



АНО «НИИ ДПБ»

г. Москва

**Верховский О. А.,
профессор**

**Новые разработки в области
иммуноферментной диагностики и
эпизоотологического мониторинга
инфекционных и инвазионных болезней
животных**

Применение ИФА для диагностики инфекционных болезней животных (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2007*)

- **ящур**
- **везикулярный стоматит**
- **чума крупного рогатого скота**
- **африканская и классическая чума свиней**
- **блютанг**
- **болезнь Ауески**
- **бруцеллез к.р.с. и свиней**
- **лейкоз к.р.с.**
- **инфекционный ринотрахеит**
- **чума мелких жвачных**
- **контагиозная плевропневмония к.р.с.**
- **лихорадка долины Рифт**
- **бешенство**
- **трихинеллез**
- **бабезиоз**
- **меди-висна**
- **ИНАН**
- **ТГС**
- **PPCC**
- **болезни птиц и др.**

ИФА в клинической практике

Обнаружение антигена

**Выявление и/или определение
уровня антител**

***Ранняя диагностика
болезни***

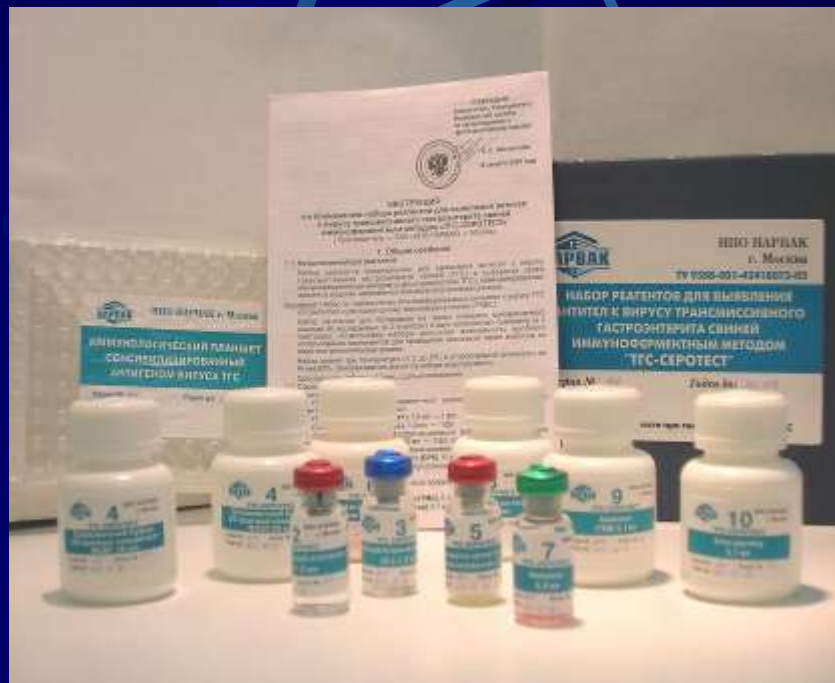
- ☐ **Этиологический анализ эпизоотии и изучение закономерности эпизоотического процесса**
- ☐ **Количественная оценка антигенов при изготовлении вакцинных и диагностических препаратов**

***Оценка гуморального иммунного
ответа***

Оценка гуморального иммунного ответа

- **Эпизоотологический мониторинг инфекций в популяции домашней и дикой фауны.** Позволяет судить о циркуляции конкретного возбудителя на обследуемой территории (район, область, страна), устанавливать его природно-очаговый резервуар и отслеживать вспышки болезни.
- **Оценка напряженности иммунитета и иммунологической эффективности вакцинных препаратов.** Позволяет изучить динамику появления, нарастания и длительности сохранения поствакцинальных антител. Наряду с результатами мониторинга инфекции, эти данные имеют важное значение в отношении выбора конкретных средств специфической профилактики и эффективных схем вакцинации поголовья.
- **Определение уровня материнских (у млекопитающих – коло-стральных, у птиц – трансовариальных) антител у молодняка в первые дни (недели) жизни.** Данная информация необходима для корректировки сроков первой вакцинации поголовья с учетом периода последующего формирования иммунитета.
- **Ретроспективная диагностика инфекции.** Основана на исследовании парных сывороток крови от одной группы животных/птиц с интервалом 14-18 суток или сравнительном исследовании сывороток крови, полученных от здоровых и больных особей. Наличие определенного уровня специфических антител в сыворотке крови невакцинированного (или вакцинированного в отдаленные сроки) поголовья, позволяет судить о циркуляции в хозяйстве полевого штамма вируса.

Выявление специфических антител – ИФА-наборы (НПО НАРВАК)



«КЧС-СЕРОТЕСТ»

«РРСС-СЕРОТЕСТ»

«ТГС-СЕРОТЕСТ»

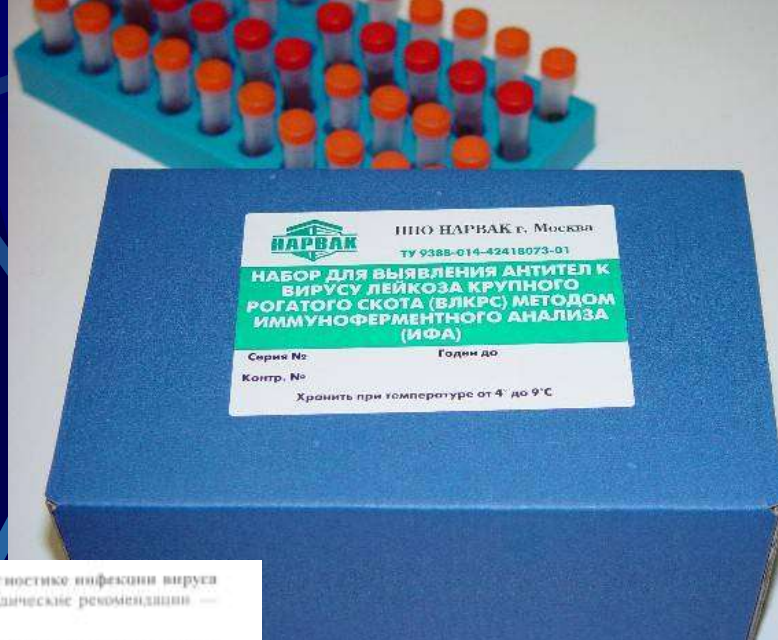
«ЦИРКО-СЕРОТЕСТ»



