

О ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ ТЕСТА ПО ВЫЯВЛЕНИЮ СЕКРЕТОРНЫХ IgA ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ОТСУТСТВИЯ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА ЯЩУРА

Д.Н. АФОНИНА, Н.Е. КАМАЛОВА, А.В. КАНЬШИНА, А.М. ТИМИНА

В России среди протективных и превентивных мер против ящура доминирует вакцинопрофилактика. Однако не исключено развитие субклинической инфекции у иммунных животных, которые становятся вирусоносителями и составляют потенциальную угрозу для восприимчивого поголовья. Поэтому разработка и внедрение в практику тестов для выявления животных-вирусоносителей сохраняют актуальность. Секреторные иммуноглобулины А (sIgA) обеспечивают первую линию защиты против многих возбудителей инфекций, способны ингибировать внутриклеточную репликацию вируса, служат медиатором нейтрализации вирусов. По сообщениям зарубежных авторов, существует возможность идентификации животных-вирусоносителей с помощью экспресс-теста на основе иммуноферментного анализа, выявляющего секреторные IgA (sIgA-ИФА). Ранее нами были определены оптимальные условия sIgA-ИФА для выявления вирусоспецифических sIgA в образцах слюны в одном разведении. В настоящей работе представлены результаты апробации и испытаний тест-системы sIgA-ИФА («сэндвич»-вариант) в сравнении с другими лабораторными методами. Приведены данные исследования биологических образцов от крупного рогатого скота (96 гол., живая масса 200-300 кг, возраст 18-24 мес) из благополучных по ящуру сельскохозяйственных предприятий (Владимирская обл.) до и после вакцинации, иммунизированных различными сериями противоящурной вакцины и подвергнутых экспериментальному заражению. Образцы слюны, сыворотки крови и пищеводно-глоточной жидкости (ПГЖ), полученные с интервалом через 3-4 сут и до 94-х сут после заражения, исследовали с использованием sIgA-ИФА, НБ-ИФА (определение антител к неструктурным белкам вируса), реакции микронейтрализации вируса (РНН) и ПЦР-РВ-анализа. Кроме того, оценили относительную чувствительность, специфичность и точность теста по формулам, рекомендованным International Epizootic Bureau (IEB — Международное эпизоотическое бюро, МЭБ) и сравнили с итогами референтного теста, выполненного Satya Parida (World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease — WRLFMD, Pirbright Institute, Great Britain) по валидированной методике. Из пяти предварительно иммунизированных и затем инфицированных животных без клинических проявлений патологии у одного (№ 8895) наличие sIgA с помощью sIgA-ИФА выявили в образце слюны на 18-е сут после заражения при ПП (процент позитивности) = $53,00 \pm 0,05$ % и в последующие сроки (с 21-х до 94-х сут) — при значениях ПП от $41,00 \pm 0,11$ до $115,00 \pm 0,41$ %. Полученные данные были подтверждены в РМН (титр sIgA на 18-е сут — $1,20 \pm 0,05$ lg, в период с 21-х по 46-е сут — до $1,58 \pm 0,08$ - $1,90 \pm 0,13$ lg). При этом в РМН отмечали существенные колебания значений, что нежелательно для идентификационного теста. В НБ-ИФА результаты обнаружения антител к неструктурным белкам ВЯ с 18-х по 94-е сут были положительными. В ПЦР РНК ВЯ выявляли в пробах ПГЖ с 28-х по 60-е сут после экспериментального заражения, но sIgA-ИФА давал более однозначные результаты, чем ПЦР. Для другого животного (№ 8898) также подтверждена скрытая форма инфекции. Таким образом, показано, что предложенная тест-система на основе непрямого «сэндвич»-варианта ИФА для определения sIgA к вирусу ящура в образцах слюны крупного рогатого скота по диагностическим характеристикам позволяет идентифицировать животных-вирусоносителей. По результатам исследования 91 образца слюны чувствительность разработанной тест-системы относительно референтной (WRLFMD) составила 100 %, относительная специфичность — 97,7 %, точность — 99,0 %. На основании параметров к-статистики ($\kappa = 0,99$) подтверждена высокая сходимость результатов для двух тест-систем.

Ключевые слова: ящур, секреторный иммуноглобулин А, иммуноферментный анализ, вирусоносительство, поствакцинальный контроль.

