

РАЗДЕЛ 3.8.

Семейство SUIDAE

ГЛАВА 3.8.1.

АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ

РЕЗЮМЕ

*Африканская чума свиней (АЧС) представляет собой инфекционную болезнь домашних и диких свиней всех пород и возрастов, вызванную вирусом, обуславливающим широкий спектр синдромов. Острое заболевание характеризуется высокой температурой тела, кровоизлияниями в ретикулоэндотелиальной системе и высокой летальностью. Резервуаром и вектором передачи вируса АЧС (ВАЧС) являются аргасовые клещи рода *Ornithodoros*, в особенности *O. moubata* и *O. erraticus*.*

*ВАЧС является единственным представителем семейства *Asfarviridae* и рода *Asfivirus*.*

Методы лабораторной диагностики АЧС делятся на две группы: к первой относятся методы выделения вируса и обнаружения антигенов вируса и геномной ДНК, а вторая включает методы выявления антител. Выбор методов зависит от ситуации в отношении заболевания и возможностей лабораторной диагностики в данном регионе или стране.

Идентификация возбудителя: *лабораторная диагностика должна быть направлена на выделение вируса одновременно путем заражения культур лейкоцитов свиней или клеток костного мозга свиней, выявление антигена в мазках или криостатных срезах тканей с помощью реакции иммунной флюоресценции (РИФ) и выявление геномной ДНК с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР представляет собой превосходный, высокочувствительный и быстрый метод выявления ВАЧС, и он очень полезен в широком диапазоне обстоятельств. Этот метод особенно ценен, если выделение вируса и выявление антигена в тканях невозможны.*

В сомнительных случаях делают пассаж материала в культурах лейкоцитов и повторяют описанные выше процедуры.

Серологические реакции: *у свиней, выживших после естественного заражения, через 7–10 дней после инфицирования обычно появляются антитела против ВАЧС, и эти антитела сохраняются в течение длительного периода времени. В эндемичных по заболеванию регионах или при первичной вспышке, вызванной штаммом с низкой вирулентностью, исследование новых вспышек должно включать выявление специфических антител в сыворотке крови или экстрактах тканей. Для выявления антител существует много методов, таких как непрямая реакция флюоресцирующих антител (НРФА), твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) и иммуноблоттинг.*

Требования к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам: в настоящее время вакцины против АЧС не существует.

А. ВВЕДЕНИЕ

Вирус африканской чумы свиней (ВАЧС) представляет собой сложный крупный икосаэдрический ДНК-содержащий имеющий оболочку вирус, имеющий много общих признаков с представителями семейств *Iridoviridae* и *Poxviridae* (Arias, Sánchez-Vizcaino, 2002a; Vinuela, 1985). Этот вирус в настоящее время рассматривается как единственный представитель семейства *Asfarviridae* (Dixon *et al.*, 2005). Во внутриклеточных вирусных частицах (200 нм) выявлено не менее 28 структурных белков (Sánchez-Vizcaino, 2006). В инфицированных макрофагах свиней обнаружено более ста инфекционных белков, и не

менее 50 из них реагируют с сывороткой инфицированных или выздоровевших свиней. Геном вируса имеет от 170 до 192 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) и состоит из консервативного центрального участка размером около 125 т.п.н. и переменных концевых участков. Эти переменные участки кодируют пять мультигенных семейств, которые напрямую определяют изменчивость генома вируса (Blasco *et al.*, 1989). Был проведен полный анализ последовательности нуклеотидов некоторых штаммов ВАЧС (Charman *et al.*, 2008; De Villier *et al.*, 2010). Разные штаммы ВАЧС различаются по способности вызывать заболевание, но в настоящее время на основе изучения антител выявлен лишь один серотип вируса.

Молекулярную эпидемиологию заболевания изучали путем секвенирования С-терминального конца гена VP72, который определяет до 22 разных генотипов (Boshoff *et al.*, 2007; Lubisi *et al.*, 2005). Ценным подтвержденным дополнительным методом генотипирования для молекулярных эпидемиологических исследований является определение полной геномной последовательности гена р54 (Gallardo *et al.*, 2009). Для более точного различения генотипов используют анализ центрального переменного участка (CVR) гена B602L, являющегося наиболее переменным локусом для различения близкородственных изолятов и выделения подгрупп вируса в некоторых из 22 генотипов (Gallardo *et al.*, 2009).

Вирус АЧС приводит к развитию ряда синдромов, варьирующих от молниеносной и острой до хронической болезни и практически здорового вирусоносительства. Свиньи представляют собой единственный вид домашних животных, который предрасположен к естественному инфицированию ВАЧС. Европейские кабаны и дикие свиньи также чувствительны к данному заболеванию, клинические признаки и смертность у них сходны с таковыми, наблюдаемыми у домашних свиней. В отличие от них, африканские дикие свиньи, такие как бородавочники (*Phacochoerus aethiopicus*), кистеухие свиньи (*Potamochoerus porcus*) и большие лесные свиньи (*Hylochoerus meinertzhageni*) устойчивы к болезни, и клинические признаки заболевания у них незначительные или отсутствуют. Эти виды диких свиней являются резервуаром ВАЧС в Африке (Sánchez-Vizcaino, 2006).

Инкубационный период в природе составляет обычно 4–19 дней. Наиболее вирулентные штаммы вызывают молниеносное или острое геморрагическое заболевание, характеризующееся высокой температурой, потерей аппетита, кровоизлияниями в кожу и внутренние органы и падежом в течение 4–10 дней, иногда даже до появления первых клинических признаков. Смертность может достигать 100%. Менее вирулентные штаммы приводят к развитию слабых клинических признаков – небольшой лихорадке, снижению аппетита и депрессии – которые легко спутать со многими другими состояниями у свиней, без подозрения на АЧС. Штаммы с низкой вирулентностью, не обладающие гемадсорбирующими свойствами, иногда обуславливают главным образом субклиническую негеморрагическую инфекцию и сероконверсию, но у некоторых животных могут развиваться отчетливые поражения в легких или на коже в местах выпячивания костей и травм. Животные, выздоровевшие после острого или хронического заболевания, могут постоянно сохранять статус инфицированных и служить вирусоносителями. Биологические основы сохранения ВАЧС в организме пока не известны (Carrillo *et al.*, 1994). Выздоровевшие свиньи, являющиеся носителями ВАЧС, и постоянно инфицированные дикие свиньи представляют собой самую большую проблему в борьбе с данным заболеванием. Серологическое распознавание свиней-вирусоносителей жизненно важно для успеха программ по эрадикации возбудителя (Arias, Sánchez-Vizcaino, 2002b).

АЧС нельзя отличить от классической чумы свиней (КЧС) на основе клинических или патолого-анатомических признаков, и обе эти болезни рассматривают при дифференциальной диагностике любого острого фебрильного геморрагического синдрома у свиней. Бактериальную септицемию также можно спутать с АЧС и КЧС. Для различения этих заболеваний необходимы лабораторные исследования.

В странах, где АЧС не зарегистрирована, но есть подозрение на нее, лабораторная диагностика должна быть направлена на выделение вируса одновременно путем заражения культур лейкоцитов свиней или клеток костного мозга, выявления антигена в мазках или криостатных срезах тканей с помощью реакции иммунной флюоресценции (РИФ) и выявления геномной ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая является наиболее чувствительным методом обнаружения присутствия вируса у постоянно инфицированных животных и особенно полезна, если имеющиеся образцы непригодны для выделения вируса и выявления антигена по причине разложения. ВАЧС может быть выявлен с помощью ПЦР на очень ранней стадии инфекции в тканях, а также пробах крови с этилендиаминотетрауксусной кислотой (ЭДТА) и плазмы. У свиней, выздоровевших после острой или хронической инфекции, вирусемия обычно наблюдается в течение нескольких недель, что делает ПЦР очень полезным методом выявления ДНК ВАЧС у свиней, инфицированных штаммами с низкой или умеренной вирулентностью.

