

Разработка тест-системы для выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотках крови восприимчивых животных

М. А. Волкова¹, Н. Г. Зиняков², П. С. Ярославцева³, И. А. Чвала⁴, Т. С. Галкина⁵, Д. Б. Андрейчук⁶

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0002-7674-639X, e-mail: volkovama@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-3015-5594, e-mail: zinyakov@arriah.ru

³ ORCID 0000-0003-0383-9912, e-mail: yaroslavtzeva@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-1659-3256, e-mail: chvala@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0001-9494-8537, e-mail: galkina_ts@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0002-1681-5795, e-mail: andreychuk@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19), вызываемая вирусом SARS-CoV-2, стала причиной пандемии, а также была зарегистрирована в популяциях животных – у норок фермерских хозяйств, собак и представителей кошачьих: домашних кошек, львов и тигров. Доказана чувствительность некоторых видов животных к вирусу SARS-CoV-2 при экспериментальном заражении. Для выявления случаев инфицирования животных эффективно применяются серологические методы. В настоящее время для обнаружения антител к коронавирусам используют такие методы, как реакция нейтрализации, иммунофлуоресцентный метод и иммуноферментный анализ. В результате проведенных исследований была разработана тест-система на основе непрямого варианта иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотках крови восприимчивых животных. Использование в качестве антигена очищенного концентрированного инактивированного вируса позволяет выявлять антитела к различным иммунодоминантным белкам (S и N) SARS-CoV-2. Оптимизированы условия постановки реакции, установлен позитивно-негативный порог при исследовании 154 негативных сывороток крови от животных шести видов (хорьков, норок, лис, песцов, кошек и собак). При определении воспроизводимости метода среднее значение коэффициента вариации не превышало 7%, что является допустимым значением. Специфичность и чувствительность относительно реакции нейтрализации при исследовании 30 сывороток крови от хорьков составила 100 и 92,6% соответственно. Высокая диагностическая чувствительность и специфичность, показанные при исследовании 50 сывороток крови от норок, лис, кошек и собак с разным иммунным статусом, позволяют рекомендовать разработанную тест-систему для проведения скрининговых исследований и контроля поствакцинального иммунитета.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, антитела, иммуноферментный анализ.

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Волкова М. А., Зиняков Н. Г., Ярославцева П. С., Чвала И. А., Галкина Т. С., Андрейчук Д. Б. Разработка тест-системы для выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотках крови восприимчивых животных. *Ветеринария сегодня*. 2021; 2 (37): 97–102. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-97-102.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Волкова Марина Алексеевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: volkovama@arriah.ru.

UDC 619:578.834.1:616-097:616-078

Development of the test kit for detection of SARS-CoV-2 antibodies in sera of susceptible animals

M. A. Volkova¹, N. G. Zinyakov², P. S. Yaroslavtseva³, I. A. Chvala⁴, T. S. Galkina⁵, D. B. Andreychuk⁶

Federal State Budgetary Institution "Federal Center for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0002-7674-639X, e-mail: volkovama@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-3015-5594, e-mail: zinyakov@arriah.ru

³ ORCID 0000-0003-0383-9912, e-mail: yaroslavtzeva@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-1659-3256, e-mail: chvala@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0001-9494-8537, e-mail: galkina_ts@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0002-1681-5795, e-mail: andreychuk@arriah.ru

SUMMARY

The novel coronavirus infection COVID-19, caused by the SARS-CoV-2, has triggered a pandemic, and has also been reported in animal populations – in farm minks, dogs and felines: domestic cats, lions and tigers. The susceptibility of some animal species to the SARS-CoV-2 has been proven by experimental infection. Serological methods are effectively used to detect the infection in animals. Currently, methods such as neutralization test, immunofluorescence assay and enzyme-linked

