

**На правах рукописи**

**Шарыпова Дарья Викторовна**

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕНА  
ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ ДЛЯ  
СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**06.02.02. «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология»**

**Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата ветеринарных наук**

**Владимир 2019**

**Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении  
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

**Научный руководитель:** **Иголкин Алексей Сергеевич**  
кандидат ветеринарных наук

**Официальные оппоненты:** **Шевкопляс Владимир Николаевич**  
доктор ветеринарных наук, профессор, проректор  
по науке ФГБОУ ВО «Московская  
государственная академия ветеринарной  
медицины и биотехнологии имени К.И.  
Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА  
имени К.И. Скрябина)

**Моргунов Юрий Петрович**  
кандидат ветеринарных наук, ведущий научный  
сотрудник лаборатории геномики вирусов  
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр  
вирусологии и микробиологии» (ФГБНУ  
ФИЦВиМ)

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий  
Российской академии наук (СФНЦА РАН)

Защита состоится 1 октября 2019 года в 10.00 часов на заседании  
диссертационного совета Д220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны  
здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г.  
Владимир, мкр. Юрьевец). Полный текст диссертации, автореферата и отзыв  
научного руководителя размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ»  
[www.arriah.ru](http://www.arriah.ru)

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2019 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**1.1 Актуальность темы.** В настоящее время для отрасли свиноводства особо остро обозначена проблема распространения в мире африканской чумы свиней (АЧС). В России вспышки АЧС регистрируют более 10 лет. Длительная циркуляция вируса связана, в том числе, и с вовлечением в эпизоотический процесс диких европейских кабанов, что обуславливает их особое значение, как природного резервуара инфекции.

Экспансия АЧС, закрепление эндемичности в регионах и случаи выявления серопозитивных диких кабанов на неблагополучных по АЧС территориях могут свидетельствовать об изменениях свойств вируса.

Ввиду отсутствия вакцины, наличие специфических антител к вирусу в сыворотке крови животного однозначно указывает на его инфицирование [7], причем, по наличию животных, имеющих антитела к вирусу АЧС, можно судить о количестве хронических и субклинических случаев болезни. Кроме того, такие животные могут являться источником инфекции. Таким образом, выявление антител к вирусу АЧС у животных на неблагополучных территориях имеет большое эпизоотологическое значение. У отдельных изолятов вируса АЧС, выделенных в России, Польше, Прибалтике отмечено изменение биологических и генетических свойств, что дает основание предполагать о снижении вирулентности вируса [4, 5, 6].

Серологические методы в лабораторной диагностике АЧС являются одними из основных и используются в программах контроля и ликвидации болезни, благодаря их чувствительности и специфичности, высокой технологичности, простоте постановки и сравнительно низкой стоимости анализа. Принципиально важной задачей в этом направлении является получение высокоспецифичных антигенов, стандартизированных по своим диагностическим свойствам, а также простых и технологичных в получении.

Иммуноферментный анализ (ИФА) и иммуноблоттинг (ИБ) обладают высокой чувствительностью и специфичностью при исследовании образцов сывороток крови. Однако, существенным недостатком ИФА является возможность получения ложноположительных результатов из-за несоблюдения условий хранения сывороток. Для подтверждения положительного результата в ИФА и в сомнительных случаях МЭБ рекомендует использовать ИБ.

В методах ТФ ИФА и ИБ, рекомендованных МЭБ, используется цитоплазматический растворимый антиген, который получают из инфицированной вирусом АЧС линии клеток почки обезьяны. Испытания показали, что

чувствительность и специфичность данного антигена достигает максимальных значений [7].

На сегодняшний день для серодиагностики АЧС не разработано отечественных наборов на основе культурального антигена, рекомендованного МЭБ. Более того, на российском рынке отсутствуют наборы для серологической экспресс-диагностики, такие, как тест-системы для выявления антител методом иммунохроматографии или в реакции латекс-агглютинации.

Основными сдерживающими факторами в разработке методов получения высокоспецифичного культурального антигена является отсутствие стандартизированной и технологичной в получении первичной культуры клеток и штамма-продуцента для наработки антигена.

Исходя из вышеизложенного, работа по усовершенствованию методов получения антигена вируса африканской чумы свиней и диагностических тестов на его основе является актуальной.

## **1.2 Степень разработанности проблемы**

Для серологической диагностики на сегодняшний день используются коммерческие наборы и тест-системы, такие как конкурентный ТФ ИФА INGEZIM PPA COMPAC (1.1.PPA.K3) (INGENAZA, Испания) на основе белка р72 вируса АЧС и моноклональных антител к нему; тест-система ELISA ID-VET (ID-VET, Франция), основанная на использовании сразу трёх рекомбинантных протеинов вируса: р30, р72 и р62; непрямой вариант ТФ ИФА SVANOVIR® ASFV-Ab assay (Boehringer Ingelheim Svanova, Швеция), на основе рекомбинантного антигена р30.

Для постановки иммуноблоттинга применяют рекомендованный МЭБ коммерческий набор ASF-OIE-IB, выпускаемый Европейской референс-лабораторией по АЧС (CISA-INIA, Испания), в котором иммунострипы изготавливаются с использованием полуочищенного цитоплазматического растворимого вирусного антигена АЧС.

Также в 2018 г. в ФГБНУ «ФИЦВиМ» выпущено 5 экспериментальных серий «Тест-системы для серодиагностики африканской чумы свиней методом иммуноблоттинга» на основе рекомбинантного р30. Отечественных тест-систем на основе комплекса специфических белков вируса АЧС до настоящего времени не разработано. Кроме того, в связи с отсутствием возможности получения стандартизированного вирусосодержащего сырья, неоправданно мало внимания, в целом, уделяется применению культурального вирусного антигена для серодиагностики АЧС с использованием реакций непрямой иммунофлуоресценции, латекс-агглютинации и др.

**1.3 Цель и задачи исследования.** Основной целью данной работы являлось усовершенствование методов получения высокоспецифичного антигена вируса АЧС, основанных на разработке технологических подходов при его накоплении и очистке, а также изучение возможности использования его в диагностических серологических тестах.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1) подобрать изолят вируса АЧС и провести его адаптацию к перевиваемой культуре клеток, изучить культурально-биологические свойства адаптированного штамма;

2) подобрать и оптимизировать условия получения культурального антигена вируса АЧС на основе полученного адаптированного штамма вируса;

3) отработать условия изготовления иммунострипов с использованием культурального антигена и разработать методику постановки иммуноблоттинга для выявления антител к вирусу АЧС, провести оценку чувствительности и специфичности метода;

4) применить адаптированный штамм вируса АЧС и антиген, полученный на его основе, для постановки серологических реакций: непрямой иммунофлуоресценции, иммунопероксидазный монослойный анализ и латекс-агглютинация.

#### **1.4 Научная новизна результатов.**

В ходе работы адаптирован к росту в перевиваемой линии клеток почки зеленой мартышки CV-1 штамм «8 №2 Одинцово 02/14» вируса африканской чумы свиней. Изучены основные биологические свойства вируса полученного штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1».

В результате проведения биологической пробы на поросятах определены основные биологические характеристики адаптированного штамма вируса «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1». В ходе исследований установлено, что адаптация вируса посредством последовательных пассажей в культуре клеток CV-1 привела к снижению летальности у животных до 37,5 %.