Поскольку вакцина против данного заболевания отсутствует, наличие антител к ВАЧС указывает на наличие инфекции в прошлом, и так как антитела образуются начиная с первой недели после инфицирования и сохраняются в течение длительного времени, они являются хорошим маркером для диагностики заболевания. Раннее появление (через 7–10 дней после инфицирования) и последующее долгосрочное присутствие антител делают методы выявления антител, такие как твердофазный ИФА, иммуноблоттинг или ИРФА, очень полезными для диагностики подострых и хронических форма заболевания.

Эпидемиология АЧС сложная, в Африке и Европе особенности эпидемиологии различаются. Распространение АЧС обусловлено циклами передачи возбудителя, в которых участвуют домашние свиньи, дикие кабаны, дикие африканские свиньи и аргасовые клещи (Sánchez-Vizcaino *et al.*, 2009). В регионах, где встречаются аргасовые клещи рода *Ornithodoros*, выявление ВАЧС в этих резервуарах инфекции способствует лучшему пониманию эпидемиологии данной болезни. Это очень важно для разработки программ эффективной борьбы с болезнью и эрадикации возбудителя (Basto *et al.*, 2006). АЧС не является зоонозным заболеванием и не влияет на общественное здравоохранение (Sánchez-Vizcaino *et al.*, 2009).

Работу с ВАЧС должны проводить лаборатории, которым соответствующие компетентные органы разрешили в соответствии с указаниями МЭБ работать с микроорганизмами 3 и 4 групп патогенности.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Идентификация возбудителя

При подозрении на АЧС в лабораторию должны быть отправлены следующие пробы: кровь с антикоагулянтом (ЭДТА), селезенка, лимфоузлы, железы и почки. При перевозке образцы должны находиться в насколько возможно охлажденном, но не замороженном состоянии. После прибытия в лабораторию их следует хранить при температуре -70°C , если обработка проводится не немедленно. Поскольку поддержание холодной цепи не всегда возможно, пробы можно предоставлять в физиологическом растворе с глицерином; это может несколько снизить вероятность выделения вируса, но облегчит предоставление проб в лабораторию, что поможет в борьбе со вспышкой инфекции.

1.1. Приготовление образца для реакции гемадсорбции

- i) Готовят суспензии тканей, растирая 0,5–1,0 г проб пестиком в ступке, содержащей стерильный песок, затем добавляют 5–10 мл забуференного физраствора или среды для культуры тканей, содержащей антибиотика.
- ii) Суспензии осветляют путем центрифугирования при 1000 *g* в течение 5 минут. Надосадочную жидкость используют для культуры клеток/гемадсорбции (см. раздел В.1.2 ниже).

1.2. Реакция гемадсорбции

Реакция гемадсорбции (РГАд) (Malmquist, Nay, 1960) основана на том факте, что эритроциты свиней прилипают к поверхности моноцитов или макрофагов свиней, инфицированных ВАЧС, и что большинство изолятов данного вируса характеризуются этим явлением гемадсорбции. Положительный результат в РГАд подтверждает диагноз АЧС. Выделено очень небольшое количество «негемадсорбирующих» вирусов, большинство из них невирулентны, но некоторые все же вызывают типичную острую АЧС. Реакция проводится путем высевания суспензий крови или тканей свиней с подозрением на заболевание в первичные культуры лейкоцитов (см. процедуру 1 ниже) или в культуры клеток альвеолярных макрофагов, а также путем приготовления культур лейкоцитов из крови свиней, зараженных в лаборатории, или из крови свиней с подозрением на заболевание, забранной в полевых условиях (см. процедуру 2 ниже). Из каждых 100 мл дефибринированной забранной крови можно получить до 300 культур в пробирках. Важно провести все процедуры таким образом, чтобы предотвратить контаминацию культур.

1.2.1. Процедура 1. Реакция гемадсорбции в первичных культурах лейкоцитов

- i) Забирают требуемый объем свежей дефибринированной крови свиней.
- ii) Центрифугируют при 700 g в течение 30 минут и забирают клетки лейкоцитарной пленки. К полученным лейкоцитам добавляют три объема 0,83% хлорида аммония. Размешивают и инкубируют при комнатной температуре в течение 15 минут. Центрифугируют при 650 g в течение 15 минут и осторожно удаляют надосадочную жидкость. Осадок промывают в среде или фосфатно-солевом буфере (ФСБ).
- iii) Клетки ресуспендируют в концентрации 10^6 – 10^7 клеток/мл в среде для культуры ткани, содержащей 10–30% свиной сыворотки и антибиотика. Для предотвращения неспецифической гемадсорбции среда должна содержать сыворотку или плазму той же свиньи, от которой получены лейкоциты. Если исследуется большой объем образцов, гомологичную сыворотку можно заменить на сыворотку, для которой предварительно установлено, что она препятствует неспецифическому розеткообразованию.
- iv) В каждую лунку планшета на 96 лунок вносят по 200 мкл суспензии клеток (300 000 клеток/лунку) и инкубируют при 37°C во влажной камере с 5% CO₂. Эту процедуру можно также проводить с аликвотами 1,5 мл в 160 x 16 мм пробирках и инкубировать в наклонном положении (5–10° от горизонтали) при 37°C.
Примечание: для рутинной диагностики достаточно чувствительными являются лишь 2–4-дневные культуры.
- v) Через 3 дня в три пробирки или лунки планшета вносят 0,2 мл/пробирку или 0,02 мл (1/10 финального разведения)/лунку приготовленных образцов. Рекомендуется инокулировать в культуры разведения в 10 и 100 раз, и это особенно важно, если взятый в поле материал прибыл в плохом состоянии.
- vi) Культуры положительного контроля инокулируют гемадсорбирующим вирусом. Неинокулированный отрицательный контроль важен для мониторинга возможности неспецифической гемадсорбции.
- vii) В забуференный физраствор в каждую пробирку добавляют 0,2 мл свежего препарата 1% свиных эритроцитов. В случае 96-луночных планшетов добавляют 0,02 мл 1% свиных эритроцитов на лунку.
- viii) Культуры осматривают ежедневно в течение 7–10 дней под микроскопом на предмет цитопатического действия (ЦПД) и гемадсорбции.
- ix) *Интерпретация результатов*
Гемадсорбция заключается в прилипании большого количества свиных эритроцитов к поверхности инфицированных клеток. ЦПД, представляющее собой

снижение количества прилипших клеток в отсутствие гемадсорбции, может быть связано с цитотоксичностью инокулята, вирусом болезни Ауески или негемадсорбирующим ВАЧС, что может быть выявлено в РИФ с клеточным осадком или с помощью ПЦР (см. ниже). Если изменений не наблюдается или результаты РИФ и ПЦР отрицательные, надосадочную жидкость инокулируют 1–3 раза в свежие культуры лейкоцитов. Все попытки выделения вируса должны быть подтверждены ПЦР и секвенированием.