immunoassay are used to detect antibodies to coronaviruses. Thanks to these studies, a test kit was developed based on an indirect enzyme-linked immunoassay to detect the SARS-CoV-2 antibodies in sera of susceptible animals. The use of a purified concentrated inactivated virus as an antigen allows the detection of antibodies to various SARS-CoV-2 immunodominant proteins (S and N). The reaction conditions were optimized, and a positive-negative threshold was established by testing of 154 negative sera from animals of six species (ferrets, minks, foxes, arctic foxes, cats and dogs). The method reproducibility analysis showed that the average value of the variation coefficient did not exceed 7%, which is an acceptable value. The specificity and sensitivity of the neutralization test, when testing 30 sera from ferrets was 100 and 92.6%, respectively. The high diagnostic sensitivity and specificity shown by testing of 50 serum samples from minks, foxes, cats and dogs with different immune status, allow us to recommend the developed test kit for screening and monitoring tests and post-vaccination immunity control.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, antibodies, enzyme-linked immunoassay.

Acknowledgements: The work was carried out at the expense of the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary welfare" research activities.

For citation: Volkova M. A., Zinyakov N. G., Yaroslavtseva P. S., Chvala I. A., Galkina T. S., Andreychuk D. B. Development of the test kit for detection of SARS-CoV-2 antibodies in sera of susceptible animals. *Veterinary Science Today*. 2021; 2 (37): 97–102. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-97-102.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Marina A. Volkova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: volkovama@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусы являются одним из основных патогенов млекопитающих (в том числе человека), земноводных и птиц [1]. Новый коронавирус SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) является возбудителем COVID-19 – коронавирусного заболевания 2019 г. Вирус SARS-CoV-2 относится к порядку *Nidovirales*, подсемейству *Orthocoronavirinae*, роду *Betacoronavirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV). Коронавирусы – это оболочечные РНК-вирусы, имеющие одноцепочечную несегментированную РНК [2]. Основные структурные белки – нуклеопротеин (N), спайковый белок (S), белок оболочки (E) и матриксный белок (M). S-белок, состоящий из двух субъединиц S1 и S2, образует тример на вирусной мембране. S1-субъединица содержит рецептор-связывающий домен (RBD), который отвечает за связывание с рецепторами клетки-хозяина, а S2-субъединица облегчает слияние между мембранами вируса и клетки-хозяина [2–4]. Белок S является наиболее изменчивым у представителей разных родов семейства *Coronaviridae* и отвечает за их трансмиссивность и адаптацию. Белок S2 является более консервативным, чем S1 [4].

Восприимчивость к заражению вирусом SARS-CoV-2 животных разных видов в настоящее время недостаточно изучена. Имеется ряд сообщений об экспериментальном заражении вирусом SARS-CoV-2 хорьков, кошек, собак и свиней [5–7]. Было установлено, что вирус SARS-CoV-2 эффективно реплицировался в организме кошек и хорьков. Собаки были менее восприимчивы к заражению, а утки и цыплята не восприимчивы [8]. B. S. Pickering et al. показали, что свиньи чувствительны к назальному заражению большой дозой вируса SARS-CoV-2 [7]. В естественных условиях обитания (в зоопарках) геном вируса SARS-CoV-2 обнаруживали у кошек, собак, тигров и львов с признаками респираторного заболевания. Весной 2020 г. сообщалось о заражении SARS-CoV-2 и гибели норок на фермах в Нидерландах [9].

Спецификой данного вирусного заболевания является выработка антител к компонентам вирусных частиц, выявление которых подтверждает перенесенное

заболевание или бессимптомное носительство и свидетельствует о наличии иммунитета. Продолжительность и интенсивность иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 у животных разных видов изучены недостаточно.

В настоящее время для обнаружения антител к коронавирусам животных используют различные методы: реакцию нейтрализации, иммуноферментный анализ, иммунофлуоресцентный метод [5, 6, 8–11]. Фирма IDvet (Франция) выпустила в 2020 г. мультивидовой иммуноферментный коммерческий набор ID Screen® SARS-CoV-2 Double Antigen Multi-species ELISA для выявления антител к нуклеопротеину SARS-CoV-2 в сыворотке, плазме и цельной крови животных разных видов. Имеется ряд сообщений о разработке других коммерческих иммуноферментных тест-систем для выявления антител к рецептор-связывающему домену (RBD) белка S1 в крови животных [5, 10, 11].

