

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

UDC 619:616.98:578.842.1:577.2

**РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ В ИЗУЧЕНИИ  
АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**

**RECOMBINANT PROTEINS IN  
INVESTIGATION OF AFRICAN SWINE  
FEVER**

Казакова Анна Сергеевна  
аспирант

Kazakova Anna Sergeevna  
postgraduate student

Южук Татьяна Эммануиловна  
к.б.н.

Yuzhuk Tatyana Emmanuilovna  
Cand.Biol.Sci.

Калантаенко Юрий Федорович  
к.в.н.

Kalantaenko Yuriy Fedorovich  
Cand.Vet.Sci.

Лыска Валентина Маркеловна  
к.б.н.

Lyska Valentina Markelovna  
Cand.Biol.Sci.

Власова Наталья Никифоровна  
д.б.н.

Vlasova Natalia Nikiforovna  
Dr.Sci.Biol.

*Государственное научное учреждение  
Всероссийский научно-исследовательский  
институт ветеринарной вирусологии и  
микробиологии Российской академии  
сельскохозяйственных наук, г.Покров, Россия*

*State Research Institution National Research Institute  
for Veterinary Virology and Microbiology of Russian  
Academy for Agricultural Sciences, Pokrov, Russia*

Статья посвящена анализу эффективности применения рекомбинантных белков р30 и р72 вируса африканской чумы свиней (АЧС) при исследовании антителообразования при различных формах течения болезни, а также уровня антител к вирусу АЧС в сыворотках крови животных при остром и хроническом течении болезни методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (непрямого ТФ ИФА)

This article describes performance analysis of using African swine fever virus (ASFV) recombinant protein p30 and p72 in indirect solid-phase Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for investigation of antibodies formation by research of their level against African swine fever virus in porcine serum under the acute and chronicle process of disease

Ключевые слова: АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ, РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ, P30, P72, ИФА, АНТИТЕЛА

Keywords: AFRICAN SWINE FEVER, RECOMBINANT PROTEINS, P30, P72, ELISA, ANTIBODIES

**Введение**

Африканская чума свиней (АЧС) – вирусная болезнь, характеризующаяся высокой летальностью и контагиозностью, сверхострым, подострым, острым и хроническим течением. В 2000 г. возбудитель отнесен к семейству *Asfarviridae* [13].

При репродукции в альвеолярных макрофагах свиньи высоковирулентного изолята Е70 синтезируется 57 кислых и 43 основных вирусспецифических белков [21].

Белок р72 является основным структурным компонентом капсида

<http://ej.kubagro.ru/2011/03/pdf/15.pdf>

вириона и мажорным белком вируса АЧС, который продуцируется на поздних стадиях инфекции [4, 12]. Исследованиями ультраструктуры вириона, проведенными Ramon Garcia-Escudero et al. в 1998 г., была определена точная локализация р72 в поверхностной структуре вириона - между двумя слоями липопротеидной оболочки во внеклеточных вирусных частицах [14].

Антитела к р72 и р54 ингибируют первый этап вирусного репликативного цикла, связанного с прикреплением вируса, в то время как антитела к р30 ингибируют интернализацию вируса в клетку [16].

Белок р30 также входит в состав внутренней мембраны вирусной частицы и по структуре представляет собой фосфопротеин [7]. По данным Gomez-Puertas et al. (1998), совместное введение белков р30 и р54 вызывает образование протективных антител у животных. При экспериментальном заражении вирулентным вирусом АЧС штамма Е75 иммунизированных рекомбинантными белками свиней, наблюдались либо задержка течения инфекционного процесса, либо полное прекращение развития инфекции и выздоровление животных [17].

Белки р22, р12 и р54 – трансмембранные: р22 выявляется на плазматической мембране инфицированных клеток на раннем этапе репродукции вируса, а р12 и р54 являются поздними белками [11]. Белок р12 вариабелен, формирует димеры с молекулярной массой 17 кДа и является белком прикрепления [8]. Гликопротеин р54 также обеспечивает прикрепление вируса АЧС к клетке хозяина, молекулярные массы его полипептидной части у различных вирусных изолятов варьируют между 24 и 28 кДа [20].

