

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ПРОТИВОЯЩУРНЫХ АНТИТЕЛ В РЕАКЦИИ ЖИДКОФАЗНОГО БЛОКИРУЮЩЕГО «СЭНДВИЧ»-ВАРИАНТА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Н.Н. Луговская¹, Е.Н. Калинина², К.С. Малкова³, О.В. Воробьева⁴, Г.М. Горячева⁵, Т.К. Майорова⁶

¹ ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lugovskaya@arriah.ru

² ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mail@arriah.ru

³ ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: malkova@arriah.ru

⁴ ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mail@arriah.ru

⁵ ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mail@arriah.ru

⁶ ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mayorova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье описан процесс валидации методики определения уровня противоящурных антител в реакции жидкофазного блокирующего «сэндвич»-варианта ИФА для типов ящура А, О и Азия-1. Произведён анализ результатов и определены основные валидационные характеристики: чувствительность, специфичность, точность, согласованность, прогностичность положительных и отрицательных результатов, воспроизводимость, промежуточная прецизионность в условиях сходимости и воспроизводимости. Результаты валидации методики постановки ИФА удовлетворяли критериям приемлемости.

Ключевые слова: валидация, иммуноферментный анализ, антитела, ящур.

VALIDATION OF THE TECHNIQUE AIMED AT THE DETERMINATION OF FMD ANTIBODIES IN LIQUID PHASE BLOCKING SANDWICH ELISA

N.N. Lugovskaya¹, Ye.N. Kalinina², K.S. Malkova³, O.V. Vorobyova⁴, G.M. Goryacheva⁵, T.K. Mayorova⁶

¹ Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: lugovskaya@arriah.ru

² Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mail@arriah.ru

³ Leading Biologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: malkova@arriah.ru

⁴ Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mail@arriah.ru

⁵ Leading Biologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mail@arriah.ru

⁶ Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mayorova@arriah.ru

SUMMARY

The paper describes the process of the validation of the technique aimed at the determination of FMD antibodies in liquid phase blocking sandwich ELISA for FMD types A, O and Asia1. The results were analyzed and the following main validation characteristics were determined: sensitivity, specificity, accuracy, consistency, predictability of positive and negative results, reproducibility and intermediate precision under the conditions of repeatability and reproducibility. The results of the ELISA procedure validation were in compliance with the acceptability criteria.

Key words: validation, ELISA, antibodies, FMD.

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшей задачей любых диагностических лабораторных исследований, в том числе и на ящур, является получение достоверных результатов, обеспечить которые призвано использование надёжных, стабильных тест-систем. Одним из самых востребованных методов в диагностике ящура является иммуноферментный анализ (ИФА). Для оценки пригодности методики проведения ИФА необходим процесс валидации, включающий оптимизацию, стандартизацию, определение объективных параметров диагностической тест-системы, именуемых валидационными характеристиками. К основным валидационным характеристикам относятся чувствительность, специфичность, точность, прогностичность положительного результата, прогностичность отрицательного результата, k-критерий и т.д. [2, 5–7, 9]. Обеспечение достоверности полученных результатов ИФА возможно лишь при качественном проведении исследований.

Для оценки степени достижения необходимого качества осуществляется анализ повторяемости (сходимости) и воспроизводимости [3, 4]. Данный анализ используется не только для того, чтобы продемонстрировать точность методики и стабильность компонентов реакции, но и показать, насколько точность, аккуратность и квалификация операторов влияют на возможность использования данного метода для решения конкретных диагностических задач.

Целью работы явилась оценка пригодности методики определения уровня противоящурных антител в сыворотке крови животных в реакции жидкофазного блокирующего «сэндвич»-варианта ИФА (ЖБС ИФА) для проведения диагностических исследований на ящур типов А, О, Азия-1 в соответствии с инструкцией по применению «Набора для определения противоящурных антител в сыворотке крови животных в иммуноферментном анализе», производимого в ФГБУ «ВНИИЗЖ».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемый материал. Материалом для исследования служили пробы сыворотки крови от вакцинированных и невакцинированных, клинически здоровых сельскохозяйственных животных, доставленных для исследования на наличие антител против ящура типов А, О, Азия-1 в референтную лабораторию диагностики ящура ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») из Киргизской Республики и 42 регионов РФ, и образцы сыворотки крови, полученные при контроле вакцины в ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Для подсчёта диагностической чувствительности использовались результаты мониторингового исследования проб сыворотки крови от вакцинированных животных в течение 2013 г. — 16 368 проб, 2014 г. — 29 914 проб, 152 пробы сыворотки крови от КРС, отобранных в ходе проведения контроля противоящурной вакцины 18 серий; для подсчёта диагностической специфичности и определения позитивно-негативного порога — 1 961 и 306 проб сыворотки крови от невакцинированного КРС соответственно. Для оценки промежуточной прецизионности в условиях сходимости и воспроизводимости результатов ИФА, полученных 4 операторами при исследовании проб в двух повторностях на одном планшете и разных планшетах в разные дни и сроки, тестировали 336 образцов сыворотки крови от вакцинированного КРС, присланных из Киргизской Республики, и 3 стандартные контрольные

пробы: сильноположительную, слабоположительную и отрицательную сыворотку. Для оценки воспроизводимости в ходе проведения межлабораторных сличительных испытаний (МСИ) методики постановки ИФА по определению уровня противоящурных антител в рамках ФГБУ «ВНИИЗЖ» использовали панель из 11 образцов сыворотки крови животных, включающую: нормальную сыворотку крови КРС; сыворотку крови КРС, вакцинированного против ящура типов С № 564, САТ-2, О₁ Маниса, О ПанАзия-2, А и Азия-1; сыворотку крови овцы, переболевшей оспой; сыворотку крови свиньи до и после экспериментальной иммунизации против везикулярной болезни свиней.

