

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ЗАВ-ИФА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИТЕЛ К НЕСТРУКТУРНЫМ БЕЛКАМ ВИРУСА ЯЩУРА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ КРУПНОГО И МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА

А.С. Яковлева<sup>1</sup>, А.В. Каньшина<sup>2</sup>, А.В. Щербakov<sup>3</sup>, Е.С. Орлова<sup>4</sup>

<sup>1</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: as\_yakovleva@arriah.ru

<sup>2</sup> старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kanshina@arriah.ru

<sup>3</sup> заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

<sup>4</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: orlova@arriah.ru

### РЕЗЮМЕ

Проведена валидация тест-системы ЗАВ-ИФА, предназначенной для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови крупного и мелкого рогатого скота. Установлено, что сходимость и воспроизводимость реакции превышают 90%, диагностическая специфичность составляет 99,8%, диагностическая чувствительность 96,6%. Высокая специфичность и чувствительность ЗАВ-ИФА подтверждена в международных слепых испытаниях по диагностике ящура и при проведении рутинных диагностических и мониторинговых исследований.

Ключевые слова: вирус ящура, неструктурные белки, иммуноферментный анализ, валидация.

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ЗАВ-ELISA TEST-SYSTEM FOR DETECTION OF ANTIBODIES TO FMD VIRUS NONSTRUCTURAL PROTEINS IN BLOOD SERA FROM CATTLE AND SMALL RUMINANTS

A.S. Yakovleva<sup>1</sup>, A.V. Kanshina<sup>2</sup>, A.V. Scherbakov<sup>3</sup>, Ye.S. Orlova<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: as\_yakovleva@arriah.ru

<sup>2</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kanshina@arriah.ru

<sup>3</sup> Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

<sup>4</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: orlova@arriah.ru

### SUMMARY

The ЗАВ-ELISA test-system for detection of antibodies to FMD virus nonstructural proteins in blood sera from cattle and small ruminants was validated. It was discovered that the reaction repeatability and reproducibility exceeded 90%, diagnostic specificity constituted 99,8%, diagnostic sensitivity came up to 96,6%. The high specificity and sensitivity of the ЗАВ-ELISA test-system was confirmed by international proficiency testings as far as FMD diagnostics and by routine diagnostic and monitoring studies.

Key words: FMD virus, nonstructural proteins, enzyme-linked immunosorbent assay, validation.

### ВВЕДЕНИЕ

Ящур — высококонтагиозное вирусное заболевание домашних и диких парнокопытных животных. Относится к категории трансграничных болезней, способных преодолевать границы между государствами, вызывать эпизоотии и наносить большой экономический ущерб животноводству.

Возбудителем болезни является безоболочечный РНК-содержащий вирус ящура, представитель рода *Aphthovirus* семейства *Picornaviridae*. Различают семь серотипов вируса: О, А, С, Азия-1, SAT-1, SAT-2, SAT-3. В пределах каждого типа существует множество генетических и антигенных вариантов вируса.

В России ящур не эндемичен, однако существует постоянная угроза заноса этой болезни из соседних азиатских стран, прежде всего из Китая. Вспышки ящура, вызванные заносом инфекции извне, регистрировались в современной России в 1995, 2000, 2004–2006 и 2010–2014 гг. [12, 13].

В Российской Федерации применяется стратегия профилактики и борьбы с ящуром, которая предполагает недопущение возникновения и распространения болезни на территории страны. В регионах с высокой степенью риска заноса и распространения ящура создана буферная зона, в которой крупный и мелкий рогатый скот вакцинируется против ящура.

При наличии противоящурной буферной зоны необходимо на регулярной основе проводить мониторинг с целью выявления возможной циркуляции вируса ящура на вакцинированном поголовье. В настоящее время наиболее эффективной технологией обнаружения инфицированных животных среди вакцинированного поголовья является иммуноферментный анализ (ИФА) по обнаружению антител к неструктурным белкам вируса ящура. Антитела к неструктурным белкам вируса ящура выявляются у инфицированных животных и не обнаруживаются у вакцинированных при условии применения очищенных вакцин, соответствующих требованиям Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) [3, 8].

Ранее нами были получены рекомбинантные неструктурные белки ЗА, ЗВ и ЗАВ вируса ящура [1] и на их основе разработаны две иммуноферментные тест-системы для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура. Первая тест-система, разработанная в 2004 г., позволяла исследовать сыворотки крови только крупного рогатого скота (КРС) [2]. В данной работе представлены результаты валидации второй тест-системы — ЗАВ-ИФА, предназначенной для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови как крупного (КРС), так и мелкого рогатого скота (МРС).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Антиген.** В качестве антигена использовали рекомбинантный белок ЗАВ, полученный экспрессией в *E. coli*. Условия экспрессии и очистки описаны ранее [1].