Полипротеин рр62 является поздним белком, для которого характерен протеолитический процессинг, в результате чего образуются два мажорных структурных белка – р35 и р15 [22].

Перечисленные выше белки являются значимыми при лабораторной диагностике АЧС.

С учетом сложности организации противоэпизоотических мероприятий при возникновении АЧС, лабораторная диагностика данной болезни приобретает первостепенное значение.

Ложноотрицательные результаты в иммунологических реакциях при выявлении антигенов совпадают с пиком титра специфических антител к вирусу АЧС. Sanchez-Botija C. et al. (1977) показали, что иммунные комплексы маскируют вирусные антигены при исследовании проб в реакции прямой иммунофлюоресценции [24].

При проведении скрининга сывороток в ELISA, также возникает проблема появления ложноположительных и ложноотрицательных результатов [6, 9, 10].

Разработанный Vidal M.I. et al. (1997) вариант ТФ ИФА на основе использования рекомбинантного рр62 позволяет по наличию антител выявить контактировавших или персистентно инфицированных вирусом свиней и обладает высокой чувствительностью. С его помощью конкурентным методом выявляется наличие иммуноглобулинов к вирусу АЧС даже в образцах с низким титром специфических антител [25].

**Целью** настоящих исследований являлось конструирование продуцентов рекомбинантных белков р30 и р72 и анализ эффективности их применения при исследовании уровня антител к вирусу АЧС в сыворотках крови животных, как при остром, так и при хроническом течении болезни методом непрямого ТФ ИФА.

### **Материалы и методы**

В работе использовали:

- авирулентный штамм вируса АЧС 691/88, адаптированный к репродукции в перевиваемой культуре клеток CV-1;
- низковирулентный штамм вируса АЧС PSA-1-NH;

- высоковирулентные изоляты вируса АЧС: Армения 2007, Чечня 11/07, Краснодар 01/08, Эльбрус 01/08, Ставрополь 03/08, Оренбург 01/09, Ростов 02/09;
- ДНК вируса АЧС вирулентного штамма Magadi;
- клетки *E.coli* штамма *BL21(DE3)pLysS*;
- интактную перевиваемую культуру клеток почки зеленой мартышки CV-1;
- сыворотки крови свиней, полученные в ходе опыта лаборатории Диагностики ГНУ ВНИИВВиМ по экспериментальному заражению подсвинков низковирулентным штаммом вируса АЧС;
- пробы крови и селезенки свиней, зараженных высоковирулентными изолятами вируса АЧС.

#### ***Приготовление лизата клеток *E.coli* рекомбинантных клонов***

Для приготовления лизата клеток рекомбинантных клонов *E.coli*, экспрессирующих р30, проводили осаждение бактериальной массы центрифугированием при 750-1000 g в течение 40 мин при 4 °С. К осадку добавляли ТЕ-буфер рН 7,2-7,4 из расчета на 100 мг осадка 1 мл буфера с добавлением ингибитора протеаз Pefablock SC (Roche) в концентрации 0,25 мг/мл. Клетки разрушали 3х-кратным замораживанием-оттаиванием и 6-кратным озвучиванием по 15 сек при частоте 18 кГц.

Аналогично готовили лизат клеток рекомбинантного клона *E.coli*, экспрессирующего р72, но вместо ТЕ-буфера использовали фосфатный буфер с 300 мМ NaCl, 8 М мочевины, рН 8,0.

Лизаты осветляли центрифугированием при 1500-2000 g в течение 15 мин. Надосадки фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Далее проводили очистку рекомбинантных белков методом аффинной хроматографии.

### ***Очистка рекомбинантных белков***

Поскольку в плазмиде pTT9/ASFVp30 имеется ген CBD, кодирующий в структуре рекомбинантного белка целлюлозо-связывающий домен, который обеспечивает сорбцию рекомбинантного белка на целлюлозе, то для очистки рекомбинантного белка p30 использовали колонки фирмы LKB Producter с целлюлозным сорбентом - микрокристаллической целлюлозой марки Avicel (MERCK).

Рекомбинантный белок p72 экспрессируется в рЕТ-системе в форме сплит-белка с гистидиновым окончанием. Поэтому для его очистки использовали метод металлохелатной аффинной хроматографии на колонке с никелевым сорбентом HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma) (неопубликованные данные).