ИФА. При валидации методики определения уровня противоящурных антител в сыворотке крови животных в ИФА реакцию проводили в соответствии с «Инструкцией по применению набора для определения противоящурных антител в сыворотке крови животных в иммуноферментном анализе» (организация-разработчик: ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир), введённой в действие 11.07.2013 г., по стандартному протоколу на поверенном оборудовании.

Относительные чувствительность, специфичность и точность определяли при параллельном тестировании разных выборок проб сыворотки крови КРС в валидируемой тест-системе ИФА и с использованием коммерческих диагностических наборов:

– LPB-ELISA for detection of antibodies of FMDV (Serotype A or O, Asia1), Пирбрайтский институт, Великобритания;

– SPCE for antibodies specific to FMDV Serotype A or O, Asia1, IZSLER, Брешиа, Италия;

– PrioCHECK FMDV type A or O, Asia1, Prionics AG, Лелстад, Нидерланды.

Постановку реакции проводили в соответствии с инструкцией к набору.

Реакция микронейтрализации (PMH). Титры вируснейтрализующих антител в образцах сыворотки крови КРС и свиней определяли в PMH на перевиваемой культуре клеток IB-RS-2 в 96-луночных культуральных планшетах фирмы Costar против 100 ТЦД₅₀ вируса ящура типа А₂₂ Ирак/64, О ПанАзия-2, Азия-1 Таджикистан/11 в соответствии с «Методическими указаниями по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура» (2002) и рекомендациями Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) [8]. Конечную точку титра антител рассчитывали как конечное разведение сыворотки, нейтрализующее 100 ТЦД₅₀ гомологичного вируса в 50% лунок, и выражали в десятичных логарифмах (lg).

Обработка результатов ИФА. При выборе точки разделения положительного/отрицательного (позитивно-негативный порог) и оценке воспроизводимости и промежуточной прецизионности в условиях сходимости и воспроизводимости результатов ИФА использовали статистическую обработку и анализ полученных данных, для чего вычисляли среднее значение PI (M или μ), стандартное отклонение SD (или σ), коэффициент вариации CV, точку разделения положительного/отрицательного (PNP) по следующим формулам:

$$M = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{1}{n} (x_1 + \dots + x_n) \quad (1);$$

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2);$$

$$CV = SD / M \times 100\% \quad (3);$$

$$PNP = M + 2SD \quad (4).$$

Чувствительность (Se), специфичность (Sp), точность (Ac) ЖБС ИФА, диагностическую (D) или относительную (R); k-критерий (k); позитивное прогностическое значение теста (PPV) и негативное прогностическое значение теста (NPV) вычисляли по формулам 5–10, используя данные, приведённые в матрице 2x2 для вычисления валидационных характеристик (табл. 1).

Чувствительность, или долю истинно положительных результатов при исследовании в ЖБС ИФА проб, полученных от животных с известным положительным статусом, определяли как:

$$Se = \frac{a}{a + c} \times 100\% \quad (5).$$

Специфичность, или долю истинно отрицательных результатов при исследовании в ЖБС ИФА проб, полученных от животных с известным отрицательным статусом, определяли как:

$$Sp = \frac{b}{b + d} \times 100\% \quad (6).$$

Точность, или долю подтверждённых результатов среди общего количества проб с известным статусом, определяли как:

$$Ac = \frac{a + b}{n} \times 100\% \quad (7).$$

k-критерий, или степень согласованности, определяли как:

$$k = \frac{Pr(a) - Pr(e)}{1 - Pr(e)} \quad (8),$$

где $Pr(a) = \frac{a + b}{n}$ — абсолютная согласованность результатов;

$$Pr(e) = \left(\frac{a + d}{n} \times \frac{a + c}{n} \right) + \left(\frac{b + c}{n} \times \frac{b + d}{n} \right) -$$

обобщенная случайная вероятность согласованности результатов.

Таблица 1
Матрица для вычисления валидационных характеристик

Известный/ подтверждённый статус	ЖБС ИФА		
	положительные	отрицательные	всего
положительные	a	c	a+c
отрицательные	d	b	b+d
всего	a+d	b+c	n

a — истинно положительные результаты; d — ложноположительные результаты;
c — ложноотрицательные результаты; n — общее количество исследованных проб.
b — истинно отрицательные результаты;

Позитивное прогностическое значение теста, свидетельствующее о том, что полученные положительные результаты являются фактически положительными в соответствии с истинным диагностическим статусом, определяли как

$$k = \frac{Pr(a) - Pr(e)}{1 - Pr(e)} \quad (9).$$

Негативное прогностическое значение теста, свидетельствующее о том, что полученные отрицательные результаты являются фактически отрицательными в соответствии с истинным диагностическим статусом, определяли как

$$NPV = \frac{(1 - P) \times Sp}{P \times (1 - Se) + (1 - P) \times Sp} \quad (10),$$

где $P = \frac{a + c}{n}$ — превалентность положительных значений.