Характеристика отечественных ИФА-наборов, использующихся в ветеринарных лабораториях для выявления вирус-специфических антител в сыворотке крови свиней

Возбудитель/ [™] набора	Вариант ИФА	Используемые специфические компоненты
Вирус КЧС / КЧС-Серотест	Конкурентный	рекомбинантный антиген Е2 и МкА к Е2 в качестве конъюгата
Вирус РРСС / РРСС-Серотест	Непрямой	рекомбинантный антиген rN и МкА к IgG свиньи в качестве конъюгата
Цирковирол 2 типа / ЦИРКО-Серотест	Непрямой	рекомбинантный антиген ORF2 и МкА к IgG свиньи в качестве конъюгата
Вирус ТГС / ТГС-Серотест	Непрямой	МкА к S-белку для адсорбции вируса и МкА к IgG свиньи в качестве конъюгата

ИФА-диагностика лейкоза крупного рогатого скота



ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Методические рекомендации



НОВОСИБИРСК 2008

Иммуноферментный анализ при диагностике инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота: Методические рекомендации — Новосибирск, 2008. — 48 с.

В практическом пособии изложены основные принципы постановки иммуноферментного анализа для диагностики лейкоза КРС.

Представлены результаты диагностических исследований при постановке ИФА и реакции иммунодиффузии в геле агара, а также с использованием молока и мазка для диагностики инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота (ИЛКРС).

Рекомендации рассчитаны на научных сотрудников НИУ, специалистов ветеринарных лабораторий и представляют собой практическое руководство по проведению лабораторных исследований с использованием тест-систем ИФА. Метод выполнения анализа излагается с учетом опыта его применения в ГНУ ИЭВСиДВ и апробации на большом поголовье крупного рогатого скота Новосибирской обл.

Методические рекомендации подготовили:

В.В. Храмцов, В.Ф. Рудницкий, Н.Г. Довеллазов, Т.А. Азаркина (ИЭВСиДВ), С.Н. Маврин, П.Н. Смирнов, С.Н. Давыдов (ИВМ НГАУ), М.Н. Ткаченко (окружная лаборатория Ханты-Мансийского АО), Т.В. Ахитер («НПО Нарвак»), О.А. Веретский (АНО «Научно-исследовательский институт диагностики профилактики болезней человека и животных, г. Москва, ЗАО «НПО Нарвак»), М.А. Азаров (Управление ветеринарии Новосибирской области)

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, профессор Г.А. Ноздрин;
доктор ветеринарных наук А.Г. Глинин

Ответственные за выпуск:

В.В. Храмцов, Н.Г. Довеллазов

Методические рекомендации «Иммуноферментный анализ при диагностике инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота» рассмотрены и утверждены на Ученом Совете ГНУ ИЭВСиДВ (протокол № 02 от 29 июня 2007 г.) и Подсекции «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол № 02 от 29 июня 2007 г.).

Новые ИФА-наборы для оценки гуморального иммунного ответа у крупного рогатого скота: 2008-2009

Гиподерматоз	«ГИПОДЕРМА-СЕРОТЕСТ»
Инфекционный ринотрахеит	«ИРТ-СЕРОТЕСТ»
Респираторно- синцитиальная инфекция	«РСИ-СЕРОТЕСТ»
Блютанг	«БЛЮТАНГ-СЕРОТЕСТ»

Новые ИФА-наборы для оценки гуморального иммунного ответа у свиней : 2008-2009

Болезнь Ауески	«АУЕСКИ gE-CEROTEST» «АУЕСКИ gB-CEROTEST»
Коронавирусная инфекция	«ТГС/ПКВС-CEROTEST»
PPCC	«PPCC-CEROTEST плюс»
Африканская чума свиней	

Новые межвидовые ИФА-наборы : 2008-2009

Грипп А	«ГРИПП А-СЕРОТЕСТ» (птицы, млекопитающие)
Бруцеллез	млекопитающие

«ГИПОДЕРМА-СЕРОТЕСТ»- набор для ранней диагностики гиподерматоза. Основан

на выявлении антител к гиподермину С (гиподермотоксину), синтезируемому личинкой первой стадии подкожного овода из отряда *Diptera* - *H.bovis* и *H.lineatum*

Гуморальный иммунный ответ – через 4 – 8 недель после проникновения личинки I стадии овода под кожу

животного

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ПРИМЕНЕНИЮ ИММУНОФЕРМЕНТ-НОГО
МЕТОДА РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ
ГИПОДЕРМАТОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРИ ОЗДОРОВЛЕНИИ
ОТ ЭТОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ



Впервые блютанг был зарегистрирован в Южной Африке в 1876 году и в начале XX века данную болезнь считали актуальной только для стран африканского континента. В настоящее время вспышки и эпизоотии блютанга регистрируются на всех континентах.