**Сыворотки крови животных.** В качестве положительного контроля использовали референтную сыворотку крови КРС, экспериментально зараженного вирусом ящура типа А. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку крови КРС, не имеющего антител к вирусу ящура. В качестве слабopоложительной сыворотки использовали сыворотку крови

КРС, отобранной на 8 день после инфицирования (ДПИ) вирусом ящура типа А. Данные сыворотки были проверены на наличие антител к неструктурным белкам вируса ящура в ИФА с коммерческим набором PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Швейцария).

Для установления рабочего разведения сывороток, позитивно-негативного порога, диагностической чувствительности и специфичности реакции использовали сыворотки крови от КРС и МРС с известным инфекционным статусом. В качестве заведомо положительных проб были использованы 309 сывороток крови КРС, экспериментально зараженного вирусом ящура, отобранные на 8–17 ДПИ, и 13 сывороток крови МРС, экспериментально зараженного вирусом ящура, отобранные на 5–10 и 30 ДПИ. В качестве заведомо отрицательных проб использовали сыворотки крови КРС и МРС, отобранные в Северо-Западном федеральном округе РФ, свободном от ящура.

**Конъюгат антивидовых антител.** В работе использовали коммерческий пероксидазный конъюгат моноклональных антител к иммуноглобулинам G овец и коз (Sigma), который также имеет сродство к IgG КРС.

**Имуноферментный анализ.** Разработка ЗАВ-ИФА являлась предметом исследований и описана в разделе «Результаты». ИФА с коммерческим набором PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Швейцария) проводили в соответствии с инструкцией к набору.

Статистическую обработку результатов ИФА проводили согласно рекомендациям МЭБ [9, 10].

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Валидацию ЗАВ-ИФА проводили в соответствии с рекомендациями МЭБ [9, 10]. Процесс включал несколько этапов.

**Оптимизация реагентов и протокола реакции.** В ходе выполнения этого этапа были установлены рабочие разведения антигена и антивидового конъюгата, оптимальный состав блокирующего раствора, температурно-временной режим для каждого этапа ИФА, допустимые значения оптической плотности контрольных сывороток.

Для определения оптимального рабочего разведения сывороток тестировали 30 сывороток крови КРС и 30 сывороток крови МРС с различным уровнем антител методом последовательных разведений в четырех различных разведениях: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200. Для каждого разведения сывороток определяли величину (S/P) по формуле:

$$S/P = (OP - NC_x) / (PC_x - NC_x),$$

где ОП — средняя оптическая плотность исследуемой сыворотки;

NC<sub>x</sub> — средняя оптическая плотность отрицательной контрольной сыворотки;

PC<sub>x</sub> — средняя оптическая плотность положительной контрольной сыворотки.

Затем рассчитывали Ig S/P и Ig T для каждого разведения. Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы STATISTICA. В результате были определены коэффициент корреляции и стандартная ошибка (табл. 1).

**Таблица 1**  
Значения коэффициента корреляции и стандартной ошибки для различных разведений сывороток

Разведение	Коэффициент корреляции	Стандартная ошибка
1:25	0,87	0,66646
1:50	0,86	0,70599
1:100	0,86	0,70029
1:200	0,57	0,75733

Как видно из таблицы, наибольший коэффициент корреляции R=0,87 при наименьшей стандартной ошибке 0,66646 получили при разведении сывороток 1:25. В связи с этим данное разведение было выбрано в качестве рабочего.

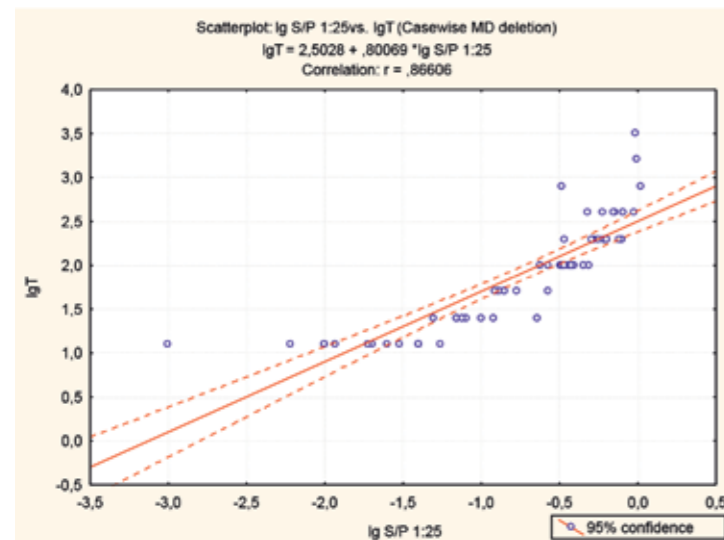
Уравнение линейной регрессии для разведения сывороток 1:25 имело вид:  $Ig T = 2,5028 + 0,80069 \times Ig S/P$ , где 2,5028 и 0,80069 — коэффициенты A и B соответственно.