Получен и депонирован в КШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» адаптированный штамм вируса АЧС – «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1», с измененными биологическими свойствами (характер гемадсорбции, вирулентность для свиней), прошедший 26 последовательных пассажей на перевиваемой культуре клеток.

На основе использования вышеуказанного штамма подобраны и оптимизированы условия получения специфического вирусного антигена для использования его в серологических реакциях.

Разработана методика по выявлению антител к вирусу АЧС методом иммуноблоттинга на основе культурального цитоплазматического антигена.

Использование штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» для наработки и очистки культурального антигена позволило подобрать и оптимизировать условия постановки следующих диагностических реакций для выявления антител к вирусу АЧС: реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), реакция латекс-агглютинации (РЛА) и иммунопероксидазный монослойный анализ (ИПМА), которые не имеют аналогов на территории РФ.

### **1.5 Теоретическая и практическая значимость работы**

Получен патент № 2675535 - 2018 на изобретение «Штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» вируса африканской чумы свиней, со сниженной вирулентностью для свиней, для вирусологических, диагностических, молекулярно-генетических и мониторинговых исследований».

Полученный штамм вируса АЧС «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1», адаптированный к репродукции в перевиваемой культуре клеток СV-1, используется в ФГБУ «ВНИИЗЖ» при получении специфического антигена для изготовления антигенсодержащих иммунострипов для иммуноблоттинга с целью выявления антител к вирусу АЧС, а также для постановки других серологических реакций.

Типоспецифическая сыворотка, полученная с использованием штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1», используется в качестве положительного контроля в диагностических наборах и тест-системах.

Разработаны «Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу африканской чумы свиней методом иммуноблоттинга», утвержденные в ФГБУ «ВНИИЗЖ» 28 декабря 2017 г. и «Методические рекомендации по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре клеток селезенки свиней», утвержденные в ФГБУ «ВНИИЗЖ» 15.03.2019 г.

### **1.6 Методология и методы исследований**

В работе использовали вирусологические (получение первичной культуры клеток, вирусовыделение, культивирование вируса, титрование вируса, постановка биопроб), препаративные методы (очистка вируса и получение антигена), серологические (РПИФ, РНИФ, ИБ, ИПТ, ТФ ИФА), молекулярно-биологические (ПЦР в режиме реального времени). Исследования в рамках диссертационной работы выполнены на базе референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ».

### **1.7 Положения, выносимые на защиту**

- полученный и депонированный в Коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» адаптированный к репликации в перевиваемой культуре клеток СV-1 штамм вируса АЧС - «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» со сниженной летальностью для

свиной, пригоден для получения антигена и типоспецифической гипериммунной сыворотки для диагностических исследований;

- отработанные условия и подобранный режим для получения культурального вирусного антигена АЧС позволяют наработать стандартный антигенсодержащий препарат в преперативных количествах;

- отработанные условия постановки реакции иммуноблоттинга и изготовления иммунострипов, а также разработанная методика иммуноблоттинга пригодны для обнаружения антител к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней;

- штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» и антиген, изготовленный с его применением, пригодны и эффективны при использовании в диагностических методах, таких как латекс-агглютинация, иммунопероксидазный тест и реакция непрямой иммунофлуоресценции.

### **1.8 Личный вклад соискателя. Благодарности**

Основной объем исследований выполнен автором самостоятельно. Автор выражает искреннюю благодарность за активное содействие и помощь в проведении отдельных этапов работы сотрудникам референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ»: д.б.н. Власовой Н.Н., к.в.н. Першину А.С., к.б.н. Жукову И.Ю., к.б.н. Шевченко И.В., также за консультативную помощь д.б.н., профессору Груздеву К.Н.

### **1.9 Степень достоверности и апробации результатов.**

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета и методической комиссии ФГБУ «ВНИИЗЖ» (2015-2018 гг.), на заседаниях Научно-технического совета Россельхознадзора (2016-2018 гг.), на IV Международной научной конференции «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику» (г. Владимир, 2016 г.), IX Международном ветеринарном конгрессе (г. Светлогорск, 2019 г.), VI Глобальном свиноводческом форуме (г. Ухань, Китай, 2019 г.). Достоверность проведенных исследований подтверждена результатами комиссионных испытаний и патентом на изобретение.

### **1.10 Публикации**

По материалам диссертационной работы опубликовано 5 научных работ в изданиях по перечню ВАК Министерства образования и науки РФ для докторских и кандидатских диссертаций, а также патент на изобретение.

### **1.11 Объем и структура диссертационной работы**

Диссертация изложена на 123 страницах компьютерного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, приложения; иллюстрирована 13 таблицами и 27 рисунками. Список использованной литературы включает 143

источника, из них 102 иностранных. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих достоверность результатов работы, ее научную новизну и практическую значимость.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Материалы**

**Животные.** Для получения первичных культур клеток использовали поросят 2-4 недельного возраста, массой 4-10 кг. Для проведения биопроб использовали свиней крупной белой породы 1,5-2 месячного возраста, массой ~18 кг.

**Культуры клеток.** Первичные культуры клеток (КК): костного мозга свиньи (КМС), селезенки свиньи (СС), альвеолярных макрофагов свиньи (АМС), тестикул свиньи (ТС), почки свиньи (СП).

Перевиваемые культуры клеток: почки африканской зеленой мартышки (CV-1), гибрид СПЭВ и спленоцитов свиньи (A<sub>4</sub>C<sub>2</sub>), почки свиньи (PK-15) и почки макаки резус (Macr-145), полученные из отдела культивирования клеток (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

**Вирус АЧС** штамма «8 №2 Одинцово 02/14» и адаптированный к репродукции в культуре клеток CV-1 штам вируса АЧС – «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1»

**Растворы и реактивы для получения вирусного антигена.** 1% раствор теотропина («А-24»); 1,1,2-трифтортрихлорэтан (фреон-113); ПЭГ-6000; NaCl; физиологический раствор; проназа Е; растворы сахарозы различных концентраций: 20%, 25%, 35%, 50%, 64%, 0,34М, 0,067М; ФБР; NP-40; Tris-HCl 1М; EDTA 0,2М; β-меркаптоэтанол; Thimerosal; КББ.

**Материалы, растворы и реактивы для постановки электрофореза, электроблоттинга и иммуноблоттинга.** Протеин А конъюгированный с пероксидазой хрена, перекись водорода 30%, 4-хлоро-1-нафтол, уксусная кислота ледяная, сухое молоко обезжиренное, персульфат аммония, натрий додецил сульфат, бромфеноловый синий, нитроцеллюлозная мембрана, фильтровальная бумага для электроблоттинга тонкая, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), набор для подготовки ПААГ, ФБР.

**Сыворотки крови свиней.** Референтные сыворотки: положительная, слабо-положительная и отрицательная к вирусу АЧС (ASF-CN, CISA-INIA); специфическая сыворотка VIII серотипа, полученная к референс-штамму «Arm 07»; сыворотки, содержащие антитела к гриппу свиней типа А подтипа H1N1, ПВИС, РРСС, болезни Ауески и КЧС.

### **2.2 Методы**

**Приготовление первичных культур клеток.** Согласно ГОСТ 28573-90 и методическим рекомендациям, разработанным в ФГБУ «ВНИИЗЖ».