Критерии приемлемости результатов валидации. Приемлемость результатов валидации оценивали по следующим показателям. Для статистических данных, отражающих воспроизводимость и промежуточную прецизионность в условиях сходимости и воспроизводимости, на основании значений CV, которые определяли только для положительных, статистически значимых результатов. Значение $CV \leq 20\%$ считали приемлемым, $CV \geq 30\%$ — не приемлемым [1, 3].

Валидационные характеристики тест-системы, такие как чувствительность, специфичность, точность, позитивное прогностическое значение теста, негативное прогностическое значение теста, оценивали по k-критерию [4]. Критерии согласованности данных приведены в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Правильность выбора точки разделения положительного/отрицательного имеет решающее значение для диагностических методов. От того, насколько точно квалифицированы результаты исследований, зависит не только правильно поставленный диагноз, но и объективность оценки тест-системы.

Ранее для данной тест-системы ИФА было подсчитано пороговое значение процента ингибиции (PI), составлявшее 50%. Подтверждённый через значительный промежуток времени позитивно-негативный порог (PNP) может свидетельствовать о стабильности компонентов и стандартности условий проведения реакции, что в свою очередь влияет на воспроизводимость и достоверность полученных результатов.

Для определения позитивно-негативного порога диагностических тест-систем для 3 типов ящура: А, О и Азия-1 — исследовали параллельно выборку из 306 проб сыворотки крови от невакцинированных, клинически здоровых животных из 5 регионов РФ: Тамбовской, Курской, Белгородской, Рязанской областей и Ненецкого автономного округа. Для каждого типа ящура вычисляли среднее значение PI, стандартное отклонение σ . Значение PNP определяли как сумму $PI_{\text{сред.}}$ и 2σ . Данные расчётов приведены в табл. 3.

Был проведён анализ значений PI и подсчитано количество проб для диапазонов значений PI, соответствующих показателям $PI_{\text{сред.}} - 1\sigma$, $PI_{\text{сред.}}$, $PI_{\text{сред.}} + 1\sigma$,

$PI_{\text{сред.}} + 2\sigma$ (PI_{PNP}), $PI_{\text{сред.}} + 3\sigma$. Плотность распределения значений PI показана на рис. 1.

График, представленный на рис. 1, свидетельствовал о приближённости распределения к нормальной модели гауссова распределения.

Для унификации процедуры обработки результатов исследования, полученных с использованием тест-систем на 3 типа ящура, было найдено среднее пороговое значение PI, которое составило $46,9 \pm 3\%$ ($CV=7,36\%$) с 95% доверительным интервалом и $58,8 \pm 3\%$ ($CV=5,06\%$) с 99% доверительным интервалом. Таким образом, поскольку пороговые значения PI, определённые для каждого из 3 типов ящура (для типа А — 43%, для типа О — 50%, для типа Азия-1 — 47%) при исследовании данной (n=306) выборки проб сыворотки (табл. 3), оказались близки ранее установленному пороговому значению в 50%, точка разделения положительного/отрицательного была подтверждена в ходе настоящих исследований.

При оценке промежуточной прецизионности в условиях сходимости и воспроизводимости результатов реакции ИФА, полученных разными операторами, повторяемость оценивали по качественным характеристикам: по положительным или отрицательным значениям, при этом подсчитывали количество совпавших и несовпавших результатов. Сходимость (уровень совпадения результатов) при тестировании на одном планшете была высокой для всех 3 тест-систем, средняя сходимость по 3 типам ящура составила 98,86%, несовпадения наблюдали в 1,14% случаев. Повторяемость результатов при тестировании в разные дни была ниже — 90,77%, но на достаточно высоком уровне. Доля несовпавших результатов в среднем была 9,27%.

Также для изучения промежуточной прецизионности в условиях сходимости и воспроизводимости (степень разброса, установленная статистическими методами) результатов внутри одной лаборатории были проанализированы результаты исследования контрольных образцов сыворотки и контроля анти-

Рис. 1. Плотность распределения значений PI, полученных при исследовании в ИФА проб сыворотки крови от невакцинированного, клинически здорового КРС