На рис. 1 представлен график зависимости  $Ig S/P$  от  $Ig T$  для рабочего разведения сывороток 1:25.

В результате оптимизации всех параметров была принята следующая схема постановки ЗАВ-ИФА. В каждую лунку планшета вносили по 50 мкл рекомбинантного белка в рабочем разведении в 0,05М карбонато-бикарбонатном буфере (рН 9,6) и инкубировали 16–18 ч при 4°C. Затем в лунки планшета вносили по 50 мкл блокирующего раствора (ТБСТ, 10% лошадиная сыворотка, рН 7,6) и инкубировали 1 ч при 37°C. После отмывания планшетов раствором ТБСТ тестируемые сыворотки, разведенные 1:25 в блокирующем буфере, вносили в объеме 50 мкл на лунку и инкубировали в термостатируемом шейкере 1 ч при 37°C. Повторяли отмывку планшетов, вносили конъюгат в рабочем разведении и инкубировали в тех же условиях. После отмывки вносили субстрат АВТС, через 10–15 мин останавливали реакцию добавлением 1%-ного раствора додецилсульфата натрия и учитывали результаты реакции на спектрофотометре при длине волны 405 нм.

Оценка сходимости и воспроизводимости результатов реакции. Для оценки сходимости результатов

*Рис. 1. График зависимости  $Ig$  титра антител в ИФА от  $Ig S/P$ , определенного в рабочем разведении сывороток 1:25*



реакции положительную и слабopоложительную сыворотки крови КРС в рабочем разведении вносили в лунки планшета и после проведения реакции высчитывали процент позитивности (ПП) для каждой повторности (табл. 2). Коэффициент вариации рассчитывали по формуле:

$$C = (\delta / \bar{x}) \times 100\%$$

где  $\delta$  — среднее квадратичное отклонение,  $\bar{x}$  — среднее арифметическое.

При исследовании положительной сыворотки на одном планшете коэффициент вариации составил 4,1%, при исследовании слабopоложительной сыворотки на одном планшете коэффициент вариации составил 2,7%, что указывает на хорошую сходимость реакции (табл. 2).

Для оценки воспроизводимости реакции исследовали положительную и слабopоложительную сыворотки крови КРС в разных условиях (в течение 10 дней, на разных термощейкерах, два оператора). Результаты представлены в табл. 3.

При исследовании положительной и слабopоложительной сывороток в разных условиях коэффициент вариации составил менее 10%, что указывает на хорошую воспроизводимость реакции.

**Определение аналитической специфичности реакции.** Для определения аналитической специфичности исследовали 10 гетерологичных сывороток крови КРС, содержащих антитела против вируса лейкоза КРС, вируса чумы КРС, и 10 сывороток МРС, содержащих антитела против вирусов чумы мелких жвачных и оспы овец и коз. Активность антигена с гетерологичными сыворотками не превышала фоновый уровень, полученный в реакции с неиммунной сывороткой.

**Определение аналитической чувствительности реакции.** Аналитическую чувствительность определяли тестированием в трех повторностях серии 2-кратных последовательных разведений референтной сыворотки крови КРС, содержащей антитела против вируса ящура. Данная сыворотка предварительно тестировалась в жидкофазном блокирующем варианте ИФА (LPBE). Титр антител в данной реакции составил 1:618. При исследовании в ЗАВ-ИФА конечное разведение тестируемой сыворотки составляло 1:1600.

**Определение позитивно-негативного порога реакции.** Для определения позитивно-негативного порога (ПНП) исследовали 96 заведомо отрицательных сывороток крови МРС и 96 отрицательных сывороток крови КРС. ПНП определяли, вычисляя средние значения оптической плотности отрицательных сывороток и прибавляя три значения среднего квадратичного отклонения. Среднее значение оптической плотности отрицательных сывороток с утроенным значением среднего квадратичного отклонения составило 0,216 для КРС и 0,318 для МРС. Граница ПНП при исследовании сывороток крови КРС и МРС соответствовала проценту позитивности, равному 25 и 30% соответственно. Значение ПНП, равное 30%, было принято за расчетное для исследований сывороток крови как КРС, так и МРС. Сыворотки крови КРС и МРС с ПП ниже 30% считались отрицательными, с ПП равным или большим 30% — положительными.