Сконструированные продуценты рекомбинантных белков p30 и p72 вируса АЧС позволили получать их очищенные препараты, которые в дальнейшем были использованы для выявления антител к вирусу АЧС в сыворотках крови животных при остром и хроническом течении болезни методом непрямого ТФ ИФА.

### ***Компоненты для постановки непрямого варианта ТФ ИФА на основе рекомбинантных белков***

Для проведения непрямого ТФ ИФА использовали планшеты полистироловые 96-луночные стрипованные для ИФА Maxi binding (фирма SPL Life science), сенсibilизированные:

- рекомбинантным хроматографически очищенным белком p30, клон 11;
- рекомбинантным хроматографически очищенным белком p72, клон 2/12;
- смесью рекомбинантных белков p30 и p72 (1:1);
- специфическим культуральным антигеном вируса АЧС из штамма 691/88;

– нормальным антигеном (отрицательный контроль) из суспензии клеток *E.coli* штамма *BL21(DE3)pLysS*;

– нормальным культуральным антигеном (отрицательный контроль), полученным из лизата перевиваемой культуры клеток CV-1.

Для постановки непрямого ТФ ИФА с рекомбинантными антигенами р30 и р72 использовали полученные в лаборатории Музейных штаммов ГНУ ВНИИВВиМ референс-сыворотки к штамму Л-57 вируса АЧС I-го серотипа, К-73 - II-го серотипа, М-78 - III-го серотипа и Ф-32 - IV-го серотипа [1, 2]; сыворотки крови от подсвинков, зараженных низковирулентным штаммом PSA-1-NH вируса АЧС; сыворотки крови свиней к вирусам болезни Тешена, классической чумы свиней (КЧС), репродуктивно-респираторному синдрому свиней (PPCC), болезни Ауески и гриппа свиней. В качестве отрицательного контроля использовали смесь сывороток крови от невакцинированных свиней.

Все исследуемые сыворотки были инактивированы β-пропиолактоном в конечной концентрации 0,01 % в течение 24 часов при температуре +37 °С с последующим контролем полноты инактивации в течение трех последовательных пассажей на перевиваемой культуре клеток CV-1.

При постановке непрямого ТФ ИФА использовали сенсibiliзирующие буферы: забуференный физиологический раствор, рН 7,0-7,2 (ЗФР) и фосфатный буферный раствор (ФБР) с 2М мочевины, рН 8,0. Отмывочный раствор – ФБР с 0,05 % твина-20, рН 7,2-7,4 (ФБР-т); блокирующий буфер – казеин-трис-мертиолятный буфер с 0,05 % твина-20, рН 7,2-7,4 (КТМБ-т); буфер для разведения сывороток и конъюгатов – раствор фосфатно-буферный с 0,05 % твин-20 и 1 % бычьего сывороточного альбумина, рН 7,2-7,4 (ФБР-т-БСА); 0,05 М цитратный

буферный раствор (ЦБР) с 0,005 % перекиси водорода и с 0,4 мМ раствора хромогенного субстрата (диаммониевая соль 2,2-азинобис (3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты), рН 4,2-4,5. В качестве антивидового конъюгата использовали конъюгат протеина А с пероксидазой хрена.

Учет реакции осуществляли фотометрически при длине волны 405 нм с использованием прибора для измерения оптической плотности растворов в лунках микропанелей Multiskan MCC/340 P. Реакцию считали положительной, если показания оптической плотности (ОП<sub>405</sub>) в лунках с исследуемым материалом превышало в 2,1 и более раз показания ОП<sub>405</sub> в контрольных лунках.

### **Результаты исследований**

#### ***Конструирование продуцентов рекомбинантных белков р30 и р72 вируса АЧС***

Конструирование рекомбинантной плазмиды рТТ9/ASFVp30 с геном белка р30 вируса АЧС подробно описано в работе Копытова В.О. [5]. Для повышения уровня экспрессии рекомбинантного белка р30 ДНК указанной плазмиды трансформировали компетентные клетки *E.coli* штамма *BL21(DE3)pLysS* (Promega) [3]. Клетки этого штамма обладают свойством в присутствии индуктора (IPTG) преимущественно экспрессировать рекомбинантные белки и в минимальном количестве собственные белки.