1998 - 2005 годы - ухудшение эпизоотической ситуации по блютангу в странах южной и центральной Европы. Вспышки блютанга (**BTV серотипы 1, 2, 4, 9 и 16**) у овец и крупного рогатого скота зарегистрированы в Италии, Турции, Греции, Тунисе. Потери – более 1,8 млн.голов скота

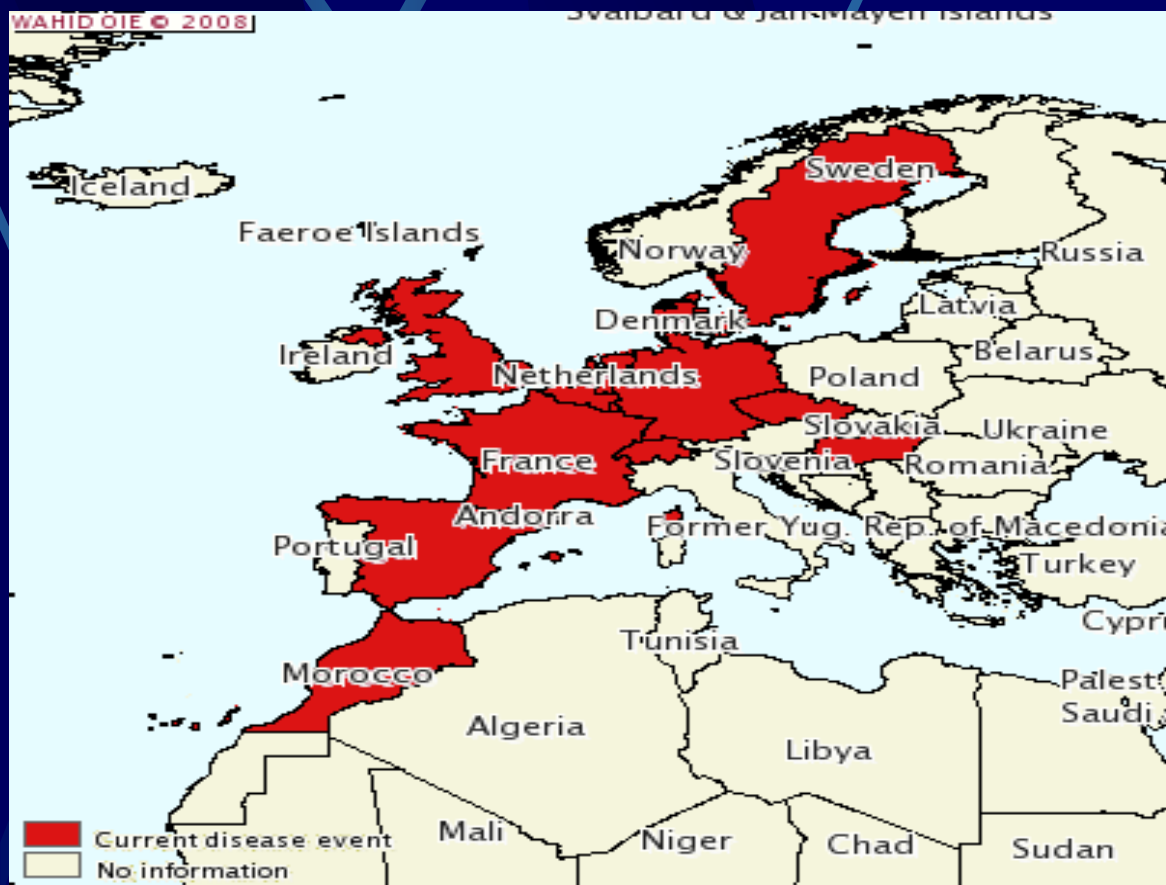
2006 год – **BTV серотип 8** – Нидерланды, Бельгия, Германия, Франция и Люксембург

2007 год – дальнейшее распространение **BTV-8** – Великобритания, Дания, Люксембург

Эпизоотическая ситуация по блютангу – 2008 г.

РОССИЯ - в связи с увеличившемся импортом племенного крупного рогатого скота повышается риск появления блютанга в нашей стране.

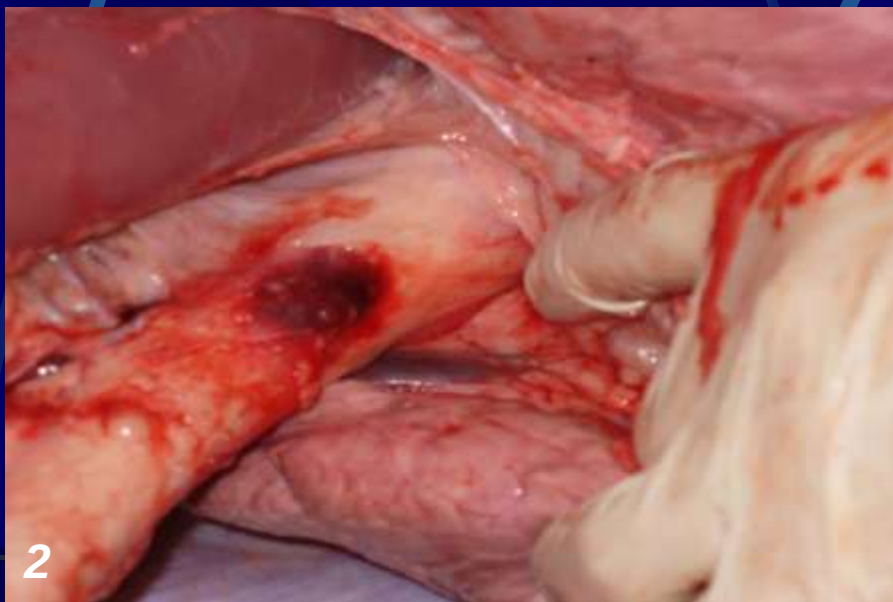
По данным ВНИИВВиМ:
из 100 000 ввезенных животных - серопозитивными являются более 3 500 ввезенных коров, причем у их потомства в 50% случаев также присутствуют сывороточные антитела к БТВ.



Клинические признаки блютанга у овец



1 – конъюнктивит



2 – изъязвление слизистой оболочки рта

Блютанг (или катаральная лихорадка овец) относится к группе экзотических особо опасных болезней овец и домашних и диких жвачных, таких как крупный рогатый скот, козы, олени, муфлоны, большинства видов африканских антилоп и различных парнокопытных.

Блютанг - трансмиссивное вирусное заболевание, характеризующееся лихорадкой, воспалительно-некротическими поражениями ротовой полости, особенно языка, желудочно-кишечного тракта, эпителия венчика и основы кожи копыт, а также дистрофическими изменениями в скелетных мышцах. Клинические проявления болезни и морфологические изменения варьируют в зависимости от патогенности штамма, индивидуальных особенностей и породы животных, влияния окружающих условий (метеорологические факторы, солнечная радиация и т.д.).