В связи с широким распространением COVID-19 в мире и опасностью заражения человека и животных была поставлена цель разработать отечественную иммуноферментную тест-систему для выявления антител к антигену вируса SARS-CoV-2 в сыворотках крови восприимчивых животных разного вида для контроля поствакцинального иммунитета и проведения скрининговых исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антиген. В качестве антигена в иммуноферментном анализе (ИФА) использовали инактивированный β -пропиолактоном вирус SARS-CoV-2 штамма «вариант В», культивированный в культуре клеток Vero. Очистка и концентрирование инактивированной вирусосодержащей культуральной жидкости включала низкоскоростное центрифугирование и ультрацентрифугирование через слой 30%-й сахарозы. Полученный 100-кратный концентрированный препарат использовали для постановки ИФА. Наличие вируса подтверждали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии 10%-го додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ).

Сыворотки крови. Отрицательным контролем служили образцы сыворотки крови животных (хорька, норки, лисы, кошки, собаки и других восприимчивых

животных), не содержащие антитела к вирусу SARS-CoV-2, положительным контролем – специфическая к вирусу SARS-CoV-2 сыворотка крови животных (хорька, норки, лисы, кошки, собаки и других восприимчивых животных) с титром не менее чем 1:800.

Непрямой вариант ИФА. Антиген в рабочем разведении в карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6) вносили в лунки 96-луночного пластикового планшета (Nunc-Immuno Plates, Дания), инкубировали в течение ночи при 4 °С, блокировали 1%-м раствором сухого обезжиренного молока (Carl Roth GmbH, Германия) в трис-НСI буферном растворе (0,02 М трис-НСI, 0,15 М NaCl, 0,1% твин-20) (ТБР-Т) с pH 7,4 в течение 1 ч при комнатной температуре и затем отмывали трехкратно ТБР-Т. При постановке реакции методом последовательных разведений титрование проб сывороток крови проводили с двукратным шагом начиная с разведения 1:50, используя при этом для разведения 1%-й раствор сухого молока в ТБР-Т. При тестировании сывороток в одном разведении в качестве рабочего использовали разведение 1:100. Исследуемые и контрольные сыворотки крови вносили в лунки планшета в объеме 100 мкл и инкубировали в течение 45 мин при 37 °С. Связавшиеся антитела определяли добавлением в каждую лунку планшета 100 мкл рабочего разведения конъюгата белка А из *Staphylococcus aureus* с пероксидазой хрена (Sigma, США) в буфере для разведения. Планшеты инкубировали в течение 45 мин при 37 °С. После каждого этапа проводили 3–4-кратную промывку лунок буферным раствором ТБР-Т. Для визуализации образовавшегося комплекса в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора субстрата АБТС [2,2-азино-ди-(3-этилбензоаминсульфонат)], инкубировали в течение 10–15 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали внесением в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора (1%-й додецилсульфат натрия). Учет реакции проводили спектрофотометрически при длине волны 405 нм. Титром антител считали последнее разведение сыворотки, оптическая плотность (ОП) в котором была более чем в 2 раза выше, чем среднее значение для отрицательного контроля. Методом одного разведения сыворотки определяли значение S/N (где S – ОП исследуемой пробы, N – ОП отрицательной контрольной сыворотки) для каждой пробы. Для определения позитивно-негативного порога было исследовано 154 сыворотки крови от клинически здоровых животных разных видов. Было подсчитано значение титра антител, S/N и стандартное отклонение, сумма среднего значения и двух стандартных отклонений определяла верхнюю границу отрицательных значений, а сумма среднего и трех стандартных отклонений – нижнюю границу положительных значений.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Электрофорез белков проводили в 10%-м ДСН-ПААГ в течение 1 ч при постоянном напряжении 200 В. Разделенные вирусные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм в течение 1 ч при напряжении 100 В с использованием аппарата для иммуноблоттинга (Mini Trans-Blot Electrophoretic transfer cell, BioRad, США) согласно руководству. Мембрану инкубировали в течение 1 ч в 1%-м растворе сухого молока в буфере ТБР-Т с pH 7,4. Затем обрабатывали нормальными и положительными к вирусу SARS-CoV-2 сыворотками крови животных, разведенными 1:100 в буфере ТБР-Т, в течение 1 ч при перемешивании на шейкере. После выдерживания в растворе конъюгата белка А с пероксидазой хре-