Продуцент рекомбинантного р72 был получен посредством направленного клонирования ПЦР-продукта гена В646L, кодирующего белок р72 вируса АЧС штамма Magadi в плазмиде рЕТ23b+ (Novagen) [3]. Затем плазмидой полученного рекомбинантного клона трансформировали компетентные клетки *E.coli* штамма *BL21(DE3)pLysS*.

Экспрессию рекомбинантных белков осуществляли в среде SOB, pH 7,5-8,0 с добавлением 100 мкг/мл ампициллина, 20мМ MgCl<sub>2</sub> и 1,0 мМ IPTG. Для наращивания бактериальной культуры клона 11, экспрессирующего р30, в питательную среду вносили дополнительно 50 мкг/мл канамицина. Индукцию проводили в течение 4 часов при температуре 28,0±0,5 °С (для клона 11) и при температуре 33,0±0,5 °С (для клона 2/12).

***Постановка непрямого ТФ ИФА на основе рекомбинантных белков р30 и р72***

При подборе основных параметров сенсibilизации планшет было экспериментально установлено, что оптимальным условием сорбции рекомбинантного белка р30 является сенсibilизация на ЗФР с pH 7,0-7,2 в течение 2 часов при температуре 37 °С или в течение 15 часов при 4 °С в дозе 100-150 нг на лунку, а рекомбинантного белка р72 – сенсibilизация на ФБР с 2М мочевины с pH 8,0 в течение 4 часов при температуре 37 °С или в течение 15 часов при 4 °С, в дозе 250-300 нг на лунку. При сенсibilизации планшет смесью р30 и р72 использовали оптимально подобранное соотношение 1:1 (по 150 нг каждого белка на лунку). Специфический культуральный антиген АЧС сенсibilизировали на ЗФР с pH 7,0-7,2 в течение 15 часов при 4 °С в дозе 750 нг на лунку.

С целью определения чувствительности метода непрямого ТФ ИФА на основе рекомбинантных белков вируса АЧС для выявления антител планшеты сенсibilизировали различными препаратами антигенов. На подготовленных планшетах проводили титрование специфических к вирусу АЧС и контрольных сывороток.

Результаты исследований представлены в таблице 1.



Таблица 1 - ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ В РЕФЕРЕНС-СЫВОРОТКАХ К ВИРУСУ АЧС МЕТОДОМ НЕПРЯМОГО ТФ ИФА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ АНТИГЕНОВ

Характеристика сыворотки		Титры антител специфических сывороток при исследовании их с различными антигенами			
Наименование	Титр в РЗГАд	p30	p72	Смесь p30 и p72	Специфический культуральный антиген АЧС
Специфическая сыворотка крови свиньи к вирусу АЧС I серотипа	1:80	1:4000	1:2000	1: 4000	1:2000
Специфическая сыворотка крови свиньи к вирусу АЧС II серотипа	1:240	1:8000	1:4000	1:16000	1:4000
Специфическая сыворотка крови свиньи к вирусу АЧС III серотипа	1:320	1:16000	1:16000	1:32000	1:8000
Специфическая сыворотка крови свиньи к вирусу АЧС IV серотипа	1:320	1:32000	1:4000	1:32000	1:4000
Сыворотка свиньи к вирусу КЧС	Титр специфических АТ <sup>1</sup> к вирусу КЧС в РН 1:64	0	0	0	0
Сыворотка свиньи к вирусу болезни Ауески	Титр специфич. АТ к вирусу болезни Ауески в РН 1:32	0	0	0	0
Сыворотка свиньи к вирусу болезни Тешена	Титр специфич. АТ к вирусу болезни Тешена в РН 1:256	0	0	0	0
Сыворотка свиньи к вирусу РРСС	Титр специфич. АТ к вирусу РРСС в РН 1:64	0	0	0	0
Нормальная сыворотка крови свиней	0	0	0	0	0

<sup>1</sup> АТ – специфические антитела к вирусу

Таким образом, испытания рекомбинантных белков р30 и р72 в качестве диагностических антигенов показали их специфичность при выявлении антител в референс-сыворотках крови свиней к вирусу АЧС I, II, III, IV серотипов.