**Культивирование и накопление вируса** проводили на первичных культурах клеток СС, КМС, АМС и перевиваемой культуре клеток CV-1.

**Адаптация вируса.** Адаптацию вируса АЧС штамма «8 №2 Одинцово 02/14» проводили к перевиваемой культуре клеток CV-1, полученной в отделе культивирования клеток ФГБУ «ВНИИЗЖ».

**Определение сероиммунотипической принадлежности вируса** проводили в реакции задержки гемадсорбции (РЗГАд), по методике ГНУ ВНИИВиМ. Определение наличия и количественную характеристику гемадсорбирующей активности проводили согласно разработкам В.В. Макарова и др. (1991 г.).

**Постановка РГАд и определение титра вируса.** Выполняли с использованием чувствительных культур клеток по стандартной методике. Титры инфекционности вируса вычисляли по методу Кербера (1931 г.) в модификации Ашмарина (1959 г., 1962 г.) и выражали в lg ГАДЕ<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

**Очистка вируса и приготовление культурального антигена.** Очистку вируса проводили при помощи высокоскоростного ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы по методу, описанному D. Black et. al. (1976) на основе известных для вируса АЧС коэффициентов седиментации. Приготовление культурального антигена проводили на основании СОП для получения цитоплазматического растворимого антигена вируса АЧС (CISA-INIA) и описанным Варенцовой А.А. (2014 г.) методом, с собственными модификациями.

**Электрофорез вирусных белков** выполняли в SDS-PAGE по U.K. Laemmli (1970 г.) с применением 8-15% ПААГ.

**Постановку РПИФ** проводили по методике ФГБУ «ВНИИЗЖ» с использованием ФИТЦ-конъюгатов: специфические ФИТЦ-иммуноглобулины для иммунофлуоресцентной диагностики АЧС (ГНУ ВНИИВВиМ); моноклональные антитела 18 BG3-FITC на протеин vp72, меченные ФИТЦ (INGENASA, Испания).

**Определение концентрации белка** проводили согласно методу, описанному Bradford, M.M. et al (1976).

**Постановка ТФ ИФА.** Определение наличия специфических антител в сыворотках крови свиней проводили с использованием коммерческого набора INGEZIM PPA COMPAC (1.1.PPA.K3) (INGENAZA, Мадрид, Испания); оценку антигенной активности вирусосодержащего культурального сырья проводили с использованием набора INGEZIM PPA DAS K2 (INGENASA, Мадрид, Испания) в соответствии с инструкциями производителя.

**Постановка иммуноблоттинга.** Электроперенос полипептидов из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану проводили в полусухой буферной системе по методу J. Kyhse-Andersen (1984 г.). Постановку реакции иммуноблоттинга осуществляли в

соответствии с методиками, описанными J.M. Escribano и E. Tabares (1987) и в стандартной операционной процедуре МЭБ с собственными модификациями.

**Статистическая обработка результатов** проводилась по разностному методу Стьюдента-Фишера, построение графиков и диаграмм с использованием пакетов прикладных программ Statistica 10.0 и Microsoft Excel 2013.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

#### **3.1. Адаптация вируса АЧС к росту в перевиваемой культуре клеток и изучение его культурально-биологических свойств.**

**3.1.1 Обоснование подбора изолята для адаптации вируса.** Для адаптации выбран штамм «8 №2/Одинцово-02/14» (материал 4 пассажа на КК КМС изолята «Одинцово 02/14») со сниженной летальностью (85,7%) для свиней. Исходный изолят обладал «рыхлой» гемадсорбцией на КК, способностью к репродукции в непермиссивной КК СП без предварительной адаптации с проявлением гемадсорбции уже на 1-ом пассаже и увеличением титра к 5-му пассажу с  $5,08 \pm 0,45$  до  $6,65 \pm 0,12 \lg \text{ГАдЕ}_{50}/\text{см}^3$  и увеличенными сроками жизни животных при их заражении данным изолятом [1, 2].

**3.1.2 Адаптация вируса к перевиваемым культурам клеток.** Для первичного тестирования способности вируса АЧС штамма «8 №2/Одинцово-02/14» к репродукции в перевиваемых КК провели его культивирование в клеточной линии СП.

Вирусосодержащим материалом штамма «8 №2/Одинцово-02/14», накопленным на КК КМС в титре  $5,21 \pm 0,36 \lg \text{ГАдЕ}_{50}/\text{см}^3$ , была инокулирована КК СП, в которой впоследствии проведено 15 пассажей. Эффективная репродукция вируса АЧС регистрировалась с 1-го пассажа с проявлением гемадсорбции. К 15-му пассажу существенно увеличились титры накопления до  $7,5-8,0 \lg \text{ГАдЕ}_{50}/\text{см}^3$ , а сроки накопления сократились с 10 до 5-6 суток.

Ввиду способности штамма «8 №2/Одинцово-02/14» эффективно репродуцировался в КК СП, работа по его адаптации была проведена с перевиваемыми КК. С этой целью в перевиваемые КК А4С2, CV-1, РК-15 и Marc-145 был внесен вирусосодержащий материал 3 пассажа на КК КМС штамма «8 №2/Одинцово-02/14» с титром  $7,21 \pm 0,36 \lg \text{ГАдЕ}_{50}/\text{см}^3$ . На каждом 5-м пассаже проводили анализ уровня накопления вируса титрованием в КК КМС. Результаты приведены в таблице 1.

Из результатов, представленных в таблице 1 видно, что вирус приобрел способность к репродукции в указанных КК. Максимальная степень адаптации наблюдалась в КК А4С2 и КК CV-1, где титры накопления вируса к 25 пассажу

превышали значения  $7,0 \text{ IgГАдЕ}_{50}/\text{см}^3$ . Отмечалось стабильное наличие рыхлой гемадсорбции у адаптированного вируса на различных пассажных уровнях.

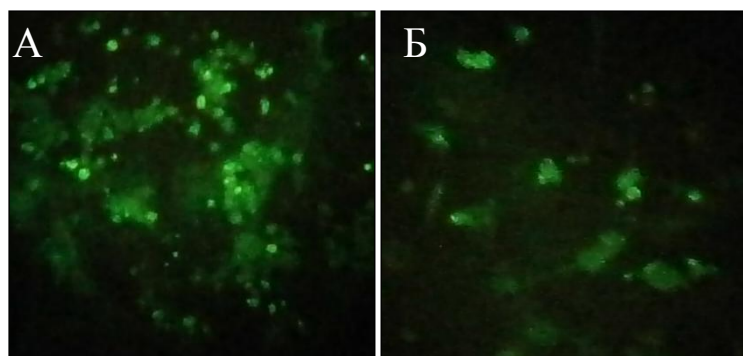
**Таблица 1** - Репродукция вируса АЧС штамма «8 №2/Одинцово-02/14» в перевиваемых культурах клеток

n=3

№ пассажа	А <sub>4</sub> С <sub>2</sub>		РК-15		Marc-145		CV-1	
	Время (сутки)	Титры (IgГАдЕ <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )	Время (сутки)	Титры (IgГАдЕ <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )	Время (сутки)	Титры (IgГАдЕ <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )	Время (сутки)	Титры (IgГАдЕ <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )
1	12	н.и.	7-8	4,17±0,34	12	н.и.	14	5,12±0,25
5	10-11	5,22±0,34	7	5,34±0,17	10	5,27±0,18	12	4,65±0,32
10	7-9	6,15±0,13	5-6	5,87±0,11	8-9	5,85±0,11	9-10	5,46±0,21
15	6-7	6,04±0,19	5	5,90±0,12	7-8	6,12±0,18	8-9	6,09±0,24
20	5-6	6,87±0,13	4-5	6,14±0,25	-	-	7-8	6,21±0,17
25	5	7,00±0,11	4-5	6,01±0,45	-	-	6-7	7,08±0,19

В результате экспериментов отобрана гетерологичная в видовом отношении КК CV-1 с наилучшими показателями накопления вируса.

