

**ИСПЫТАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ  
ДИАГНОСТИКИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ  
МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Р30**

О.А. ДУБРОВСКАЯ<sup>1</sup>, А.С. КАЗАКОВА<sup>1</sup>, И.Р. ИМАТДИНОВ<sup>1</sup>,  
А.П. ВАСИЛЬЕВ<sup>1</sup>, А.Д. СЕРЕДА<sup>1</sup>, П.А. КРАСОЧКО<sup>2</sup>, Д.В. КОЛБАСОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной  
вирусологии и микробиологии РАСХН», пос. Вольгинский, РФ

<sup>2</sup>РУП «Институт экспериментальной ветеринарии  
им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск, РБ

*Поступила в редакцию 14.09.2015 г.*

**ВВЕДЕНИЕ**

Африканская чума свиней (АЧС) – контагиозная, септическая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и высокой летальностью. К АЧС восприимчивы домашние свиньи и дикие кабаны независимо от породы и возраста, у которых болезнь может протекать сверхостро, остро, подостро, хронически и бессимптомно. Поскольку вакцины против АЧС не разработаны, то для ликвидации и предупреждения распространения болезни применяются тотальный убой свиней в первой угрожаемой зоне, а также жесткие карантинные мероприятия во второй угрожаемой зоне. С учетом этого лабораторная диагностика имеет огромное значение для принятия решений о ликвидации вспышек и контроля за распространением болезни.

Есть все основания опасаться, что в результате многократного пассирования вируса АЧС в популяциях диких кабанов европейских стран могут появиться изоляты, вызывающие не острую, как в настоящее время, форму течения болезни, а хроническую или бессимптомную.

Современные методы лабораторной диагностики АЧС, основанные на определении вирусных антигенов или ДНК, не всегда обеспечивают выявление животных, инфицированных ослабленными по вирулентности изолятами. В этих случаях наиболее информативными являются серологические методы, основанные на определении антител к вирусным белкам в пробах сывороток крови или органов иммунной системы свиней.

Согласно рекомендациям Международного эпизоотического бюро (МЭБ) для подтверждения сомнительных результатов лабораторной серодиагностики АЧС непрямым твердофазным иммуноферментным анализом (ТФ ИФА) или непрямой реакцией иммунофлуоресценции (РНИФ) следует использовать метод иммуноблоттинга. В рекомендованных МЭБ тест-системах для выявления антител к вирусу АЧС методом иммуноблоттинга вирусные антигены происходят из живого вируса, что предполагает манипуляции с инфекционным агентом при их изготовлении. Применение вместо живого вируса бактериальных продуцентов рекомбинантных белков гарантирует биологическую безопасность производства и высокую специфичность диа-

гностических тест-систем [1, 2]. Установлено, что в ранние сроки после заражения низко-, умеренно- и высоковирулентными штаммами вируса АЧС в сыворотках крови свиней преимущественно выявляются антитела к структурному вирусному белку р30 [3]. Было показано, что чувствительность и специфичность непрямого ТФ ИФА при использовании рекомбинантного белка р30 для обнаружения антител к вирусу АЧС в сыворотках экспериментально инфицированных свиней и в полевых сыворотках от серопозитивных животных с бессимптомным течением болезни составляют 96 % и 99 % соответственно [4].

Ранее нами были изготовлены нитроцеллюлозные иммунострипы с иммобилизованным на них полипептидом рекомбинантного белка р30 вируса АЧС и продемонстрирована их пригодность для выявления серопозитивных свиней при острой и хронической формах АЧС методом иммуноблоттинга [5].