Клинические признаки блютанга у коров



1 - поражение носового зеркала

2 – конъюнктивит

3 – изъязвление слизистой оболочки рта

Течение болезни у домашних животных сильно различается - от инаппарантного с огромным количеством инфицированных животных, до фатального исхода в популяции зараженных овец, оленей и диких жвачных. Хотя частота вспышек блютанга у КРС относительно выше, чем у овец, а генерализованное течение болезни наблюдается реже и его клинические признаки более стерты.

Течение инфекционного процесса у домашних жвачных варьирует от острой геморрагической формы болезни с высокой смертностью, как например, в популяциях белохвостых оленей (*Odocoileus virginianus*), до инаппарантного течения болезни - у североамериканского лося (*Cervus canadensis*).

Повышение температуры не всегда коррелирует с течением болезни: легкую, перемежающуюся лихорадку можно наблюдать при тяжелом течении болезни и гибели животных. Иногда при внезапном подъеме температуры до 42°C, фиксируют легкое течение болезни и быстрое выздоровление.

Противоэпизоотические мероприятия по предотвращению распространения блютанга



Поскольку переносчики вируса блютанга - мокрецы рода *Culicoides*, то одним из противоэпизоотических мероприятий являются меры по ограничению размножения насекомых и предотвращению контакта с ними чувствительных животных.

Кроме того, возможно применение вакцинации чувствительных животных в угрожаемых зонах, хотя не следует забывать, что существует опасность утяжеления течения инфекционного процесса на иммунном фоне при возникновении эпизоотии, вызванной другим серотипом вируса блютанга.

Неотъемлемая роль насекомых в эпизоотологии блютанга определяет и максимальное распространение болезни и повышенную инцидентность, которые зависят от таких экологических факторов, как наводнения, продолжительные периоды дождей, оптимум температуры и влажности, повышающие размножение и выживание насекомых.

Анализ полевых проб насекомых в 2005 году показал, что максимальное количество инфицированных особей относится к роду *C. Obsoletus* (80%) и пятую часть от насекомых вирусоносителей составляют особи рода *C. Pulicaris* (20%). В 2006 году распределение по родам выглядело следующим образом: *C. Obsoletus* (80%), *C. Dewulfi* (15%), *C. Pulicaris* (5%).

Инфицированные мокрецы остаются вирусоносителями всю жизнь.

Вirus попавший в организм насекомого от инфицированных животных с вирусемией, после 6-8 дневного периода репликации, появляется в слюнных железах и передается интактным особям в процессе укуса и кровососания.

Противоэпизоотические мероприятия

ВНИИВВиМ - проведение противоэпизоотических мероприятий при вспышках болезни в Республике Бурятия в 1992-1993 гг.

С целью устранения опасности дальнейшего распространения болезни был проведен поголовный убой овец неблагополучной отары. Павшие и убитые животные были уничтожены путем сжигания с последующим захоронением остатков в землю на глубину 3-4 метра. Место нахождения неблагополучной отары было тщательно очищено, подвергнуто многократной дезинфекции 10% горячим раствором едкого натра. Навоз обеззараживали биотермическим способом. В связи со вспышкой блютанга на хозяйство был наложен карантин, прилегающие хозяйства были объявлены угрожаемыми, в них проводились соответствующие мероприятия, т.е. специфическая вакцинация.

Проведение своевременных противоэпизоотических мероприятий при вспышке блютанга позволило ограничить эпизоотический очаг количеством животных менее 1 тыс. голов (в Забайкальском регионе России находилось 2054 тыс. голов овец), и не допустить распространения блютанга среди поголовья овец в угрожаемой зоне и других территориях России.

Современные методы диагностики и эпизоотологического мониторинга блютанга

СТАНДАРТЫ ОIE, 2008 – идентификация антигена, реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РДП), иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР). **ИФА и ПЦР рекомендованы для референтных лабораторий всего мира.**

ИФА – 6 производителей наборов, назначение - выявление антител ко всем 24 серотипам BTV,