Для изучения начальных этапов процесса антителообразования у свиней, инфицированных высоковирулентными изолятами вируса АЧС, проводили парентеральное заражение подсвинков в дозе 1000 ГАЕ<sub>50</sub>/на голову. Затем отбирали кровь на 5-10 сутки после заражения и селезенку от павших животных и исследовали наличие антител к белкам р72 и р30 вируса АЧС методом непрямого ТФ ИФА. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 - ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ В ПРОБАХ КРОВИ И СЕЛЕЗЕНКИ СВИНЕЙ, ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ АЧС ВЫСОКОВИРУЛЕНТНЫХ ИЗОЛЯТОВ, МЕТОДОМ НЕПРЯМОГО ТФ ИФА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Изолят вируса АЧС	Исследуемый материал <sup>2</sup>	Титры антигена АЧС в исследуемом материале	Титры антител в пробах крови и органов при их исследовании со смесью р30 и р72
Армения 2007	Кровь свиньи (10-е сут. п/з <sup>3</sup> )	1:10	1:160
Армения 2007	Селезенка свиньи (10-е сут. п/з)	1:20	1:10
Чечня 11/07	Селезенка дикого кабана (10-е сут. п/з)	1:80	1:80
Краснодар 01/08	Кровь свиньи (7-е сут. п/з)	1:20	1:40
Эльбрус 01/08	Кровь свиньи (7-е сут. п/з)	1:10	1:10

<sup>2</sup> пробы органов и цельная кровь взяты от одного и того же животного

<sup>3</sup> п/з – после заражения

Эльбрус 01/08	Селезенка свиньи (7-е сут. п/з)	1:80	1:80
Ставрополь 03/08	Кровь свиньи (5-е сут. п/з)	1:10	0
Ставрополь 03/08	Селезенка свиньи (5-е сут. п/з)	1:40	1:10
Оренбург 01/09	Кровь свиньи (5-е сут. п/з)	1:40	0
Оренбург 01/09	Селезенка свиньи (5-е сут. п/з)	1:20	1:20
Ростов 02/09	Селезенка свиньи (6-е сут. п/з)	1:40	1:40

Как видно из данных таблицы 2, использование смеси рекомбинантных белков р30 и р72 позволяет установить наличие антител при остром течении инфекции уже на 5-е сутки в пробах селезенки и на 7-е сутки в пробах крови. Кроме того, обращает на себя внимание тот факт, что высокий уровень антител в селезенке характерен для начальной стадии инфекционного процесса 5-7-е сутки (пробы Ростов 02/09 и Эльбрус 01/08), когда уровень антигена в селезенке достигает значений титра – 1:40-1:80. На более поздних стадиях инфекционного процесса, т.е. на 10-е сутки начинает возрастать уровень антител в крови, при снижении такового в селезенке (пробы Армения 2007), а титры антигена в крови невысоки - 1:10-1:20. В отличие от проб крови, в пробах селезенки определяются высокие титры антител -1:80 даже при наличии аналогичных значений (1:80) титров антигена (пробы Чечня 11/07 и Эльбрус 01/08). Следовательно, одномоментное присутствие антител и антигена вируса АЧС в крови ведет либо к связыванию данных компонентов в комплексы, либо к их маскированию и получению заниженных значений их титров.

Для изучения начальных этапов процесса антителообразования у животных с хроническим течением болезни использовали сыворотки крови свиней, зараженных низковирулентным штаммом вируса АЧС, <http://ej.kubagro.ru/2011/03/pdf/15.pdf>

любезно предоставленные сотрудниками лаборатории Диагностики ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии и проверенные совместно с Беляниным С.А. Исследовали наличие антител к белкам р72 и р30 вируса АЧС методом непрямого ТФ ИФА. Данные представлены в таблице 3.