Известно, что секреторные иммуноглобулины А (sIgA) обеспечивают первую линию защиты против многих возбудителей инфекций (1). В секретах sIgA, связавшись с бактериями и вирусами, предотвращают их адгезию на поверхности слизистой оболочки, а в высоких концентрациях блокируют прикрепление вируса к клеточной стенке. В то же время низкие концентрации полимерных sIgA способны ингибировать внутриклеточную репликацию вируса, не оказывая при этом заметного влияния на

его адгезивные свойства. sIgA служат медиатором нейтрализации вирусов (после нейтрализации вируса sIgA, возможно, способствуют элиминации вируса), а также стимулируют фагоцитоз, обеспечивая тем самым местную резистентность к инфекции. Предполагается, что увеличение содержания sIgA в крови связано не только с повреждением эпителия, но и с усилением его образования в поврежденных органах (2). Информация о разработке тестов, предназначенных для обнаружения специфических sIgA, свидетельствует о возможности применения этого феномена в комплексе мониторинговых исследований в отношении ящура (3, 4).

В России среди оперативных и превентивных мер борьбы с ящуром как особо опасной для животноводства инфекцией доминирует вакцинопрофилактика. Однако не исключены случаи развития субклинической инфекции, вызванной вирусом ящура (ВЯ) у иммунных животных, которые впоследствии становятся вирусоносителями. В связи с этим вирусоносители составляют потенциальную угрозу для восприимчивых животных, поэтому возникает необходимость их идентификации и изоляции, чтобы исключить дальнейшее распространение инфекции (5).

Для выявления животных-вирусоносителей референтным считается метод выделения вируса ящура из проб пищеводно-глоточной жидкости (ПГЖ) в чувствительных культурах клеток (6). Однако острая фаза репликации вируса может быть непродолжительной при отсутствии клинических признаков, поэтому вероятность его обнаружения мала. Для выявления вирусного генома в ПГЖ даже в малых количествах используют высокочувствительную и специфичную ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). В то же время у этого метода существует ряд недостатков. Так, возможны ложноположительные результаты из-за наличия неспецифических ингибиторов, кроме того, в ПЦР амплифицируется даже разрушенный геном вируса, утратившего инфекционность (7).

Есть сообщения об обнаружении геномного материала ВЯ в эпителиальных клетках глотки с помощью гибридизации *in situ*, но при массовом скрининге после экстренной вакцинации этот трудоемкий подход неудобен для практического использования. Установлено, что при ящуре в организме животного образуются антитела как к структурным, так и к неструктурным белкам ВЯ, тогда как инактивированная вакцина индуцирует антитела только к структурным белкам. В связи с этим практическое применение получил серологический метод по определению антител к неструктурным белкам (НБ), или так называемые НБ-тесты. Однако их точность при определении антител в сыворотках крови животных зависит от качества коммерческой вакцины или от наличия НБ, а также от количества антигена в вакцине и от частоты вакцинации (8-11). Следовательно, сохраняется актуальность разработки альтернативных или дополнительных методов обнаружения субклинической инфекции ящура среди вакцинированных животных (12).

По сообщениям зарубежных авторов, существует возможность идентификации животных-вирусоносителей с помощью экспресс-теста на основе иммуноферментного анализа, выявляющего sIgA (так называемый sIgA-ИФА) (3, 4, 12). Ранее мы определили оптимальные условия ИФА для обнаружения вирусоспецифических sIgA в образцах слюны в одном разведении (14).

Целью этой работы стала апробация и сравнительные испытания тест-системы sIgA-ИФА для обнаружения животных-вирусоносителей.

Методика. В эксперименте использовали крупный рогатый скот (КРС) (96 гол., живая масса 200-300 кг, возраст 18-24 мес) из благополучных по ящуру сельскохозяйственных предприятий (Владимирская обл.), в

которых не проводилась вакцинация против этой инфекции. Животных иммунизировали подкожно в среднюю треть шеи моновалентной сорбированной противоящурной вакциной (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия), изготовленной на основе ВЯ типа О (штамм Pan Asia 2), выращенного в клетках ВНК-21 (СТО 00495527-0143-2010), иммуногенность которой, по данным теста на иммуногенность для КРС, составляла, согласно Европейской фармакопеи (15), не менее 6 PD₅₀. Спустя 28 сут после вакцинации КРС заражали штаммом ВЯ О № 2108 Забайкальский/2010 в две точки интрадермолингвально в дозе 10⁴ ИД₅₀ в 0,2 см³ (контролем служили невакцинированные зараженные животные) и до 94-х сут (с интервалом 3-4 сут) получали образцы слюны (16), пищеводно-глоточной жидкости (ПГЖ) (17) и сыворотки крови (общепринятым способом). У животных, инфицированных после иммунизации и не проявлявших клинических признаков заболевания, биологический материал отбирали с 18-х сут после заражения в течение 2,5 мес с той же периодичностью. Результаты учитывали на 8-е сут после контрольного заражения. Опыты на животных проводили в экспериментальных условиях на базе вивария Федерального центра охраны здоровья животных.