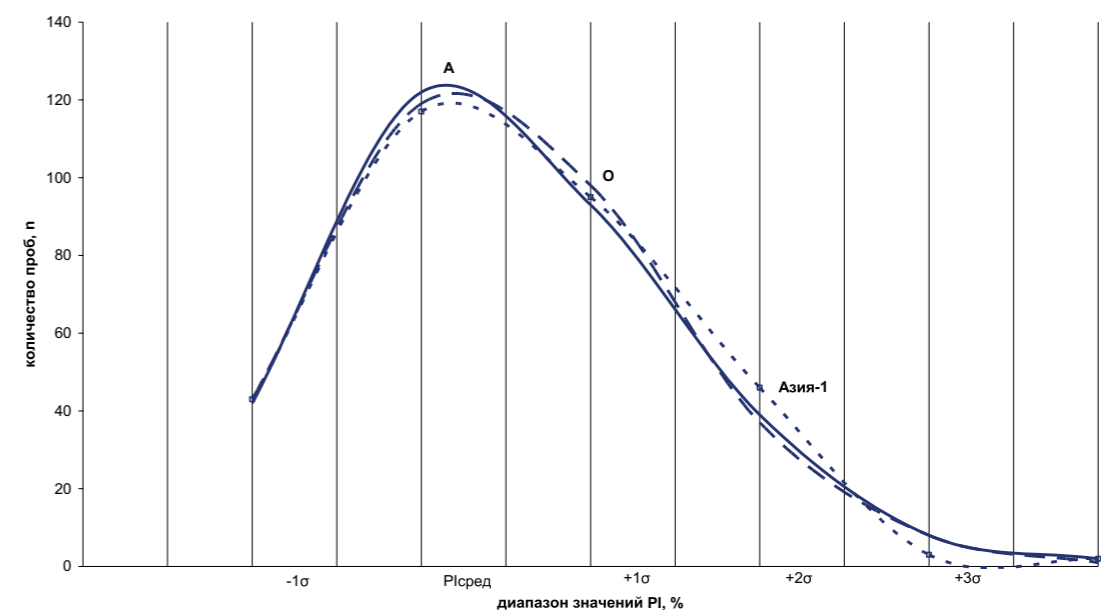


Таблица 2
Критерии согласованности данных

k-критерий	Согласованность
<0	нет согласованности
0–0,20	незначительная
0,21–0,40	слабая
0,41–0,60	умеренная
0,61–0,80	значительная
0,81–1,00	высокая

Таблица 3
Расчёт позитивно-негативного порога

Процент ингибиции	Тип ящура		
	А	О	Азия-1
$PI_{\text{сред.}}$	18,773	27,929	23,539
σ	12,397	11,318	11,632
$PI_{\text{сред.}} + 1\sigma$	31,17	39,247	35,171
$PI_{\text{сред.}} + 2\sigma$ (PI_{PNP})	43,467	50,365	46,803
$PI_{\text{сред.}} + 3\sigma$	55,964	61,88	58,435

гена, проведённые в ходе одной реакции и в разных реакциях в разные дни.

Каждый образец тестировали в целом 394 раза. Как показывал анализ результатов, средние значения PI для контрольных образцов находились в рамках установленного интервала, который соответствовал следующим значениям PI:

