

African swine fever (ASF) - distributed devastating viral disease that currently threatens the pigs all over the world. This is one of the most serious animal diseases as causes of high mortality among pigs, socio-economic impacts, and has a tendency to rapid and unexpected spread. The disease belongs to the group of transboundary animal infections defined by FAO as diseases that have a significant impact on the economy, trade and food security of a significant number of countries, can easily spread from one country to another and reach epidemic proportions.

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА

Дубровская О.А., 5 курс факультета ветеринарной медицины
Научный руководитель: к.б.н., м.н.с. Казакова А.С.
ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

Ключевые слова: африканская чума свиней (АЧС), рекомбинантный белок р30, иммуноблоттинг, тест-система.

В статье описано определение диагностической чувствительности и специфичности тест-системы для экспресс-диагностики африканской чумы свиней (АЧС) путем выявления вирусспецифических антител методом иммуноблоттинга с использованием нитроцеллюлозных иммунострипов с иммобилизированным на них полипептидом рекомбинантного белка р30.

Африканская чума свиней (АЧС) – экономически значимая болезнь, характеризующаяся лихорадкой, кровоизлияниями и отеками, неоднозначно выраженными при различных формах ее течения, начиная от сверхострой, со 100% гибелью животных, до субклинической [16, 3]. Домашние свиньи и дикие кабаны восприимчивы к болезни, а бородавочники и кустарниковые свиньи являются пожизненными вирусносителями АЧС [3, 4].

Возбудитель АЧС – цитоплазматический ДНК- содержащий вирус, который в 2000 г. был отнесен к семейству Asfarviridae [12].

С 2007 г. по 2014 г. зарегистрировано 656 вспышек в 36 регионах Российской Федерации (РФ), пали и были вынужденно убиты более 900 тыс. свиней [8]. Болезнь регистрировалась в Грузии, Армении Азербайджане, Иране. В 2012-2014 гг. отмечены заносы АЧС в Белоруссию и Украину из РФ, в 2014 г. – в Литву и Польшу из Белоруссии [1, 2, 7, 9, 10].

В связи с особенностями биологических свойств возбудителя эффективные средства специфической профилактики против АЧС не разработаны, поэтому быстрая лабораторная диагностика имеет решающее значение в борьбе с болезнью [6]. Стратегия борьбы с распространением вируса

АЧС должна основываться на комплексе мероприятий по индентификации возбудителя и предотвращению его распространения.

Согласно рекомендациям МЭБ, подтверждающим тестом на наличие антител в сыворотках крови свиней является иммуноблоттинг (постановка реакции около 2-3 часов), который применяют, в том числе, при нарушении условий хранения проб [13, 14].

Целью данной работы является показать перспективы использования реакции иммуноблоттинга для выявления антител к вирусу АЧС на основе современных рекомбинантных биотехнологий.

В соответствии с поставленной целью работы сформулирована задача исследования, заключающаяся в определении диагностической чувствительности и специфичности разработанной тест-системы при исследовании полевых проб с предпосылкой дальнейшего её внедрения в лабораторную диагностику АЧС.

Материалы и методы. Для определения чувствительности и специфичности разработанной тест-системы проводили исследование 100 полевых образцов, из них 47 проб 20% суспензий селезенки (29 – от кабанов и 18 – от домашних свиней, положительных – 29, отрицательных – 18) и 53 образца сывороток крови (50 – от свиней, 3 – от кабанов, положительных – 40, отрицательных - 13, из них 2 сыворотки от свиней, иммунных к вирусу КЧС).

Также проводили титрование с двухкратным шагом с 1:8 специфических сывороток крови свиней № 1, 2, 3, к аттенуированному вирусу АЧС шт. Ставрополь 01/08 А₄С₂/9к (33 п.), полученных на 3, 7, 15 и 28 сут. после заражения [6].

В качестве положительного контроля реакции (К+) использовали специфическую сыворотку крови свиньи (SS), иммунную к аттенуированному вирусу АЧС шт. Ставрополь 01/08 А₄С₂/9к (24 п.) VIII сероиммунотипа (28 сут. после контрольного заражения) с титром антител (АТ) в РЗГАд 1:320, полученную из коллекции лаборатории «Музейных штаммов» ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, в разведении 1:20 [6]. Отрицательным контролем реакции (К-) являлась сыворотка крови интактного животного (NS) в разведении 1:20.

Постановку реакции иммуноблоттинга осуществляли, основываясь на методике, предложенной J.M. Escribano и E. Tabares (1987) [11]. При учете данных каждый иммунострип сравнивали с отрицательным и положительным контрольными образцами. Реакцию считают положительной и специфичной, если выявляют окрашенную полосу на уровне положительного контроля по центру иммунострипа (на уровне 1,3-1,7 см от верхнего края иммунострипа).

