом ФІА в розрізі областей

№ п/п	Область	Кількість досліджених зразків
1	АР Крим	2880
2	Вінницька	285
3	Волинська	540
4	Дніпропетровська	641
5	Закарпатська	3
6	Запорізька	97
7	Івано-Франківська	1045
8	Київська	2038
9	Кіровоградська	1606
10	Луганська	30
11	Миколаївська	787
12	Одеська	1285
13	Полтавська	1933
14	Рівненська	589
15	Сумська	1377
16	Тернопільська	1205
17	Харківська	952
18	Херсонська	652
19	Хмельницька	118
20	Черкаська	67
21	Чернівецька	236
22	Чернігівська	1695
Всього		20061

За результатами лабораторних досліджень в жодній з досліджених проб GE ВРХ не виявлено.

Висновки і перспективи подальших досліджень:

1. Тест-набір HerdChek BSE-Scrapie Antigen (IDEXX) має високу діагностичну чутливість (100 %) та специфічність (100%).

2. В подальшому рекомендуємо метод ферментативної імуoadсорбції при застосуванні тест-набору HerdChek BSE-Scrapie Antigen (IDEXX) для проведення моніторингових досліджень на GE ВРХ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вербицький П.І. Губчастоподібна енцефалопатія великої рогатої худоби та інші пріонні інфекції : монографія / П.І. Вербицький. – К. : Ветінформ, 2005. – 240 с.

2. Will R.G. A new variant of Creutzfeldt-Jakob Disease in the UK / R.G. Will [et al.] – Lancet, 1996. – P. 921–925.

3. Animal Health in the World. BSE situation in the world and annual incidence rate [Electronic resource]. – Mode of access : <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/number-of-cases-in-the-united-kingdom/>. – Number of cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) reported in the United Kingdom.

4. Animal Health in the World. BSE situation in the world and annual incidence rate [Electronic resource]. – Mode of access : <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/bse-situation-in-the-world-and-annual-incidence-rate/10-13-number-of-reported-cases-worldwide->

excluding-the-united-kingdom-copy-1/. – Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in farmed cattle worldwide (excluding the United Kingdom).

5. Інструкція щодо діагностики, профілактики та боротьби з губчастоподібною енцефалопатією великої рогатої худоби [Electronic resource]. – Mode of access : <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/z0897-02>. – Інструкція щодо діагностики, профілактики та боротьби з губчастоподібною енцефалопатією великої рогатої худоби.

6. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics [Electronic resource]. – Mode of access : https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf. – The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.

7. Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency Microbiological Methods of Analysis. The EPA Forum on Environmental Measurements (FEM). - The FEM Microbiology Action Team. FEM Document Number 2009-01 – October 7, 2009 [Electronic resource]. – Mode of access : <http://www.readbag.com/epa-fem-pdfs-final-microbiology-method-guidance-110409>. – Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency Microbiological Methods of Analysis.

ВЕРИФИКАЦІЯ МЕТОДА ФЕРМЕНТАТИВНОЇ ІММУНОАДСОРБЦІЇ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ГУБЧАТОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА / Ложкина Е.В., Марчук О.Т., Павлунько В.Г.

Проведен анализ ситуации в мире по количеству положительных случаев заболевания крупного рогатого скота губчатой энцефалопатией за последние шесть лет. Приведены данные по количеству поголовья крупного рогатого скота, импортированного из стран Европы на территорию Украины. В статье приведены результаты верификации метода ферментативной иммуноадсорбции для диагностики губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота. Представлены данные по определению чувствительности, специфичности и воспроизводимости метода, что указывает на возможность применения данного метода для диагностики губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота в условиях лаборатории.

Ключевые слова: губчатая энцефалопатия, крупный рогатый скот, метод ферментативной иммуноадсорбции, верификация.

VERIFICATION OF ELISA METHOD FOR DIAGNOSIS SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY OF CATTLE / Lozhkina O.V., Marchuk O.T., Pavlunko V.G.

Introduction. *At the end of the last century, humanity faced the problem of prion infections. Spongiform encephalopathy (SE) in cattle, which in 1985 began to spread massively in the UK, and and later in Europe, causing major economic losses and social disruption.*

In 1996, it was found that the BSE pathogen can infect people, causing a new variant Creutzfeldt-Jakob disease. People infected by eating meat products from subclinical sick animals.

Today in the world there is a tendency of reducing the number of cases of SE cow.

For researches on SE of cow in Ukraine it was purchased test kit HerdChek BSE-Scrapie Antigene - for ELISA to detect antigen of bovine spongiform encephalopathy (BSE) - Skrepi (EIA). This test kit was validated in the IDEXX company laboratory.

To establish the possibility of using this test system in a laboratory of the State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise it was necessary to verify the method.

The goal of the work. *Verification of ELISA method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy.*

Materials and methods of research. *The work was carried out on the basis of research pathomorphological department of the State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise.*

For the verification method we used following material:

– 50 samples of bovine brain (obex), imported from Europe, which came to SSRILDVSE for diagnostic tests according to p. 7.8. Instructions for diagnosis, prevention and control of spongiform encephalopathy in cattle.

– negative samples – 10 samples of bovine brain (obex) that previously tested at the Research Pathomorphologically Department immunoassay method.

– positive samples (reference material) - brain homogenates cattle positive for TSE provided by the National Veterinary Laboratory of Lithuania, Vilnius.

Interpretation of the results was performed using the «Magellan for F50».