1.2.2. Процедура 2. Реакция гемадсорбции с «авторозеткообразованием» с лейкоцитами периферической крови инфицированных свиней

Эта процедура занимает меньше времени, чем приготовление и инокуляция первичных культур свинных лейкоцитов (описанная в процедуре 1 выше), и быстрее дает результаты в положительных случаях. Она может быть проведена в лабораториях, не имеющих оборудования для рутинных вирусологических исследований; минимальные требования – предметные и покровные стекла, микроскоп и стерильная среда, пробирки или флаконы и пипетки. Кровь свиней с подозрением на заболевание в полевых условиях или свиней, зараженных в лаборатории, забирают в пробирки с гепарином, и готовят культуры лейкоцитов для непосредственного изучения гемадсорбции. Однако результаты этой реакции трудно оценивать, и в настоящее время ее заменяют ПЦР.

- i) Забирают 20 мл цельной крови в шприц, содержащий 2000 МЕ гепарина в 2 мл физраствора, размешивают и переносят в стеклянную пробирку или флакон с узким горлом.
- ii) Помещают пробирку/флакон вертикально в камеру для инкубации или на водяную баню при 37°C и дают клеткам осесть. Для стимуляции осаждения добавляют 2 мл плазмозамещающей жидкости, такой как Dextravan150, представляющей собой раствор Декстрана 150 в 0,9% растворе NaCl для инъекций (Fisons, Соединенное Королевство).
- iii) Культуры инкубируют в течение 6–8 ч при 37°C, а затем изучают культуры с интервалом 2–3 ч, перенося небольшие аликвоты богатой лейкоцитами надосадочной жидкости, вместе с небольшим количеством эритроцитов, на предметное стекло.
- iv) *Интерпретация результатов*
Наличие гемадсорбирующих клеток, выявленных при изучении под микроскопом, указывает на наличие ВАЧС. Гемадсорбция заключается в прилипании большого количества свинных эритроцитов к поверхности инфицированных клеток. Любых признаков гемадсорбции достаточно для повторения анализа или подтверждения наличия ВАЧС с помощью другого метода, например ПЦР.

1.3. Выявление антигена с помощью реакции иммунной флюоресценции (РИФ)

РИФ (Boal *et al.*, 1969) можно использовать как дополнительный метод для выявления антигена в тканях свиней с подозрением на заболевание в полевых условиях или свиней, зараженных в лаборатории. Положительный результат РИФ плюс клинические признаки и соответствующие поражения могут быть основанием для предположительного диагноза АЧС. Ее можно также использовать для выявления антигена ВАЧС в культурах лейкоцитов, в которых не наблюдается РГАд, и таким образом обнаружить негемадсорбирующие штаммы вируса. С ее помощью можно также различить ЦПД, вызванное ВАЧС и вызванное другими вирусами, такими как вирус болезни Ауески, или цитотоксическим инокулятом. Однако важно отметить, что в случае подострой и хронической болезни чувствительность РИФ значительно снижается. Это снижение чувствительности может быть связано с образованием комплексов антиген-антитело в тканях инфицированных свиней, что блокирует взаимодействие между антигеном ВАЧС и конъюгатом АЧС (Sánchez-Vizcaino, 2006).

1.3.1. Методика

- i) Готовят криостатные срезы или мазки-отпечатки исследуемых тканей, или распределяют клеточный осадок инокулированных культур лейкоцитов по предметным стеклам, высушивают на воздухе и фиксируют ацетоном в течение 10 мин при комнатной температуре.
- ii) Окрашивают флуоресцеинизотиоцианат(ФИТЦ)-конъюгированным анти-ВАЧС иммуноглобулином в рекомендованном или установленном в результате титрования разведении в течение 1 ч при 37°C во влажной камере.
- iii) Аналогичным образом фиксируют и окрашивают препараты положительного и отрицательного контроля.
- iv) Промывают путем 4-кратного погружения в свежий чистый ФСБ, препараты окрашенных тканей заключают в ФСБ/глицерин и изучают под микроскопом в ультрафиолетовом свете с соответствующими барьерным и возбуждающим фильтрами.
- v) *Интерпретация результатов*
Результат считается положительным, если в паракортикальной ткани лимфоидных органов или в фиксированных макрофагах в других органах или в зараженных культурах лейкоцитов наблюдается специфическая гранулярная цитоплазматическая флуоресценция.

1.4. Выявление генома вируса с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Метод ПЦР был разработан с использованием праймеров из высококонсервативной области генома для выявления и идентификации широкого спектра изолятов, принадлежащих ко всем известным генотипам вируса, включая негемадсорбирующие вирусы и изоляты с низкой вирулентностью. Метод ПЦР особенно полезен для выявления вирусной ДНК в тканях свиней, непригодных для выделения вируса или выявления антигена по причине разложения, или когда есть весоые причины полагать, что вирус мог быть инактивирован до получения проб лабораторией.

Описано две валидированные процедуры ПЦР, состоящие из приготовления образца и последующей процедуры исследования. Эти процедуры служат общим руководством и начальной точкой для протокола ПЦР. Оптимальные условия реакции (время и температура инкубации, модели и поставщики оборудования, концентрации аналитических реактивов, таких как праймеры и dNTP) могут варьировать, поэтому сначала следует провести оценку описанных условий.

1.4.1. Методика приготовления образца (Agüero *et al.*, 2003; 2004)

Ниже описана чувствительная процедура экстрагирования с использованием коммерческого набора High Pure PCR Template Preparation Kit¹. В продаже имеется много других наборов для экстрагирования ДНК, пригодных для проведения ПЦР в зависимости от пробы, подлежащей анализу, и их можно использовать. В данной процедуре можно использовать разные пробы, такие как надосадочная жидкость культуры клеток, кровь с ЭДТА, сыворотка крови и гомогенизированные ткани, даже если последние хранились в тепле и в некоторой степени разложились. Эта процедура имеет то преимущество, что может использоваться для экстрагирования как ДНК ВАЧС, так и РНК вируса КЧС, что позволяет проводить одновременное выявление обоих вирусов с помощью множественной ПЦР (Agüero *et al.*, 2004).

Набор High Pure PCR Template Preparation Kit¹ включает следующие реактивы: связывающий буфер, протеиназа К, буфер для удаления ингибиторов, отмывочный буфер, а также фильтровальные пробирки High Pure и пробирки для сбора.

¹ «Рош Диагностика».

Для проб органов и тканей сначала готовят гомогенат материала 1/10 в ФСБ, затем центрифугируют для осветления при 12 000 g в течение 5 мин. Экстрагируют ДНК/РНК из полученной надосадочной жидкости. Иногда рекомендуется параллельно использовать разведение 1/10 надосадочной жидкости.

Экстрагирование для контрольных образцов: в каждую операцию по выделению нуклеиновой кислоты следует включать не менее чем один положительный и один отрицательный контроль. Пробами для положительного контроля могут служить 200 мкл ВАЧС-положительной сыворотки, кровь с ЭДТА или гомогенаты ткани 1/10 (того же типа, что и анализируемые образцы): отрицательным контролем может служить 200 мкл воды или ВАЧС-отрицательная кровь с ЭДТА или гомогенат ткани. Контроли должны обрабатываться вместе с исследуемыми образцами.

1.4.2. Приготовление рабочих растворов

- i) Лиофилизированная протеиназа К
Протеиназу К растворяют в 4,5 мл стерильной дистиллированной воды и помещают аликвоты раствора во флаконы на 500 мкл. До использования хранят при -20°C.
- ii) Буфер для удаления ингибиторов
В оригинальный флакон вносят 20 мл абсолютного этанола. Соответствующим образом маркируют флакон с указанием даты.
- iii) Отмывочный буфер
В оригинальный флакон вносят 80 мл абсолютного этанола. Соответствующим образом маркируют флакон с указанием даты.