на (Sigma, США) в течение 1 ч мембрану окрашивали субстратной смесью, включающей 4-chloro-1-naphthol и 0,04% перекиси водорода. Каждый этап заканчивался 3–4-кратным отмыванием мембраны в буфере ТБР-Т.

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 10.0 (Stat Soft. Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После очистки и концентрирования вирусосодержащей культуральной жидкости определяли наличие вируса в полученном препарате методом электрофореза вирусных белков в 10%-м ДСН-ПААГ и иммуноблоттинга со специфическими сыворотками (рис. 1, 2).

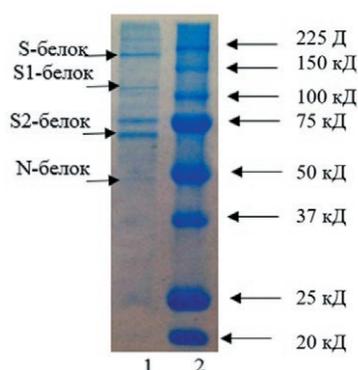


Рис. 1. Антиген SARS-CoV-2. Электрофорез в 10%-м ДСН-ПААГ, окрашивание Coomassie Brilliant Blue G-250: 1 – белковые фракции очищенного антигена SARS-CoV-2; 2 – маркер молекулярных весов (BioRad, США)

Fig. 1. SARS-CoV-2 antigen. SDS-PAGE electrophoresis, Coomassie Brilliant Blue G-250 staining: 1 – purified SARS-CoV-2 antigen protein fractions; 2 – molecular weight marker (BioRad, USA)

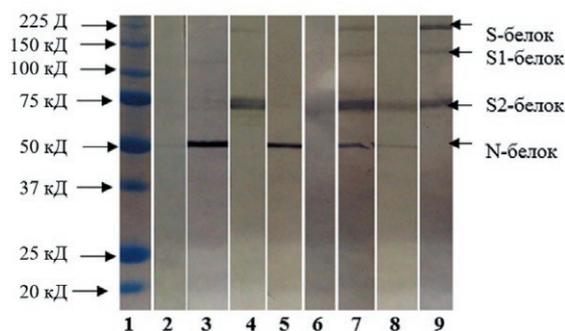


Рис. 2. Иммуноблоттинг белков антигена SARS-CoV-2 с нормальной и специфическими к коронавирусу сыворотками крови животных: 1 – маркер молекулярных весов (BioRad, США); 2, 6 – белковые фракции очищенного антигена SARS-CoV-2 с нормальной сывороткой крови хорька и кошки; 3, 4, 5, 7, 8, 9 – белковые фракции очищенного антигена SARS-CoV-2 со специфической к коронавирусу сывороткой крови хорька (3), норки (4), лисы (5), кошки (7, 8), собаки (9)

Fig. 2. SARS-CoV-2 antigen protein immunoblotting using normal and coronavirus-specific animal sera: 1 – molecular weight marker (BioRad, USA); 2, 6 – purified SARS-CoV-2 antigen protein fractions using normal ferret and cat sera; 3, 4, 5, 7, 8, 9 – purified SARS-CoV-2 antigen protein fractions using coronavirus-specific sera of ferret (3), mink (4), fox (5), cat (7, 8), dog (9)