Постановку ИФА (непрямой «сэндвич»-вариант) осуществляли, как описано (18). Методом одного разведения в ИФА оценивали значение процента позитивности (ПП) (14) (ПП ≥ 40 % считали положительными).

Антитела к неструктурным белкам ВЯ определяли, как описано (19). Для выделения вируса пользовались методикой, утвержденной Департаментом ветеринарии МСХ РФ (10.11.2002). Реакцию микронеutralизации вируса (РН) выполняли согласно указаниям (6), полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) — в соответствии с рекомендациями (20).

Относительную чувствительность, специфичность и точность теста оценивали по формулам, рекомендованным International Epizootic Bureau (IEB — Международное эпизоотическое бюро, МЭБ) (12):

$$\text{Относительная чувствительность } Se = \frac{a}{a + c} \times 100 \%, \quad [1]$$

$$\text{Относительная специфичность } Sp = \frac{d}{b + d} \times 100 \%, \quad [2]$$

где a — истинно положительные; b — ложноположительные образцы; c — ложноотрицательные; d — истинно отрицательные образцы.

При статистической обработке данных были использованы общепринятые методы, рекомендованные И.П. Ашмариним и соавт. (1975), и компьютерная программа MS Excel 2003.

Результаты. При экспериментальном заражении ящуром вакцинированных животных генерализацию заболевания (вторичные афты на конечностях) не отмечали (имелись лишь первичные афты на языке), у невакцинированных во всех случаях наблюдались ящурные поражения на конечностях и образование афт на языке.

Всего исследовали 96 образцов слюны от интактного КРС, 40 — от вакцинированных, 5 — от инфицированных спустя 21 сут после вакцинации и 96 — от инфицированных животных. В слюне от интактных и вакцинированных животных до экспериментального заражения противоящурные sIgA не выявили. После инфицирования у КРС с клиническими признаками ящура sIgA обнаруживались спустя 5-6 сут, на 8-е сут и на 10-11-е сут, что согласуется с результатами других исследователей (6).

В опыте на КРС, предварительно иммунизированном вакциной из штамма ВЯ О Pan Asia 2 с последующим экспериментальным заражением штаммом ВЯ О № 2108 Забайкальский/10, отобрали также пять особей без

клинических признаков ящура. Было установлено (данные не опубликованы) близкое антигенное родство штамма ВЯ О № 2108/Забайкальский/2010 со штаммом О Pan Asia 2 (показатель антигенного родства $r_1 = 0,42-0,47$). У этих животных выделение ВЯ из образцов ПГЖ в чувствительных культурах клеток — первичной (почка поросенка СП) и перевиваемых (почка поросенка IB-RS-2 и почка горного козерога ПСГК-30), а также последующие слепые пассажи положительных результатов не дали. Из пяти обследованных животных у одного (№ 8895) наличие sIgA с помощью sIgA-ИФА выявили в образце слюны на 18-е сут после заражения при ПП = $53,00 \pm 0,05$ % и в последующие сроки (с 21-х до 94-х сут) — при значениях ПП от $41,00 \pm 0,11$ до $115,00 \pm 0,41$ %. Исходя из результатов теста, концентрация sIgA в слюне животного увеличивалась до 67-х сут (ПП = $115,00 \pm 0,41$ %, $OD_{405} = 1,20 \pm 0,14$ о.е.), затем незначительно уменьшалась и сохранялась до конца наблюдения (на 94-е сут ПП = $71,00 \pm 0,02$ %, $OD_{405} = 0,91 \pm 0,14$ о.е.).

Полученные данные были подтверждены при исследовании образцов слюны в РМН: титр sIgA на 18-е сут равнялся $1,20 \pm 0,05$ lg, в период с 21-х по 46-е сут составлял до $1,58 \pm 0,08-1,90 \pm 0,13$ lg, дважды достигая максимума ($1,90 \pm 0,13$ lg) (табл. 1), но при этом с 32-х по 53-и сут оказался низкими ($1,07 \pm 0,09-1,40 \pm 0,10$ lg) и имел значения, указывающие на отрицательные результаты теста (см. табл. 1). В завершающий период (после 60-х сут) титр sIgA в целом повышался до $1,50 \pm 0,05-1,90 \pm 0,13$ lg, дважды достигая максимума (см. табл. 1). Анализ результатов определения sIgA в образцах слюны с помощью РМН свидетельствует о существенном колебании значений (как положительные, так и отрицательные), что нежелательно для идентификационного теста.