1.4.2.1. Метод приготовления

- i) Пипеткой забирают 200 мкл образца в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл.
- ii) Добавляют 200 мкл связывающего буфера и 40 мкл протеиназы К. Сразу же перемешивают. Инкубируют в течение 10 мин при 72°C.
- iii) Непродолжительное время центрифугируют микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл для удаления капель на внутренней поверхности крышки.
- iv) В пробирку с образцом вносят 100 мкл изопропанола.
- v) Помещают фильтровальную пробирку High Pure в пробирку для сбора и пипеткой переносят образец в верхнюю емкость. Центрифугируют в течение 1 мин при 8000 об./мин (в случае пробы крови этап центрифугирования повторяют, если образец остается в фильтровальной пробирке).
- vi) Пробирку для сбора отбрасывают и помещают фильтровальную пробирку в чистую пробирку для сбора.
- vii) Добавляют 500 мкл буфера для удаления ингибиторов в верхнюю емкость и центрифугируют в течение 1 мин при 8000 об./мин.
- viii) Отбрасывают пробирку для сбора и помещают фильтровальную пробирку в чистую пробирку для сбора.
- ix) Добавляют 450 мкл отмывочного буфера в верхнюю емкость и центрифугируют в течение 1 мин при 8000 об./мин.
- x) Отбрасывают пробирку для сбора и повторяют этап промывки.
- xi) Отбрасывают пробирку для сбора и помещают фильтровальную пробирку в чистую пробирку для сбора. Центрифугируют в течение 10 с при 13 000 об./мин для удаления остаточных количеств отмывочного буфера.
- xii) Отбрасывают пробирку для сбора и помещают фильтровальную пробирку в чистую микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл.
- xiii) Для элюции нуклеиновых кислот добавляют 50 мкл предварительно подогретой (70°C) стерильной воды в верхнюю емкость (не допускается использование буфера

- для элюции, входящего в набор для определения РНК вируса КЧС).
Центрифугируют в течение 1 мин при 8000 об./мин.
- xiv) Приготовленный образец используют сразу после приготовления или хранят до последующего использования при -20°C.

1.4.3. ПЦР-амплификация с помощью стандартной ПЦР (Agüero *et al.*, 2003)

Набор праймеров для ВАЧС, описанный в данной процедуре, можно комбинировать со специальным набором праймеров для вируса КЧС при использовании метода множественной ПЦР ОТ, что позволяет одновременно осуществить дифференциальную детекцию геномов обоих вирусов в одной реакции (Agüero *et al.*, 2004).

1.4.4. Исходные растворы

- i) Безнуклеазная стерильная вода.
- ii) ДНК-полимераза Hot Start Taq Gold, 10 x ПЦР-буфер II и хлорид магния имеются в продаже.
- iii) Смесь нуклеотидов для ПЦР, содержащая 10 мМ каждого dNTP, имеется в продаже.
- iv) Праймеры в концентрации 20 пкмоль/мкл: праймер PPA-1 с последовательностью 5'-AGT-TAT-GGG-AAA-CCC-GAC-CC-3' (прямой праймер); праймер PPA-2 с последовательностью 5'-CCC-TGA-ATC-GGA-GCA-TCC-T-3' (обратный праймер).
- v) 10 x загрузочный буфер
0,2% ксиленианол, 0,2% бромфеноловый синий, 30% глицерин.
- vi) Буфер ТАЕ (50 x) для агарозного геля.
Трис-основание (242 г); ледяная уксусная кислота (57,1 мл); 0,5 М ЭДТА с pH 8,0 (100 мл); дистиллированная вода (до 1 литра).
- vii) Маркерная ДНК
Лэддер из 100 пар оснований имеется в продаже.

1.4.4.1. Метод приготовления

- i) Для каждой пробы в стерильной микроцентрифужной пробирке на 1,5 мл готовят реакционную смесь для ПЦР, описанную ниже. Готовят общий объем реакционной смеси, соответствующий количеству исследуемых проб плюс одна или более.
- ii) Безнуклеазная или стерильная дистиллированная вода (17,375 мкл), 10 x ПЦР-буфер II (2,5 мкл), хлорид магния 25 мМ (2 мкл), смесь dNTP 10 мМ (0,5 мкл), праймер PPA-1, 20 пкмоль/мкл (0,25 мкл), праймер PPA-2, 20 пкмоль/мкл (0,25 мкл), ДНК-полимераза Taq Gold 5 ед./мкл (0,125 мкл).
- iii) В необходимое количество ПЦР-пробирок на 0,2 мл добавляют 23 мкл реакционной смеси для ПЦР.
- iv) В каждую ПЦР-пробирку добавляют 2 мкл ДНК образца. При каждой постановке ПЦР используют положительный контроль (2 мкл ДНК ВАЧС) и отрицательный контроль (2 мкл дистиллированной воды).
- v) Все пробирки помещают в автоматический термоциклер и запускают следующую программу:
1 цикл при 95°C в течение 10 мин.
40 циклов при 95°C в течение 15 с, при 62°C в течение 30 с и при 72°C в течение 30 с.
1 цикл при 72°C в течение 7 мин.
Выдержать при 4°C.
- vi) В конце программы вынуть ПЦР-пробирки и добавить 2,5 мкл 10 x загрузочного буфера в каждую пробирку.
- vii) Все образцы помещают в 2% агарозный гель в буфере ТАЕ, содержащем этидия бромид в конечной концентрации 0,5 мкг/мл.

- viii) Добавляют маркерную ДНК на одну дорожку с каждой стороны геля.
- ix) Электрофорез геля проводят при постоянном напряжении 150–200 вольт в течение около 30 мин.
- x) *Интерпретация результатов*
Изучают гель в ультрафиолетовом свете. В положительных образцах присутствует отчетливая полоса, которая должна соответствовать движению ПЦР-продукта положительного контроля. Рассчитывают размер ПЦР-продуктов испытуемых образцов и положительного контроля на основе стандартных маркеров. ПЦР-продукт положительного контроля имеет размер 257 пар оснований. В отрицательном контроле не должно быть полос.
- xi) *Дополнительно*
Можно провести дополнительный подтверждающий анализ на основе разложения продуктов амплификации рестрикционной эндонуклеазой BsmA I. Для этого анализа в течение 2,5 ч инкубируют при 55°C весь объем 5 мкл продукта амплификации ДНК в финальном объеме 20 мкл гидролитической смеси: 2 мкл 10 х буфера, 1 мкл BsmA I (5 ед./мкл) и 12 мкл стерильной дистиллированной воды. Затем проводят электрофорез образцов в 3% агарозном геле как описано выше. Тип рестрикции у положительных проб должен включать два фрагмента размером 173–177 и 84–80 пар оснований.

1.4.5. Методика ПЦР: протокол TaqMan® ПЦР (King *et al.*, 2003)

1.4.5.1. Приготовление образца

В продаже имеется много наборов для выделения ДНК, пригодных для приготовления матрицы для ПЦР, в зависимости от пробы, представленной для анализа, подходящих для использования в референтных лабораториях.

Ниже описана процедура (спин-протокол) для мини-набора для вирусной РНК QIAamp® (QIAGEN). Этот набор можно использовать для крови свиней с подозрением на чуму свиней. Кровь инфицированных свиней должна быть с добавлением ЭДТА. Детекция ВАЧС может проводиться параллельно с выявлением вируса КЧС (см молекулярные методы выявления вируса КЧС в главе 2.8.3. *Классическая чума свиней*).