При изучении локализации в инфицированных клетках CV-1 вирусных белков методом РПИФ с использованием ФИТЦ-конъюгата моноклональных антител к р72, наблюдалось характерное флуоресцентное окрашивание, которое ограничивалось дискретными областями цитоплазмы, соответствующими локализации «вирусных фабрик» (рисунок 1).



**Рисунок 1** - обнаружение вируса АЧС в культуре клеток CV-1 в реакции прямой иммунофлуоресценции: А - увеличение x200, Б – увеличение x400.

Полученный адаптированный к росту в перевиваемой КК CV-1 вариант вируса АЧС (вирусодержащий материал 25-го пассажа) депонирован в КШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» под авторским наименованием «Штамм вируса АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1 (Д)».

### 3.2 Изучение биологических свойств адаптированного штамма вируса.

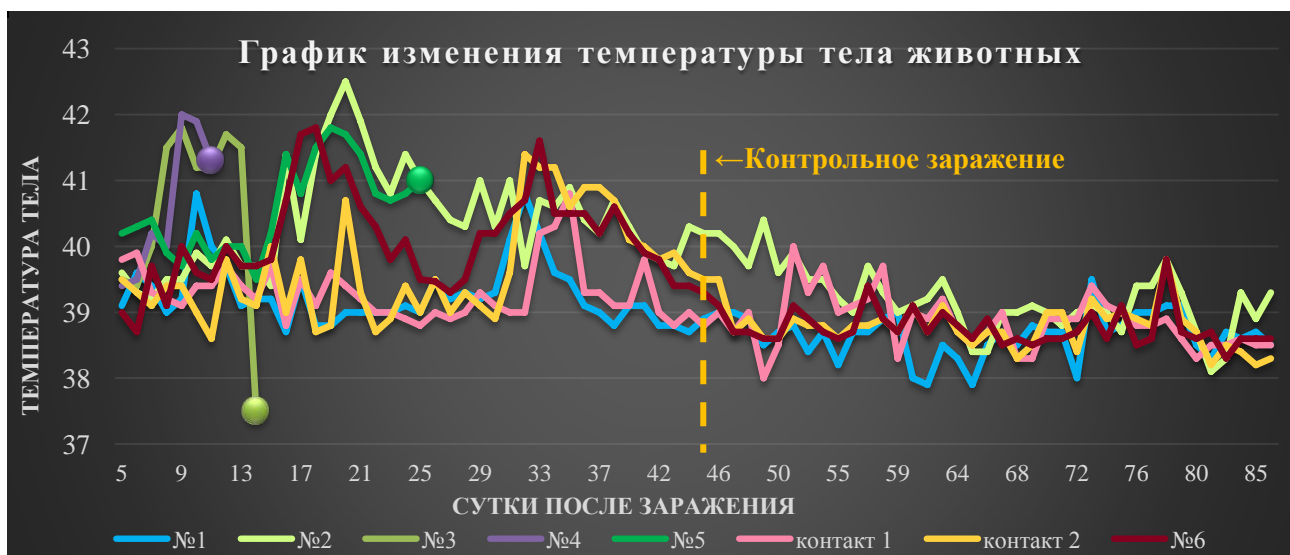
Для изучения биологических свойств штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1» проведено заражение 8 голов свиней: 6 из них заражали внутримышечно (в/м) вирусодержащей суспензией в дозе 10 ГАдЕ/гол, а 2 головы оставляли совместно с инфицированными свиньями для контактного заражения. На протяжении всего

опыта осуществляли визуальный контроль клинических признаков, измерение температуры тела (рисунок 13) и отбор крови у экспериментальных животных.

Подъем температуры тела и в течение времени наблюдали с 6-7 суток после введения вируса. Антитела к вирусу АЧС у животных, зараженных в/м, выявляли с 10 дня после заражения (д.п.з.), а у животных контактной группы с 31 суток.

На 11, 14 и 24 д.п.з. три свиньи пали с проявлением характерных для АЧС клинических признаков и патологоанатомических изменений. С 38 д.п.з. температура тела у оставшихся животных нормализовалась и оставалась в пределах физиологической нормы (рисунок 2).

На 45 сутки, после первичного заражения вирусом АЧС штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1», провели контрольное заражение высоковирулентным вирусом штамма «Arm 07» (II генотип VIII серотип) в дозе 1000 ГАДЕ/гол.



**Рисунок 2-** График термометрии животных

В ходе эксперимента 5 свиней (№№1, 2, 6, контакт 1, контакт 2), выживших при первичном заражении, остались живы после заражения высоковирулентным вирусом до окончания эксперимента (85 суток). Выживаемость животных в ходе всего эксперимента составила 62,5 %.

Таким образом, в результате постановки биологической пробы со штаммом вируса АЧС «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» установлено, что данный штамм обладает сниженной летальностью для свиней (37,5 %). При контрольном заражении установлено, что животные приобрели устойчивость к вирусу АЧС.

**3.3 Получение типоспецифической гипериммунной сыворотки крови.** В ряде экспериментов получены образцы типоспецифической гипериммунной сыворотки. Методом ТФ ИФА проведено исследование и сравнительный анализ уровня вирусспецифических антител в сыворотках, полученных до и после контрольного заражения. Результаты эксперимента представлены в таблице 2.

**Таблица 2** - Уровень накопления антител в крови выживших животных

№ жив- го / д.п.з	Разведение сыворотки								
	11	18	25	31	38	45	54	65	83
1	1/2	1/20	1/20	1/160	1/1280	1/1280	1/2560	1/5120	1/5120
2	1/2	1/2	1/10	1/40	1/640	1/640	1/2560	1/2560	1/2560
6	1/2	1/10	1/20	1/40	1/320	1/640	1/2560	1/5120	1/10240
контакт 1	0	0	0	1/20	1/640	1/640	1/2560	1/2560	1/5120
контакт 2	0	0	0	1/40	1/320	1/320	1/1280	1/5120	1/10240

Из результатов, представленных в таблице 2, видно, что к моменту окончания эксперимента титр антител в крови достигал значений 1/10240. Таким образом, установили, что после контрольного заражения титры вирусоспецифических антител достигали значений - 4,01 Ig/cm<sup>3</sup>. Полученная по окончании опыта сыворотка крови имела высокий уровень антител, что позволяет использовать ее в диагностических наборах и при серотипировании изолятов вируса АЧС.