1. Сравнение динамики накопления антител к вирусу ящура и генома вируса в образцах патологического материала от экспериментально зараженного крупного рогатого скота при исследовании разными методами ($M \pm m$)

Срок отбора образцов после заражения, сут	Слюна		ПГЖ в ПЦР	Сыворотка крови		
	sIgA-ИФА, ПП %	РМН, lg		НБ-ИФА	ИФА, lg	РМН, lg
Животное № 8895 ($n = 3$)						
18	$53,00 \pm 0,05$	$1,20 \pm 0,05$	+	+	$2,71 \pm 0,15$	$2,56 \pm 0,05$
21	$54,00 \pm 0,19$	$1,85 \pm 0,05$	-	+	$2,48 \pm 0,08$	$2,70 \pm 0,05$
28	$86,00 \pm 0,05$	$1,58 \pm 0,08$	+	+	$2,56 \pm 0,08$	$2,70 \pm 0,15$
32	$56,00 \pm 0,10$	$1,15 \pm 0,25$	+	+	$2,56 \pm 0,05$	$2,70 \pm 0,05$
35	$41,00 \pm 0,11$	$1,07 \pm 0,09$	-	+	$2,56 \pm 0,08$	$2,70 \pm 0,15$
39	$55,00 \pm 0,03$	$1,90 \pm 0,13$	+	+	$2,40 \pm 0,10$	$2,70 \pm 0,05$
42	$78,00 \pm 0,11$	$1,40 \pm 0,10$	-	+	$1,95 \pm 0,08$	$2,70 \pm 0,05$
46	$65,00 \pm 0,10$	$1,90 \pm 0,13$	+	+	$1,95 \pm 0,08$	$2,56 \pm 0,08$
49	$43,00 \pm 0,11$	$1,20 \pm 0,05$	-	+	$2,26 \pm 0,15$	$2,56 \pm 0,05$
53	$43,00 \pm 0,03$	$1,20 \pm 0,05$	+	+	$1,95 \pm 0,08$	$2,56 \pm 0,05$
56	н.и.	н.и.	+	+	$2,26 \pm 0,15$	$2,56 \pm 0,05$
60	$41,00 \pm 0,19$	$1,58 \pm 0,08$	+	+	$2,26 \pm 0,15$	$2,56 \pm 0,05$
63	$65,00 \pm 0,08$	$1,75 \pm 0,13$	-	+	$2,56 \pm 0,05$	$2,56 \pm 0,08$
67	$115,00 \pm 0,41$	$1,85 \pm 0,10$	-	+	$2,41 \pm 0,15$	$2,56 \pm 0,05$
74	$91,00 \pm 0,21$	$1,60 \pm 0,10$	-	+	$2,33 \pm 0,38$	$2,56 \pm 0,05$
81	$56,00 \pm 0,10$	$1,90 \pm 0,13$	-	+	$2,41 \pm 0,15$	$2,56 \pm 0,05$
88	$88,00 \pm 0,51$	$1,80 \pm 0,10$	-	+	$2,56 \pm 0,05$	$2,70 \pm 0,05$
91	$78,00 \pm 0,02$	$1,90 \pm 0,13$	-	+	$2,70 \pm 0,05$	$2,40 \pm 0,10$
94	$71,00 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,05$	-	+	$2,70 \pm 0,05$	$2,56 \pm 0,05$
Животное № 8898 ($n = 3$)						
18	$8,00 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,15$	-	+	$3,38 \pm 0,08$	$2,70 \pm 0,05$
21	$10,00 \pm 0,05$	н.и.	+	+	$3,23 \pm 0,07$	$2,70 \pm 0,15$
28	$26,00 \pm 0,09$	$1,60 \pm 0,05$	+	+	$3,00 \pm 0,05$	$2,70 \pm 0,08$
32	$64,00 \pm 0,10$	$1,27 \pm 0,12$	+	+	$2,86 \pm 0,15$	$2,70 \pm 0,05$
35	$56,00 \pm 0,04$	$1,60 \pm 0,15$	+	+	$3,00 \pm 0,05$	$2,70 \pm 0,05$
39	$68,00 \pm 0,05$	$1,65 \pm 0,10$	+	+	$2,86 \pm 0,15$	$2,70 \pm 0,08$
42	$47,00 \pm 0,11$	$1,20 \pm 0,05$	+	+	$2,26 \pm 0,31$	$2,70 \pm 0,15$
46	$31,00 \pm 0,15$	$1,50 \pm 0,05$	+	+	$2,56 \pm 0,08$	$2,70 \pm 0,08$