**Определение диагностической специфичности реакции.** Диагностическую специфичность ЗАВ-ИФА определяли путем тестирования 1280 заведомо отрицательных сывороток крови КРС (640) и МРС (640)

**Таблица 2**  
Оценка сходимости ЗАВ-ИФА

Характеристика сыворотки крови	Минимальное значение ПП, % ( $x_{min}$ )	Максимальное значение ПП, % ( $x_{max}$ )	Среднее значение ПП, % ( $\bar{x}$ )	Среднее квадратичное отклонение, ( $\delta$ )	Коэффициент вариации, % (C)
Положительная сыворотка	90,22	107,57	96,19	3,943	4,1
Слабopоложительная сыворотка	45,08	50,97	48,40	1,318	2,7

**Таблица 3**  
Оценка воспроизводимости ЗАВ-ИФА

Характеристика сыворотки крови	Минимальное значение ПП, % ( $x_{min}$ )	Максимальное значение ПП, % ( $x_{max}$ )	Среднее значение ПП, % ( $\bar{x}$ )	Среднее квадратичное отклонение, ( $\delta$ )	Коэффициент вариации, % (C)
Положительная сыворотка	95,60	106,27	101,21	3,464	3,4
Слабopоложительная сыворотка	49,34	61,95	53,32	4,094	7,7

из Новгородской области. При этом было получено 3 ложноположительных результата. Таким образом, на данной панели сывороток крови специфичность реакции составляла 99,8%.

**Определение диагностической чувствительности реакции.** Для оценки диагностической чувствительности ЗАВ-ИФА использовали сыворотки крови КРС и МРС, экспериментально инфицированного вирусом ящура. 16 голов КРС были заражены вирусом ящура типа А, 10 — типа О, 5 — типа Азия-1. Кровь отбиралась до заражения, а также с 8 по 17 ДПИ. У МРС кровь была отобрана на 5–10 и 30 ДПИ.

Все сыворотки крови, отобранные до заражения, были серонегативными в ЗАВ-ИФА (табл. 4). Антитела к вирусу ящура были обнаружены в 21 из 31 сыворотки крови КРС, отобранной на 8 ДПИ, в 29 из 31 сыворотки на 9 ДПИ и во всех сыворотках, отобранных на 10–17 ДПИ, т.е. ЗАВ-ИФА определил как положительные 298 из 309 проб от КРС. Все 13 сывороток крови от МРС, экспериментально зараженного ящуром, были положительными.

Таким образом, на данной панели сывороток диагностическая чувствительность ЗАВ-ИФА составила 96,6%.

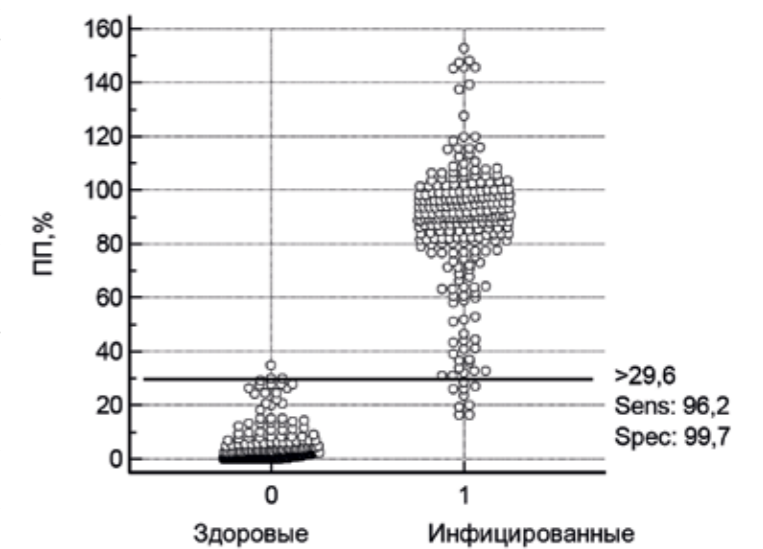
Дополнительно были исследованы 7 референтных сывороток от КРС, экспериментально зараженного вирусом ящура семи серотипов. Антитела к вирусу ящура были выявлены во всех пробах. Это доказывает, что ЗАВ-ИФА способен выявлять антитела ко всем серотипам вируса ящура.

**ROC-анализ.** Полученные в процессе определения диагностической чувствительности и специфичности данные были использованы для проведения ROC-анализа. ROC-анализ проводили с помощью программы MedCalc. На рис. 2 приведена точечная диаграмма, отражающая распределение результатов исследования в ИФА сывороток крови от здоровых и инфицированных животных. В результате анализа данных программа установила, что оптимальный баланс специфичности (99,7%) и чувствительности (96,2%) достигается при ПНП в 29,6%. Таким образом, значение ПНП, полученное с помощью ROC-анализа, практически совпадает со значением ПНП, определенного на панели отрицательных сывороток крови (30%).