**3.4 Определение сероиммунотиповой и генотиповой принадлежности штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1».** Сероиммунотипovou принадлежность штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1», определяли в РЗГАд со специфической сывороткой VIII серотипа, полученной к референс-штамму «Arm 07». В результате эксперимента установлено, что специфическая сыворотка, полученная на штамм «Arm 07» вируса АЧС (VIII серотип), вызывает задержку гемадсорбции, в то время как нормальная сыворотка свиньи и референс-сыворотка к вирусу АЧС IV серотипа (CISA INIA, Испания) не вызывали задержки. На основании полученных данных штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» отнесен к VIII серотипу.

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена р72 (В646L) штамма вируса «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» и штамма «Грузия 2007/1» показал их 100%-ную гомологию, а результаты генетического анализа подтвердили принадлежность штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» ко второму (II) генотипу. Следовательно, изменения, произошедшие при адаптации вируса к росту в непермиссивной культуре клеток, не затронули гены, определяющие его классификационные характеристики.

**3.5 Получение антигена на основе вируса АЧС штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1».** Для получения в препаративных количествах технологичного в производстве и стандартизированного вирусного антигена провели сравнительный анализ препаратов антигенов вируса, изготовленных согласно различным технологиям.

Были испытаны 3 разных метода приготовления препаратов антигена, в которых использовали вирусосодержащую суспензию КК СV-1, зараженную

вирусом АЧС штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» в дозе  $10^{-3}$  ГАД<sub>Е50</sub>/см<sup>3</sup> на клетку. Полученные образцы исследовали в ТФ ИФА для определения их активности. Три полученных образца антигена и референс-антиген (CISA INIA, Испания) в разведениях на КББ использовали для сенсibilизации плашек в течение 12 часов при 4°C и определили рабочее разведение с референс-сывороткой к вирусу АЧС IV серотипа. Результаты титрования приведены в таблице 3.

**Таблица 3** - Сравнительный анализ разведений антигенов вируса АЧС штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1», полученного различными методами

Разведение антигена	Показатель оптической плотности (ОП <sub>450</sub> )			
	Антиген с CV-1			Референс-антиген
	С фреоном	Вирионный	С сахарозой	
1:50	<b>2, 231</b>	<b>2,134</b>	<b>2,485</b>	<b>2,367</b>
1:100	<b>2, 147</b>	<b>2,070</b>	<b>2,422</b>	<b>2,328</b>
1:200	<b>1, 789</b>	<b>1,899</b>	<b>2,149</b>	<b>1,910</b>
1:400	<b>1,116</b>	<b>1,328</b>	<b>1,455</b>	<b>1,231</b>
1:800	0, 610	0,630	<b>0,890</b>	<b>0,896</b>
1:1600	0, 495	0,414	0,763	0,515
1:3200	0, 370	0,346	0,690	0,361
контроль	<b>0,444</b>	<b>0,446</b>	<b>0,443</b>	<b>0,444</b>

**Примечание:** Положительными считаются образцы, значения ОП которых в 2 раза и более превышают значение ОП отрицательного контрольного образца.

Из результатов, представленных в таблице 3, видно, что максимальное значение разведения получено для антигена «с сахарозой». Рабочее разведение для него, соответствовало таковому для референс-антигена и составило 1:800. Образцы, полученные двумя другими методами, имели более низкую активность (до разведения 1:400) в ИФА.

Таким образом, для дальнейшей работы выбран метод с использованием сахарозы. Схема получения антигена согласно данной методике заключается в следующем: после появления 40-50% ЦПД монослой снимали механическим способом, клетки осаждали центрифугированием при 650g в течение 5 минут, удаляли супернатант, клетки в осадке, промывали 0,34М раствором сахарозы. Полученную суспензию центрифугировали при 1000g 5 минут, осадок ресуспендировали в 0,067М растворе сахарозы. Инкубировали на льду 10 минут (из них 5 минут на льду на шейкере). Добавляли NP-40 до конечной концентрации 1% и оставляли еще на 10 минут на льду (из них 5 минут на льду на шейкере). Затем добавляли 1/7 объема сахарозы 64% и центрифугировали при 1200g 10 минут, собирали супернатант, к нему добавляли 1/19 часть от общего объема TEN-buffer (TrisHCl 1M, EDTA 0,2M, β-меркаптоэтанола и дистиллированная вода) и 1/10 часть от объема 5M NaCl. Смесь инкубировали на льду 15 минут, наслаивали на

поверхность 20% сахарозы и подвергали ультрацентрифугированию при 100000g в течение 1 часа при +4°C. Отбирали полосу на поверхности сахарозы и добавляли в получившийся объем Thimerosal до финальной концентрации 0,1%. Концентрация белка в полученных препаратах антигена вируса АЧС составляла 0,7-0,8 мг/мл.

Таким образом, данный метод позволил получить антиген в наибольшей концентрации. Он является достаточно технологичным, процедура получения занимает не более 5-6 часов, что согласуется с данными зарубежных ученых [3].

**3.6 Использование культурального антигена для постановки иммуноблоттинга. Отработка и оптимизация условий постановки реакции.** Отработка условий постановки реакции включала в себя: определение оптимального рабочего разведения антигена, подбор режима и условий проведения электрофореза, определение режима электропереноса вирусных протеинов из ДСН-ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану, подбор условий проведения реакции ИБ.

**3.6.1 Определение рабочего разведения антигена.** В ходе работы образцы антигена титровали двукратными разведениями начиная с 1:10. Проводили электрофоретическое разделение белков для каждого разведения, затем электроперенос протеинов на нитроцеллюлозную мембрану. Реакцию ИБ проводили с использованием положительной сыворотки VIII серотипа. В результате опыта установлено, что оптимальное разведение антигена вируса АЧС штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1», достаточное для визуальной детекции в ИБ, составило 1:20, однако, четкое окрашивание отдельных полос белков с молекулярными массами от 10 до 100 кДа наблюдалось до разведения 1:80.

**3.6.2 Подбор режима и условий проведения электрофореза и электропереноса белков на нитроцеллюлозную мембрану.** Электрофорез белков проводили в 10%, 12,5% и 15% полиакриламидном разделяющем геле с использованием 3% и 8% концентрирующего геля при аналогичных параметрах. После электрофореза белки переносили методом полусухого электропереноса на нитроцеллюлозную мембрану и проводили постановку реакции ИБ.

Установили, что оптимальными условиями для проведения электрофореза являются гель-электрофорез в 12,5% разделяющем геле с 8% концентрирующим гелем при напряжении 200 В в течение 45 минут. При таких параметрах белки с близкими молекулярными массами разделяются в геле равномерно, полосы с перенесенными протеинами на нитроцеллюлозной мембране яркоокрашенные, четкие и ровные при визуальной детекции результатов.

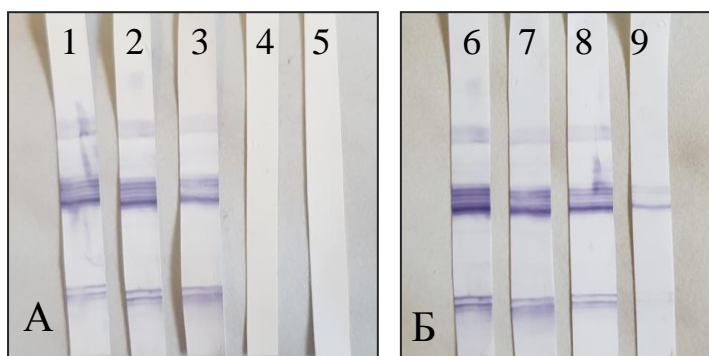
Электроперенос протеинов на нитроцеллюлозную мембрану проводили методом полусухого электроблоттинга при силе тока 1,3 А и постоянном

напряжении 25В 7 минут, поскольку при этих параметрах происходит перенос большего количества белков с высокими и низкими молекулярными массами.

