

Принципы отбора проб для эффективной

ПЦР/ИФА диагностики

Илья Волков Biochek РФ



Текущие вопросы касательно ИФА\ПЦР мониторингов

- Оптимальное количество проб для мониторинга которое нужно отбирать для достоверной диагностики разных по инфекционному статусу и уровню циркуляции инфекции популяций свиней?
- Выборка группы животных для мониторинга
 - - станок
 - - комната/полуздание
 - - цех
 - - репродуктор

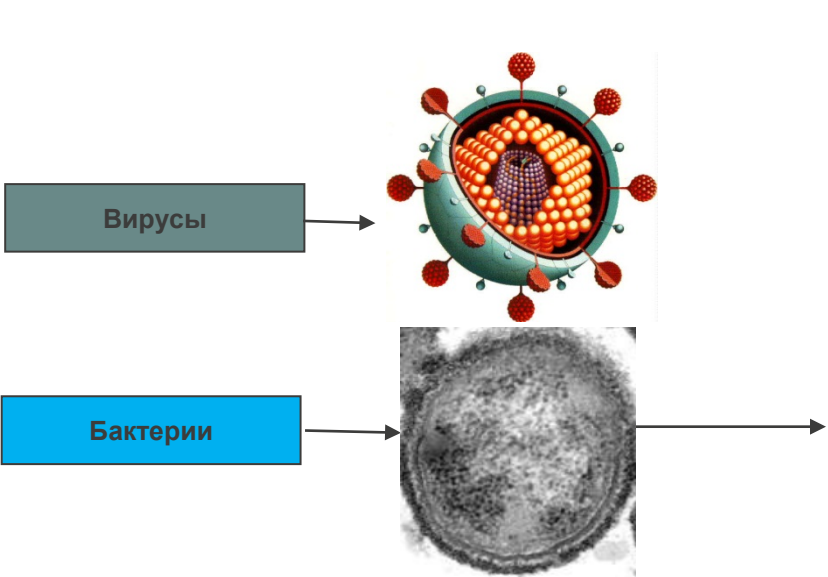
Выбор протокола мониторинга исходя из задач?

- Мониторинг инфекции с выраженными клиническими признаками
- Мониторинг латентной циркуляции инфекции
- Подтверждение СПФ статуса
- Выбор метода исследования и материала для ИФА\ПЦР при разных инфекциях

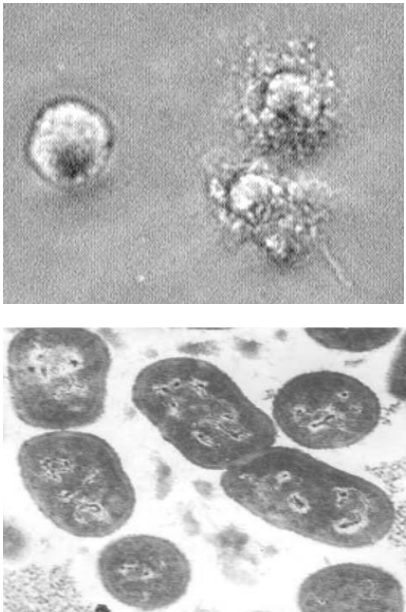


Разница в отборе проб в зависимости от уровня циркуляции инфекции

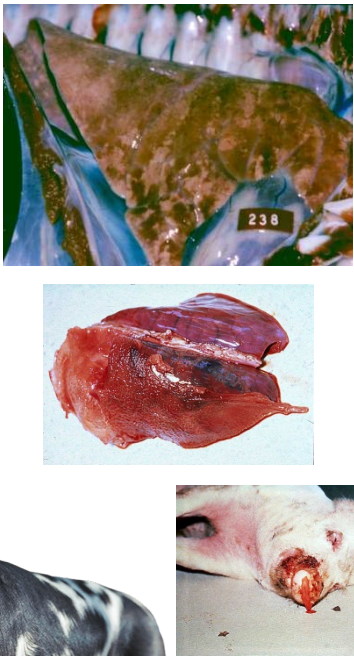
Контаминация



Бессимптомная циркуляция



Инфекция



- Контаминация** - % инфицированных менее 5% от популяции
- Бессимптомная циркуляция** – распространение инфекции в популяции в зависимости от Уровня контагиозной R - % инфицированных 5-15%
- Клиническое проявление инфекция** – четкие клинические, признаки, % инфицированных более 15%



Отбор проб в зависимости от уровня циркуляции инфекции для 95% достоверности исследования

← Prevalence of PRRS-, PCV2-, M hyo-, App-, Influenza-, Aujeszky- and CSF infection mostly high

herd size	prevalence in %											
	50	40	30	25	20	15	10	5	2	1	0.5	0.1
20	4	6	7	9	10	12	16	19	20	20	20	20
30	4	6	8	9	11	14	19	26	30	30	30	30
40	5	6	8	10	12	15	21	31	40	40	40	40
50	5	6	8	10	12	16	22	35	46	50	50	50
60	5	6	8	10	12	16	23	38	55	60	60	60
70	5	6	8	10	13	17	24	40	62	70	70	70
80	5	6	8	10	13	17	24	42	68	79	80	80
90	5	6	8	10	13	17	25	43	73	87	90	90
100	5	6	9	10	13	17	25	45	78	96	100	100
150	5	6	9	11	13	18	27	49	95	130	148	150
200	5	6	9	11	13	18	27	51	105	155	190	200
500	5	6	9	11	14	19	28	56	129	225	349	500
1000	5	6	9	11	14	19	29	57	138	258	450	950
5000	5	6	9	11	14	19	29	59	147	290	564	2253
10000	5	6	9	11	14	19	29	59	148	294	581	2588
∞	5	6	9	11	14	19	29	59	149	299	596	2995

Martin et al.