- i) Пипеткой переносят 560 мкл входящего в набор буфера AVL в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл.
- ii) Добавляют 140 мкл исследуемого или контрольного образца и размешивают с помощью пульсирующего вортекса в течение около 15 с. Образцы для отрицательного контроля АЧС, состоящие из гомогената селезенки неинфицированных свиней и костного мозга неинфицированных свиней (РВМ) и мононуклеаров периферической крови (РВЛ), следует обрабатывать параллельно с исследуемыми образцами. Для каждого исследуемого образца и неинфицированного отрицательного контроля можно также приготовить дополнительные отрицательные контроли экстрагирования путем параллельного проведения экстрагирования безнуклеазной воды (все контроли должны затем анализироваться на основе процедуры ПЦР параллельно с исследуемыми образцами).
- iii) Инкубируют при комнатной температуре в течение не менее чем 10 мин.
- iv) Непродолжительное время центрифугируют микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл для удаления капель с внутренней поверхности крышки.
- v) К образцу добавляют 560 мкл этанола, размешивают пульсирующим вортексом в течение около 15 с и непродолжительное время центрифугируют для удаления капель с внутренней поверхности крышки.
- vi) Добавляют 630 мкл раствора v) в спин-колонку QIAamp (в пробирке для сбора на 2 мл), оставляя края сухими. Закрывают крышку и центрифугируют в течение 1 мин при 6 000 g. Помещают спин-колонку в

чистую пробирку для сбора на 2 мл и отбрасывают пробирку, содержащую фильтр.

- vii) Осторожно открывают спин-колонку QIAamp и повторяют этап vi.
- viii) Осторожно открывают спин-колонку QIAamp и добавляют 500 мкл буфера AW1. Закрывают крышку и центрифугируют в течение 1 мин при 6 000 g. Помещают спин-колонку в чистую пробирку для сбора на 2 мл и отбрасывают пробирку, содержащую фильтр.
- ix) Осторожно открывают спин-колонку QIAamp и добавляют 500 мкл буфера AW2. Закрывают крышку и центрифугируют в течение 3 мин при 20 000 g.
- x) Помещают спин-колонку QIAamp в новую микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл. Отбрасывают старую пробирку для сбора, содержащую фильтр. Осторожно открывают спин-колонку QIAamp и добавляют 60 мкл буфера AVE. Закрывают крышку и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 мин. Центрифугируют в течение 1 мин при 6 000 g.
- xi) Отбрасывают спин-колонку QIAamp. Экстрагированную ДНК (60 мкл) хранят при температуре -20°C до процедуры ПЦР-амплификации.

1.4.5.2. Исходные растворы

- i) Безнуклеазная или другая стерильная вода соответствующего качества и реакционная мастер-смесь для ПЦР TaqMan® (2 x).
- ii) Праймеры в концентрации 50 пкмоль/мкл: Праймер 1 с последовательностью 5'-CTGCT-CATGG-TATCA-ATCTT-ATCGA-3' (положительный); праймер 2 с последовательностью 5'-GATAC-CACAA-GATC(AG)-GCCGT-3' (отрицательный).
- iii) Зонд TaqMan® в концентрации 5 пкмоль/мкл: (5'-[6-карбоксивуоресцеин (FAM)]-CCACG-GGAGG-AATAC-CAACC-CAGTG-3'-[6-карбокситетраметилродамин (TAMRA)]).

1.4.5.3. ПЦР-амплификация на основе анализа TaqMan® (Fernández-Pinero *et al.*, 2010)

- i) В стерильной микроцентрифужной пробирке на 1,5 мл для каждой пробы готовят реакционную смесь для ПЦР, описанную ниже. Готовят общую реакционную смесь, соответствующую количеству испытуемых проб плюс одна.
Безнуклеазная или стерильная вода (7,5 мкл); реакционная мастер-смесь для ПЦР (концентрация 2x) TaqMan® (12,5 мкл); праймер 1, 50 пкмоль (1,0 мкл); праймер 2, 50 пкмоль (1,0 мкл); зонд TaqMan®, 5 пкмоль (1,0 мкл)
- ii) В лунки оптического реакционного планшета MicroAmp® добавляют 22 мкл реакционной смеси для ПЦР для каждого испытуемого образца.
- iii) Добавляют 3 мкл экстрагированной ДНК образца или холостого контроля экстрагирования и плотно закрывают каждую лунку крышкой.
- iv) Центрифугируют планшет в течение 1 мин в соответствующей центрифуге для размешивания содержимого каждой лунки.
- v) Помещают планшет в систему для определения последовательностей TaqMan® для ПЦР-амплификации и запускают следующую программу:
1 цикл при 50°C в течение 2 мин,
1 цикл при 95°C в течение 10 мин,
40 циклов при 95°C в течение 15 с, 58°C в течение 1 мин.
Примечание: при отсутствии термоциклера TaqMan® можно использовать обычный термоциклер и анализировать продукты ПЦР с помощью анализаторов конечной флуоресценции или с использованием электрофореза в 1,5% агарозном геле. Ожидается продукт размером 250 п.н.

vi) *Интерпретация результатов*

Для каждой ПЦР определяют пороговое значение цикла (C_T) на основе скана всех графиков амплификации (графиков связи между сигналом флуоресценции и номером цикла). Отрицательные пробы, отрицательный неинфицированный контроль или холостой контроль экстрагирования должны иметь значение $C_T > 40,0$. Положительные испытуемые пробы и контроли должны иметь значение $C_T < 40,0$ (строго положительные образцы имеют значение $C_T < 30,0$).

Изменение данного протокола на основе использования других имеющихся в продаже наборов для амплификации может дать даже более высокий выход ПЦР, однако эти наборы для амплификации следует надлежащим образом валидировать перед использованием.

2. Серологические реакции

У выздоровевших свиней антитела сохраняются в течение длительного времени, иногда пожизненно, и для выявления этих антител существует много методов, хотя для рутинного использования в диагностических лабораториях разработано лишь несколько (Escribano *et al.*, 1990; Pastor *et al.*, 1990; Sánchez-Vizcaino, 1987). Чаще всего используется твердофазный ИФА (Sánchez-Vizcaino *et al.*, 1983; Wardley *et al.*, 1979), который пригоден для исследования как сыворотки крови, так и тканевой жидкости. В критических случаях следует провести подтверждающий анализ проб, давших положительный результат в твердофазном ИФА, с использованием альтернативных методов, таких как ИРФА, иммунопероксидазное окрашивание или иммуноблоттинг (Escribano *et al.*, 1990; Pastor *et al.*, 1989). У свиней, зараженных вирулентным ВАЧС, антитела обычно не выявляются, поскольку животные погибают раньше, чем антитела успевают образоваться. Антитела образуются у свиней, инфицированных вирусами АЧС с низкой или умеренной вирулентностью, но это не вполне нейтрализующие антитела.

Недавнее интенсивное исследование, проведенное с целью оценки специфичности и чувствительности серологических реакций для выявления АЧС при разных эпидемиологических сценариях в Африке и Европе и для циркулирующих в настоящее время изолятов ВАЧС (включая кавказский генотип II и восточноафриканские изоляты, отличающиеся большей изменчивостью), показало, что рекомендованные МЭБ исследования позволяют с точностью и высокой чувствительностью обнаружить присутствие антител к АЧС во всех проанализированных эпидемиологических ситуациях (Gallardo *et al.*, 2010).

В эндемичных по АЧС регионах подтверждение случаев подозрения на заболевание лучше всего проводить с использованием стандартного серологического исследования (твердофазный ИФА) в комбинации с альтернативным серологическим методом (ИРФА) или путем выявления антигена. В некоторых странах более 95% подтвержденных случаев были выявлены с использованием комбинации ИРФА и ИФА (Sánchez-Vizcaino, 2006).