Данная работа выполнена с целью испытать разработанную тест-систему для серодиагностики АЧС методом иммуноблоттинга, в том числе, с задачей выявления серопозитивных животных с хронической или бессимптомной формами АЧС.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

При проведении исследований были использованы домашние свиньи породы крупная белая и дикий кабан массой до 50 кг. Штаммы вируса АЧС – из «Музея штаммов» ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. Для постановки РНИФ и непрямого варианта ТФ ИФА применяли диагностические наборы производства ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. РНИФ, непрямой ТФ ИФА и метод иммуноблоттинга выполняли по рекомендациям МЭБ [2]. Пробы сывороток крови, органов свиней и кабана получали после воспроизведения на них в лабораторных условиях хронической и бессимптомной форм инфекции.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Разработанная «Тест-система для серологической диагностики африканской чумы свиней методом иммуноблоттинга» (далее тест-система) сформирована из двух комплектов, которые хранятся при различных температурных режимах.

- Комплект №1 с температурой хранения от 2°C до 6°C включает:
- иммунострипы (50 шт.) – нитроцеллюлозные тест-полоски 3,0 см × 0,3 см с полипептидом очищенного рекомбинантного белка р30;
  - 10 × ФБР (5 флаконов по 4,0 см<sup>3</sup>) – 10 × фосфатный буферный раствор;
  - 10 × ФБР-т (5 флаконов по 40,0 см<sup>3</sup>) – 10 × ФБР с 1 % твина-20;
  - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 33 % (5 пробирок по 0,2 см<sup>3</sup>) – раствор перекиси водорода.
- Комплект № 2 с температурой хранения от -18°C до -20°C включает:
- K<sup>+</sup> (5 пробирок по 0,025 см<sup>3</sup>) – положительная инактивированная контрольная сыворотка;
  - K<sup>-</sup> (5 пробирок по 0,025 см<sup>3</sup>) – отрицательная контрольная сыворотка;
  - 2000 × конъюгат (5 пробирок по 0,01 см<sup>3</sup>) протеина А с пероксидазой хрена;
  - ДАБ (5 пробирок по 0,02 г) – 3,3' диаминобензидин тетрагидрохлорид.

Хроническую и бессимптомную формы АЧС воспроизводили благодаря использованию аттенуированных штаммов вируса. В лабораторных условиях в различные сроки после внутримышечной инокуляции вируса АЧС были получены 54 пробы сывороток крови свиней и дикого кабана на каждый из ниже перечисленных:

- гемадсорбирующий аттенуированный штамм PSA-1-NH (I сероиммунотип);
- гемадсорбирующий аттенуированный штамм КК-262/с (II сероиммунотип);
- гемадсорбирующий аттенуированный штамм МК-200 (III сероиммунотип);
- гемадсорбирующий аттенуированный штамм ФК-135 (IV сероиммунотип);
- гемадсорбирующий аттенуированный штамм Ставрополь 01/08 на уровне 33 пассажа в перевиваемой культуре клеток А<sub>4</sub>С<sub>2</sub>/9к (VIII сероиммунотип).

При использовании тест-системы получены следующие результаты:

- пробы сывороток крови или органов регистрировали как положительные по наличию на иммунострипе одной полосы коричневого цвета;
- антитела к белку р30 определяли в пробах сывороток крови, полученных, начиная с 8–10 суток после внутримышечной инокуляции животным аттенуированных штаммов вируса АЧС, независимо от их сероиммунотиповой принадлежности и способности индуцировать гемадсорбцию;
- время анализа при комнатной температуре составляло не более 3 часов при исследовании до 30 проб сывороток одним сотрудником. Для исследования 40–60 проб одному сотруднику требовалось 4–5 часов;
- минимальное количество исследуемых проб от 1 до 10;
- срок хранения тест-системы составляет 12 месяцев.

Не удалось выявить антитела в пробе сыворотки крови свиньи, которой инокулировали гемадсорбирующий вирулентный штамм Л-57 (I сероиммунотип), в связи с гибелью животного от острой формы АЧС на 8 сутки, что согласуется с данными A.L. Reis et al. (2007), которые показали, что при сверхострой и острой формах выявление вирусоспецифических антител возможно только в пробах селезенки, так как специфические антителопродуцирующие клетки и, следовательно, антитела появляются там на 2–3 сутки после инфицирования, в то время как животные гибнут уже на 3–7 сутки [6].