ROC-кривая, отражающая соотношение специфичности и чувствительности ЗАВ-ИФА, показана на рис. 3. Визуальный анализ ROC-кривой показывает, что она проходит очень близко к верхнему левому углу графика, где доля истинно положительных проб составляет 100% (идеальная чувствительность), а доля ложноположительных проб равна 0 (идеальная специфичность). Вычисление показало, что AUC (площадь под кривой) составила 0,999. Качество модели (теста) интерпретируется как «отличное» при значениях AUC в пределах 0,9–1,0. Таким образом, проведенный ROC-анализ подтверждает высокую прогностическую способность ЗАВ-ИФА.

**Выявление антител к неструктурным белкам вируса ящура у вакцинированных животных.** Способность ЗАВ-ИФА дифференцировать инфицированных и вакцинированных животных была изучена на сыворотках крови от КРС, вакцинированного против ящура в экспериментальных условиях. Сыворотки крови были предоставлены сотрудниками лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ». В соответствии с рекомендац

*Рис. 2. Точечная диаграмма результатов в ЗАВ-ИФА для здоровых (код-0) и инфицированных (код-1) животных*



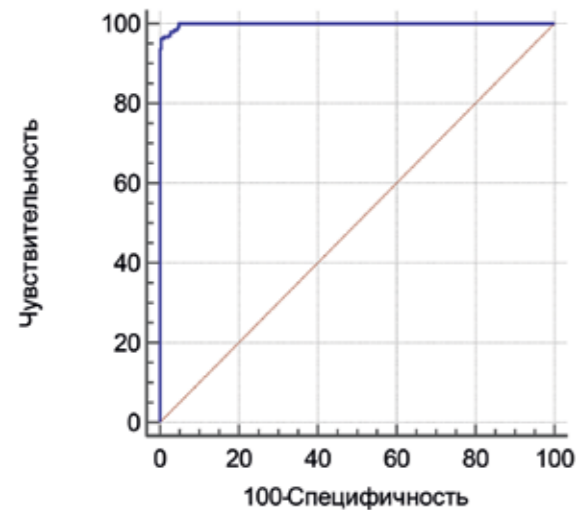


Рис. 3. ROC-кривая выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура методом ЗАВ-ИФА

ями МЭБ [12] животные были вакцинированы трижды с интервалом в 1 месяц. Кровь отбиралась до вакцинации и через 21–28 сут. после каждой вакцинации. Все 32 исследованных образца показали в ЗАВ-ИФА отсутствие антител к неструктурным белкам вируса ящура (табл. 5). При этом даже после третьей вакцинации ПП был далек от ПНП (30%) и соответствовал фоновому уровню.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что ЗАВ-ИФА способен выявлять антитела к вирусу ящура у инфицированных животных, тогда как вакцинированные против ящура животные определяются в этом тесте как серонегативные.

Интерпретация результатов ЗАВ-ИФА: ПП≥30% — положительный результат, ПП<30% — отрицательный результат.

Оценка реакции в международных сличительных испытаниях. В 2009–2014 гг. ЗАВ-ИФА применялся в международных сравнительных испытаниях по диагности-

ке ящура, организованных Всемирной референтной лабораторией по ящуру (Пирбрайт, Великобритания). В ходе испытаний был правильно определен статус всех закодированных проб сывороток крови, что подтверждает специфичность и чувствительность ЗАВ-ИФА.

Оценка реакции при проведении рутинных диагностических и мониторинговых исследований. В период 2009–2014 гг. ЗАВ-ИФА применялся в диагностических и мониторинговых исследованиях ящура. Исследования проводились в соответствии с правилами, принятыми во Всемирной референтной лаборатории по ящуру. Сначала пробы исследовались в скрининговой тест-системе, а затем все сыворотки крови, показавшие положительный результат, повторно тестировались в подтверждающей тест-системе. ЗАВ-ИФА применялся в качестве скрининговой тест-системы, как подтверждающий тест использовался коммерческий набор PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Швейцария).

В 2013–2014 гг. в рамках государственного мониторинга особо опасных болезней на наличие антител к вирусу ящура было исследовано 11 488 сывороток крови КРС и МРС из Северо-Западного федерального округа Российской Федерации, где ящур никогда не регистрировался. В ЗАВ-ИФА было получено 32 положительных результата, которые не подтвердились при перепроверке в тест-системе PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Швейцария). Таким образом, при проведении мониторинговых исследований диагностическая специфичность ЗАВ-ИФА составляла 99,7%.

В ряде случаев ЗАВ-ИФА применялся для тестирования животных из очагов ящура с целью подтверждения клинического диагноза на заболевание. На наличие антител к вирусу ящура было исследовано 27 проб сывороток крови от КРС из п. Молодежный Забайкальского края, где в марте 2013 г. был зарегистрирован ящур. Положительными в ЗАВ-ИФА были 12 из 17 проб, отобранных 17 марта 2013 г. (начало вспышки), и 10 из 10 проб, отобранных 10 апреля 2013 г. В подтверждающем тесте положительными были 13 из 17 проб от 17.03.2013 и 10 из 10 проб — от 10.04.2013.