### **3.6.3 Подбор оптимальных параметров постановки иммуноблоттинга.**

Для определения оптимального разведения блокирующего буфера на этапе блокирования использовали растворы обезжиренного сухого молока в концентрациях 2%, 3% и 5% (рисунок 3, А). Существенной разницы в окрашивании иммунострипов не обнаружено, в связи с чем, выбрана меньшая концентрация вещества, т.е. 2% раствор молока.

При подборе времени инкубации иммунострипов с 2% блокирующим буфером установлено, что оптимальной является инкубация в течение 40 минут. Инкубация в течение 15 и 30 минут также привела к получению положительных результатов и может использоваться для ускорения реакции (рисунок 3,Б).



**Рисунок 3** - Блотограммы исследования проб сывороток крови свиней, полученные при различных условиях блокировки

**Примечание:** А –различные концентрации буферного раствора; Б – различное время инкубации (2% буферный раствор); 1,2,3,6,7,8,9 – положительные сыворотки, 4,5 – отрицательные сыворотки; 1,4 –2% раствор буфера, 2 - 3% раствор буфера, 3,5 - 5% раствор буфера, 6 – инкубация 15 мин, 7 –инкубация 30 мин, 8 –инкубация 40 мин, 9 –инкубация 60 мин

Следовательно, оптимальными параметрами постановки реакции иммуноблоттинга являются: блокирование свободных сайтов сорбции 2% раствором обезжиренного молока, приготовленного на PBS в течение 40 минут; разведение исследуемой сыворотки 1:40 и инкубация с ней иммунострипов в течение 40 минут при 37°C; разведение конъюгата протеина А - 1:1000, между всеми этапами реакции - отмывка стрипов 2%-м раствором обезжиренного молока.

**3.7 Определение основных валидационных характеристик метода иммуноблоттинга, комиссионные испытания метода.** С целью определения относительной чувствительности и специфичности проводили исследование 350 проб сыворотки крови свиней и сравнение результатов, полученных разработанным методом ИБ с РНИФ. Результаты представлены в таблице 4. Из представленных результатов видно, что из 77 положительных, по результатам



РНИФ, сывороток крови 74 определены как положительные методом ИБ. Таким образом, относительная чувствительность метода ИБ составила 96,1% (таблица 4).

**Таблица 4** - Определение чувствительности и специфичности метода ИБ

		Иммуноблоттинг		
		Положительные	Отрицательные	Всего
РНИФ	Положительные	74	3	77
	Отрицательные	0	273	273
	Всего	74	276	350

Из 273 отрицательных в РНИФ сывороток крови все из них определены как отрицательные в ИБ. Относительная специфичность метода составила 100% (98,66% – 100%). Позитивная прогностическая значимость – 100%. Отрицательная прогностическая значимость – 98,91% (96,78% – 99,64%).

При постановке методом ИБ (показатель сходимости) в 10 повторностях одного образца, содержащего антитела к вирусу АЧС, получены совпадающие положительные результаты. Оценку воспроизводимости осуществляли по результатам параллельных исследований контрольных образцов с использованием одной и той же серии реагентов и реактивов в десяти повторностях. Оба специалиста при проведении исследований 10 положительных и 10 отрицательных сывороток методом ИБ получили совпадающие результаты.

В рамках комиссионных испытаний проводили исследования положительных и отрицательных к вирусу АЧС сывороток крови свиней, а также сывороток, содержащих антитела к гетерологичным вирусным инфекциям свиней. Предварительно сыворотки тестировали с помощью коммерческого набора ИФА (INGENAZA, Испания). Результаты представлены в таблице 5.

**Таблица 5** - Сравнительное исследование проб сыворотки крови свиней методами ИБ и ИФА

Сыворотка крови	Результат в ИФА	Результат в ИБ	Совпадение результатов +/-
Положительная к вирусу АЧС (изолят Антоново, 64 д.п.з.)	полож.	полож.	+
Референтная отрицательная (CISA-INIA)	отриц.	отриц.	+
Специфическая к болезни Ауески	отриц.	отриц.	+
Положительная к вирусу АЧС (изолят Одинцово, поросенок №8, 21 дпз.)	полож.	полож.	+
Специфическая к гриппу свиней	отриц.	отриц.	+
Специфическая к ПВИС	отриц.	отриц.	+
Специфическая к РРСС	отриц.	отриц.	+
Положительная к вирусу АЧС (изолят Одинцово, поросенок №3, 21 дпз.)	полож.	полож.	+
Референтная положительная (CISA-INIA)	полож.	полож.	+
Специфическая к КЧС	отриц.	отриц.	+

Из данных таблицы 5 следует, что испытуемый культуральный очищенный антиген вируса АЧС на иммуострипах взаимодействовал только с антителами к вирусу АЧС специфических сывороток и не взаимодействовал с антителами отрицательной сыворотки и антителами к гетерологичным вирусным инфекциям свиней. Следовательно, все образцы сыворотки идентифицированы правильно, а результаты ИБ соответствуют результатам ИФА.

Таким образом, разработанный метод может быть рекомендован как диагностический и использован при проведении надзорных мероприятий, для контроля за распространением АЧС.

В целях изучения эффективности разработанного метода иммуоблоттинга для диагностических и подтверждающих исследований протестировано 127 сомнительных и ложноположительных в ИФА (пр-ль тест-системы INGENAZA, Испания) проб сыворотки крови. Все указанные пробы идентифицированы методом ИБ как отрицательные, что характеризует его как высокоспецифичный подтверждающий метод.

### **3.8 Изучение возможности использования полученного антигена вируса АЧС и штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» для серологических тестов**

**3.8.1 Реакция непрямой иммуофлуоресценции.** При использовании культуры клеток, инфицированной вирусом «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1», для детекции в сыворотках крови свиней антител методом РНИФ, наблюдали специфическое флуоресцентное свечение цитоплазмы клеток в препаратах, инкубированных с сыворотками, содержащими антитела к вирусу АЧС, что не наблюдалось с отрицательными сыворотками и в препаратах с интактной культурой клеток. Результаты постановки РНИФ с применением штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» оказались сопоставимы с результатами, полученными при исследовании вышеуказанных сывороток крови методом ТФ ИФА. РНИФ позволила выявить антитела к вирусу АЧС, как в положительных к вирусу АЧС референтных, так и в экспериментальных сыворотках. Данные приведены в таблице 6.

