

DOI: 10.37925/0039-713X-2020-5-26-28

УДК 636.4

PPCC: сравнительные испытания ИФА-тестов для объективной диагностики



В.В. МИХАЙЛОВА, зав. отделом вирусологии, Т.П. ЛОБОВА, кандидат биолог. наук, ст. научный сотрудник отдела вирусологии, А.Н. СКВОРЦОВА, мл. научный сотрудник отдела вирусологии, М.С. ШИШКИНА, мл. научный сотрудник отдела вирусологии, ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»

Рассмотрены проблемы зависимости точности диагностики PPCC от специфичности и чувствительности диагностических наборов. Отмечена важность правильной диагностики для составления плана противоэпизоотических мероприятий. Приведены примеры чувствительности и специфичности разных тестов.

Ключевые слова: PPCC, диагностика, ИФА, специфичность, чувствительность.

PPRS: comparative tests of ELISA tests for objective diagnosis

V. V. MIKHAILOVA, head of the department of virology, T.P. LOBOVA, candidate of biological sciences, senior researcher of virology department, A.N. SKVORTSOVA, junior researcher of virology department, M.S. SHISHKINA, junior researcher of virology department, FSBI Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory

Troubles of dependence of accuracy of diagnostic kit on PRRS from its specificity and sensitivity and the importance of correct diagnostics for planning of antiepidemiological measures are observed in this article. Examples of sensitivity and specificity of different tests are shown.

Key words: PRRS, diagnosis, ELISA, specificity, sensitivity.

Репродуктивно-респираторный синдром свиней («синее ухо»), вызываемый вирусом рода Arterivirus, является причиной серьезных экономических потерь во всем мире [1]. Вирус PPCC представляет собой одноцепочечную структуру РНК с высокой генетической изменчивостью и в основном характеризуется репродуктивной недостаточностью у свиноматок и респираторными заболеваниями у свиней всех возрастов. Клинические признаки могут значительно различаться между животными и зависят от вирулентности заражающего штамма [3]. Существуют два основных различающихся по антигенам типа вируса – 1-й тип (европейский) и 2-й тип (североамериканский). Раньше 1-й тип был ограничен территорией Европы, а 2-й тип – Северной Америки, но в настоящее время оба типа распространены по всему миру, а в Азии выделены высокопатогенные штаммы, которые являются сублинией PPCC 2-го типа [4, 5].

Источником возбудителя инфекции являются больные и переболев-

шие свиньи. Основные пути передачи возбудителя болезни – контакт с инфицированными животными, экскрементами, мочой, семенной жидкостью, скармливание необеззараженных продуктов и сырья, полученного от больных животных, инфицированные предметы ухода, корма, транспортные средства, а также подтверждена возможность передачи на небольшие рас-

стояния посредством насекомых (мух и комаров) и аэрогенным путем.

В настоящее время проблемой широкого распространения репродуктивно-респираторного синдрома свиней является высокая изменчивость вируса. Большое генетическое разнообразие вируса затрудняет разработку лабораторных тест-систем и осложняет оценку уровня защиты свиней от PPCC. Животные

Batch Kwalificatie Formulier / Batch Qualification Certificate

Bestelno. / Cat no.	SW-PPRSV-REF3	VLDIA243
Specificiteit / Specificity	PPRSV Porcine Reproductive & Respiratory Syndrome positive reference serum US strain	
Geproduceerd in / Produced in	Varken / Swine	
Lotnummer / Lot no.	07130-130707	
Expiratiedatum / Expiration date	07-2021	
Gebruiksdoel / To be used for	Positive reference serum	
Presentatie / Presentation	250 µl gevriesdroogd / 250 µl lyophilized	
Opslag condities / Storage	2 tot 8 °C / 2 to 8 °C	
Gekontrolleerd / Quality Control	Datum / Date 13 Feb 2019 Paraaf / Signature <i>Rel</i>	

TEST	Resultaat / Results ²⁾
IDEXX ELISA	0,58
HIPRA EU ELISA	31
HIPRA US ELISA	185
IPMA EU	9
IPMA US	>=11



Сертификат соответствия референтной сыворотки VLDIA 243

могут показывать гомологичную защиту в течение длительного времени – до 600 дней, тем не менее защита от одного штамма РРСС не ограждает от гетерологичных штаммов. Уровень гетерологичной защиты значительно варьируется, и его невозможно предсказать. Таким образом, анализ последовательности (секвенирование) не дает объективной оценки защиты. К тому же, как оказалось, на уровень защиты влияет и геном хозяина.

Также осложняют проблему распространения репродуктивно-респираторного синдрома свиней и условия содержания больших популяций на ограниченном пространстве, невыясненные проблемы путей передачи [6]. Поэтому для постановки достоверного диагноза рекомендуется проводить комплексные исследования несколькими лабораторными методами.