49	83,00±0,13	1,95±0,15	+	+	2,86±0,15	2,70±0,08
53	70,00±0,16	1,95±0,05	-	+	2,40±0,21	2,70±0,08
56	46,00±0,10	1,80±0,10	-	+	2,86±0,15	2,70±0,15
60	77,00±0,02	1,65±0,15	-	+	2,70±0,05	2,70±0,08
63	73,00±0,16	1,73±0,08	-	+	3,46±0,05	2,70±0,05
67	66,00±0,15	1,50±0,05	-	+	н.и.	2,70±0,08
74	75,00±0,24	1,95±0,15	-	+	2,63±0,37	2,56±0,05
81	68,00±0,15	1,80±0,10	-	+	2,78±0,38	2,56±0,05
88	81,00±0,15	н.и.	-	+	3,46±0,05	2,70±0,15
91	114,00±0,11	н.и.	-	+	3,00±0,05	2,40±0,10
94	89,00±0,13	н.и.	-	+	2,86±0,08	2,40±0,15

Примечание. *M* — среднее, *m* — стандартная ошибка среднего; н.и. — не исследовали; «+» и «-» — соответственно положительный и отрицательный результат; ИФА — иммуноферментный анализ, НБ-ИФА — определение антител к неструктурным белкам вируса, ПП — процент позитивности, РМН — реакция микронейтрализации, ПГЖ — пищеводно-глоточная жидкость.

В НБ-ИФА результаты обнаружения антител к неструктурным белкам ВЯ с 18-х по 94-е сут были положительными. В ПЦР РНК ВЯ выявляли в пробах ПГЖ с 28-х по 60-е сут после экспериментального заражения, хотя и не во все сроки. Иными словами, при исследовании слюны sIgA-ИФА давал более однозначные результаты, чем ПЦР. К подобным экспериментальным выводам пришли и другие авторы (5). Согласно полученным данным, это обследованное животное находилось в состоянии вирусносительства, что в производственных условиях должно сопровождаться его немедленной изоляцией.

Результаты комплексного исследования образцов биологического материала от другого животного (№ 8898) также наглядно свидетельствовали о скрытой форме инфекции (см. табл. 1). Так, с 32-х сут после экспериментального заражения в слюне с помощью sIgA-ИФА обнаруживали вирусспецифические sIgA с ПП = 64,00±0,10 %. Во все последующие сроки в sIgA-ИФА получали положительные значения ПП — от 46,00±0,10 до 114,00±0,11 %. В РМН титры противоящурных секреторных антител составляли в основном 1,60±0,10 lg, к 49-м сут достигая 1,95±0,15 lg и сохраняясь до 63-х сут в пределах значений 1,65-1,95 lg. Далее происходило уменьшение титров, что сопровождалось некоторым снижением ПП, но с 74-х сут и до конца наблюдения количество sIgA, выявляемое в слюне как в ИФА, так и в РМН, возрастало (см. табл. 1). В НБ-ИФА постинфекционные антитела обнаружили во всех образцах слюны во все сроки. Кроме того, при исследовании проб ПГЖ в ПЦР реакция была положительной на 21-49-е сут после экспериментального заражения. Следует отметить, что у всех инфицированных животных в сыворотке крови определяли высокий уровень вируснейтрализующих антител независимо от формы развития инфекции (персистентная или типичная), причем в течение всего периода наблюдений существенных различий не установили. Это обстоятельство еще раз продемонстрировало, что выявление вируснейтрализующих антител в сыворотке крови не подходит для идентификации животных-вирусоносителей.

У животного № 8896 sIgA были выявлены в ИФА на 74-94-е сут после инфицирования, в РМН — на 81-94-е сут (титр 1,80-1,95 lg). Тем не менее, результаты ПЦР-анализа на наличие РНК ВЯ для образцов ПГЖ, отобранные в период с 21-х по 94-е сут, оказались отрицательными. Можно предположить, что содержание животных совместно с вирусносителями в одном боксе в течение 2 мес послужило причиной повторного контактного инфицирования.