The verification method is performed using a test kit HerdChek BSE-Scrapie Antigen (IDEXX) and equipment for ELISA. The study was conducted according to the guidelines to the test kit.

After the test was carried out calculations of sensitivity, specificity and reproducibility of the method. Determine the coefficient of variation (CV) between holes one plates.

Results of research and discussion. At the first stage of sampling was performed, using disposable syringe 0.30 g were taken (± 0.05 g) of the nervous tissue of the left or right side of the brain stem (obex). Selected tissue was placed in a test tube for crushing and tissue homogenization was performed.

After homogenization of samples brought to the dies, and conducted trials under guidance instructions to the test kit.

In the verification method obtained the following results:

– the sensitivity of the method: $M = 2 / (2 + 0) \times 100\% = 100\%$

– the specificity of the method: $C = 10 / (10 + 0) \times 100\% = 100\%$

– the reproducibility of the method: $\sigma = \sqrt{0,00006806 / (9-1)} = 0,00291$

– the coefficient of variation: $CV = 0,00291 / 0,045 \times 100\% = 6.47\%$

In order to monitoring BSE of cattle in Ukraine during 2012, 2013 and 2014 studied 20,061 samples of bovine brain enzyme immunoabsorbent by using a test set HerdChek BSE-Scrapie Antigen (IDEXX). As a result of investigations the BSE have not found.

Conclusions and prospects for further research:

1. Test kit HerdChek BSE-Scrapie Antigen (IDEXX) has high diagnostic sensitivity (100%) and specificity (100%).

2. Recommend enzymatic immunoabsorption method when using test kits HerdChek BSE-Scrapie Antigen (IDEXX) for monitoring research on TSE of cattle.

Keywords: spongiform encephalopathy, cattle, ELISA method, verification.

REFERENCES

1. Verbič'kij, P.I. (2005). *Gubchastopodibna encefalopatija velikoï rogadoï hudobi ta inshi prionni infekcii [Spongiform encephalopathy of cattle and other prion infection]*. Kiiv: Vetinform [in Ukrainian].

2. Will R.G. Ironside J.W.; Zeidler M.; Cousens S.N.; Estibeiro K. & Alperovitch A. et al (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob Disease in the UK. *Lancet*, 347 (9006), 921-925.

3. Animal Health in the World. BSE situation in the world and annual incidence rate. *www.oie.int*. Retrieved from <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/number-of-cases-in-the-united-kingdom/>.

4. Animal Health in the World. BSE situation in the world and annual incidence rate. *www.oie.int*. Retrieved from <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/bse-situation-in-the-world-and-annual-incidence-rate/10-13-number-of-reported-cases-worldwide-excluding-the-united-kingdom-copy-1/>.

5. Instrukcija shhodo diagnostiki, profilaktiki ta borot'bi z gubchastopodibnoju encefalopatieju velikoï rogadoï hudobi [Instructions for diagnosis, prevention and control of spongiform encephalopathy in cattle]. *www.rada.gov.ua*. Retrieved from <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/z0897-02> [in Ukrainian].

6. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. www.eurachem.org. Retrieved from https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf.

7. The FEM Microbiology Action Team. FEM Document Number 2009-01 (2009). The EPA Forum on Environmental Measurements (FEM). Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency Microbiological Methods of Analysis. www.epa.gov. Retrieved from <http://www.readbag.com/epa-fem-pdfs-final-microbiology-method-guidance-110409>.

УДК 616.98:578.824.11:616-036.22

МАЗУР М.В.*, e-mail: mazur_mykola1991@ukr.net

ПОЛУПАН І.М., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: vetmedic@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

ГЕНЕТИЧНА РІЗНОМАНІТНІСТЬ ВІРУСУ СКАЗУ ТА ІНШИХ ЛІССАВІРУСІВ ТВАРИН

У статті поданий аналіз інформації зі статистичних і літературних джерел щодо вивчення епізоотологічних даних різноманітності генотипів вірусу сказу та інших ліссавірусів тварин, які циркулюють у природних умовах серед популяції кажанів. Представлені характеристики класифікованих та некласифікованих ліссавірусів тварин, ідентифікованих за допомогою панелей моноклональних антитіл та молекулярно-генетичних методів, з подальшим розподілом генотипів на філогрупи. Наведена інформація про летальні випадки серед людей після неспровокованих нападів кажанів на території Європи та України.

Ключові слова: *сказ, кажани, генотип, ліссавіруси*

Вступ. Усі захворювання викликані різними ліссавірусами реєструються під загальною назвою – сказ. Це особливо небезпечна інфекційна хвороба всіх теплокровних тварин і людини [1].

На сьогодні захворювання реєструється у 113 країнах світу. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), сказ входить в п'ятірку хвороб спільних для людини і тварин, що наносять найбільший соціально-економічний збиток. Рабічна інфекція характеризується тяжким ураженням центральної нервової системи (ознаками поліенцефаломієліту), внаслідок цього, кожного року в світі гине понад 60 тисяч людей (близько 40% з них – діти віком до 15 років), більше одного мільйону тварин, понад 20 мільйонів людей отримують антирабічну постекспозиційну вакцинацію після перенесених укусів [2].

За допомогою перехресної реакції нейтралізації з сироватками, а далі й моноклональними антитілами до глікопротеїну вірусу сказу, рід *Lyssavirus* було поділено на чотири серотипи: 1-й серотип – до нього відносять абсолютну більшість вуличних і фіксованих штамів вірусу з самих різноманітних частин

*Аспірант, наук. керівник – канд. вет. наук, ст. наук. сп. **Полупан І.М.**