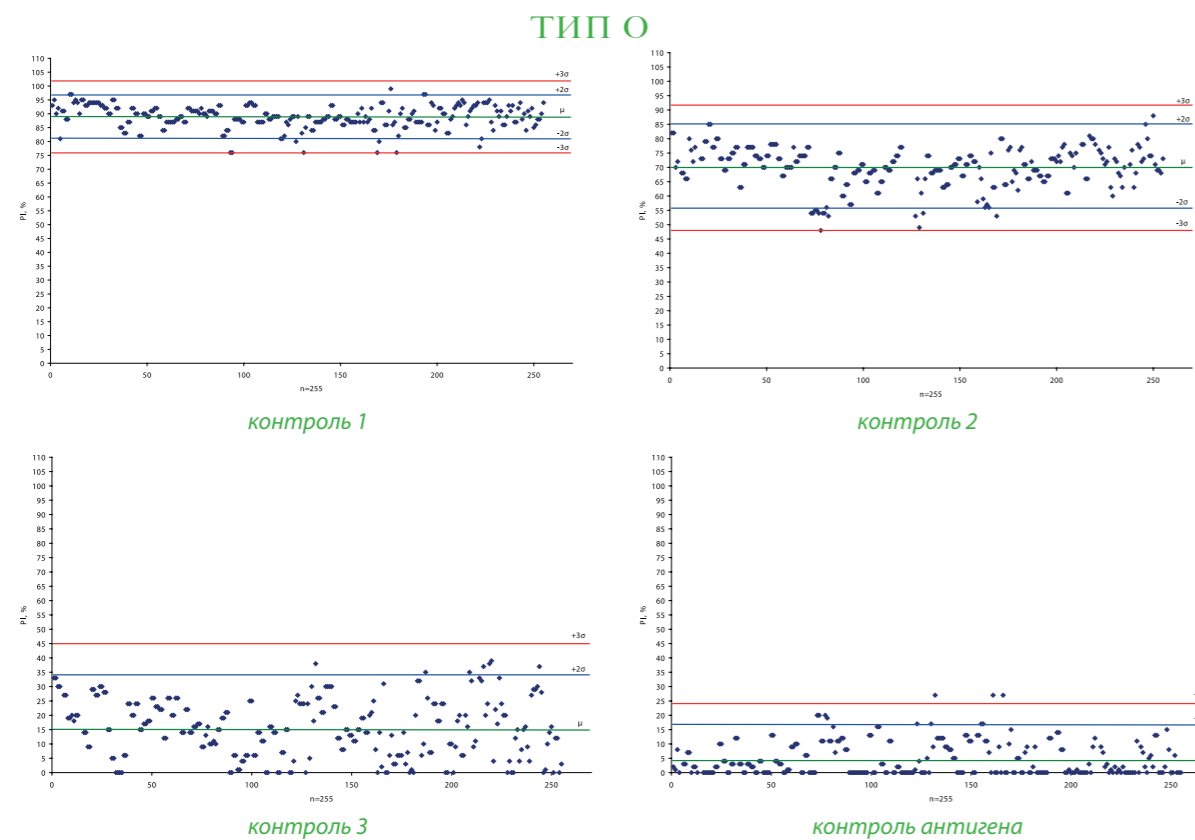
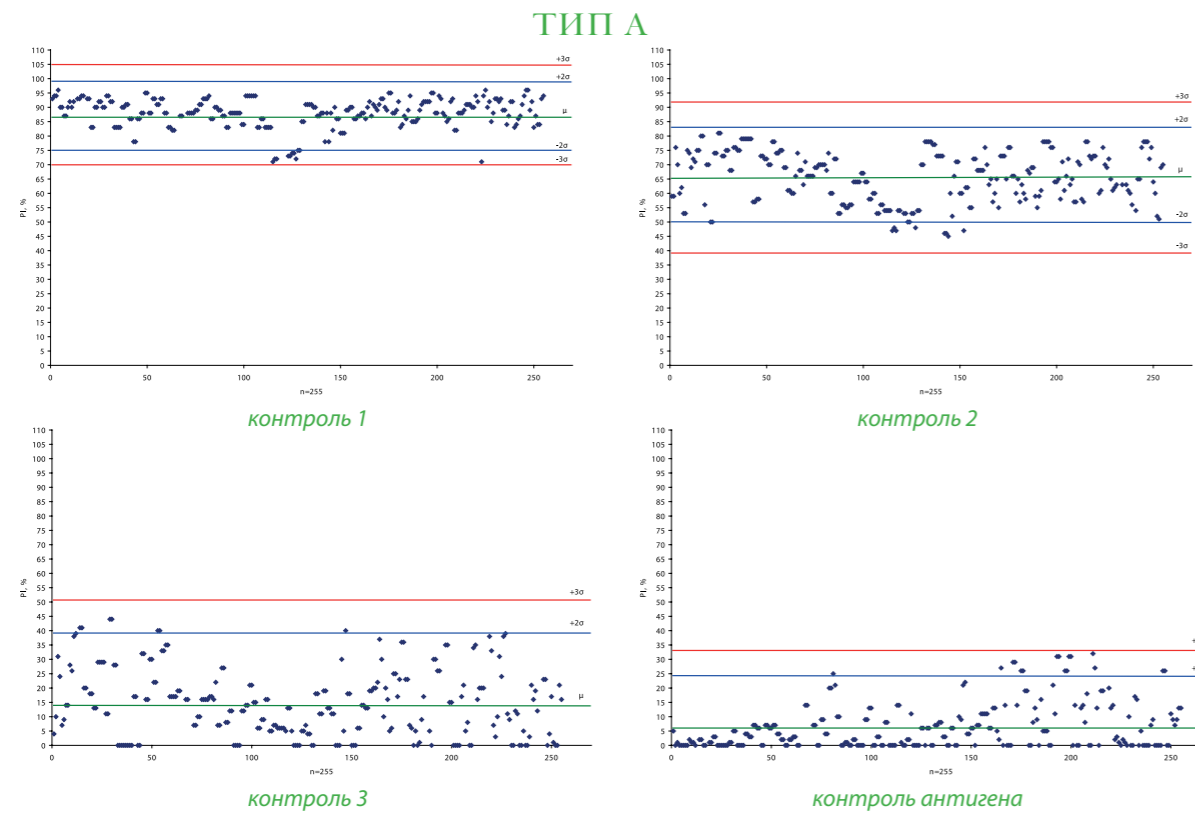
- контроль 1 (сильноположительная сыворотка) — >75%;
- контроль 2 (слабоположительная сыворотка) — 50–75%;
- контроль 3 (отрицательная сыворотка) — <50%.

Значения стандартного отклонения σ не превышали 13,5%, коэффициент вариаций CV соответствовал прием-

лемым значениям для контролей 1 и 2. В среднем по всем 3 тест-системам значение CV для контроля 1 было 4,9%, для контроля 2 — 13,47%. Для контроля 3 и контроля антигена значение CV не определяли, поскольку из-за низких значений PI разброс был значительный, однако, даже с учётом стандартного отклонения, не выходил за рамки допустимого 50% и 30% порога соответственно.

При визуальном изучении карт Шухарта (рис. 2), построенных на основании результатов использования контрольных образцов в разные временные периоды (n=255), видно, что основной массив данных находился в определённой для каждого контроля области и значения PI варьировали в интервале $\mu \pm 2\sigma$.