Таблица 1
Результаты исследования воспроизводимости метода

Table 1
Results of the method reproducibility study

Характеристика сыворотки	Оператор / день постановки реакции	Показатель			
		Среднее значение S/N	Стандартное отклонение (σ)	Коэффициент вариации (CV%)	Среднее значение CV%
Сходимость (по 6 определениям)					
Слабо-положительная	1/1	4,44	0,205	4,62	3,70
	2/1	4,01	0,125	3,12	
	1/2	3,76	0,144	3,82	
	2/2	4,05	0,129	3,17	
Сильно-положительная	1/1	6,00	0,174	2,91	2,43
	2/1	6,04	0,144	2,39	
	1/2	6,05	0,285	4,71	
	2/2	6,25	0,170	2,72	
Воспроизводимость (по 24 определениям)					
Слабо-положительная	2 оператора / 2 дня	4,07	0,280	6,99	5,12
Сильно-положительная	2 оператора / 2 дня	6,08	0,197	3,24	

Таблица 2
Результаты выявления антител к антигену SARS-CoV-2 в гомологичных и гетерологичных сыворотках крови животных методом ИФА

Table 2
Results of SARS-CoV-2 antigen antibody detection in homologous and heterologous animal sera by ELISA

№ п/п	Характеристика пробы	Титр антител*	S/N	Качественная оценка результата
1	Сыворотка крови к вирусу трансмиссивного гастроэнтерита свиней	50	0,88	отрицательный
2	Сыворотка крови к коронавирусу крупного рогатого скота	50	0,78	отрицательный
3	Сыворотка крови к вирусу диареи крупного рогатого скота	100	0,99	отрицательный
4	Сыворотка крови к вирусу инфекционного бронхита кур	50	0,57	отрицательный
5	Отрицательная контрольная сыворотка крови	100	1,00	отрицательный
6	Положительная контрольная сыворотка крови к вирусу SARS-CoV-2	800	5,70	положительный

* Титр антител – величина, обратная разведению сыворотки (Antibody titer is the reciprocal value of the serum dilution).

Расположение полипептидов после электрофореза соответствовало данным, полученным другими авторами для вируса SARS-CoV-2 [2, 4].

Исследование сывороток крови от животных, вакцинированных против коронавирусной инфекции (COVID-19), методом иммуноблоттинга показало, что антитела образовывались на основные иммунодоминантные белки: S1- и S2-субъединицы спайк-белка и N-белок, это подтверждается данными других исследователей [10, 11].

Полученный инактивированный препарат вируса использовали в качестве антигена в непрямом варианте ИФА для определения антител к SARS-CoV-2.

При разработке иммуноферментной тест-системы были оптимизированы условия постановки реакции: определено рабочее разведение антигена (1:300) и иммунопероксидазного конъюгата (1:10000). В результате тестирования 30 значений оптической плотности контрольных сывороток, исследованных в разведении 1:100, установлены их допустимые значения: для отрицательного контроля – не выше 0,2; для положительного – не ниже 0,4.

Для объективной оценки иммунного ответа необходимо было установить позитивно-негативный порог. 154 сыворотки крови от клинически здоровых животных разных видов (хорьки, норки, лисы, песцы, кошки и собаки), не вакцинированных против COVID-19, исследовали в трех повторностях в различные дни. В результате получили среднее значение S/N отрицательных сывороток, равное 1,333, и стандартное отклонение – 0,3769. На основании проведенного статистического анализа результат считали отрицательным, если $S/N \leq 2,1$; положительным, если $S/N \geq 2,5$; промежуточные значения считали сомнительными. При постановке реакции методом последовательных разведений титр антител меньше или равный 1:100 считали отрицательным, а больше или равный 1:200 – положительным.