Результаты исследований. При определении специфичности и чувствительности тест-системы установили, что из 100 исследуемых полевых образцов (69 – положительных и 31 – отрицательных) 4 были ложнонегативными и 1 – ложнопозитивным. Результаты статистической обработки показали, что специфичность тест-системы составляет 96,77 %, чувствительность – 94,2%.

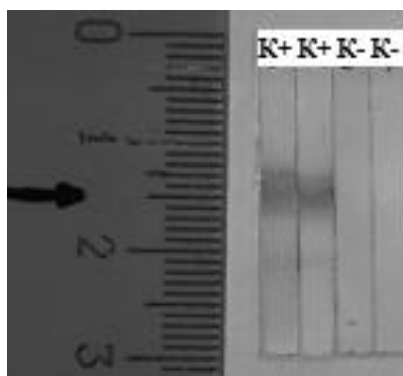


Рис. 1. Специфическое окрашивание иммунострипа (указано стрелкой) в результате взаимодействия рекомбинантного белка р30 вируса АЧС со специфическими антителами положительной контрольной сыворотки крови свиньи, иммунной к вирусу АЧС (SS), и отсутствие окрашивания иммунострипа после инкубирования его с сывороткой крови от интактной свиньи (NS); K⁺ – сыворотка SS, K⁻ – сыворотка NS.

При определении специфичности и чувствительности тест-системы с использованием сывороток крови от экспериментально зараженных подсвинок установлено, что указанные показатели тест-системы приближаются к 100%.

В результате исследований, представленных в таблице, установлена корреляция полученных результатов титрования сывороток в иммуноблоттинге с результатами в РНИФ.

Таблица 1 – Выявление антител к вирусу АЧС в сыворотках крови экспериментально зараженных животных методом иммуноблоттинга с использованием рекомбинантного белка р30

n=3

№ подсвинка	№ п/п образца	Сутки п/и ¹	Титр антител к вирусу АЧС в РНИФ	Титр антител к Rec р30 вируса АЧС методом иммуноблоттинга ²
Подсвинок № 1	2	7-е сут. п/и	1:8-1:16	0-1:8
	5	15-е сут. п/и	1:8-1:16	1:16-1:32
	8	28-е сут. п/и	1:16-1:32	1:32-1:64
Подсвинок № 2	1	3-е сут. п/и	0 ³	0
	3	7-е сут. п/и	0	0-1:8
	6	15-е сут. п/и	1:16-1:32	1:16-1:32
	9	28-е сут. п/и	1:32-1:64	1:32-1:64
Подсвинок № 3	4	7-е сут. п/и	1:4-1:8	1:16-1:32
	7	15-е сут. п/и	1:8-1:16	1:64-1:128
	10	28-е сут. п/и	1:64-1:128	1:128-1:256

Примечание: ¹ п/и – после инфицирования, ² с использованием «Тест-системы для экспресс-диагностики африканской чумы свиней методом иммуноблоттинга с использованием рекомбинантного белка р30», ³ 0 – отсутствие выявления АТ к вирусу АЧС

Обсуждение результатов исследований. В настоящее время рекомбинантные белки широко используются в качестве диагностикумов. Тест-системы на основе рекомбинантных антигенов обладают чувствительностью и

специфичностью приближающимися к 100 %. Кроме того, их применение обеспечивает безопасность проводимых работ. В настоящий момент, утвержденная МЭБ схема лабораторной диагностики включает постановку иммуноблоттинга для подтверждения положительных результатов, определенных в ИФА. Основным компонентом существующей тест-системы для выявления антител к вирусу АЧС методом иммуноблоттинга (референс-лаборатория по АЧС CISA-INIA (Мадрид, Испания)) является вирусспецифический антиген. Разработанная впервые в РФ в рамках представленной НИР тест-система основывается на использовании в качестве антигена рекомбинантного белка р30 вируса АЧС [5], что позволяет исключить работу с «живым» вирусом. По данным D.M. Perez-Filgueira et al. (2006) чувствительность и специфичность метода иммуноблоттинга с использованием рекомбинантного белка р30 составляют 96-100% [15]. Полученные в результате выполнения НИР данные полностью согласуются с данными зарубежных авторов.

Заключение. В результате проведенных исследований определены диагностическая специфичность и чувствительность разработанной «Тест-система для экспресс-диагностики АЧС для выявления антител к вирусу методом иммуноблоттинга с использованием рекомбинантного белка р30». Установлено, что при исследовании полевых проб сывороток крови и селезенок от больных и павших свиней и кабанов специфичность и чувствительность составляют 96,77% и 94,2% соответственно, что дает предпосылки для дальнейшего её усовершенствования и внедрения в лабораторную диагностику.