**Таблица 6** – Сравнительный анализ результатов ТФ ИФА и РНИФ с целью выявления антител к вирусу АЧС сыворотках крови

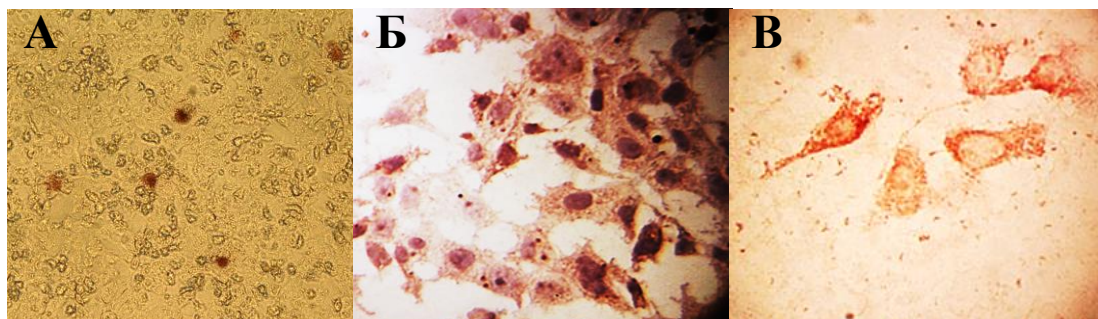
<b>Наименование сыворотки</b>	<b>Разведения в ТФ ИФА</b>	<b>Результат РНИФ</b>	<b>Совпадение +/-</b>
Референтная положительная	1:2560	положительный	+
Референтная слабо-положительная	1:40	положительный	+
Референтная отрицательная	0	отрицательный	+
Специфическая к вирусу АЧС №1	1:320	положительный	+
Специфическая к вирусу АЧС №2	1:1280	положительный	+
Неспецифическая к вирусу АЧС	0	отрицательный	+
Интактная культура клеток	0	отрицательный	+

Таким образом, полученные в ходе опыта результаты дали 100% совпадение и подтвердили целесообразность и эффективность использования КК CV-1, инфицированной адаптированным штаммом вируса АЧС «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1» в качестве антигена для постановки РНИФ.

**3.8.2 Иммунопероксидазный монослойный анализ.** Проведено изучение возможности использования вируса «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1» для изготовления тест-препаратов для постановки реакции ИПМА и отработаны условия реакции.

Экспериментально установлено, что фиксация клеток 96% спиртом приводит к меньшему разрушению монослоя, чем фиксация 80% ацетоном.

Положительные и отрицательные к вирусу АЧС сыворотки крови исследовали с применением изготовленных тест-препаратов на основе штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1» вируса АЧС. В результате экспериментов показано, что специфическое окрашивание клеток при постановке РНИФ наблюдалось в лунках с зараженной культурой клеток при добавлении специфической сыворотки крови свиньи к вирусу АЧС до разведения 1:160. В лунках с незараженной культурой клеток и в лунках с инфицированной культурой, но с внесенными сыворотками к гетерологичным вирусным инфекциям (КЧС, грипп свиней) характерного окрашивания выявлено не было. Наиболее четкий для оценки результат был получен для лунок с разведением специфической сыворотки 1:40 (рисунок 4)



**Рисунок 4** - положительная реакция ИПМА

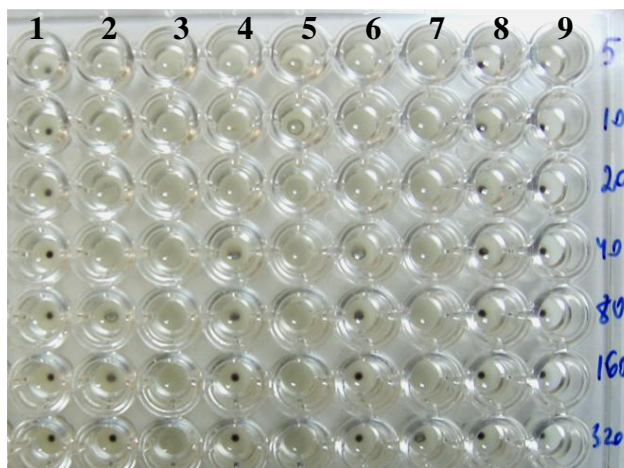
**Примечание:** А – увеличение  $\times 200$ ; Б – увеличение  $\times 400$  (дифференцировка ядер гематоксилином); В - увеличение  $\times 400$

Таким образом, ИПМА с использованием инфицированной вирусом АЧС штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1» КК CV-1, в качестве антигена, является эффективным, специфичным и чувствительным способом детекции антител в сыворотках крови свиней.

**4.12.3 Реакция латекс-агглютинации (РЛА).** Для разработки методики РЛА проведен подбор оптимальных условий иммобилизации биологанда на латексные частицы и параметров постановки реакции. В результате проведенных исследований подобран режим конструирования антительного латексного диагностикума на основе очищенного вирусного антигена и отработаны условия

постановки реакции. Для выявления специфических антител использовали полистирольную латексную суспензию с диаметром микросфер 0,9-1,1 мкм без функциональных групп (ДиаМ, Россия). Суспензию латекса (2,5%) обрабатывали 0,05% раствором глутарового альдегида на ЗФР в течение 1 часа при 37°C или ЗФР (рН 5,8-6,0). После этого, вносили препараты антигенов вируса АЧС в разведении 1:40 на 0,01 М фосфатно-солевом буфере. Оптимальное время инкубации составило 6 часов при 37°C. Свободные сайты сорбции блокировали 0,1М глициновым буфером на ЗФР с 1% БСА (если обрабатывали глутаровым альдегидом) или 1% БСА на ЗФР (если обрабатывали ЗФР) в течение 2 часов.

В лунки U-образных микропланшетов вносили 10 мкл латексного диагностикума (рабочая концентрация 0,5%) и 20 мкл исследуемых сывороток крови в разведениях от 1:5 до 1:320, инкубировали 15-30 минут. Все используемые сыворотки предварительно были проверены в ТФ ИФА. Результаты реакции оценивали визуально, по форме осаждения частиц (рисунок 5).



**Рисунок 5** – постановка РЛА для выявления антител к вирусу АЧС

**Примечание:** 1 – референтная отрицательная сыворотка; 2 – референтная слабо-положительная сыворотка; 3 – референтная положительная сыворотка; 4, 5, 6 – экспериментальные положительные сыворотки; 8, 9 – экспериментальные отрицательные сыворотки крови. Разведения сыворотки указаны с правой стороны на планшете.

Кроме того, проведен сравнительный анализ двух диагностикумов (на основе культурального антигена и рекомбинантного белка) при исследовании образцов сыворотки крови, отобранных у зараженных свиней с различными формами течения болезни (от острой со 100%-ной летальностью до хронической) и на различные сроки инфицирования (с 9 по 42 сутки). Полученные результаты показали, что большей чувствительностью для всех исследуемых образцов обладал диагностикум на основе культурального вирусного антигена, что, вероятно, связано с тем, что в его состав входит более 10 мажорных белков вируса АЧС.