Выпадающие значения имели скорее случайный, а не систематический характер, вызванный неточностями



ТИП АЗИЯ-1

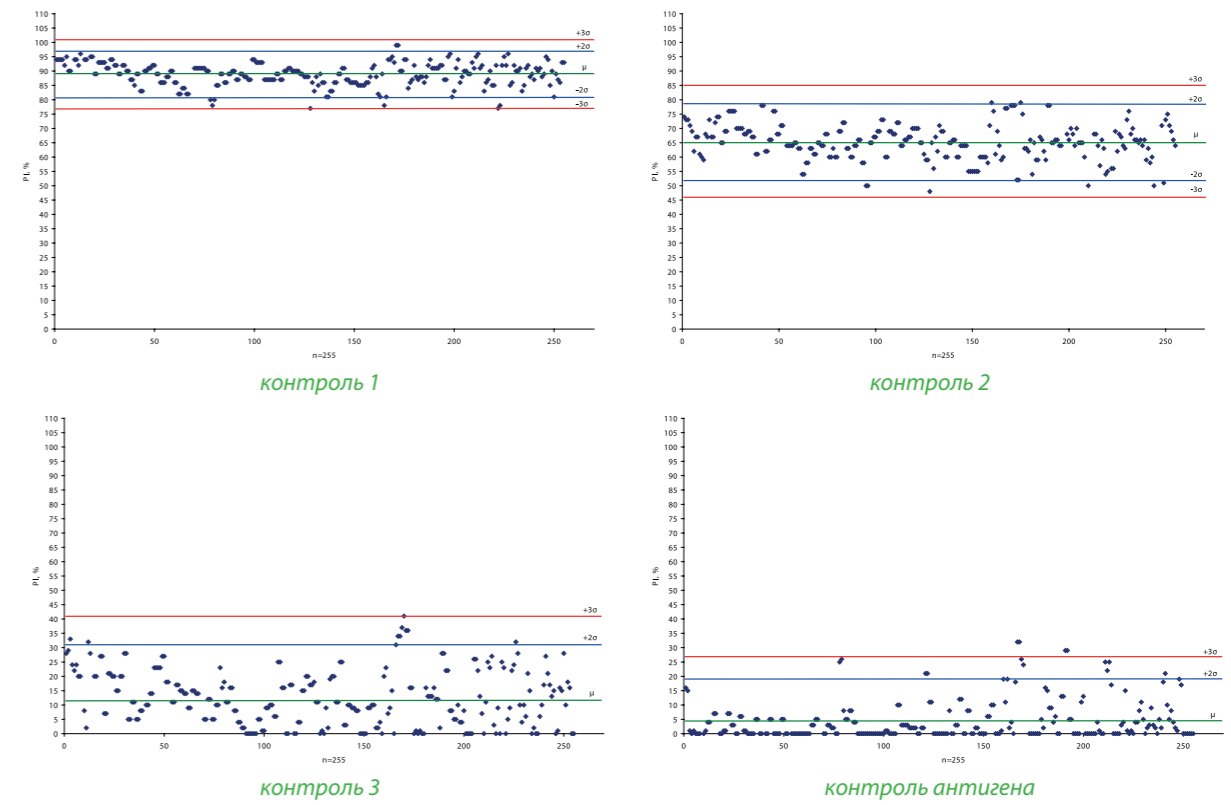


Рис. 2. Контрольные карты для ИФА. Зелёным цветом выделено μ ($PI_{\text{сред}}'$, n=255), синим — $\mu \pm 2\sigma$, красным — $\mu \pm 3\sigma$

ми в соблюдении протокола или техническими погрешностями, допущенными операторами при постановке реакции ИФА, что легко устранялось в последующих исследованиях.

Оценку воспроизводимости результатов, т.е. возможности с помощью данного метода получать достоверные результаты для одних и тех же испытуемых образцов в разных лабораториях, производили на основании анализа результатов, полученных в ходе проведения МСИ. Для проведения МСИ методики постановки ИФА по определению уровня противоящурных антител в рамках учреждения (приказ зам. директора ФГБУ «ВНИИЗЖ» № 314 от 16.12.2013 г.) использовали зашифрованную панель из 11 образцов сыворотки крови животных (см. Материалы и методы) (данные не показаны).

Операторам, использующим данную методику постановки ИФА впервые, удалось идентифицировать зашифрованные пробы. Значение CV для положительных испытуемых и контрольных образцов не превышало 19%, что свидетельствовало о приемлемости результатов и хорошей воспроизводимости методики.

Была проведена предварительная оценка тест-системы по основным валидационным характеристикам: диагностическая чувствительность (DSe), диагностическая специфичность (DSp), диагностическая точность (DAc), к-критерий, прогностичность положительного результата (PPV), прогностичность отрицательного результата (NPV). Для этой цели использовали результаты контроля противоящурной вакцины 18 серий. Кровь отбиралась на 21 сут. после иммунизации (табл. 4). Расчёты диагностических характеристик тест-системы представлены в табл. 5.