Библиографический список

1. Африканская чума свиней проникла в Евросоюз (24.01.2014)/ Российская газета [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.rg.ru/2014/01/24/chuma-site-anons.html> - Загл. с экрана.
2. Вспышка африканской чумы свиней в Беларуси (3.04.2014)/ Белорусские новости [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://naviny.by/popular/ic_popular_240_299/ - Загл. с экрана.
3. Казакова, А.С. Конструирование продуцентов рекомбинантных белков р72, р30 и р54 вируса африканской чумы свиней: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.02: защищена 16.05.2013/ Казакова Анна Сергеевна. – Покров, 2013. – 137 с.
4. Козлова, Д.И. Современные проблемы африканской чумы свиней/ Д.И. Козлова, В.А. Бесхлебнов/ ВНИИТЭИСХ. – М., 1980. – 60 с.
5. Пат. 2463343RU 2463343 С1. Штамм клеток E.coli BL21(DE3)pLysS, клон рТТ9/ASFVp30, содержащий рекомбинантную плазмиду со встройкой участка гена CP204L вируса африканской чумы свиней, кодирующего конформационный эпитоп белка р30, пригодный для изготовления диагностических препаратов/ В.О. Копытов, С.Ж. Цыбанов, А.С. Казакова, Т.Э. Южук, С.А. Белянин, А.Г. Гузалова, Н.Н. Власова, Д.В. Колбасов (RU). - № 2011141517/10; заявлено 13.10.2011; опубл. 10.10.2012, Бюл.№28. – 8 с.
6. Прудникова, Е.Ю. Адаптация вируса африканской чумы свиней, выделенного на территории Российской Федерации, к перевиваемым культурам клеток и изучение его биологических свойств: автореферат дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02: защищена 26.12.2013/ Прудникова Елена Юрьевна. – Покров, 2013. – 27 с.
7. Распространение АЧС в Кавказском регионе и странах Восточной Европы (на 31.03.2014)/ Официальный сайт Россельхознадзора [Электронный ресурс]. - Режим

- доступа: http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/foreign/2014/march/asf_foreign_south_04_01.pdf - Загл. с экрана.
8. Россельхознадзор/ Эпизоотическая ситуация/ АЧС (на 31.03.2014)/ Официальный сайт Россельхознадзора [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.fsvps.ru/fsvps/asf/> - Загл. с экрана.
 9. Эпизоотическая ситуация в сопредельных с РФ странах по срочным сообщениям МЭБ (март 2014)/ Официальный сайт Россельхознадзора [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/foreign/2014/march/foreign.pdf> - Загл. с экрана.
 10. African Swine Fever (ASF) recent developments – timely updates / Dietze K., Beltran-Alcrudo D., Khomenko S., Seck B., Pinto J., Diallo A., Lamien C., Lubroth J., Martin V., Rozstalnyu A.// FOCUS ON [Электронный ресурс]. - 2012. - №6. - P.1-6. – Режим доступа: <http://www.fao.org/docrep/016/ap372e/ap372e.pdf>. - Загл. с экрана.
 11. Escribano, J.M. Proteins specified by African swine fever virus V. Identification of immediate early, early and late proteins/ J.M. Escribano, E. Tabares// Arch. Virol. – 1987. – Vol.92. – P.221-238.
 12. Family Asfarviridae/ L.K. Dixon, J.V. Costa, J.M. Escribano, D.L. Rock, E. Vinuela, P.J. Wilkinson/ In: M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carestens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B.F.A. Wickner, C.M. Murphy, D.H.L. Fauquet, S.A. Bishop, A.W. Ghabrial, G.P. Jarvis, M.D. Martelli (eds)// Virus taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. -Summers Academic Press, San Diego, 2000. – P.159-165.
 13. Immunoblotting OIE for Serological Diagnosis of African Swine Fever (SOP/CISA/ASF/IB/1/2008) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://asf-referencelab.info/asf/images/files/SOPs/SOP-AFSIB12008.pdf>. - Загл. с экрана.
 14. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Capter 2.8.1. African swine fever/ Office International des Epizooties [Электронный ресурс]. – Paris, France, 2008. – 6th ed. – Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.08.01_ASF.pdf. - Загл. с экрана.
 15. Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in Trichoplusia ni larvae/ D.M. Perez-Filgueira, F. Gonzalez-Camacho, C. Gallardo [et al.]// J. clin. microbiol. – 2006. – Vol.44, №9. – P.3114–3121.
 16. Pan, I.C. Virulence in African swine fever: its measurement and implications/ I.C. Pan, W.R. Hess// Am J Vet Res. – 1984. – Vol.45, №2. – P.361-366.

DEFINITION OF DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF A TEST-SYSTEM FOR RAPID DIAGNOSIS OF AFRICAN SWINE FEVER BY IMMUNOBLOTTING ASSAY

Dubrovskaya O.A., Kazakova A.S.

Key words: African swine fever (ASF), recombinant protein p30, immunoblotting assay, test system.

The article is devoted to the definition of diagnostic sensitivity and specificity of a test-system for rapid diagnosis of African swine fever (ASF) through the detection of virus-specific antibody by immunoblotting assay with using nitrocellulose immunostrips containing recombinant protein p30 polypeptide immobilized on them.