В июне 2014 г. в с. Гродеково Амурской области в очаге ящура были отобраны 8 проб сывороток крови. Из них 6 показали в ЗАВ-ИФА положительный результат. В подтверждающем тесте положительными были также 6 из 8 проб.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Валидация ЗАВ-ИФА была проведена в соответствии с рекомендациями МЭБ, т.е. были проведены все требуемые процедуры: оптимизированы реагенты и протокол реакции, оценена воспроизводимость результатов реакции, определены аналитическая и диагностическая специфичность и чувствительность метода, проведена оценка реакции при проведении рутинных диагностических исследований.

Проведенные исследования показали, что в оптимизированном варианте ЗАВ-ИФА обеспечивает высокий уровень схожимости и воспроизводимости результатов: коэффициент вариации составлял менее 10%.

Диагностическая специфичность ЗАВ-ИФА на панели из 1280 сывороток крови составляла 99,8%, что сравнимо с зарубежными тест-системами для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура [5–7, 11].

Диагностическая чувствительность ЗАВ-ИФА на панели из 322 сывороток крови от КРС и МРС, экспери-

ментально инфицированного ящуром, составила 96,6%. Данный (не идеальный) показатель чувствительности объясняется тем, что в панель были включены сыворотки крови, отобранные на ранних сроках после инфицирования (8–9 ДПИ). Строго говоря, такие сыворотки крови могут считаться заведомо положительными весьма условно и обычно при определении чувствительности ИФА не применяются. Так, A. Dekker с соавт. (2008) и С. Не с соавт. (2010) при валидации NSP-ИФА использовали как заведомо положительные сыворотки крови, отобранные на 21 ДПИ [4, 11]. Если сыворотки крови, отобранные на 8–9 ДПИ, исключить из панели заведомо положительных проб, чувствительность ЗАВ-ИФА будет составлять 100%.

ROC-анализ, проведенный с использованием программы MedCalc, подтвердил правильность выбранного значения ПНП реакции и высокую прогностическую способность ЗАВ-ИФА.

Способность выявлять антитела ко всем серотипам вируса ящура — не единственное преимущество ИСП-ИФА перед традиционным типоспецифическим ИФА. Эта технология при определенных условиях позволяет дифференцировать инфицированных и вакцинированных животных. Пригодность для этих целей ЗАВ-ИФА была продемонстрирована на сыворотках от КРС, вакцинированного в экспериментальных условиях в соответствии с рекомендациями МЭБ по контролю «чистоты» вакцины. Все животные после 3-кратной вакцинации были серонегативными в ЗАВ-ИФА.

Таким образом, результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что ЗАВ-ИФА способен с высокой специфичностью и чувствительностью выявлять антитела к вирусу ящура у инфицированных животных, тогда как вакцинированные против ящура животные определяются в этом тесте как серонегативные. Это подтверждает возможность использования ЗАВ-ИФА в качестве DIVA-теста, т.е. для дифференциации инфицированных вирусом ящура животных от вакцинированных. Необходимо отметить, однако, что это возможно только при условии, что применявшаяся противоящурная вакцина соответствует требованиям МЭБ на отсутствие неструктурных белков вируса ящура в своем составе.

Согласно международным требованиям валидация диагностического метода не должна ограничиваться серией экспериментов, оценка метода проводится все время, пока он применяется в исследованиях. В наших условиях такая постоянная оценка ЗАВ-ИФА проводилась в ежегодных международных сличительных испытаниях по диагностике ящура и в рутинных диагностических и мониторинговых исследованиях.

В ходе международных сличительных испытаний с применением ЗАВ-ИФА был правильно определен статус всех закодированных проб сывороток крови, что подтверждает высокую специфичность и чувствительность метода.

Рутинные диагностические исследования показали, что ЗАВ-ИФА позволяет выявлять животных, инфицированных ящуром в естественных условиях, в том числе уже переболевших животных. Результаты мониторинговых исследований 11 488 полевых сывороток крови от КРС и МРС из Северо-Западного федерального округа РФ подтвердили высокую диагностическую специфичность метода: в ЗАВ-ИФА было получено всего 32 ложноположительных результата, т.е. специфичность реакции составляла 99,7%. Этот показатель

Таблица 5  
Результаты исследования в ЗАВ-ИФА сывороток крови КРС, вакцинированного против ящура

Сроки отбора крови	№ пробы	Результаты ЗАВ-ИФА (ПП), %
до вакцинации	1	0%
	2	0%
	3	0%
	4	0%
	5	0%
	6	0%
	7	0%
	8	0%
21 день после первой вакцинации	9	0%
	10	0%
	11	0%
	12	0%
	13	0,78%
	14	0%
	15	0%
	16	1,37%
27 дней после второй вакцинации	17	0,3%
	18	2,93%
	19	1,73%
	20	0%
	21	0%
	22	1,02%
	23	3,41%
	24	0%
28 дней после третьей вакцинации	25	1,02%
	26	0%
	27	0,06%
	28	0,78%
	29	1,37%
	30	0,30%
	31	1,14%
	32	0%

Интерпретация результатов ЗАВ-ИФА: ПП≥30% — положительный результат, ПП<30% — отрицательный результат.