Следует отметить, что если свиньи были инфицированы авирулентным штаммом или штаммом с низкой вирулентностью, то серологические методы могут быть единственным способом выявления инфицированных животных.

2.1. Твердофазный иммуноферментный анализ (установленное для международной торговли исследование)

Твердофазный ИФА (Pastor *et al.*, 1990) является прямым методом, с помощью которого можно выявить антитела к ВАЧС у свиней, инфицированных вирусами с низкой или умеренной вирулентностью. Существует коммерческий набор для высокочувствительного и специфичного твердофазного ИФА, валидированный для использования в разных эпидемиологических ситуациях. Более дешевой альтернативой является приготовление

растворимого антигена для использования в непрямом твердофазном ИФА, и процедура с использованием этого растворимого антигена описана ниже.

Чувствительность твердофазного ИФА снижается, если исследуемые пробы сыворотки имеют плохую сохранность. Для решения этой проблемы проводится валидация ряда новых методов твердофазного ИФА, основанных на использовании новых рекомбинантных белков ВАЧС (Gallardo *et al.*, 2006).

Проведение второго подтверждающего анализа, такого как иммуноблоттинг, ИРФА или иммунопероксидазный тест, описанных ниже, рекомендуется в случае сомнительного результата или положительного результата, который может быть связан с плохой сохранностью сыворотки.

2.1.1. Приготовление антигена для твердофазного ИФА

Антиген для твердофазного ИФА получают от инфицированных клеток, выращиваемых в присутствии свиной сыворотки (Escribano *et al.*, 1989).

- i) Клетки MS (стабильные клеточные линии обезьян) инфицируют с повторностью 10 адаптированным вирусом и инкубируют в среде, содержащей 2% свиной сыворотки.
- ii) Клетки забирают через 36–48 ч после инфицирования, когда ЦПД высокое. Промывают ФСБ, осаждают при 650 *g* в течение 5 мин, промывают клетки 0,34 М раствором сахарозы в 5 мМ трис/НСl, рН 8,0 и центрифугируют до осаждения клеток.

Этапы с (iii) до (v) проводят на льду:

- iii) Ресуспандируют клеточный осадок в 67 мМ растворе сахарозы в 5 мМ трис/НСl, рН 8,0 (1,8 мл на колбу вместимостью 175 см²) и оставляют на 10 мин при помешивании через 5 мин.
- iv) Добавляют неионный детергент Nonidet P-40 до конечной концентрации 1% (масса/объем) и оставляют на 10 мин (с помешиванием через 5 мин) для лизиса клеток.
- v) Добавляют сахарозу до конечной концентрации 64% (по массе) в 0,4 М трис/НСl, рН 8,0, и центрифугируют при 1 000 *g* в течение 10 мин для осаждения ядер.
- vi) Забирают надосадочную жидкость и добавляют ЭДТА (конечная концентрация 2 мМ), бета-меркаптоэтанол (конечная концентрация 50 мМ) и NaCl (конечная концентрация 0,5 М) в 0,25 мМ трис/НСl, рН 8,0, и инкубируют в течение 15 мин при 25°C.
- vii) Центрифугируют при 100 000 *g* в течение 1 ч при температуре 4°C над слоем 20% (по массе) сахарозы в 50 мМ трис/НСl, рН 8,0.

Забирают слой, расположенный непосредственно над слоем сахарозы, и используют в качестве антигена для твердофазного ИФА. Хранят при температуре -20°C.

2.1.2. Методика непрямого твердофазного ИФА (Pastor *et al.*, 1990)

- i) Покрывают микропланшет (микропланшеты) для твердофазного ИФА PolySorp антигеном, внося в каждую лунку 100 мкл рекомендованного или предварительно титрованного разведения антигена в 0,05 М карбонатном/бикарбонатном буфере с рН 9,6.
- ii) Инкубируют при 4°C в течение 16 ч (в течение ночи), затем пять раз промывают 0,05% твином-20 в ФСБ, рН 7,2.
- iii) Испытуемую сыворотку, а также сыворотку положительного и отрицательного контроля разводят 1/30 в 0,05% твине-20 в ФСБ, рН 7,2, и вносят 100 мкл каждой разведенной сыворотки в двух повторностях в лунки покрытого антигеном планшета (планшетов).

Если четыре пары сывороток положительного и отрицательного контроля внесены в лунки в разных частях планшета, на одном планшете может быть изучено 40 сывороток в двух повторностях, как показано ниже на плане планшета.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+											-
B	+											-
C				+					-			
D				+					-			
E				-					+			
F				-					+			
G	-											+
H	-											+

- iv) Планшеты инкубируют при 37°C в течение 1 ч (можно на планшетном шейкере), затем промывают пять раз 0,05% твином-20 в ФСБ.
- v) В каждую лунку вносят 100 мкл конъюгата белок А/пероксидаза хрена (Pierce) в рекомендованном или предварительно титрованном разведении в 0,05% твине-20 в ФСБ.
- vi) Планшеты инкубируют при 37°C в течение 1 ч, затем пять раз промывают 0,05% твином-20 в ФСБ.
- vii) Субстрат: добавляют перекись водорода к раствору субстрата (0,04% ортофенилендиамин (OPD) в фосфатном/цитратном буфере, pH 5,0) в соотношении 10 мкл/25 мл, и в каждую лунку вносят 100 мкл субстрата.
Вместо OPD можно использовать субстрат DМAВ/МВТН: в каждую лунку вносят 200 мкл субстрата (10 мл 80,6 мМ раствора DМAВ + 10 мл 1,56 мМ раствора МВТН + 5 мкл Н₂О₂).

 - a) Приготовление субстрата DМAВ/МВТН
DМAВ - 3-диметиламинобензойная кислота (SIGMAD-07871643); МВТН - 3-метил-2-бензотиазолинонгидазона гидрохлорида моногидрат (SIGMA M-8006).
 - b) Раствор DАМВ 80,6 мМ
Растворяют 13,315 г DАМВ кислоты в 1000 мл 0,1 М фосфатного буфера с pH 7 (5,3 г КН₂РО₄, 8,65 г Na₂НРО₄, объем доводят до 1000 мл дистиллированной водой) при постоянном помешивании в течение 1 ч при комнатной температуре, pH доводят до 7 NaOH (5 М). Фильтруют через воронку.
 - c) Раствор МВТН 1,56 мМ
Растворяют 0,3646 г МВТН в 1000 мл 0,1 М фосфатного буфера с pH 7 (5,3 г КН₂РО₄, 8,65 г Na₂НРО₄, объем доводят до 1000 мл дистиллированной водой) при постоянном помешивании в течение 1 ч, pH доводят до 6,25 концентрированной хлористоводородной кислотой. Фильтруют через воронку.

Необходимый объем на 1 планшет составляет: 10 мл DМAВ + 10 мл МВТН + 5 мкл Н₂О₂ 30%.

Субстрат можно приготовить в виде исходных растворов, разделить на аликвоты и хранить при температуре -20°C. Растворы DАМВ и МВТН смешивают (1:1) непосредственно перед использованием и добавляют необходимое количество 30% Н₂О₂.

- viii) Инкубируют при комнатной температуре в течение около 6–10 мин (до начала окрашивания отрицательного контроля). Время, необходимое для появления

окраски, зависит как от температуры субстрата при добавлении в лунки, так и от комнатной температуры.