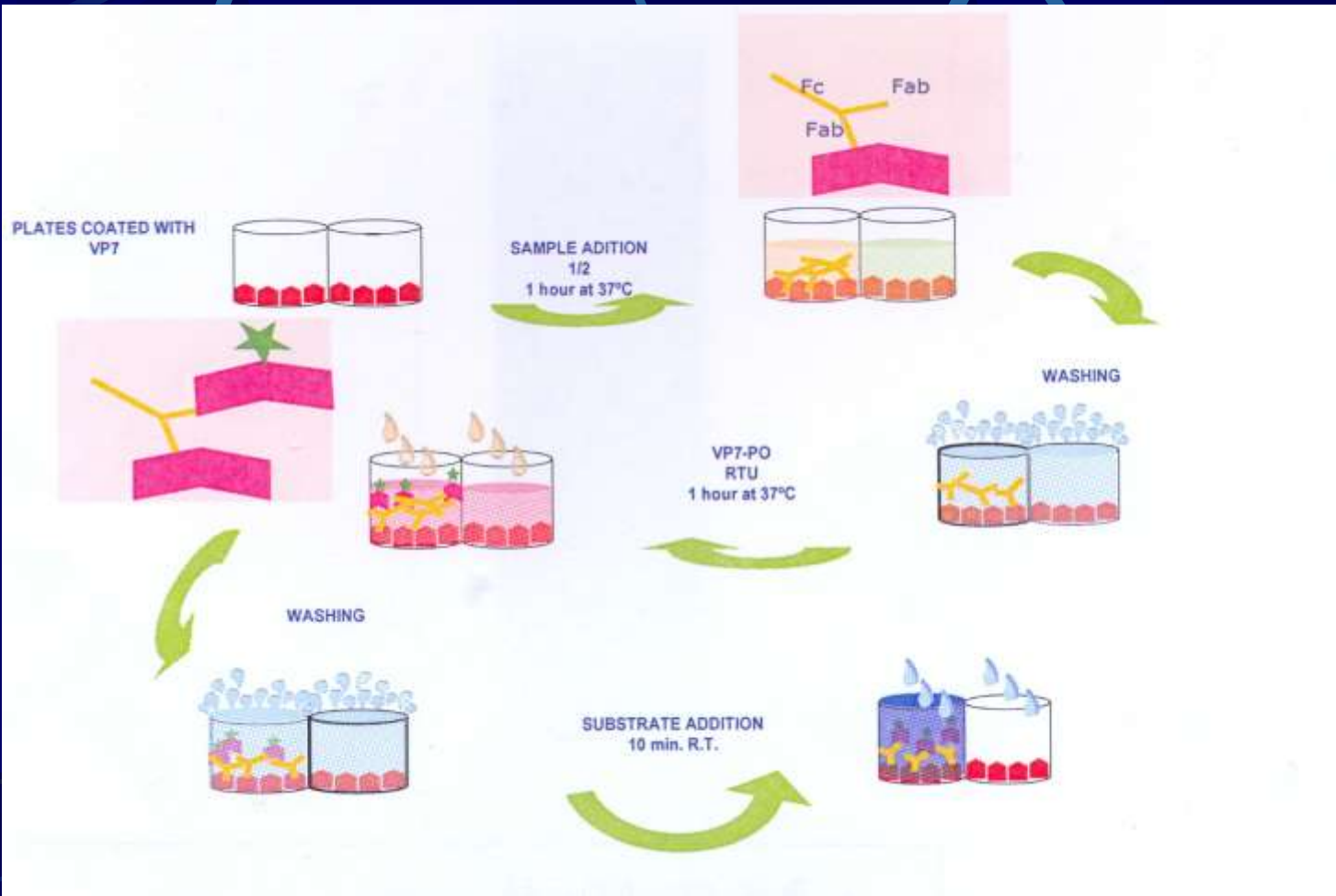
чувствительность и специфичность: выявление антител у экспериментально-зараженных овец – на 8-е и у коров – на 9-е сутки п.и.

ПЦР в реальном времени - позволяет выявить наличие РНК BTV у больных и павших животных, при его персистенции в организме чувствительных особей, в латентной стадии заболевания, а также у насекомых-переносчиков.

чувствительность и специфичность: выявление РНК BTV у экспериментально-зараженных овец – на 3-е и у коров – на 2-е сутки п.и.

«БЛЮТАНГ –СЕРОТЕСТ»: метод двойного распознавания антител к ВТВ в сыворотке крови жвачных

Белок VP7 ВТВ кодируется небольшим сегментом РНК – S7 – и имеет массу 38кДа, является мажорным белком коры, его обнаруживают в культуре клеток через 3-6 часов после инфицирования. VP7 - группоспецифический структурный белок-тример, участвующий в процессе проникновения вируса в клетку и поддержании инфекционности в клетках насекомых-переносчиков. За счет ранней гиперпродукции VP7 диагностическая тест-система ИФА позволяет выявить IgM- и IgG- антитела к ВТВ на ранней стадии инфицирования животного.





АНО «НИИ ДЛБ»

г. Москва

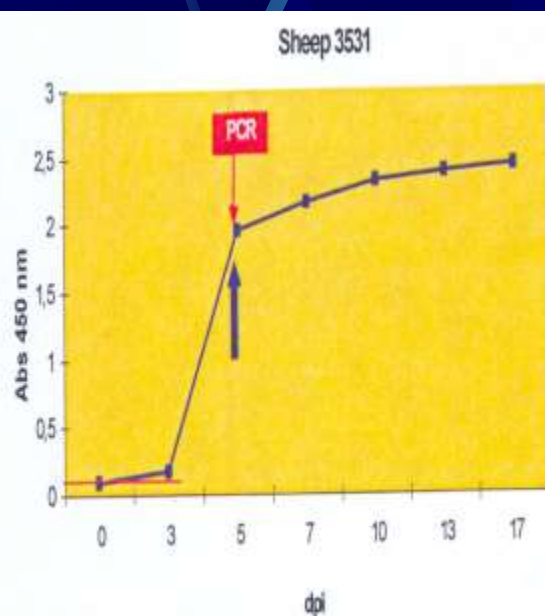
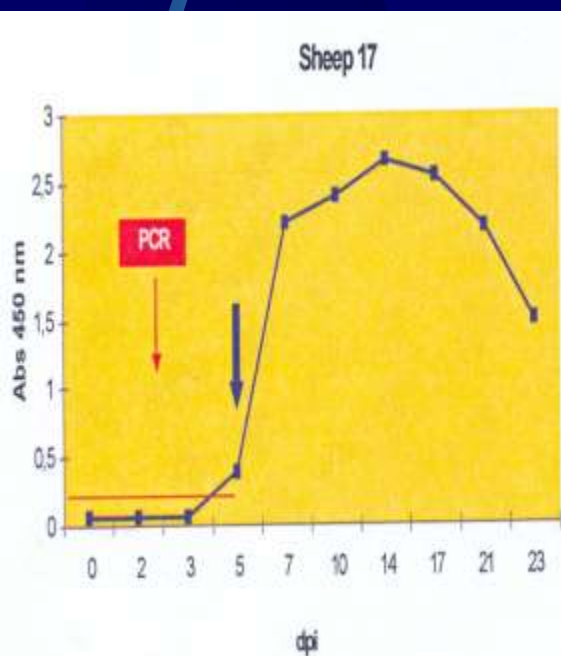
INGENASA

Испания

НАБОР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ БЛЮТАНГА (BTV) ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ МЕТОДОМ «БЛЮТАНГ-СЕРОТЕСТ»