**Таблица 3 - ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ СВИНЕЙ, ЗАРАЖЕННЫХ НИЗКОВИРУЛЕНТНЫМ ВИРУСОМ АЧС, МЕТОДОМ НЕПРЯМОГО ТФ ИФА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ АНТИГЕНОВ**

Наименование проб		Титры антител специфических сывороток при исследовании их с различными антигенами			
		р30	р72	Смесь антигенов р30 и р72	Специфический культуральный антиген
Сыворотка крови свиньи №1	5 сутки	0	0	0	0
	7 сутки	0 <sup>4</sup>	1:40	0	1:40
	10 сутки	1:80	1:80	1:320	1:320
	15 сутки	1:5120	1:40	>1:5120	1:640
Сыворотка крови свиньи №2	5 сутки	0	0	0	0
	7 сутки	1:20	0	1:40	1:20
	10 сутки	1:640	1:20	1:1280	1:640
	15 сутки	>1:5120	1:20	>1:10240	1:1280
Сыворотка крови свиньи №5	5 сутки	0	0	0	0
	7 сутки	0	0	0	0
	10 сутки	1:320	1:20	1:1280	1:320
	15 сутки	1:1280	1:40	>1:10240	1:160

<sup>4</sup> Знаком 0 обозначено отсутствие выявления вирусспецифических антител

Из данных, приведенных в таблице 3, следует, что использование рекомбинантного р30 и смеси его с рекомбинантным р72 увеличивало чувствительность реакции в 4-8 раз по сравнению с рекомбинантным р72 отдельно и по сравнению с использованием специфического культурального антигена.

Следовательно, для анализа сывороток на наличие специфических антител к вирусу АЧС использование смеси рекомбинантных белков р30 и р72 позволяет повысить чувствительность и специфичность метода непрямого ТФ ИФА. Кроме того, следует отметить, что при низких разведениях исследуемых сывороток (в пределах 1:10 -1:40) показатели оптической плотности при длине волны 405 нм (ОП<sub>405</sub>) не превышали 0,1, в то время как использованный специфический антиген давал аналогичные показатели только при разведении анализируемых сывороток в 50 и более раз.

### **Обсуждение**

Зарубежная практика диагностических исследований сывороток на наличие специфических антител к вирусу АЧС доказала эффективность и целесообразность использования рекомбинантных белков. Технология получения рекомбинантных антигенов даёт много преимуществ по сравнению с методами, базирующимися на получении антигена из экстракта инфицированных клеток:

- 1) исключается использование живого вируса для получения антигена;
- 2) отпадает необходимость инаktivации вируса, что сохраняет нативными конформационные эпитопы антигена;
- 3) позволяет стандартизировать антиген, что значительно облегчает интерпретацию полученных результатов исследований.

Многие производители уже осуществили переход на альтернативные источники антигенов, в том числе и для вируса африканской чумы свиней.

Gallardo C. et al. (2006) с использованием четырех рекомбинантных антигенов показали соответствие выявления IgM антительного ответа у недавно (3-5суток) инфицированных животных. При титровании сывороток с использованием рекомбинантных антигенов было установлено, что уровень антител к рр62 был выше в 2-8 раз, чем к р30 и р54. Однако данный факт может являться следствием наличия большего количества экспонированных эпитопов у рр62, чем у р30 и р54. При валидации ELISA с рекомбинантными антигенами были тестированы 425 полевых сывороток. Результаты с использованием рекомбинантного рр62 как антигена в ELISA показали 99 % специфичность метода, в то время как применение р30 and р54 – только 97 % [15].

В работе Ana Luisa Reis et al. (2007) для определения корреляции между антительным ответом и патогенезом развития АЧС у животных с асимптоматическим и хроническим течением инфекции было проведено сравнение уровней IgG в сыворотке крови к двенадцати рекомбинантным белкам вируса АЧС. Было продемонстрировано, что для белков NP419L/DNAIlgase, CP312R, B646L/p73, K196R/thymidine kinase и K205R, титры антител значительно выше у животных с прогрессирующими клиническими признаками, чем при инаппарантном течении инфекции [19].

Для диагностики вирусных болезней животных на настоящий момент в Российской Федерации разработаны тест-системы на основе рекомбинантных антигенов для таких особо опасных инфекций, как КЧС, РРСС и некоторые другие. В нашем институте разработаны «Набор диагностикумов для твердофазного иммуноферментного анализа при болезни свиней» (Цыбанова Л.Я., 1985), «Набор диагностикумов для твердофазного иммуноферментного анализа при африканской чуме свиней» и экспериментальный образец набора на основе рекомбинантного белка р30 «Набор диагностических препаратов на основе рекомбинантного

антигена вируса африканской чумы свиней для ТФ ИФА» (Копытов В.О., 2004).