Таким образом, РЛА сравнима с ТФ ИФА и позволяет эффективно и за короткое время (15-30 минут) определять наличие антител к вирусу АЧС в

сыворотках крови свиней. Метод имеет преимущество перед ТФ ИФА в простоте и скорости постановки реакции при отсутствии необходимости применения энергозависимого и дорогостоящего лабораторного оборудования, ввиду чего может послужить альтернативным диагностическим методом.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

##### 4.1 Выводы:

1. Вирус АЧС штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» адаптирован к росту в перевиваемой линии клеток СV-1, его инфекционная активность достигает значений 7,0 - 7,5 lg ГАД<sub>Е50</sub>/см<sup>3</sup> при сроках накопления 6-7 суток.
2. Биологические свойства вируса АЧС штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» отличаются от таковых исходного штамма «8 №2 Одинцово 02/14», уровень летальности для домашних свиней при проведении биологической пробы составил 37,5%. Основные антигенные свойства, генотиповая и сероиммунотипология характеристики адаптированного штамма не отличаются от таковых исходного изолята и штамма «Грузия 2007/1».
3. Усовершенствована и оптимизирована методика получения антигена вируса АЧС на основе стандартизированной и паспортизированной культуры клеток СV-1, которая позволяет накопить материал в титрах 7,0 - 7,5 lg ГАД<sub>Е50</sub>/см<sup>3</sup> и является более технологичной и доступной при крупномасштабном культивировании.
4. На основе штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» вируса АЧС получены препараты антигена с концентрацией белка – 0,7-0,8 мг/мл, не уступающие по своим характеристикам референс-антигену, рекомендованному МЭБ, и типоспецифические гипериммунные сыворотки крови свиней с активностью до 4,01 lg/см<sup>3</sup>, которые могут применяться в диагностических реакциях, таких как ИБ, ИФА, РПИФ и др.
5. На основе усовершенствованного метода получения культурального цитоплазматического антигена вируса АЧС подобран способ изготовления иммунострипов для выявления антител к вирусу АЧС и разработана методика постановки иммуноблоттинга, относительная чувствительность и специфичность которого составили 96,1% и 100%, соответственно.
6. Инфицированная вирусом штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» культура клеток СV-1 и очищенный культуральный антиген, полученный на основе указанного штамма, пригодны для использования в реакциях непрямой иммунофлуоресценции, латекс-агглютинации и монослойного пероксидазного анализа, что позволяет выявлять антитела к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней, начиная с 9 суток после инфицирования, в диапазоне разведений от 1:5 до 1:1280.

## 4.2 Практические предложения

В результате проведенных исследований изучен и охарактеризован штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1», который депонирован в КШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» под авторским наименованием «Штамм вируса АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1 (Д)».

Адаптированный к репродукции в перевиваемой КК СV-1 штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» вируса АЧС может использоваться в НИИ и диагностических центрах для приготовления специфического антигена и получения серотипоспецифической сыворотки крови.

Разработанные методические рекомендации по выявлению антител к вирусу АЧС методом могут применяться в лабораторной практике при диагностических и научных исследованиях.

## 4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» можно использовать для дальнейшей разработки и усовершенствования других методов и тест-систем серодиагностики АЧС. Вирусный антиген, полученный на основе штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/СV-1» будет использован для изготовления тест-системы ИБ и внедрения ее в лабораторную практику РФ. Разработанные и усовершенствованные методы серологической диагностики АЧС на основе культурального антигена будут испытаны в лабораторных условиях, определены их валидационные характеристики и составлена соответствующая нормативная документация.

## 5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жуков И.Ю., Биологические свойства изолятов вируса африканской чумы свиней и особенности течения болезни при экспериментальном заражении: дисс. ... канд. биол. наук / Жуков Иван Юрьевич. – Владимир, 2018. – 145 с.
2. Шевченко И.В., Биологические свойства и анализ полных геномов российских изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных в 2013-2014 гг.: дисс. канд. биол. наук / Шевченко Иван Вячеславович. – Владимир, 2017.–145с.
3. A sensitive dot immunobinding assay for serodiagnosis of African swine fever virus with application in field conditions / Maria J. Pastor, Marisa Arias, Carlos Alcaraz, Maribel De Diego, Jose M. Escribano // J Vet Diagn Invest – 1992. - №4 – P. 254-257.
4. Comparative analysis of clinical and biological characteristics of African swine fever virus isolates from 2013 year Russian Federation / N.N. Vlasova, A.A Varentsova, I.V Shevchenko et. al. // British Microbiology Research Journal. -2015.- Vol.5,-N 3.- P. 203-215.
5. Genetic Variation among African Swine Fever Genotype II Viruses, Eastern and Central Europe / C.Gallardo, J. Fernández-Pinero, V. Pelayo et al // Emerg. Infect. Dis.- 2014.- Vol.20, N 9.- P. 1544-1547.

6. Tandem Repeat Insertion in African Swine Fever Virus / K.V. Goller., A.S. Malogolovkin, S. Katorkin et al. // Emerg. Infect. Dis..- 2015.- Vol.21, N 4- P 731-732.

7. World Organisation for Animal Health (OIE). – African swine fever. Chapter 2.8.1. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals,birds and bees).- 2012.

## **6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Сравнительный анализ репродукционных свойств вируса африканской чумы свиней изолята Одинцово 02/14 в первичных культурах клеток / **Д. В. Шарыпова**, И. Ю. Жуков, Н. Н. Власова [и др.] // Ветеринария сегодня. - 2017. - № 1. - С. 5-12.

2. Анализ результатов мониторинговых исследований по выявлению ДНК вируса африканской чумы свиней, проведенных в 2017 г. / Д.Н. Федосеева, Е.В. Аронова, А.А. Варенцова, А.А. Елсукова, Мазлум А., **Д.В. Шарыпова**, Н.Н. Власова, А.С. Иголкин // Ветеринария сегодня - 2018.- 26, № 3.- с. 21-25.

3. Влияние полудана на репродукцию вирусов репродуктивно-респираторного синдрома, трансмиссивного гастроэнтерита и африканской чумы свиней в первичных и перевиваемых культурах клеток / **Д.В. Шарыпова**, И.Ю. Жуков, Мазлум А., Н.Н. Власова, О.С. Пузанкова, В.Л. Гаврилова, А.С. Иголкин // Ветеринария сегодня.- 2018.- 24, № 1.- с. 37-41.

4. Анализ изменений генетической структуры и биологических свойств вируса африканской чумы свиней при адаптации к перевиваемой культуре клеток / Мазлум А., Н.Г. Зиняков, А.С. Першин, И.В. Шевченко, И.Ю. Жуков, Д.Н. Федосеева, **Д.В. Шарыпова**, А.С. Иголкин, Н.Н. Власова // Ветеринария сегодня.– 2018.– 27, № 4.– р. 21-25.

5. Разработка и усовершенствование методов серологической диагностики африканской чумы свиней / **Д. В. Шарыпова**, О. В. Капустина, И. Ю. Жуков, Н. Н. Власова, А. С. Иголкин// Ветеринария сегодня - 2019.- 29, № 2.- с. 30-34.

6. Патент № 2675535/ 19.12.2019-15.05.2038// Штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/ СВ-1» вируса африканской чумы свиней, со сниженной вирулентностью для свиней, для вирусологических, диагностических, молекулярно-генетических и мониторинговых исследований // Власова Н.Н., Жуков И.Ю., Мазлум А., **Шарыпова Д.В.**, Першин А.С., Иголкин А.С. Объект: штамм микроорганизма МПК: С12N7/00 (2006/01) А61К39/135 (2006.01)

---

Подписано в печать \_\_\_\_\_ июля 2019 г.

Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л.1.

Тираж 80 экз.

Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ  
«Федеральный центр охраны здоровья животных»