Серия №
Контроль №
Годен до

Хранить в темном месте
при температуре от 2° до 8°С
СТО - XXX-XX-XXXXXXX



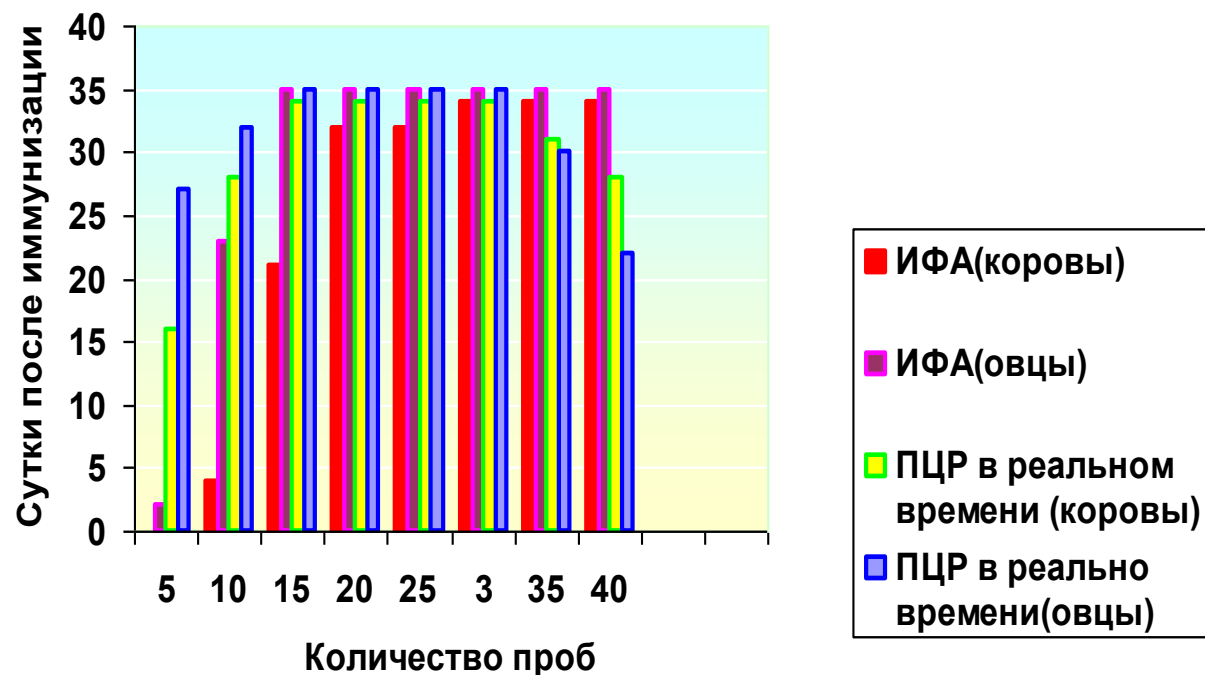
Результаты эксперимента №2 по выявлению антител к BTV в ИФА в сравнительном аспекте с обнаружением вируса методом ПЦР. В опыте использовали 26 зараженных овец, из которых у 25 антитела были выявлены на 5 - 7-е сутки после инфицирования. Результаты ИФА подтвердили результаты обнаружения вируса на 3-7 сутки после инфицирования методом ПЦР.

«БЛЮТАНГ –СЕРОТЕСТ»: оценка эффективности вакцины

ИФА: овцы –
достоверное
выявление
антител на 10-е
сутки п.в.
КРС – на 30-е

Максимальные
значения – 30-е и
40-е сутки п.в.
соответственно

Детекция антител и вируса блютанга в плазме
крови иммунизированных животных



АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ (АЧС)

Высококонтагиозная вирусная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, геморрагическим диатезом, воспалительными, дистрофическими и некротическими изменениями в различных органах

Возбудитель – вирус африканской чумы свиней

Семейство – *Asfarviridae* (*african swine fever and related viruses*)

Род – *Asfivirus*

Вид – вирус АЧС

Сохраняет жизнеспособность

5° С – 7 лет

20° С – 18 мес (сыворотка, кровь)

37° С – 30 дней

Замороженное мясо – 6 мес

Копченая ветчина – 5 мес

Почва – 6 мес

Навоз – 5 мес

Диаметр – 175-215 нм

Стабильность – pH 4-13

Чувствительность – хлороформ, эфир

Инаktivация – 60° С 30 мин

Серотипы (иммунотипы) 7- 8

Белки > 50 (в клетке > 150)

Геном 170-190 т.п.н. (170101)

Размножение

In vivo

моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эндотелий,
гепатоциты, эпителий почечных канальцев

Ornithodoros moubata (Африка)

Ornithodoros erraticus (Пиренейский п-ов)

In vitro

КЛС, ККМС, ПП, РК, Vero

Продолжительность жизни свиней после экспериментального заражения АЧС (n= 120)

Коваленко Я.Р. и др., 1972

Продолжительность жизни (сутки)	Количество животных	Процент к общему количеству животных
3	3	6,3
4	20	16,7
5	36	28,5
6	30	23,9
7	12	9.5
8	8	6.3
10-15	11	8,8

В ВИЭВе исследования по проблеме АЧС проводились на опытной базе (о. Лисий) с 1959 по 1965 г. Штамм L (Лиссабон) вируса АЧС был получен из Португалии акад. Я.Р.Коваленко.

Передача вируса АЧС у домашних свиней (*Wilkinson, 1989*)



ЭПИЗООТОЛОГИЯ

АЧС вне Африки

Португалия	– 1957, 1960-1993, 1999 (4500/1977; 10/1993; 1/1999)
Испания	– 1960-1994 (1939/1977; 13/1994)
Франция	– 1964, 1967, 1974
Италия	– 1967-1969; 1983; 1978-2007 (Сардиния)
Куба	– 1971, 1980
СССР	– 1977
Бразилия	– 1978-1981 (17 из 22 штатов; 30 млн. \$)
Доминиканская Республика	– 1978-1980 (убой всех свиней; 1 млн.)
Мальта	– 1978-1979 (убой всех свиней, 70 тыс.)
Гаити	– 1978-1984 (убой всех свиней, 800 тыс.)
Бельгия	– 1985 (12)
Голландия	– 1986 (2)