Согласно Приказу Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 24.01.2018 №25 «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов репродуктивно-респираторного

синдрома свиней (РРСС)» диагноз считается установленным, если в пробах обнаружен возбудитель, или его генетический материал, или антигена против РРСС, не связанные с вакцинацией. Поэтому в большинстве лабораторий РФ используются такие методы диагностики, как вирус-выделение, ПЦР и ИФА.

На территории России распространенным методом лабораторной диагностики РРСС является ИФА. Несмотря на то что он нетрудоёмкий и человеческий фактор сведен к минимуму посредством автоматизированных станций, достоверность полученных результатов зависит от применяемых коммерческих тест-систем и точности иммуноферментных анализаторов. Поэтому перед использованием тест-систем в лабораторной практике необходимо проводить внутрिलाбораторную оценку чувствительности, специфичности и воспроизводимости. При этом нужно иметь в наличии широкую линейку стандартизированных референтных образцов для проверки тест-набора и тем самым удостовериться в его качестве. Для полноценного анализа также следует учитывать валидационные отчеты, полученные при производстве. Добросовестные разработчики по запросу предоставляют такие данные.

Цель работы – оценка пригодности двух коммерческих тест-систем для определения антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней методом ИФА.

Материалы и методы

Были проведены исследования с использованием двух коммерческих тест-систем: №1 – PRRS X3 Ab Test (IDEXX); №2 – другого производителя аналогичных тест-наборов (BioChek). Испытания были произведены и проанализированы в соответствии с инструкцией по применению производителя. Получение и обработка результатов была осуществлена с помощью спектрофотометров, используемых в лаборатории и внесенных в область аккредитации.

В качестве материала для анализа чувствительности использовалась референтная сыворотка PRRSV Serum (VLDIA 243). Эта сыворотка, по данным GD, оценена как слабоположительная. Обычно такие результаты характерны при исследовании на наличие антител через одну-две недели после инфицирования, когда иммунный ответ только начинает формироваться.

Для оценки повторяемости данная рефсыворотка исследовалась в 20 повторах. Результаты этого исследования приведены в **таблице 1**.

Таблица 1. Оценка повторяемости

№1 (IDEXX)			
ID пробы	оптимальная плотность	S/P	результат
Отрицательный контроль	0,058		
Отрицательный контроль	0,064		
Положительный контроль	0,469		
Положительный контроль	0,478		
VLDIA 243	0,305	0,592	Положительно
VLDIA 243	0,322	0,633	Положительно
VLDIA 243	0,326	0,642	Положительно
VLDIA 243	0,330	0,652	Положительно
VLDIA 243	0,407	0,839	Положительно
VLDIA 243	0,333	0,659	Положительно
VLDIA 243	0,333	0,659	Положительно
VLDIA 243	0,323	0,635	Положительно
VLDIA 243	0,339	0,674	Положительно
VLDIA 243	0,349	0,698	Положительно
VLDIA 243	0,376	0,764	Положительно
VLDIA 243	0,369	0,747	Положительно
VLDIA 243	0,365	0,737	Положительно
VLDIA 243	0,355	0,713	Положительно
VLDIA 243	0,360	0,725	Положительно
VLDIA 243	0,348	0,696	Положительно
VLDIA 243	0,361	0,727	Положительно
VLDIA 243	0,347	0,693	Положительно
VLDIA 243	0,348	0,696	Положительно
VLDIA 243	0,348	0,696	Положительно
CV%			7,70

№2 (BioChek)			
ID пробы	оптимальная плотность	S/P	результат
Отрицательный контроль	0,139		
Отрицательный контроль	0,141		
Положительный контроль	1,090		
Положительный контроль	1,040		
VLDIA 243	0,374	0,253	Отрицательно
VLDIA 243	0,414	0,296	Отрицательно
VLDIA 243	0,369	0,248	Отрицательно
VLDIA 243	0,384	0,264	Отрицательно
VLDIA 243	0,347	0,224	Отрицательно
VLDIA 243	0,382	0,262	Отрицательно
VLDIA 243	0,384	0,264	Отрицательно
VLDIA 243	0,388	0,268	Отрицательно
VLDIA 243	0,395	0,276	Отрицательно
VLDIA 243	0,393	0,274	Отрицательно
VLDIA 243	0,343	0,219	Отрицательно
VLDIA 243	0,398	0,279	Отрицательно
VLDIA 243	0,368	0,246	Отрицательно
VLDIA 243	0,389	0,269	Отрицательно
VLDIA 243	0,390	0,270	Отрицательно
VLDIA 243	0,388	0,268	Отрицательно
VLDIA 243	0,415	0,297	Отрицательно
VLDIA 243	0,381	0,261	Отрицательно
VLDIA 243	0,383	0,263	Отрицательно
VLDIA 243	0,358	0,236	Отрицательно
CV%			8,00

Стоит отметить, что референтный образец, заявленный GD Animal Health как слабоположительный, в исследуемых тест-системах показал разные результаты, так как, согласно инструкциям к тест-наборам, результат при использовании тест-набора №1 считается положительным при значении S/P-отношения меньше 0,4, а при применении тест-набора №2 – при значении S/P-отношения меньше 0,5.