При исследовании двух других животных (№ 8897 и № 8899) по описанной схеме их не идентифицировали как вирусносителей. На основании анализа образцов слюны и ПГЖ у животного № 8897 не представ-

ляется возможным сделать вывод о вирусоносительстве, так как sIgA не были обнаружены ни в sIgA-ИФА, ни в РМН, а в ПЦР РНК ВЯ выявлялась только с 18-х по 32-е сут (вероятно, вследствие экспериментального заражения). У особи № 8899 в слюне с помощью sIgA-ИФА секреторные иммуноглобулины были выявлены только на 21-е сут, но результаты исследования образцов слюны в РМН не подтвердили наличия вирусоспецифических sIgA (титр < 0,9-1,2±0,005 lg). При этом в ПГЖ с 18-х по 32-е сут, а также на 46-е и 49-е сут с помощью ПЦР детектировали РНК ВЯ.

Таким образом, на основании полученных данных нами было сделано заключение об идентификации двух животных (№ 8895 и № 8898), инфицированных после вакцинации, как вирусоносителей.

Для оценки результатов исследований и в связи с отсутствием их подтверждения референтным методом выделения ВЯ из проб ПГЖ в культуре клеток данные, полученные с применением тест-системы sIgA-ИФА ФГБУ «ВНИИЗЖ», сравнили с итогами референтного теста, выполненного Satya Parida (World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease — WRLFMD, Pirbright Institute, Great Britain) по валидированной методике (6) с теми же образцами слюны. Специфичность валидированного sIgA-ИФА составляла 97,1 % при пороговом значении OD₄₀₅ = 0,47; с увеличением порогового значения до 0,60 показатель специфичности теста повышался до 99,4 % (6). При сравнении чувствительности и специфичности разработанной нами тест-системы относительно тест-системы WRLFMD образцы, не проверенные одним из методов, исключали, сомнительные идентифицировали как положительные. По результатам исследования 91 образца слюны чувствительность разработанной тест-системы относительно референтной (WRLFMD) составила 100 %, относительная специфичность — 97,7 %, точность — 99,0 %.

Кроме того, на основании сравнения результатов исследования образцов слюны, полученных с помощью тест-систем sIgA-ИФА ФГБУ «ВНИИЗЖ» и WRLFMD (табл. 2), определили κ-критерий (κ-статистика), характеризующий согласованность результатов для двух тест-систем.

2. Согласованность результатов применения иммуноферментных тест-систем World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease (WRLFMD) и ФГБУ «ВНИИЗЖ» для выявления противоящурных sIgA в образцах слюны крупного рогатого скота

WRLFMD ФГБУ «ВНИИЗЖ»	Положительный	Отрицательный	Всего	Выявленная превалентность
Положительный	$a = 47$	$b = 1$	$a + b = 48$	$(a + b)/n = 48/91 = 0,53$
Отрицательный	$c = 0$	$d = 43$	$c + d = 43$	$(c + d)/n = 43/91 = 0,47$
Всего	$a + c = 47$	$b + d = 44$		
Выявленная превалентность	$(a + c)/n = 47/91 = 0,52$ $(b + d)/n = 44/91 = 0,48$			$n = 91$

Примечание. a — истинно положительные; b — ложноположительные образцы; c — ложноотрицательные; d — истинно отрицательные образцы; n — размер выборки.

Показатель абсолютной согласованности результатов sIgA-ИФА $(a + d)/n$ составил $(47 + 43)/91 = 0,99$; случайной согласованности положительных результатов — $0,52 \times 0,53 = 0,28$; случайной согласованности отрицательных результатов — $0,48 \times 0,47 = 0,23$; обобщенной случайной вероятности согласованности результатов — $0,28 \times 0,23 = 0,06$; наблюдаемой согласованности результатов без учета случайностей — $0,99 - 0,06 = 0,93$; неслучайной максимально возможной согласованности методов — $1 - 0,06 = 0,94$; κ-критерий (κ-статистика) — $0,93/0,94 = 0,99$. Это значение κ-критерия свидетельствует об очень хорошей согласованности результатов применения двух тест-систем.

Итак, тест-система на основе непрямого «сэндвич»-варианта ИФА, предложенная нами для определения IgA к вирусу ящура в образцах слюны крупного рогатого скота, позволяет идентифицировать животных-вирусоносителей. Определены диагностические характеристики предлагаемого теста, в том числе относительно валидированного метода. Полученные данные свидетельствуют о том, что результаты тестирования с использованием указанных систем (разработанной в Федеральном центре охраны здоровья животных в России и в World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease в Великобритании) согласуются достаточно хорошо (κ -критерий = 0,99).