Level of testing → **conventional**

SPF



Расчет достоверности отбора проб для мониторинга

1. Задача опередить размер выборки для расчета % циркуляции инфекции в стаде 1000 голов в достоверностью 95%
2. Для решения этой задачи используем формулу Кохрена

$$n = [Z^2 \times p \times (1-p)] / [d^2 + Z^2 \times p \times (1-p) / N]$$

n – необходимый размер выборки

Z – коэффициент доверительной вероятности 1,96

P – ожидаемая вероятность больных в выборке 10%

d - допустимая погрешность(возьмем 5%)

Выводы по расчету для 1000 голов нужно выбрать в зависимости от уровня погрешности от 122 – 176 голов.

Усредняем размер выборки – 150 голов



2 шаг расчета

1. Проводим тестирование 150 образцов
 - Для SPF стада методом ИФА
 - Для определения уровня латентной циркуляции инфекции на не вакцинированном стаде - методом ИФА
 - Для определения латентной инфекции на вакцинированном поголовье ПЦР/ИФА

2. Например из 150 проб получили 30 позитивных проб

Вывод = с вероятностью 95% уровень преваляирования инфекции в стаде = 20%

3. Подставляем 20% в таблицу Мартина и понимаем что для данного процента преваляирования инфекции в стаде статистически достоверным количеством отбора проб будет 14 проб от 1000 голов.

4. Выбираем протокол мониторинга из расчета что в исследуемых группах будет от 1000 и более голов.



Пример практического применения

1. Пример Завезли 1000 голов рем свинки вакцинированной маркированной вакциной против ВБА и поставили на карантин

В анамнезе g1 позитивы у единичных животных

Вопрос сколько в стаде позитивных g1 животных, какой % преваляирования латентной инфекции в стаде для планирования программы эрадикации.

Следуя формуле Кохрена отбираем 150 проб от 1000 голов проводим ИФА мониторинг на g1 – получили 8 позитивных проб ремсвинки определяем % инфицирования стада с достоверностью 95% = 5% в данный момент.

Подставляем уровень превалентности 5% в таблицу Мартина = получаем для достоверного мониторинга ВБА
С поголовья 1000 голов нам достаточно взять 57 проб сыворотки крови!

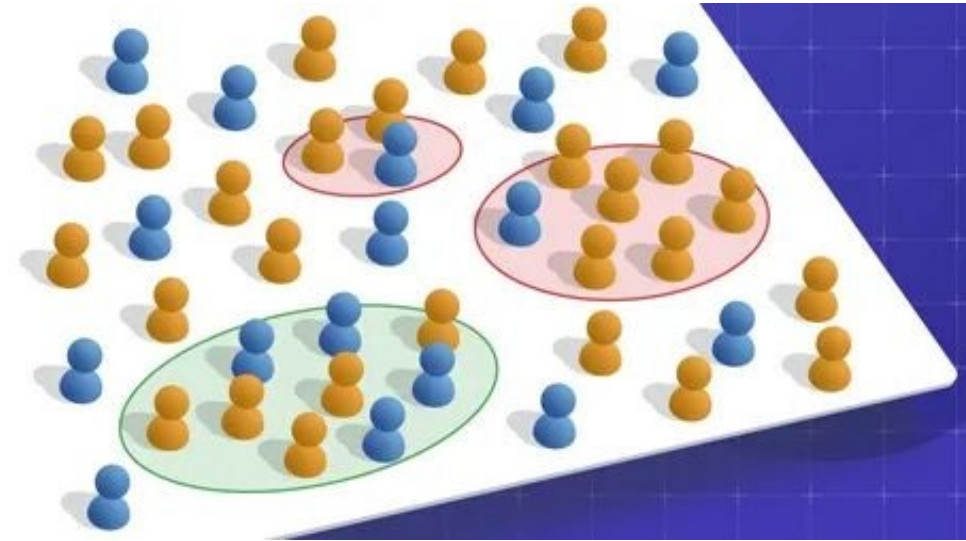
2. Можно применять данную методику для определения уровня преваляирования инфекции в стаде
Для расчета лечебное профилактических мероприятий.

3. На вакцинированном поголовье также будет эффективно определить уровень латентной циркуляции
Например ВБА на откорме или ЦВИС или РРСС, так как данные инфекции могут циркулировать в стаде не смотря
На вакцинацию.