был очень близок к значению диагностической специфичности, установленному на этапе разработки метода (99,8%).

Таким образом, в процессе рутинных диагностических исследований подтвердились характеристики ЗАВ-ИФА (высокая чувствительность и специфичность), установленные на этапе разработки метода.

Таблица 4  
Результаты исследований в ЗАВ-ИФА сывороток крови КРС, экспериментально зараженного вирусом ящура

Дни после инфицирования	Результаты ЗАВ-ИФА (положит./исследован.)			
	тип А	тип О	тип Азия-1	Всего
0	0/16	0/10	0/5	0/31
8	11/16	5/9	5/5	21/30
9	16/16	8/10	5/5	29/31
10	16/16	10/10	5/5	31/31
11	16/16	10/10	5/5	31/31
12	16/16	10/10	5/5	31/31
13	16/16	10/10	5/5	31/31
14	16/16	10/10	5/5	31/31
15	16/16	10/10	5/5	31/31
16	16/16	10/10	5/5	31/31
17	16/16	10/10	5/5	31/31

**ВЫВОДЫ**

1. Проведена валидация ЗАВ-ИФА, предназначенного для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови крупного и мелкого рогатого скота.
2. Результаты валидации доказывают, что ЗАВ-ИФА способен с высокой точностью, специфичностью и чувствительностью выявлять антитела к вирусу ящура у инфицированных животных.
3. Вакцинированные против ящура животные определяются в ЗАВ-ИФА как серонегативные при условии, что вакцина соответствует требованиям МЭБ на отсутствие неструктурных белков вируса ящура.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Рекомбинантные неструктурные белки 3А, 3В и ЗАВ вируса ящура: использование для дифференциации вакцинированного и инфицированного крупного рогатого скота / А.С. Яковлева, А.В. Щербаков, А.В. Каньшина [и др.] // Мол. биология. — 2006. — Т. 40, № 1. — С. 165–171.
2. Яковлева А.С. Разработка и применение иммуноферментной тест-системы для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови крупного рогатого скота: дис. ... канд. биол. наук. — Владимир, 2005. — 110 с.
3. An overview on ELISA techniques for FMD / L.N. Ma, J. Zhang, H.T. Chen [et al.] // Virol. J. — 2011. — Vol. 8. — URL: <http://www.virologyj.com/content/8/1/419> (дата обращения: 23.03.15).
4. A recombinant truncated FMDV 3AB protein used to better distinguish between infected and vaccinated cattle / C. He, H. Wang, Y. Yan [et al.] // Vaccine. — 2010. — Vol. 28. — P. 3435–3439.
5. Comparative evaluation of non-structural protein-antibody detecting ELISAs for foot-and-mouth disease sero-surveillance under intensive vaccination / G.K. Sharma, J.K. Mohapatra, S. Mahajan [et al.] // J. Virol. Methods. — 2014. — Vol. 207. — P. 22–28.
6. Comparative evaluation of the six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus / E. Brocchi, I.E. Bergmann, A. Dekker [et al.] // Vaccine. — 2006. — Vol. 24. — P. 47–48.
7. Comparison of sensitivity and specificity in three commercial foot-and-mouth disease virus non-structural proteins ELISA kits with swine sera in Taiwan / S.P. Chen, T.M. Ellis, M.C. Lee [et al.] // Vet. Microbiol. — 2007. — Vol. 119. — P. 164–172.
8. Foot-and-mouth disease. — URL: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.01.05\\_FMD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.05_FMD.pdf) (дата обращения: 21.04.15).
9. Jacobson R.H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases // Rev. Sci. Tech. OIE. — 1998. — Vol. 17, № 2. — P. 469–486.
10. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infection disease. — URL: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/1.01.05\\_VALIDATION.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf) (дата обращения: 23.03.15).
11. Use of continuous results to compare ELISAs for the detection of antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus / A. Dekker, D. Sammin, M. Greiner [et al.] // Vaccine. — 2008. — Vol. 26. — P. 2723–2732.
12. [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI).
13. [http://www.wrlfmd.org/fmd\\_genotyping/](http://www.wrlfmd.org/fmd_genotyping/).