Воспроизводимость метода оценивали по коэффициенту вариации в пределах одной постановки и между постановками, проводя повторные исследования 2 положительных образцов сыворотки крови от восприимчивых животных (хорьки) с различной концентрацией антител (низкой и высокой). Коэффициент вариации значений S/N в пределах одной постановки оценивали по 6 определениям, выполненным одним оператором, коэффициент вариации между постановками – по 24 определениям, выполненным на 4 различных планшетах двумя операторами в разные дни (табл. 1).

Результаты, полученные при постановке ИФА в повторности, показали, что среднее значение коэффициента вариации не превышало 7%. Таким образом, использование разработанной тест-системы для выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 в непрямом варианте ИФА позволило получить воспроизводимые результаты.

Для подтверждения специфичности разработанной методики были использованы специфические сыворотки к α -коронавирусу (вирусу трансмиссивного гастроэнтерита свиней), β -коронавирусу (коронавирусу крупного рогатого скота), γ -коронавирусу (вирусу инфекционного бронхита кур) и пестивирусу (вирусу диареи крупного рогатого скота). Было показано (табл. 2), что активность антигена SARS-CoV-2 с гетерологичными сыворотками не превышала фоновый уровень (реакция с неиммунной сывороткой).

С целью оценки относительной специфичности и чувствительности тест-системы проводили сравнительные результаты, полученных с применением разработанного ИФА и реакции нейтрализации, используя таблицу сопряженности 2×2 . В таблице 3 представлены результаты тестирования в двух реакциях 30 проб сыворотки крови, отобранных от хорьков через 28 дней после иммунизации экспериментальными образцами вакцины против коронавирусной инфекции (COVID-19).

плотоядных животных (производство ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Из полученных данных следует, что 3 пробы были отрицательными и 25 проб – положительными в обеих реакциях. Две пробы, положительные в реакции нейтрализации, при исследовании методом ИФА показали отрицательный результат.

Специфичность и чувствительность ИФА относительно реакции нейтрализации для поствакцинальных сывороток составила 100 и 92,6% соответственно.

С целью определения диагностической чувствительности и специфичности тестировали 50 проб сыворотки крови от разных видов животных (норки – 14, лисы – 10, кошки – 14 и собаки – 12) до и после (через 4–6 недель) вакцинации против COVID-19 экспериментальными образцами вакцины производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». Результаты исследований представлены в таблице 4. Антитела к вирусу SARS-CoV-2 были обнаружены в сыворотках крови всех вакцинированных животных, до иммунизации все пробы сыворотки крови были отрицательными в ИФА.

Результаты выявления антител с помощью разработанной тест-системы сравнивали с коммерческим набором IDvet (Франция). С этой целью 44 сыворотки крови животных разных видов были исследованы с использованием тест-системы ФГБУ «ВНИИЗЖ» и коммерческого набора фирмы IDvet для определения антител к нуклеопротеину SARS-CoV-2 в соответствии с инструкцией производителя (табл. 5).

Во всех образцах сывороток крови вакцинированных животных, исследованных с помощью разработанной тест-системы, обнаружены антитела к вирусу SARS-CoV-2.

При исследовании набором IDvet специфические к вирусу SARS-CoV-2 антитела были выявлены только в сыворотках крови от вакцинированных хорьков, лис и норок. В крови вакцинированных собак и кошек специфические антитела не обнаружены. Поскольку набор фирмы IDvet предназначен для выявления антител только к нуклеопротеину SARS-CoV-2, можно предположить, что в сыворотках крови кошек и собак содержание антител к белку N очень низкое, что также подтверждает исследование данных сывороток методом иммуноблоттинга (рис. 2). В пробах сыворотки крови от непривитых свиней вирусспецифические антитела в обеих тест-системах ИФА не обнаружены.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная тест-система на основе непрямого варианта ИФА для выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 показала высокую специфичность (100%), чувствительность (92,6%), воспроизводимость и может применяться для проведения скрининговых исследований SARS-CoV-2 у различных видов восприимчивых животных и контроля иммунного ответа после вакцинации против коронавирусной инфекции (COVID-19) животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 1, 2, 4–11 см. REFERENCES)

3. Харченко Е. П. Коронавирус SARS-CoV-2: особенности структурных белков, контагиозность и возможные иммунные коллизии. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020; 19 (2): 13–30. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-2-13-30.