- Резервуар вируса – свиньи и клещи орнитодорины
- У клещей вирус передается сексуально, трансвариально и трансстадийно
яйцо → личика → нимфа → имаго
- Экономический ущерб

Испания	– последние 5 лет,	92 млн. \$
США	– предполагаемый ущерб	2-9 млрд. \$

Распространение АЧС в странах Европы и Африки

страны со
стационарными
очагами АЧС

страны со вновь
возникшими
очагами АЧС

Европа (3 страны)

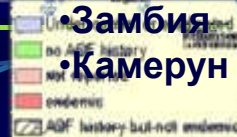
Италия 2005-2007
Грузия 2007
Армения 2007

Грузия:
очаги – 56
заболело – 59961
пало – 59156 (98,7%)

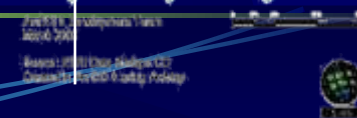
Абхазия: очаги – 6
Армения:
очаги – 6
заболело – 657
пало – 657 (100%)

Африка (20 стран)

•Ангола	•Кения	•Нигерия
•Бенин	•Конго (Д.Р.)	•Танзания
•Буркина-Фасо	•Конго (Н.Р.)	•Того
•Гвинея-Бисау	•Мадагаскар	•Уганда
•Гана	•Малави	•ЮАР
•Замбия	•Мозамбик	•Намибия
•Камерун		



Europe



ЭРАДИКАЦИЯ (ИСКОРЕНЕНИЕ) АЧС НА КУБЕ (1971 и 1980 гг.)

Поголовье свиней – 3,5 млн.

Вакцинация против КЧС и рожи

1971 год

- АЧС в 2-х провинциях из 14-ти
 - Очаги – 33 (32 524 гол.)
 - пало – 12 173 (37%)
 - убито – 20 351 (63%)
- Все свиньи (463 332) в 2-х провинциях были убиты

Диагностика

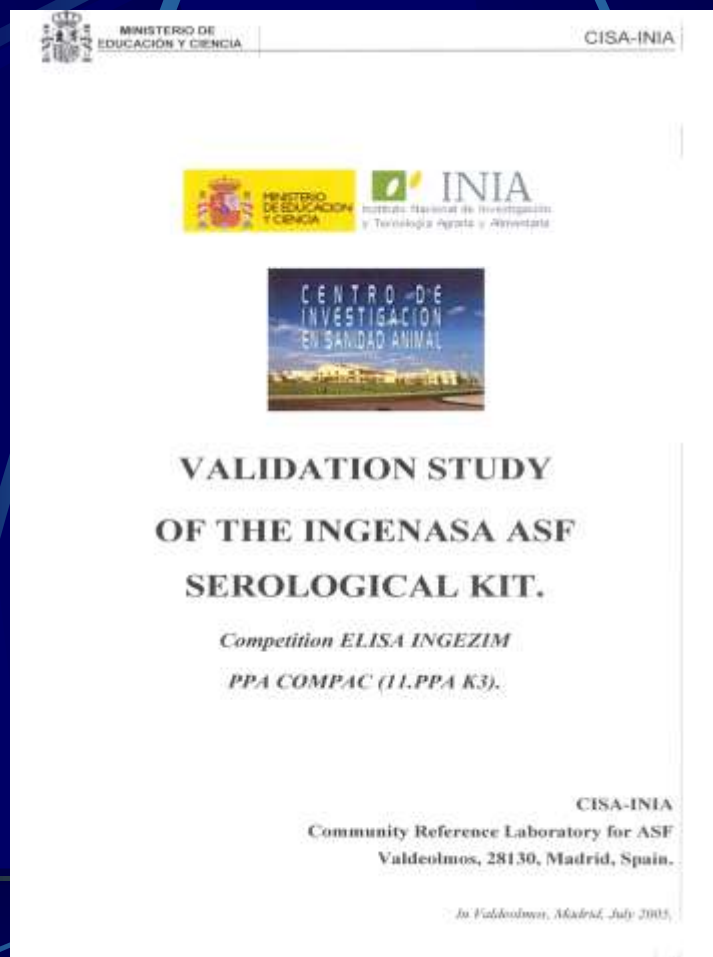
- Выделение вируса в ККМС
- Обнаружение вирусного антигена в мазках тканей прямым МФА
- Экономический ущерб – 25 млн. \$

1980 год

- АЧС в 3-х провинциях из 14-ти
- Убито – 137 287, сожжено – 123 250 (90%)
- Очаги – 56 (260 537 гол.)
- Экономический ущерб – более 9 млн. \$

Диагностика и эпизоотологический мониторинг АЧС

СТАНДАРТЫ ОIE, 2008 – ИФА - основной утвержденный тест



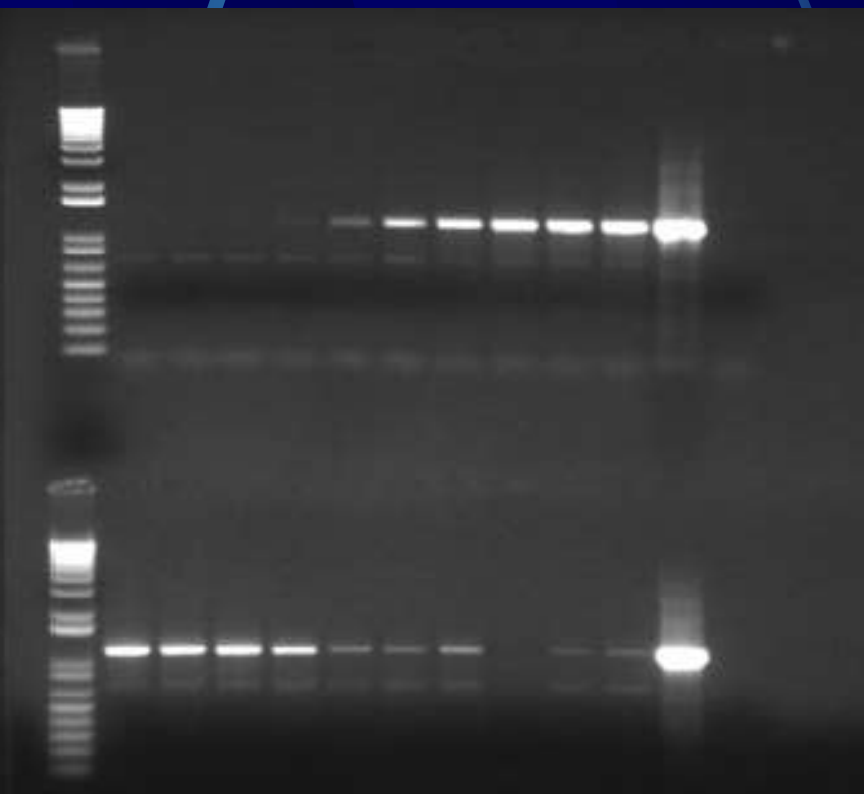
Основан на конкурентном ИФА и выявляет антитела к основному структурному белку VP73 вируса АЧС