Результаты представленного исследования также показали, что в организме больных животных, зараженных вирусом АЧС, антитела к р72 - основному структурному белку вируса, появляются раньше, чем антитела к р30. Данный факт объясняется особенностями строения вируса АЧС: в структуре вириона р30 всего 1-3 %, в то время как доля р72- основного белка капсида - превышает 10 %. Проведенные нами исследования подтверждают эффективность разработки и применения тест-систем нового поколения на основе использования рекомбинантных белков для изучения АЧС, ее диагностики и мониторинговых исследований.

Можно предложить использовать данный подход для выявления хронически инфицированных животных в дикой природе и контролировать возможные источники инфекции [18, 23, 26], т.к. в ходе исследований использование панели с двумя рекомбинантными белками р30 и р72 позволило выявить различия в уровнях антител при начальных стадиях инфекционного процесса и при переходе его в хроническую форму.

Кроме того, препарат хроматографически очищенного рекомбинантного белка р30 обладал высокой иммуногенной активностью, с его помощью были получены моноспецифические сыворотки, которые нашли свое применение в реакции непрямой иммунофлуоресценции при диагностике АЧС (данные не приведены).

### **Заключение**

В результате исследований были получены рекомбинантные клоны *E.coli*, стабильно экспрессирующие р30 и р72 вируса АЧС. Их использование в ТФ ИФА в 4-8 раз повышает чувствительность метода и позволяет выявлять специфические антитела к вирусу АЧС у животных с 5-7 суток после заражения. Это является важным для установления

источников персистенции вируса АЧС при проведении эпизоотологического мониторинга и обнаружения иммунных животных, устойчивых к повторному заражению, которые являются возможным резервуаром для данного возбудителя в дикой природе.

### **Благодарность**

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам лаборатории Диагностики ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии Куриннову В.В. и Васильеву А.П., предоставившим нам возможность проведения данной работы. Особая благодарность выражается Белянину С.А. за помощь в проведении исследований.

### **Литература**

1. География АЧС и типовая гетерогенность возбудителя болезни / В.М. Балышев, В.А. Книзе, С.Ж. Цыбанов [и др.] // Проблемы инфекционных и инвазионных болезней в животноводстве на современном этапе: тезисы докладов МВА им. К.И. Скрябина. – Москва, 1999. – С. 92-94.
2. Сероиммунологическая классификация природных изолятов вируса африканской чумы свиней / И.Ф. Вишняков, Н.И. Митин, Ю.И. Петров [и др.] // Материалы научно-практической конференции ВНИИВВиМ. – Покров, 1995. – С. 141-143.
3. Гловер, Д. Клонирование ДНК. Методы / Д. Гловер; пер. с англ. П.Л. Иванова, Л.Г. Николаева. – М.: Мир, 1988. – 538 с.
4. Колонцов, А.А. Локализация мажорных полипептидов вируса АЧС и вирусассоциированных ферментов в структуре вирионов / А.А. Колонцов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 1995. - № 3.- С. 34-38.
5. Копытов, В.О. Клонирование и экспрессия генов структурных белков р30 и р72 вируса африканской чумы свиней: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.00.06: защищена 23.12.04 / Копытов Валерий Олегович. - Покров, 2004.
6. Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to an african swine fever virus / C.I. Alcaraz, M. De Diego, M.J. Pastor [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 1990. - № 2. – P. 191-196.
7. Andres, G. Characterization of two african swine fever virus 220-kDa proteins: a precursor of the major structural protein p150 and an oligomer of phosphoprotein p32 / G. Andres, C. Simon-Mateo, E. Vinuela // Virology. - 1993. - № 194. – P. 284-293.
8. Angulo, A. Comparison of the sequence of the gene encoding African swine fever virus attachment protein p12 from field virus isolates and viruses passaged in cell culture / A. Angulo, E. Vinuela, A. Alcami // J. Virol. – 1992. - № 66. – P. 3869-3872.
9. African swine fever diagnosis. Role of the new tests / M. Arias, M. Pastor, J.M. Escribano [et al.] // Proc. Workshop Coordinat. Agricult. Res.- Lisbon. - 1993. - P.185-189.
10. Laboratory diagnosis and disease occurrence in the current african swine fever eradication program in Spain 1989-1991 / S. Bech-Nielsen, M.L. Arias, J. Panadero [et al.] // Prevent. Vet. Med. – 1993. - № 17. – P. 225-234.