Авторы выражают благодарность Satya Parida (World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease, Pirbright Institute, Great Britain) за выполнение референтного теста на наличие противоящурных секреторных IgA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Avian immunology /F. Davison, B. Kaspers, K.A. Shat (eds.). Amsterdam, 2008.
2. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунная недостаточность. Выявление и лечение. М., 2003.
3. Biswal J.K., Paton D., Taylor G., Parid S. Detection of persistently foot-and-mouth disease infected cattle by salivary IgA test: Appendix 67. Proc. Conf. «The Global Control of FMD — tools, ideas and ideals» (Erice, Italy, 14-17 October 2008). Erice, 2009: 377-382.
4. Parida S., Anderson J., Cox S.J., Barnett P.V., Paton D.J. Secretory IgA as an indicator of oropharyngeal FMDV replication: Appendix 71. In: Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Chania, Crete, Greece, 2004: 440-445.
5. Mohan M.S., Gajendragad M.R., Kishore S., Chockalingam A.K., Suryanarayana V.V.S., Gopalakrishna S., Singh N. Enhanced mucosal immune response in cattle persistently infected with foot-and-mouth disease virus. Vet. Immunol. Immunopathol., 2008, 125: 337-343 (doi: 10.1016/j.vetimm.2008.05.031).
6. Parida S., Anderson J., Cox S.J., Barnett P.V., Paton D.J. Secretory IgA as an indicator of oropharyngeal foot-and-mouth disease virus replication and as a tool for post vaccination surveillance. Vaccine, 2006, 24(8): 1107-1116.
7. Grubman M.J., Baxt B. Foot-and-mouth disease. Clin. Microbiol. Rev., 2004, 17(2): 465-493 (doi: 10.1128/CMR.17.2.465-493.2004).
8. Moonen P., Jacobs L., Crienen A., Dekker A. Detection of carriers of foot-and-mouth disease virus among vaccinated cattle. Vet. Microbiol., 2004, 103(3-4): 151-160 (doi: 10.1016/j.vetmic.2004.07.005).
9. Woodbury E.L., Hott M.C., Brown C.C., Salt J.S. Optimization of an in situ hybridization technique for the detection of foot-and-mouth disease virus in bovine tissues using the digoxigenin system. J. Virol. Methods, 1995, 51: 89-93 (doi: 10.1016/0166-0934(94)00153-8).
10. Cox S.J., Joyce C., Parida S., Reid S.M., Hamblin P.A., Paton D.J., Barnett P.V. Protection against direct-contact challenge following emergency FMD vaccination of cattle and the effect on virus excretion from the oropharynx. Vaccine, 2005, 23(9): 1106-1113 (doi: 10.1016/j.vaccine.2004.08.034).
11. Parida S., Cox S.J., Reid S.M., Hamblin P., Barnett P.V., Inoue T., Anderson J., Paton D.J. The application of new techniques to the improved detection of persistently infected cattle after vaccination and contact exposure to foot-and-mouth disease. Vaccine, 2005, 23(44): 5186-5195 (doi: 10.1016/j.vaccine.2005.06.012).
12. Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A.I. Aspects of the persistence of foot-and-mouth disease virus in animals — the carrier problem. Microbes and Infection, 2002, 4: 1099-1110 (doi: 10.1016/S1286-4579(02)01634-9).
13. Fen Z.-X., Shao G.-Q., Liu M.-J., Wang H.-Y., Gan Y., Wu X.-S. Development and validation of a sIgA-ELISA for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. Vet. Microbiol., 2010, 143: 410-416.
14. Афонина Д.Н., Камалова Н.Е. Разработка тест-системы для выявления секреторных иммуноглобулинов А к вирусу ящура в образцах слюны КРС. Ветеринария и кормление, 2011, 6: 5-6.
15. Европейская фармакопея 7.0. Т. 1-3. М., 2011.
16. Афонина Д.Н., Константинов А.В., Камалова Н.Е. Методические рекомендации по отбору образцов слюны крупного рогатого скота для исследования на наличие противоящурных секреторных иммуноглобулинов А. Владимир, 2012.
17. Никифоров В.В., Кременчугская С.Р., Камалова Н.Е., Фомина Т.А., Малкова К.С. Методические указания по исследованию продуктов убоя животных

- при подозрении на ящур. Владимир, 2005.
18. Афолина Д.Н., Камалова Н.Е., Кременчугская С.Р. Методические рекомендации по выявлению противоящурных секреторных иммуноглобулинов А в слюне крупного рогатого скота с использованием иммуноферментного анализа в одном разведении. Владимир, 2011.
 19. Яковлева А.С., Щербачков А.В., Каньшина А.В. Методические указания по обнаружению антител к неструктурным белкам вируса ящура иммуноферментным методом в сыворотках крови крупного и мелкого рогатого скота. Владимир, 2008.
 20. Щербачков А.В., Тимина А.М. Методические указания по обнаружению вируса ящура методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Владимир, 2007.