При оценке коэффициента вариации (сходимости результатов) нужно обратить внимание на то, что чем больше значение CV%, тем относительно больший разброс и, соответственно, меньшая однородность значения S/P. Если коэффициент вариации меньше 10%, то изменчивость вариационного ряда принято считать незначительной. Из **таблицы 1** можно сделать вывод о том, что в двух исследуемых тест-системах коэффициент вариации меньше 10%, при этом тест-система №2 имеет значения немного выше, чем тест-система №1.

Также были проведены сравнительные исследования группы проб, которые состоят из шести полевых сывороток крови, полученных из разных свиноводческих хозяйств путем случайной выборки. Данные пробы исследовались параллельно в одинаковых условиях.

1. Zimmerman J.J., Benfield D.A., Murtaugh M.P., Osorio F., Stevenson G.W., Torremorell M. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus. In Diseases of swine. 9th edition. Edited by Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. Ames, Iowa: Blackwell Science, 2006. P. 387–417.

2. Гусев А.А., Пунтус И.А., Бабак В.А. Репродуктивно-респираторный синдром свиней: меры специфической профилактики. Материалы Международного агробиотехнологического

Таблица 2. Исследования полевых образцов

Полевой образец	№1 (IDEXX)			№2 (BioChek)		
	оптимальная плотность	S/P	результат	оптимальная плотность	S/P	результат
Отрицательный контроль	0,058			0,139		
Отрицательный контроль	0,064			0,141		
Положительный контроль	0,469			1,09		
Положительный контроль	0,478			1,04		
1-я	0,321	0,630	Положительно	0,490	0,378	Отрицательно
2-я	0,903	2,041	Положительно	1,367	1,326	Положительно
3-я	0,963	2,187	Положительно	2,681	2,747	Положительно
4-я	0,284	0,541	Положительно	0,315	0,189	Отрицательно
5-я	0,722	1,602	Положительно	1,239	1,188	Положительно
6-я	0,850	1,913	Положительно	2,821	2,898	Положительно
Средний титр		1,486			1,454	
CV%		44,5			84	

Из данных, представленных в **таблице 2**, видно, что некоторые образцы продемонстрировали положительный результат в обоих тест-наборах (пробы №2, №3, №5, №6), но образцы №1 и №4 показали значительные расхождения: исследованные на тест-наборе №1 оценены как положительные, а на тест-наборе №2 – как отрицательные.

Чувствительность тест-систем по РРСС играет определяющую роль в системе современных мер контроля и предотвращения распространения РРСС. Ведь в первую очередь необ-

ходимо контролировать племенных животных – ремонтных и основных свинок и хряков как основной фактор распространения болезни, а также завозимых в хозяйство. Поэтому лаборатории должны использовать наиболее чувствительные тест-системы ИФА, чтобы не допустить заноса инфекции. Чувствительность тест-системы также позволит наиболее точно оценить своевременность и эффективность вакцинации и заблаговременно предупредить о вероятности обострения эпизоотии при ее латентной форме.

Литература

симпозиума, посвященного 80-летию члена-корреспондента РАН, заслуженного деятеля науки РФ Софья В.В., 2016.

3. Stadejek T., Stankevicius A., Murtaugh M.P., Oleksiewicz M.B. Molecular evolution of PRRSV in Europe: current state of play. Vet. Microbiol., 2013. 165: 21–28. 10.1016/j.vetmic.2013.02.029.

4. Дудников С.А. Количественная эпизоотология: основы эпидемиологии и биостатистики. Владимир, 2004. 460 с.

5. Nguyen T.D.T., Nguyen T.T., Nguyen G.S., Le T.T.H., Vo K.H., Nguyen T.N., Do V.A.K. Genetic analysis of ORF5 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus isolated in Vietnam. Microbiol. Immunol., 2013. 57:518–526.

6. Ануфриев П.А., Паршин П.А., Сулейманов С.М. Клинико-эпизоотологическая и патоморфологическая диагностика репродуктивно-респираторного синдрома свиней. Вестник Российского университета дружбы народов: Агрономия и животноводство, 2009. №3. С. 74–80. ☺

Í Æ Ì ÐÌ Ì ÓÑÒÈÒÀ Ì Ì ÄÏ ÈÑÈÓ Í À ÆÓÐÍ Æ «ÑÄÈÍ Ì ÄÏ ÄÑÒÄÏ» Í À Ì ÄÐÄÏ Ä Ì Ì ËÓÄÏ ÄÈÄ 2021 á.!

Индексы в каталоге Роспечати 70809, 47913

Подписку можно оформить и через редакцию. Для этого необходимо прислать свои реквизиты и заявку с указанием почтового адреса для доставки.