- ix) Реакцию останавливают путем добавления в каждую лунку 100 мкл 3 н. серной кислоты.
- x) Интерпретация результатов: положительная сыворотка имеет заметное окрашивание (желтое в случае субстрата OPD, синее в случае субстрата DМAB/МВТН), заметное визуально, но для обеспечения выявления всех положительных сывороток необходимо определить оптическую плотность каждой лунки спектрофотометрически, при 492 нм (субстрат OPD) или при 600–620 нм (в случае DМAB/МВТН), с помощью твердофазного ИФА-ридера. При использовании субстрата OPD положительной считается любая сыворотка, у которой значение оптической плотности более чем в два раза превышает среднюю оптическую плотность контрольной отрицательной сыворотки на этом планшете. При использовании субстрата DМAB/МВТН исследование валидировано, если среднее значение оптической плотности положительного контроля более чем в четыре раза выше средней оптической плотности отрицательного контроля. Для правильной интерпретации результатов важно рассчитать пороговое значение для дифференциации отрицательного, сомнительного и положительного результатов. Пороговое значение определяется следующим уравнением:

Пороговое значение = оптическая плотность отрицательной сыворотки \times 1 оптическая плотность положительной сыворотки \times 0,2.

- a) Сыворотка с оптической плотностью ниже порогового значения на 0,1 может считаться отрицательной.
- b) Сыворотка с оптической плотностью выше порогового значения на 0,1 может считаться положительной.
- c) Сыворотка с оптической плотностью в диапазоне пороговое значение \pm 0,1 может считаться сомнительной, и этот результат требуется подтвердить с помощью метода иммуноблоттинга.

2.2. Непрямая реакция флюоресцирующих антител

Это исследование (Pan *et al.*, 1974) следует использовать в качестве подтверждающего исследования для сывороток животных из регионов, в которых АЧС не зарегистрирована, давших положительный результат в твердофазном ИФА, и сывороток из эндемичных регионов, давших сомнительный результат в твердофазном ИФА.

2.2.1. Методика

- i) Готовят суспензию инфицированных ВАЧС клеток почек свиней или клеток обезьян в концентрации 5×10^5 клеток/мл, наносят небольшие капли на предметные стекла, высушивают на воздухе и фиксируют ацетоном при комнатной температуре в течение 10 мин. Стекла можно хранить при температуре -20°C до использования.
- ii) Испытуемую сыворотку инактивируют нагреванием при 56°C в течение 30 мин.
- iii) Добавляют соответствующие разведения испытуемой сыворотки и сывороток положительного и отрицательного контроля в забуференном физрастворе на стекла с инфицированными и неинфицированными контрольными клетками и инкубируют в течение 1 ч при 37°C во влажной камере.
- iv) Стекла промывают путем четырехкратного погружения в свежий чистый ФСБ, а затем в дистиллированную воду.
- v) Добавляют заранее определенные или рекомендованные разведения антисвиного иммуноглобулина/ФИТЦ или конъюгата белок А/ФИТЦ на все стекла и инкубируют в течение 1 ч при 37°C во влажной камере.

- vi) Стекла промывают путем четырехкратного погружения в свежий чистый ФСБ, а затем в дистиллированную воду, заключают в ФСБ/глицерин и изучают под микроскопом в ультрафиолетовом свете с соответствующими барьерным и возбуждающим фильтрами.
- vii) *Интерпретация результатов:* контрольная положительная сыворотка с инфицированными клетками должна быть положительной, а все другие контроли должны быть отрицательными, только после этого можно интерпретировать результаты. Сыворотки положительны, если инфицированные культуры демонстрируют специфическую флуоресценцию.

2.3. Иммуноблоттинг (Escribano *et al.*, 1990; Pastor *et al.*, 1989)

Эту реакцию следует использовать как альтернативу ИФА для подтверждения сомнительных результатов, полученных для отдельных сывороток. Иммуноблоттинг является очень специфичной реакцией и позволяет интерпретировать результаты легче и более объективно и лучше распознавать слабоположительные образцы.

Были определены вирусные белки, индуцирующие образование специфических антител у свиней. Эти полипептиды помещаются на полоски с антигеном и было показано, что они в реакции иммуноблоттинга реагируют со специфическими антителами начиная с 9 дня после инфицирования.

2.3.1. Приготовление полосок с антигеном

- i) Цитоплазматические растворимые вирусные белки подготавливают как описано в методике подготовки антигена для твердофазного ИФА в разделе В.2.1.
- ii) Проводят электрофорез в 17% акриламидо/*N,N'*-диаллилтартардиамидном (DATD) геле с соответствующими стандартами молекулярной массы.
- iii) Белки переносят на нитроцеллюлозную мембрану 14 x 14 см² с помощью электрофореза при постоянном токе 5 мА/см в транспортном буфере (20% метанол в 196 мМ глицине, 25 мМ трис/HCl, pH 8,3).
- iv) Мембрану высушивают и маркируют сторону, на которую нанесены белки.
- v) Отрезают одну полоску с края фильтра и проводят процедуру иммуноблоттинга, описанную ниже. Выявляют область, содержащую белки с молекулярной массой 23 - 35 кДа, проводя параллельное сравнение со стандартами молекулярной массы, и отрезают этот участок в виде полоски шириной 0,5 см. Маркируют каждую полоску со стороны, на которую были нанесены белки.

Эти полоски (длиной около 4 см) представляют собой полоски с антигеном, используемые для иммуноблоттинга, и содержат белки, с которыми будут реагировать антитела сывороток свиней как в острой фазе заболевания, так и выздоравливающих. Эти антитела у некоторых свиней сохраняются пожизненно.

2.3.2. Приготовление раствора субстрата хлоронафтола

Этот раствор необходимо готовить непосредственно перед использованием.

- i) Растворяют 6 мг 4-хлор-1-нафтола в 2 мл метанола и медленно добавляют этот раствор к 10 мл ФСБ при помешивании.
- ii) Удаляют белый преципитат, образующийся в результате фильтрования через бумажный ватмановский фильтр № 1 (не обязательно).
- iii) Добавляют 4 мкл 30% перекиси водорода.

2.3.3. Методика

В ходе иммунологической реакции полоски с антигеном необходимо располагать маркированной стороной вверх.

- i) Полоски с антигеном инкубируют в блокирующем буфере (2% обезжиренное сухое молоко в ФСБ) при 37°C в течение 30 мин при постоянном помешивании.

- ii) Готовят разведение 1/40 испытуемых сывороток и сывороток положительного и отрицательного контроля в блокирующем буфере.
- iii) Полоски с антигеном инкубируют в соответствующей сыворотке при 37°C в течение 45 мин при постоянном помешивании. Инкубируют одну полоску с антигеном в сыворотке положительного контроля и одну – в сыворотке отрицательного контроля. Эти две полоски являются контрольными. Промывают четыре раза в блокирующем буфере, последнюю промывку проводят в течение 5 мин при постоянном помешивании.
- iv) Добавляют конъюгат белка А/пероксидазы хрена в рекомендованном или предварительно определенном путем титрования разведении (обычно 1/1000) в блокирующем буфере ко всем полоскам с антигеном. Инкубируют при 37°C в течение 45 мин при постоянном помешивании. Промывают четыре раза в блокирующем буфере, последнюю промывку проводят в течение 5 мин при постоянном помешивании.
- v) Готовят раствор субстрата, добавляют к полоскам с антигеном и инкубируют при комнатной температуре в течение 5–15 мин при постоянном помешивании.
- vi) Реакцию останавливают с помощью дистиллированной воды, когда полосы белков становятся достаточно темными.
- vii) *Интерпретация результатов:* положительные сыворотки реагируют более чем с одним вирусным белком на полоске с антигеном; они должны давать сходный белковый профиль и такую же интенсивность цвета, что и полоски с антигеном, окрашенные сывороткой положительного контроля.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

В настоящее время вакцина против АЧС отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

AGÜERO M., FERNÁNDEZ J., ROMERO L., SANCHEZ C., ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2003). Highly sensitive PCR assay for the routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples, *J. Clin. Microbiol.*, **41** (9), 4431–4434.