чувствительность и специфичность:

выявление антител у экспериментально-зараженных свиней– на 7-е сутки п.и.

Диагностика АЧС с помощью ПЦР (ВНИИВВиМ)

Для лабораторной диагностики АЧС за рубежом применяется высокочувствительный гнездовой вариант ПЦР (Steiger Y., Askermann M. 1992). Высокая чувствительность метода ПЦР позволяет сделать вывод, что с ее помощью можно выявлять животных с хроническим и бессимптомным течением болезни, когда титр инфекционности не превышает значений 1,5-2,5 Ig ГАдЕ50/мл.



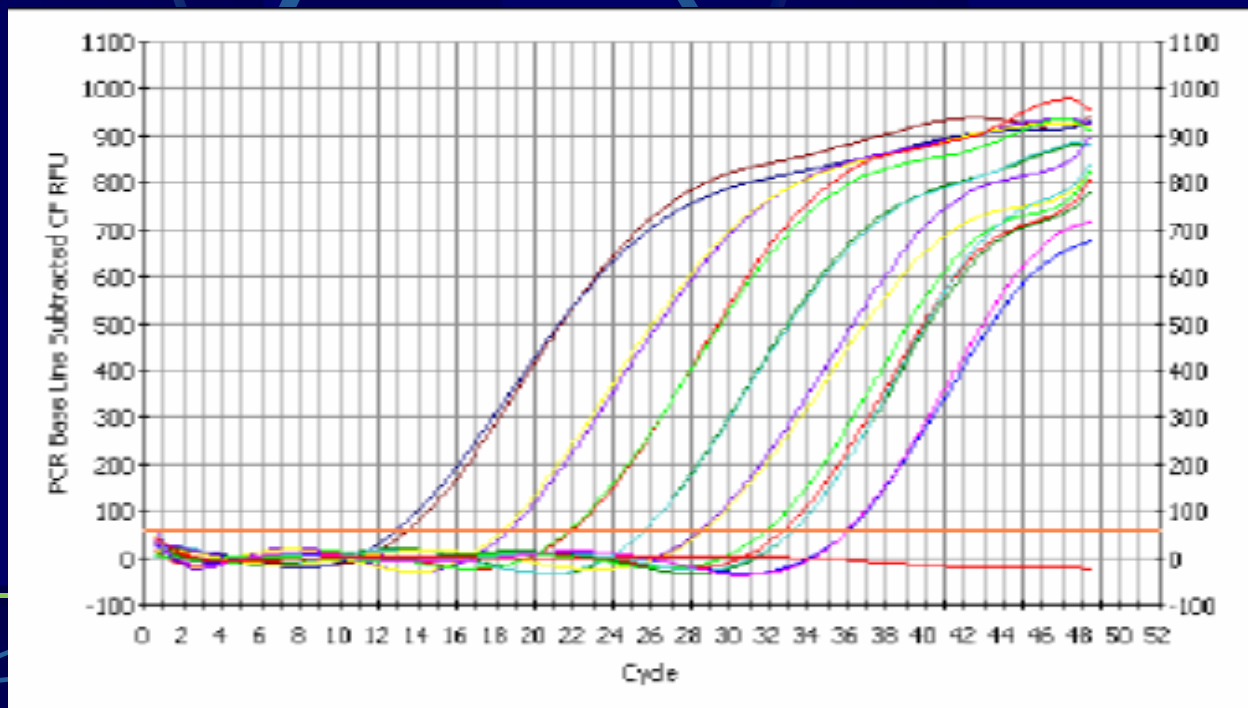
Исследование проб от диких животных различных областей Северной Осетии показало 100% корреляцию результатов с данными исследования проб методом флуоресцирующих антител. Кроме того, применение ПЦР-анализа оказалось эффективным и при исследовании клещей, снятых с возможно-инфицированных диких кабанов.

Метод детекции ДНК вируса АЧС на основе Real-Time PCR.



Дальнейшим направлением совершенствования методов экспресс-диагностики инфекционных болезней являются разработки способов выявления при использовании методологии ПЦР в реальном времени.

Разработанная тест-система на основе ПЦР в реальном времени позволяет через 1,5 часа после начала анализа, выявить и определить концентрацию ДНК вируса АЧС в биологических материалах различного происхождения при титрах вируса 1,0-1,5 Ig ТЦД50/мл.





НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ

НАРВАК - крупнейший в России разработчик и производитель тест-систем и наборов на основе ИФА и ПЦР для диагностики вирусных и бактериальных болезней животных.



105120, Москва, 3-й Сыромятнинский пер., д. 3/9
Тел./ факс: (095) 916-17-05
E-mail: vetdoctor@resvet.ru, www.narvak.com



АНО «НИИ ДПБ»

г. Москва

Наши предложения:

- **Поставка готовых ИФА- и ПЦР- наборов**
- **Проведение комплексных разноплановых диагностических исследований**
- **Обучение специалистов ветеринарных лабораторий диагностическим методам**
- **Консультационные услуги**

***Благодарю за
внимание!***