Критерии по отбору проб для мониторинга

1. Нужно правильно выбрать исследуемую группу животных
(Участок доращивания, несколько комнат, 1 комната.)
2. Производить отбор проб с охватом согласно выбранной группы
(если это комната нельзя отбирать пробы из 1 станка)
3. Отбирать пробы у клинически здоровых животных
4. Выбрать оптимальные методики для мониторинга:
 - Парные сыворотки
 - Метод возрастных срезов
 - Метод по подтверждению статуса
 - Выбор метода тестирования ИФА или ПЦР или их комбинация
 - ПЦР(PPCC) – длительность виремии 36 дней
 - ИФА длительность иммунного фона 3-6 мес



Выводы

- При отборе 150 проб сывороток крови от группы животных в 1000 голов – со статистической достоверностью более 90% в ИФА мы можем обнаружить 5% и менее циркуляции инфекции на не вакцинированном поголовье
- При большей циркуляции инфекции в не вакцинированном стаде от 20-30% достаточно 10 проб с группы 500 - 1000 голов что бы ее обнаружить.
- При пороге инфекционной циркуляции более 50% достаточно 5 проб от 1000 голов что бы найти хотя бы 1 голову после контакта с патогеном.
- На вакцинированном поголовье используем мониторинга возрастного среза, где с каждой группы животных отбирается 10 проб сыворотки крови и таких возрастных групп не менее 7. Оптимальные возраста для отбора 20,60,90,140,170,210, свиноматки 2-3 цикл.
- Проблема современного ПЦР мониторинга в низкой статистической достоверности результата и за маленькой выборки и пулирования они не дают возможность отследить небольшой % вирусных животных(или свиней латентных носителей) из за ограниченного количества отбора
- **Вывод – оптимальный мониторинг болезней свиней это всегда разумное сочетание ИФА и ПЦР в статистически достоверной выборке а не преобладания одного метода диагностики на другим!**



Ожидаемые значения результатов ИФА мониторинга BioChek



Что такое «ожидаемые титры» - это информация от производителя по каждому тест набору о значениях результатов ИФА которые может получить клиент пользуясь ИФА тестами Биочек в своей лаборатории.

Компания производитель перед выпуском тест наборов протестировала их на контрольных позитивных сыворотках и предоставляет данную информацию клиенту в качестве дополнительного сервиса.

Ожидаемые значения конечного результата очень важны, клиент при получении результата в своей лаборатории может без труда сравнить его с уровнем ожидаемых титров и понять значение полученных результатов.

Ожидаемые значения ИФА это положительные результаты получение либо от контакта с инфекцией либо после вакцинации.

Помимо этого, компания Биочек предоставляет клиенту референтный контроль для оценки качества постановки реакции Elisa, который работает по этому же принципу. Если реакция прошла валидна, то результаты постановки референтного контроля должны уложиться в коридор ожидаемых значений титров.



Ожидаемые титры – как инструмент интерпретации ИФА результатов

Ожидаемые титры могут помочь клиенту в следующих вопросах эпизоотологии:

- Оценка качества и длительности материнского иммунитета
- Оценка качества и длительности поствакцинального иммунитета
- Поиск циркуляции инфекции на вакцинированном и не вакцинированном поголовье
- Оценка качества адаптации ремонтного поголовья
- Но важно понимать что референтные значения ожидаемых титров не нужно слепо применять к каждой ситуации для получения интерпретации результата.
- Для эффективной интерпретации полученного результата нужна дополнительная информация:
 - % однородности иммунитета в группе
 - % негативных проб
 - % ожидаемых титров в референтных значениях
 - % высоко позитивных проб(полученных от возможного контакта с полевой инфекцией)
- Дополнительно:
 - В идеале клиническая оценка исследуемого поголовья
 - Результаты Пат вскрытия + ПЦР мониторинг
 - Оптимальный протокол отбора проб для мониторинга
 - Мониторинг сопутствующих заболеваний для дифференциального диагноза



Ожидаемые показатели поствакцинального иммунитета

Для мониторинга ЦВИС, РРСС, Гриппа ,КЧС используется протокол из 7 возрастных групп:
20,60,90,140,170,210, свиноматки 2-3 цикла ,по 10 проб в группе.



Инфекции	Поствакцинальный референс ,средний Титр группы	% однородности группы	% негативов	% ВЫСОКО ПОЗИТИВОВ
ЦВИС	2000-6000	Не менее 70%	До 5% в группе 60-140 До 15% в 170 дней жизни	Более 6000
РРСС	1500- 6000	Не менее 50%	До 20%	Более 7000
Ауески gB	2000 – 10 000	Не менее 70%	До 5%	Более 10 000
Ауески g1	Любой позитив выше 2000	Не нормируется	Не нормируется	Не нормируется
КЧС	1700-7000	Не менее 70%	недопустимы	Более 8000
Грипп	1200- 4000	Не менее 70%	До 10%	Более 3000
АПП ОМРа	2000-6000	Не менее 70%	До 5%	Более 8000
Гемофилез	1500-3500	Не менее 70%	Не нормируется	Более 4000



Спасибо за Внимание!!!