УДК 619:616.98:578.821.2:616-076

# РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНОДИАГНОСТИКИ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА В ДАГЕСТАНЕ И ЧЕЧЕНСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ — ПЕРВОЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ БОЛЕЗНИ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

М.В. Бирюченкова<sup>1</sup>, А.М. Тимина<sup>2</sup>, Н.Г. Зиняков<sup>3</sup>, А.В. Щербаков<sup>4</sup><sup>1</sup> научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chelysheva@arriah.ru<sup>2</sup> старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: timina@arriah.ru<sup>3</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zinyakov@arriah.ru<sup>4</sup> заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: ascherbakov@arriah.ru**РЕЗЮМЕ**

В сентябре 2015 г. в Республике Дагестан и Чеченской Республике у крупного рогатого скота было зарегистрировано заболевание с клиническими признаками, характерными для нодулярного дерматита (заразного узелкового дерматита КРС, бугорчатки). В референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ» была проведена лабораторная диагностика, и методом полимеразой цепной реакции в патматериале от больных животных обнаружен вирус нодулярного дерматита. Секвенирование продуктов ПЦР подтвердило видовую принадлежность выявленного вируса. Проведенные исследования являются первым официальным подтверждением нодулярного дерматита на территории Российской Федерации.

**Ключевые слова:** нодулярный дерматит (заразный узелковый дерматит КРС), вирус бугорчатки, полимеразная цепная реакция.

UDC 619:616.98:578.821.2:616-076

# RESULTS OF GENE DIAGNOSIS OF LUMPY SKIN DISEASE IN THE DAGESTAN AND CHECHEN REPUBLICS — THE FIRST OFFICIAL CONFIRMATION OF THE DISEASE OCCURRENCE IN THE RUSSIAN FEDERATION TERRITORY

M.V. Biryuchenkova<sup>1</sup>, A.M. Timina<sup>2</sup>, N.G. Zinyakov<sup>3</sup>, A.V. Scherbakov<sup>4</sup><sup>1</sup> Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chelysheva@arriah.ru<sup>2</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: timina@arriah.ru<sup>3</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: zinyakov@arriah.ru<sup>4</sup> Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: ascherbakov@arriah.ru**SUMMARY**

In September 2015 a disease with clinical signs characteristic of lumpy skin disease (bovine contagious nodular dermatitis) was registered in cattle in the Republic of Dagestan and Republic of Chechnya. Laboratory diagnosis was carried out in the Reference Laboratory for highly dangerous animal diseases of the FGBI «ARRIAH». Lumpy skin disease virus was detected by polymerase chain reaction (PCR) in samples from the diseased animals. Sequencing of the PCR products confirmed the detected virus identification results. The above-mentioned tests were the first official confirmation of lumpy skin disease occurrence in the territory of the Russian Federation.

**Key words:** lumpy skin disease (bovine contagious nodular dermatitis), lumpy skin disease virus, polymerase chain reaction.

**ФГБУ ВНИИЗЖ ПРОИЗВОДИТ****Вакцины против овец и коз:**

- вирусвакцина против оспы овец культуральная сухая.
- вирусвакцина против оспы коз культуральная сухая.
- вирусвакцина против оспы овец и оспы коз культуральная сухая.

**Чумы мелких жвачных животных**

- вирусвакцина против чумы мелких жвачных культуральная сухая.

Вакцины предназначены для профилактической иммунизации овец и коз против оспы и ЧМЖ в неблагополучных и угрожаемых пунктах и хозяйствах.

**ДИАГНОСТИКА ОСПЫ:**

Диагноз на оспу ставят на основании анализа эпизоотологических, клинических, электронной микроскопии, патологоанатомических данных и результатов лабораторных исследований, включая биопробу.

Серологический метод диагностики основан на выявлении в сыворотке крови при помощи реакции нейтрализации антител к антигену вируса оспы. Применяют так же другие реакции: связывания комплемента (РСК), иммунофлуоресценции (РИФ), иммуноферментного анализа (ИФА). Для выявления возбудителя в пробах биоматериала используют полимеразно цепную реакцию (ПЦР), реакцию диффузной преципитации (РДП).

**ДИАГНОСТИКА ЧМЖ**

- диагностика путем идентификации вируса, его антигена (РСК, РДП, РТГА, РИФ), специфических антител (РСК, РН в культуре клеток) и вирусспецифических изменений в ткани (внутриядерные и цитоплазматические включения);
- серологическая диагностика, основанная на выявлении в сыворотке крови при помощи ИФА антител к антигену вируса ЧМЖ;
- идентификация генома возбудителя с помощью ОТ-ПЦР.

**Сектор продаж ветеринарных препаратов на территории РФ 8-4922-26-15-25, 26-15-51 (доб. 2536)**

**По вопросам проведения исследований обращаться по тел.: 8-4922-26-15-25 (доб.2135)**