Для оценки диагностической чувствительности и точности в реальных условиях использовали результаты мониторинговых исследований на ящур по Волгоградской области в 2014 году. Данный регион был выбран не случайно. Мониторинговый контроль на ящур в этом регионе осуществлялся на протяжении нескольких лет как ФГБУ «ВНИИЗЖ», так и ГБУ «Волгоградская областная ветеринарная лаборатория» с использованием наборов производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». Результаты исследований разных лабораторий согласовывались между собой. К тому же в Волгоградской области вакцинация и отбор проб проводились строго в соответствии с планом, пробы доставлялись своевременно, и была предоставлена точная информация о возрасте животных и применённых вакцинах. Поскольку статус животных был определён с большой долей достоверности, образцы сыворотки крови КРС из данного региона были использованы для валидации методики, что не противоречит рекомендациям МЭБ по подбору проб [6]. Для оценки диагностической специфичности также использовали пробы сыворотки крови от клинически

Таблица 4
Результаты исследования в ИФА на ящур типов А, О, Азия-1 образцов сыворотки крови КРС, отобранных в ходе контроля противоящурной вакцины

Диагностический статус животных	Положительные на тип А/О/Азия-1	Отрицательные на тип А/О/Азия-1	Всего
вакцинированные против ящура типа А/О/Азия-1	66/105/65	10/11/13	76/116/78
невакцинированный контроль	0/0/0	26/36/30	26/36/30
всего	66/105/65	36/47/43	102/152/108

Таблица 5
Диагностические характеристики для реакции ИФА на ящур типов А, О, Азия-1

Диагностические характеристики	Тип ящура		
	А	О	Азия-1
DSe	86,8%	90,5%	83,3%
DSp	100%	100%	100%
DAc	90,2%	92,8%	88,0%
k-критерий	0,77	0,819	0,736
PPV	1,0	1,0	1,0
NPV	0,723	0,766	0,698

Таблица 6
Результаты исследования в ИФА на ящур типов А, О, Азия-1 образцов сыворотки крови КРС с известным диагностическим статусом

Диагностический статус животных	Положительные на тип А/О/Азия-1	Отрицательные на тип А/О/Азия-1	Всего	Превалентность для типа А/О/Азия-1
вакцинированные против ящура типа А/О/Азия-1	802/850/803	156/108/155	958/958/958	0,328/0,343/0,451
невакцинированные	19/28/28	1942/1808/1140	1961/1836/1168	
всего	821/878/831	2098/1916/1295	2919/2794/2126	

здоровых животных из регионов, свободных от ящура, где не применяется профилактическая вакцинация. Сведения о количестве положительных и отрицательных образцов и результатах их исследования в ИФА для типов ящура А, О и Азия-1 отражены в табл. 6.

Результаты расчётов диагностических характеристик для данной выборки испытуемых образцов сыворотки приведены в табл. 7, в скобках указан доверительный интервал.

Высокий уровень значений k для реакций на все 3 типа ящура (более 0,81) свидетельствовал о хорошей согласованности результатов исследований с диагностическим статусом образцов, а значения PPV и NPV, лежащие в диапазоне 0,881–0,977, — о достоверности результатов исследований.

Однако для другой выборки проб (n=46282), в которую входили нестандартизованные полевые пробы сыворотки крови, отобранные от животных разного возраста в разные сроки до и после вакцинации, чув-

ствительность и точность были ниже и составили 59,4 и 61% для типа А, для типа О — 58,2 и 59,7%, для типа Азия-1 — 60 и 60,9% соответственно. Это можно объяснить неоднородностью выборки проб для исследования и наличием целого ряда внешних факторов, влияющих на эффективность вакцинации.

Относительные чувствительность (RSe), специфичность (RSp) и точность (RAc) определяли при параллельном тестировании разных выборок проб сыворотки крови КРС в валидируемой тест-системе ИФА (ФГБУ «ВНИИЗЖ») и с использованием коммерческих диагностических наборов.

Результаты сравнения тест-системы ФГБУ «ВНИИЗЖ» с коммерческими наборами на основе ИФА представлены в табл. 8. В целом валидируемая тест-система ИФА демонстрировала значительную согласованность с референтными иммуноферментными диагностическими наборами, k-критерий находился в интервале 0,632–0,782, и лишь при сравнении с наборами IZSLER для типов О и Азия-1 значения k составляли 0,561 и 0,398 соответственно, т.е. согласованность результатов исследований была выражена в умеренной и слабой степени.

Таблица 7
Диагностические характеристики тест-системы на основе ИФА

Диагностические характеристики	Тип ящура		
	А	О	Азия-1
DSe	83,7% (82,7–84,5%)	88,7% (87,7–89,6%)	83,8% (82,7–84,8%)
DSp	99% (98,6–99,4%)	98,5% (97,9–99,0%)	97,6% (96,7–98,4%)
DAc	94%	95,1%	91,4%
k-критерий	0,859 (0,843–0,871)	0,89 (0,873–0,904)	0,825 (0,803–0,841)
PPV	0,977 (0,965–0,986)	0,969 (0,956–0,978)	0,967 (0,953–0,977)
NPV	0,926 (0,921–0,929)	0,944 (0,938–0,948)	0,881 (0,872–0,887)