AGÜERO M., FERNÁNDEZ J., ROMERO L., ZAMORA M.J., SANCHEZ C., BELÁK S., ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2004). A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever. *Vet. Res.*, **35**, 1–13.

ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2002a). African swine fever. *In: Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, Iowa State University press, pp 119–124. ISBN 0813803837.

ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2002b). African swine fever eradication: the Spanish model. *In: Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, Iowa State University Press, pp 133–139. ISBN 0813803837.

BASTO A.P., PORTUGAL R.S., NIX R.J., CARTAXEIRO C., BOINAS F., DIXON L.K., LEITAO A. & MARTINS C. (2006). Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*. *Arch. Virol.*, **151** (4), 819–826.

BLASCO R., AGÜERO M., ALMENDRAL J.M. & VIÑUELA E. (1989). Variable and constant region in African swine fever virus DNA. *Virology*, **168**, 330–338.

- BOOL P.H., ORDAS A. & SANCHEZ BOTIJA C. (1969). El diagnostico de la peste porcina africana por inmunofluorescencia. (The diagnosis of African swine fever by immunofluorescence). *Bull. OIE*, **72**, 819–839.
- BOSHOFF C.I., BASTOS A.D., GERBER L.J. & VOSLOO W. (2007). Genetic characterisation of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973–1999). *Vet. Microbiol.*, **121** (1–2), 45–55.
- CARRILLO C., BORCA M.V., AFONSO C.L., ONISK D.V. & ROCK D.L. (1994). Long-term persistent infection of swine monocytes/macrophages with African swine fever virus. *J. Virol.*, **68**, 580–583.
- CHAPMAN D.A., TCHEREPANOV V., UPTON C. & DIXON L.K. (2008). Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J. Gen. Virol.*, **89**, 397–408.
- DEVILLIER E.P., GALLARDO C., ARIAS M., DA SILVA M., UPTON C., MARTIN R. & BISHOP R.P. (2010). Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virol.*, **400** (1), 128–136.
- DIXON L.K., ESCRIBANO J.M., MARTINS C., ROCK D.L., SALAS M.L. & WILKINSON P.J. (2005). In: *Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J, Desselberger U. & Ball L.A., eds. Elsevier/Academic Press, London, UK. 135–143.
- ESCRIBANO J.M., PASTOR M.J., ARIAS M. & SANCHEZ VIZCAINO J.M. (1990). Confirmación de sueros positivos a ELISA- peste porcina africana, mediante la técnica de ‘Immunoblotting’. Utilización de las proteínas inducidas por el virus con pesos moleculares comprendidos entre 23 y 35 kilodaltons, en el desarrollo de un ‘kit’ de diagnóstico. (Confirmation of sera positive by ASF ELISA with the immunoblotting technique. Use of virus-induced proteins of 23–25 kDa in the development of a diagnostic kit.) *Med. Vet.*, **7**, 135–141.
- ESCRIBANO J.M., PASTOR M.J. & SANCHEZ VIZCAINO J.M. (1989). Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false positive reactions in the sero diagnosis of African swine fever. *Am. J. Vet. Res.*, **50**, 1118–1122.
- FERNÁNDEZ-PINERO J., GALLARDO C., ELIZALDE M., RASMUSSEN T.B., STAHL K., LOEFFEN W., BLOME S., BATTEN C., CROOKE H., LE POTIER M.F., UTTENTHAL Å., LEBLANC N., ALBINA E., KOWALCZYK A., MARKOWSKA-DANIEL I., TIGNON M., DE MIA G.M., GIAMMARIOLI M., ARIAS M. & HOFFMANN B. (2010). EPIZONE ring trial on ASFV real-time PCR. Annual Meeting of National African Swine Fever Laboratories, 18 May 2010, Pulawy, Poland.
- GALLARDO C., BLANCO E., RODRÍGUEZ M.J., CARRASCOSA A. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (2006). Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells. *J. Clin. Microbiol.*, **44** (3), 1489–1495.
- GALLARDO C., MWAENGO D.M., MACHARIA J.M., ARIAS M., TARACHA E.A., SOLER A., OKOTH E., MARTÍN E., KASITI J. & BISHOP R.P. (2009). Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes*, **38** (1), 85–95.

GALLARDO C., SOLER A., SIMÓN A., MARTÍN E., MARTÍN R., PELAYO V., OKOTH E., BISHOP R., SÁNCHEZ M.A., DE MIA G., FASINA F.O., SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. & ARIAS M. (2010). African Swine Fever Threat: Evaluating diagnostic tools with ASFV circulating strains. Annual Meeting of National African Swine Fever Laboratories, 18 May 2010, Pulawy, Poland.

KING D.P., REID S.M., HUTCHINGS G.H., GRIERSON S.S., WILKINSON P.J., DIXON L.K., BASTOS A.D.S. & DREW T.W. (2003). Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Methods*, **107**, 53–61.

LUBISI B.A., BASTOS A.D., DWARKA R.M. & VOSLOO W. (2005). Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa. *Arch Virol.*, **150** (12), 2439–2452.

MALMQUIST W.A. & HAY D. (1960). Haemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am. J. Vet. Res.*, **21**, 104–108.

PAN I.C., TRAUTMAN R., HESS W.R., DE BOER C.J., TESSLER J., ORDAS A., SANCHEZ BOTIJA C., OVEJERO J. & SANCHEZ M.C. (1974). African swine fever: comparison of four sero tests on porcine serums in Spain. *Am. J. Vet. Res.*, **35**, 787–790.

PASTOR M.J., ARIAS M. & ESCRIBANO J.M. (1990). Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody. *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 1540–1543.

PASTOR M.J., LAVIADA M.D., SANCHEZ VIZCAINO J.M. & ESCRIBANO J.M. (1989). Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay. *Can. J. Vet. Res.*, **53**, 105–107.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (1987). African swine fever diagnosis. *In: African Swine Fever*, Becker Y., ed. Martinus Nijhoff, Boston, USA, 63–71.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2006). African swine fever. *In: Diseases of Swine*, Ninth Edition, Straw B., D'Allaire S., Mengeling W., Taylor D., eds. Iowa State University, USA, pp. 291–298.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M., CROWTHER J.R. & WARDLEY R.C. (1983). A collaborative study on the use of the ELISA in the diagnosis of African swine fever. *In: African Swine Fever*. (CEC/FAO Research Seminar, Sardinia, Sept. 1981). Wilkinson P.J., ed. Commission of the European Communities Publication EUR 8466 EN, 297–325.

SANCHEZ-VIZCAINO J.M., MARTINEZ-LOPEZ B., MARTINEZ-AVILES M., MARTINS C., BOINAS B., VIAL L., MICHAUD V., JORI F., ETTER E., ALBINA E. & ROGER F. (2009). Scientific Review on African Swine Fever. CFP/EFSA/AHAW/2007/02, pp: 1–141.

VINUELA E. (1985). African swine fever. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **116**, 151–170.

WARDLEY R.C., ABU ELZEIN E.M.E., CROWTHER J.R. & WILKINSON P.J. (1979). A solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of African swine fever antigen and antibody. *J. Hyg.*, **83**, 363–369.

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по диагностике африканской чумы свиней (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения более подробной информации, касающейся тестов и реагентов для диагностики африканской чумы свиней, просим Вас обращаться в Референтные лаборатории МЭБ.