11. Camacho, A. Protein p22 of african swine fever virus: an early structural protein that is incorporated into the membrane of infected cells / A. Camacho, E. Vinuela // *Virology*. – 1991. - № 181. – P. 251-257.
12. General morphology and capsid fine structure of african swine fever virus particles / J.L. Carrascosa, J.M. Carazo, A.L. Carrascosa [et al.] // *Virology*. – 1984. - № 132. – P. 160-172.
13. Family Asfarviridae / L.K. Dixon, J.V. Costa, J.M. Escribano [et al.] // *Virus taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. - San Diego: Summers Academic Press, 2000. - P. 159-165.
14. Inducible Gene Expression from African Swine Fever Virus Recombinants: Analysis of the Major Capsid Protein p72 / R.G. Escudero, G. Andres, F. Almazan, E. Vinuela // *J. Virol.* - 1998. – Vol. 72. - № 4. - P. 3185–3195.
15. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells / C. Gallardo, E. Blanco, J.M. Rodriguez [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* - 2006. - Vol. 44, № 3. - P. 950–956.
16. Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization / P. Gomez-Puertas, F. Rodriguez, J.M. Oviedo [et al.] // *J. Virol.* - 1996. - № 70. - P. 5689–5694.
17. The African Swine Fever Virus Proteins p54 and p30 Are Involved in Two Distinct Steps of Virus Attachment and Both Contribute to the Antibody-Mediated Protective Immune Response / P. Gomez-Puertas, F. Rodriguez, J.M. Oviedo [et al.] // *Virology*. - 1998. - № 243. - P. 461–471.
18. Myers, K.M, Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits. III. Observations on two succeeding epizootics in Australian wild rabbits on the Riverine plain of south-eastern Australia, 1951-1963 / K.M. Myers, I.D. Marshall, F. Fenner // *J. Hyg.* - 1954. - Vol. 52. - P. 337.
19. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus / A.L. Reis, R.M.E. Parkhouse, A.R. Penedos [et al.] // *J. Gen. Virol.* - 2007. - № 88. - P. 2426–2434.
20. Characterization and molecular basis of heterogeneity of the african swine fever virus envelope protein p54 / F. Rodriguez, C. Alcaraz, A. Eiras [et al.] // *J. Virol.* – 1994. - № 68. – P. 7244-7252.
21. Rodriguez, J.M. African swine fever virus-induced polypeptides in porcine alveolar macrophages and in Vero cells: two-dimensional gel analysis / J.M. Rodriguez, M.L. Salas, J.F. Santaren // *Proteomics*. - 2001. – Vol. 1, № 11. - P. 1447-1456.
22. Proteolytic processing in African swine fever virus: evidence for a new structural polyprotein, pp62 / C. Simon-Mateo, G. Andres, F. Almazan, E. Vinuela // *J. Virol.* - 1997. - № 71. - P. 5799–5804.
23. Sanchez-Botija, C. Estudio sobre la peste porcina africana en Espana / C. Sanchez-Botija // *Bull. off. internat. epiz.* – 1962. - Vol. 58. - P. 707-727.
24. Sanchez-Botija, C. Laboratory manual for diagnosis on african swine fever C. Sanchez-Botija, A. Ordas // Madrid. - 1977.
25. A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, for the detection of african swine fever virus antigens and antibodies / M.I. Vidal, M. Stiene, J. Henkel [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 1997. – Vol. 66, № 2. – P. 211-218.
26. Williams, R.T. Evidence for the existence of latent myxoma virus in rabbits (*Oryctolagus cuniculus* (L.)) / R.T Williams, J.T. Dunsmore, I. Parer // *Nature*. - 1972. - Vol. 238. - № 5359. - P. 99-101.