Таблица 8
Сравнение диагностической тест-системы ИФА ФГБУ «ВНИИЗЖ» с референтными наборами на основе ИФА

Относительные характеристики ИФА, ФГБУ «ВНИИЗЖ»	ЖБС ИФА, Пирбрайт			сИФА, IZSLER			сИФА, PrioCHECK		
	Тип А	Тип О	Тип Азия-1	Тип А	Тип О	Тип Азия-1	Тип А	Тип О	Тип Азия-1
RSe	98,5%	100%	100%	87,8%	70,0%	67,0%	81,8%	68,5%	81,3%
RSp	79,1%	78,9%	65,2%	91,1%	90,2%	96,0%	100%	97,5%	100%
RAc	86,2%	85,3%	88%	89,2%	77,7%	72,2%	89,0%	81,1%	87,5%
k-критерий	0,719	0,694	0,71	0,782	0,561	0,398	0,78	0,632	0,742
PPV	0,731	0,673	0,846	0,927	0,920	0,988	0,93	0,974	0,994
NPV	0,99	0,987	0,978	0,854	0,652	0,386	0,782	0,703	0,724

При сравнении результатов параллельного тестирования образцов сыворотки крови КРС в реакциях ИФА и микронейтрализации наблюдали хорошую согласованность: k-критерий, определённый для типа О, продемонстрировал высокую степень согласованности и значительную степень — для типов А и Азия-1 (табл. 9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённой валидации диагностической тест-системы на основе жидкофазного блокирующего «сэндвич»-варианта ИФА в соответствии с «Инструкцией по применению набора для определения противоящурных антител в сыворотке крови животных в иммуноферментном анализе» показано, что данная методика исследований на ящур была воспроизводимой не только в пределах одной лаборатории, но и при проведении межлабораторных сравнительных испытаний в рамках ФГБУ «ВНИИЗЖ». Воспроизводимость и промежуточная прецизионность в условиях сходимости и воспроизводимости результатов не выходили за рамки допустимых значений CV ($\leq 20\%$). Значения диагностических показателей: чувствительности — $>83\%$, специфичности — $>97\%$, точности — $>91\%$, высокий уровень значений k для реакций на все 3 типа ящура ($>0,81$) свидетельствовали о хорошей согласованности результатов исследований с диагностическим статусом образцов, а значения PPV и NPV, лежащие в диапазоне 0,881–0,977, — о достоверности результатов исследований. Также валидируемая тест-система демонстрировала согласованность с реакцией микронейтрализации: k-критерий, определённый для типа О, показал высокую степень согласованности и значительную — для типов А и Азия-1. По основным характеристикам тест-система ИФА ФГБУ «ВНИИЗЖ» не уступала референтным иммуноферментным диагностическим наборам и проявляла значительную степень согласованности результатов. Подтверждённый позитивно-негативный порог в 50% свидетельствовал о стабильности и стандартности реакции ИФА. Таким образом, результаты валидации методики постановки ИФА удовлетворяли критериям приемлемости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дудников С.А. Количественная эпизоотология: основы эпидемиологии и биостатистики. — Владимир, 2004. — 460 с.
- Использование принципов аналитической эпизоотологии в ветеринарной практике / А.К. Караулов, С.А. Дудников, К.П. Николаева, В.М. Гуленкин // Тр. фе-

дерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2005. — Т. 3. — С. 73–84.

3. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М: Высшая школа, 1990. — 352 с.

4. Статистические методы анализа в клинической практике / П.О. Румянцев, В.А. Саенко, У.В. Румянцева, С.Ю. Чекин. — URL: <http://www.kantiana.ru/medicinal/help/StatMethodsInClinics.pdf>.

5. Jacobson R.H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases // Rev. Sci. Tech. OIE. — 1998. — Vol. 17, № 2. — P. 469–486.

6. OIE. Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Chapter 1.1.5. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. — 7th ed. — Paris, France, 2012. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf.

7. OIE. Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Validation Guidelines 3.6.1. Development and optimisation of antibody detection assay. — Paris, France, 2014. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.1_ANTIBODY_DETECT.pdf.

8. OIE. Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Chapter 2.1.5. Foot and mouth disease. — 7th ed. — Paris, France, 2012. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.05_FMD.pdf.

9. Vallat B. OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. — 2nd ed. — Paris, France, 2008. — 67 p.

Таблица 9
Сравнение диагностической тест-системы ИФА с реакцией микронейтрализации

Относительные характеристики ИФА	РМН		
	Тип А	Тип О	Тип Азия-1
RSe	94,3% (92,2–96,0%)	90,7% (89,2–91,7%)	96,7% (95,2–98,0%)
RSp	80,3% (76,2–83,7%)	96,7% (94,3–98,3%)	66,7% (58,1–73,3%)
RAc	89,5%	93,0%	91,9%
k-критерий	0,761 (0,697–0,813)	0,855 (0,817–0,880)	0,684 (0,569–0,782)
PPV	0,903 (0,883–0,920)	0,978 (0,962–0,987)	0,939 (0,924–0,951)
NPV	0,879 (0,833–0,915)	0,867 (0,845–0,881)	0,794 (0,692–0,873)