Оценку аналитической чувствительности тест-системы производили на основании сравнения результатов исследования раститрованных положительных сывороток крови (двухкратные разведения) методом иммуноблоттинга и в РНИФ. Пределом чувствительности считали последнее разведение, при котором регистрировали положительный результат. Из исследованных 13 проб сывороток крови титры антител, определяемые методом иммуноблоттинга, превышали таковые по результатам РНИФ в 10 пробах, в 2 – совпадали, в 1 – были ниже. Максимальные значения титров антител в пробах сывороток крови инфицированных свиней в иммуноблоттинге достигали 1:2048.

С использованием тест-системы были исследованы 10% суспензии проб органов домашней свиньи, которой внутримышечно инокулировали аттенуированный штамм Ставрополь 01/08 на уровне 33 пассажа в перевиваемой

культуре клеток А<sub>4</sub>С<sub>2</sub>/9к и через 21 сутки вводили вирулентный штамм Ставрополь 01/08 (убой на 38 сутки), и дикого кабана, которому внутримышечно инокулировали аттенуированный штамм МК-200 (убой на 25 сутки). У обоих животных максимальные титры антител к белку р30 были обнаружены в лимфоузлах (1:32), легких и селезенке (1:8–1:32).

В целом было отмечено соответствие результатов исследования титрования проб сывороток методом иммуноблоттинга и в РНИФ. Преимуществом метода иммуноблоттинга было отсутствие потребности в сложном техническом оборудовании. В дальнейшем планируется проведение более масштабных исследований для валидации и лицензирования тест-системы для серодиагностики АЧС методом иммуноблоттинга.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментов свидетельствуют, что разработанная тест-система может быть использована для серодиагностики и мониторинга АЧС по пробам сывороток крови и органов домашних свиней и диких кабанов с хронической или бессимптомной формами АЧС. Антитела к белку р30 в сыворотках крови свиней удастся выявить, начиная с 8–10 суток после их инфицирования слабовирулентными и авирулентными штаммами вируса АЧС. По специфичности и аналитической чувствительности тест-система не уступает РНИФ.

Работа выполнена согласно государственному контракту с Министерством образования и науки Российской Федерации № 14.М04.12.0010 от «27» июня 2014 г. в ходе реализации Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» в рамках НИР «Создание тест-системы для серодиагностики африканской чумы свиней».

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Середя, А.Д. Белки вируса африканской чумы свиней/ А.Д. Середя, Д.В. Колбасов// *Научный журнал КубГАУ*.– 2012.– № 77(03).– С. 21–37.– 0421200012/0181.– Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2012/03/pdf/48.pdf>.
- 2 Тест-система для экспресс-диагностики африканской чумы свиней методом иммуноблоттинга с использованием рекомбинантного белка р30/А.С. Казакова, А.Д. Середя, О.М. Стрижакова, С.П. Живодеров, В.М. Лыска, В.М. Бальшев, Ю.П. Моргунов, И.Ю. Хухорова, Д.В. Колбасов, А.А. Гусев // *Ветеринария*. – 2014. – № 9. – С. 52–56.
- 3 *Immunoblotting OIE for Serological Diagnosis of African Swine Fever (SOP/ CISA/ASF/IB/1/2008)* [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://asf-referencelab.info/asf/images/files/SOPs/SOP-AFSIB12008.pdf>. – Загл. с экрана.
- 4 *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Chapter 2.8.1. African swine fever/ Office International des Epizooties.*– Paris, France, 2008. – 6th ed. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.08.01-ASF.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.08.01-ASF.pdf). – Загл. с экрана.
- 5 *Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae/ M.G. Barderas, A. Wigdorovit, F. Merelo, F. Beitia, C. Alonso, M.V. Borca, J.M. Escribano// Journal of Virological Methods.*–2000. – Vol. 89, №1–2. – P. 129–136.
- 6 *Systematic analysis with African swine fever virus/ A.L. Reis, R.M. Parkhouse, A.R. Penedos, C. Martins, A. Leitro// Journal of General Virology.*–2007.–Vol. 88.– № 9. – P.2426–2434.