ФБГУ Федеральный центр охраны здоровья животных,
600901 Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»,
e-mail: afonina@arriah.ru, kamalova@arriah.ru, kanschina@arriah.ru,
timina@arriah.ru

Поступила в редакцию
31 марта 2014 года

DIAGNOSTIC VALUE OF A TEST FOR DETECTION OF SECRETORY IgA FOR CONFIRMATION OF ABSENCE OF FMD VIRUS CIRCULATION

D.N. Afonina, N.Ye. Kamalova, A.V. Kan'hina, A.M. Timina

*Federal Centre for Animal Health, FGBU «VNIIZZh», mkr. Yur'evets, Vladimir, 600901 Russia, e-mail afonina@arriah.ru,
kamalova@arriah.ru, kanschina@arriah.ru, timina@arriah.ru
Received March 31, 2014*

doi: 10.15389/agrobiology.2014.6.73eng

Abstract

In Russia the preventive vaccination dominates over other protective and preventive measures against foot and mouth disease (FMD). However, the development of the subclinical infection in immune animals should not be ruled out as these animals become virus carriers and pose a potential threat for susceptible animal population. Therefore, the design and reduction to practice of tests for identification of virus-carrier animals continues to be relevant. Secretory immunoglobulins A (sIgA) provide the first line of protection against many infectious agents, they are capable of inhibiting virus intracellular replication and serve as a transmitter of virus neutralization. As reported by foreign authors there is a possibility to identify virus-carrier animals using a rapid ELISA-based test detecting secretory IgA (sIgA-ELISA). Previously we determined sIgA-ELISA optimal conditions for detection virus-specific sIgA in saliva samples in one dilution. In the given paper results of validation and evaluation of the sIgA-ELISA test-system («sandwich» ELISA) are shown as compared with other laboratory methods. The paper presents data on testing bovine biological samples (96 animals with body weight of 200-300 kg at the age of 18-24 months) from FMD-free agricultural enterprises (Vladimir Oblast) collected before and after vaccination from animals, immunized with different batches of FMD vaccine and subject to experimental infection. Samples of saliva, blood sera and esopharyngeal fluid collected with an interval of 3-4 days and up to 94 days after infection were tested using sIgA-ELISA, NP-ELISA (detection of antibodies to virus nonstructural proteins), microneutralization test and Real-Time PCR. Besides, relative sensitivity, specificity and accuracy of the test was evaluated using formulae recommended by the World Organisation for Animal Health (OIE) and compared with results of a reference test conducted by Satya Parida (World Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease — WRL, Pirbright Institute, Great Britain) according to a validated method. Out of five preliminary immunized and then infected animals without clinical signs one animal (№ 8895) demonstrated the presence of sIgA in saliva in sIgA-ELISA on day 18 after infection at PP (positivity percent) = 53.00 ± 0.05 % and at other dates (from 21 to 94 days) — at PP from 41.00 ± 0.11 to 115.00 ± 0.41 %. The obtained results were confirmed using the microneutralization test (sIgA titer on day 18 was 1.20 ± 0.05 lg, during a period from day 21 to day 46 the titer was 1.58 ± 0.08 - 1.90 ± 0.13 lg). At that, the microneutralization test showed significant variations in values and it is undesirable for an identification test. Results of detecting antibodies to FMD virus nonstructural proteins on day 18-94 were positive. FMD virus RNA was detected using PCR in esopharyngeal fluid samples during a period from day 28 to day 60 after experimental infection, but sIgA-ELISA showed more unambiguous results as compared with PCR. A latent infection was also confirmed in the other animal (№ 8898). Thus, it was demonstrated that the suggested test-system on the basis of indirect «sandwich» ELISA for detection of sIgA to FMD virus in bovine saliva samples made it possible to identify virus-carrier animals according to diagnostic characteristics. After considering results of testing 91 saliva samples the sensitivity of the developed test-system as compared with the reference one (WRL) was 100 %, relative specificity — 97.7 %, accuracy — 99.0 %. The high reproducibility of two test-systems was confirmed on the basis of κ -statistics ($\kappa = 0.99$).

Keywords: foot and mouth disease, secretory immunoglobulin A, solid phase immunosorbent assay, virus carrier state, post-vaccination control.