REFERENCES

1. Cui J., Li F., Shi Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019; 17 (3): 181–192. DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9.

Таблица 3

Оценка относительной чувствительности и специфичности ИФА для выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотках крови животных

Table 3

Analysis of ELISA relative sensitivity and specificity for SARS-CoV-2 antibody detection in animal sera

Реакция нейтрализации*	ИФА		
	Положительные	Отрицательные	Всего
Положительные пробы	25/a	2/c	27/a+c
Отрицательные пробы	0/d	3/b	3/d+b
Всего проб	25	5	n = 30

* Исследование сывороток крови в реакции нейтрализации выполнено в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (г. Москва) / Sera were tested by neutralization test at the "N. F. Gamaleya NRCEM" of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow);

a – истинно положительные результаты (true-positive results);

b – истинно отрицательные результаты (true-negative results);

c – ложноотрицательные результаты (false-negative results);

d – ложноположительные результаты (false-positive results).

Таблица 4

Результаты выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотках крови животных до и после вакцинации против коронавирусной инфекции (COVID-19) животных в ИФА

Table 4

Results of SARS-CoV-2 antibody detection in animal sera before and after vaccination against coronavirus infection (COVID-19) by ELISA

№ п/п	Характеристика проб сыворотки крови	Титр антител*	S/N**	Количество проб / из них положительных
1	Норки до вакцинации	64 ± 9	1,45 ± 0,11	7/0
2	Норки после вакцинации	829 ± 216	6,03 ± 0,89	7/7
3	Лисы до вакцинации	50 ± 0	1,45 ± 0,11	5/0
4	Лисы после вакцинации	400 ± 0	3,61 ± 0,65	5/5
5	Кошки до вакцинации	50 ± 0	1,31 ± 0,08	7/0
6	Кошки после вакцинации	543 ± 95	5,03 ± 0,47	7/7
7	Собаки до вакцинации	83 ± 11	1,69 ± 0,13	6/0
8	Собаки после вакцинации	667 ± 84	4,33 ± 0,40	6/6

* Среднее значение титра антител ± стандартная ошибка среднего, где титр антител – величина, обратная разведению сыворотки (Average value of the antibody titer ± standard error of the mean, where the antibody titer is the reciprocal value of the serum dilution);

** значение S/N ± стандартная ошибка среднего (S/N value ± standard error of the mean).

2. Yao H., Song Y., Chen Y., Wu N., Xu J., Sun C., et al. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell*. 2020; 183 (3): 730–738. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.018.

3. Kharchenko E. P. The coronavirus SARS-CoV-2: the characteristics of structural proteins, contagiousness, and possible immune collisions. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2020; 19 (2): 13–30. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-2-13-30. (in Russian)

4. Herrera N. G., Morano N. C., Celikgil A., Georgiev G. I., Malonis R. J., Lee J. H., et al. Characterization of the SARS-CoV-2 S protein: Biophysical, biochemical, structural, and antigenic analysis. *ACS Omega*. 2021; 6 (1): 85–102. DOI: 10.1021/acsomega.0c03512.

5. Richard M., Kok A., de Meulder D., Bestebroer T. M., Lamers M. M., Okba N. M. A., et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat. Commun.* 2020; 11 (1):3496. DOI: 10.1038/s41467-020-17367-2.

6. Shi J., Wen Z., Zhong G., Yang H., Wang C., Huang B., et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*. 2020; 368 (6494): 1016–1020. DOI: 10.1126/science.abb7015.

Таблица 5
Результаты выявления антител к вирусу SARS-CoV-2
в сыворотках крови животных в ИФА

Table 5
Results of SARS-CoV-2 antibody detection in animal sera by ELISA

№ п/п	Характеристика проб сыворотки крови	ИФА (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)		ИФА (IDvet)	
		Титр антител*	Количество проб / из них положительных	S/P (%)**	Количество проб / из них положительных
1	Хорьки после вакцинации	1600 ± 0	5/5	707 ± 66	5/5
2	Норки до вакцинации	50 ± 0	2/0	47 ± 9	2/0
3	Норки после вакцинации	1025 ± 225	8/8	529 ± 58	8/8
4	Лисы после вакцинации	300 ± 58	4/4	208 ± 62	4/4
5	Свины невакцинированные	50 ± 0	4/0	3,1 ± 1,8	4/0
6	Песцы невакцинированные	50 ± 0	2/0	2 ± 0	2/0
7	Кошки до вакцинации	50 ± 0	3/0	1 ± 0	3/0
8	Кошки после вакцинации	560 ± 264	5/5	0,80 ± 0,01	5/0
9	Собаки до вакцинации	50 ± 0	4/0	8,3 ± 6,6	4/0
10	Собаки после вакцинации	700 ± 205	6/6	2,40 ± 1,09	6/0

Пробы сыворотки крови от вакцинированных животных отобраны через 4–5 недель после иммунизации экспериментальными вакцинными препаратами против коронавирусной инфекции (COVID-19) производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Serum samples from vaccinated animals were taken 4–5 weeks after immunization using experimental vaccines against coronavirus infection (COVID-19) produced by the FGBI "ARRIAH");

* среднее значение титра антител ± стандартная ошибка среднего, где титр антител – величина, обратная разведению сыворотки (the average value of the antibody titer ± the standard error of the mean, where the antibody titer is the reciprocal value of the serum dilution);

** среднее значение S/P ± стандартная ошибка среднего (mean S/P ± standard error of the mean).

Интерпретация результатов в наборе IDvet (Interpretation of the results obtained by IDvet kit): S/P ≤ 50% – результат отрицательный (negative result), S/P ≥ 60% – результат положительный (positive result), 50% < S/P < 60% – результат сомнительный (inconclusive result).

7. Pickering B. S., Smith G., Pinette M. M., Embury-Hyatt C., Moffat E., Marszal P., et al. Susceptibility of domestic swine to experimental infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27 (1): 104–112. DOI: 10.3201/eid2701.203399.

8. Sit T. H. C., Brackman C. J., Ip S. M., Tam K. W. S., Law P. Y. T., To E. M. W., et al. Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature.* 2020; 586 (7831): 776–778. DOI: 10.1038/s41586-020-2334-5.

9. Oreshkova N., Molenaar R. J., Vreman S., Harders F., Oude Munink B. B., Hakze-van der Honing R. W., et al. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25 (23):2001005. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005.

10. Zhang Q., Zhang H., Gao J., Huang K., Yang Y., Hui X., et al. A serological survey of SARS-CoV-2 in cat in Wuhan. *Emerg. Microbes. Infect.* 2020; 9 (1): 2013–2019. DOI: 10.1080/22221751.2020.1817796.

11. Wernike K., Aebischer A., Michelitsch A., Hoffmann D., Freuling C., Balkema-Buschmann A., et al. Multi-species ELISA for the detection of antibodies against SARS-CoV-2 in animals. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020; tbed.13926. DOI: 10.1111/tbed.13926.

Поступила 22.03.2021

Принята в печать 24.05.2021

Received on 22.03.2021

Approved for publication on 24.05.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Волкова Марина Алексеевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Зиняков Николай Геннадьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Ярославцева Полина Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Чвала Илья Александрович, кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР и мониторингу ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Галкина Татьяна Сергеевна, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики болезней мелких домашних животных ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Андрейчук Дмитрий Борисович, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Marina A. Volkova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Nikolay G. Zinyakov, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Polina S. Yaroslavtseva, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Ilya A. Chvala, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Deputy Director for Research and Monitoring, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Tatyana S. Galkina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Pet Disease Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry B. Andreychuk, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.