

*Т.В. Гребенникова*¹, *А.Д. Забережный*¹, *Т.И. Алипер*¹, *О.А. Верховский*³,
*Е.А. Непоклонов*²

ДИАГНОСТИКА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

¹ ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, Москва

² Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору, Москва

³ АНО «НИИ диагностики и профилактики болезней человека и животных», Москва.

В представленном обзоре рассмотрены основные молекулярно-генетические характеристики вируса Африканской чумы свиней (АЧС), а также методы диагностики АЧС и особенности их применения.

Ключевые слова: *африканская чума свиней, АЧС, вирус африканской чумы свиней, диагностика.*

*T.V. Grebennikova*¹, *A.D. Zaberezhny*¹, *T.I. Aliper*¹, *O.A. Verkhovsky*³, *E.A. Nepoklonov*²

DIAGNOSTICS OF AFRICAN SWINE FEVER IN RUSSIAN FEDERATION

¹ D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Russian Ministry of Public Health, Moscow

² Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance, Moscow

³ DPRI Center for Diagnostics and Prevention of Human and Animal Diseases, Moscow

In this review the basic molecular-genetic characteristics of the African swine fever (ASF) virus, as well as methods of diagnosis of ASF and especially their application depending has been considered.

Ключевые слова: *African swine fever, ASF, African swine fever virus, diagnostics.*

Африканская чума свиней (АЧС) – высококонтагиозное вирусное заболевание свиней, характеризующееся высокой летальностью и наносящее огромный экономический ущерб свиноводству. АЧС вызывается ДНК-содержащим вирусом сем. *Asfarviridae*, рода *Asfivirus* [1]. Важнейшей эпизоотологической особенностью АЧС является быстрое изменение форм течения инфекции среди домашних свиней от острого со 100 % летальностью до хронического и бессимптомного носительства и непредсказуемого распространения. В естественных условиях к вирусу АЧС восприимчивы домашние и дикие свиньи всех возрастов. Экономический ущерб, наносимый АЧС, носит социальный и экономический характер и складывается из прямых потерь по тотальной ликвидации болезни, ограничений в международной торговле и измеряется сотнями миллионов долларов [2].

В ряде африканских стран и на итальянском острове Сардиния АЧС сохраняется в виде энзоотии. В России и бывшем СССР АЧС регистрировалась ранее, в 1977 г.. В результате заноса инфекции через порты Одессы были зарегистрированы 3 эпизоотические вспышки заболевания [3].

В 2007 г. АЧС зарегистрирована во всех районах Грузии, в Абхазии, Чечне, Южной и Северной Осетии, Армении. С 2008 г. вспышки АЧС регистрируются на территории Российской Федерации. Несмотря на предпринимаемые меры борьбы эпизоотическая ситуация по АЧС остаётся напряжённой.

В настоящее время нет эффективных способов профилактики и лечения данного заболевания. Ранняя диагностика АЧС максимально значима, поскольку позволяет определить наличие инфекционного агента на начальных этапах развития болезни и выработать оптимальную стратегию её искоренения. Своевременная и эффективная диагностика является важнейшей частью программы по искоренению этой болезни.

В настоящем обзоре рассмотрены основные молекулярно-генетические характеристики вируса АЧС, а также методы диагностики АЧС и особенности их применения.

Вирус АЧС – единственный представитель рода *Asfivirus* сем. *Asfarviridae* [1, 3]. Вирион имеет сложное внутреннее строение и внешнюю оболочку гексагонального сечения со средним размером 200 нм. В её формировании важную роль играет мембранный белок р54. В формировании зрелых инфекционных частиц икосаэдрической формы принимает активное участие трансмембранный белок р17, расположенный на внутренней поверхности оболочки вириона [4]. Геном вируса АЧС представлен двуцепочечной линейной молекулой ДНК, содержащей 170–190 тыс. п.н. в зависимости от штамма. ДНК кодирует более 100 белков. На концах генома расположены

инвертированные повторяющиеся последовательности, центральная часть размером около 125 тыс. п.н. консервативна, концевые области переменны. Консервативные гены сосредоточены в центральной области генома, между позициями 51 915 и 174 351 п.н.. В этой области находятся гены, кодирующие белки репликации ДНК, транскрипции РНК, а также структурные белки, белки модификации и сборки вирусных частиц (рис. 1). Левая переменная область, размером примерно в 55 тыс. п.н., правая – 12 тыс. п.н.. На рис. 1 пики указывают на области повышенной изменчивости генома. Левый и правый концы генома отмечены стрелками. Указаны имена переменных генов и регионов. Видно, что функции некоторых генов вируса АЧС не определены. Есть данные, подтверждающие эволюционную близость вируса АЧС с «гигантским» ДНК-содержащим вирусом HcDNAV, который размножается в океанском планктоне *Heterocapsa circularisquama* [5]. Фрагменты генов вируса АЧС идентичны ряду фрагментов неизвестных геномов, выявленных в сыворотках крови человека и в канализационных стоках, что свидетельствует о возможном существовании родственных вирусов [6]. Белки р72, р54, р30 и р12 обладают ярко выраженными антигенными свойствами и используются для серодиагностики [7]. Вирус АЧС адаптирован к различным перевиваемым клеточным линиям, включая VERO, CV, COS-1 [8–10]. В заражённых свиньях вирус размножается в мононуклеарных клетках и макрофагах [11], в клетках эндотелия [12], ренальных тубулярных эпителиальных клетках [13], гепатоцитах [14], нейтрофилах [15]. Не описано репликации вируса в Т- и В-лимфоцитах [13, 16]. Вирус также размножается в некоторых видах аргасовых клещей: *Ornithodoros moubata*, *Ornithodoros erraticus* и *Ornithodoros porcinus* [17–19].

Свиньи – единственные домашние животные, которые болеют АЧС. Для человека она не опасна. Дикие кабаны демонстрируют те же клинические проявления и уровни смертности, что и домашние свиньи [20, 21]. Африканские дикие свиньи (*Phacochoerus aethiopicus*, *Hylochoerus meinertzhageni*, *Potamochoerus porcus*) переносят инфекцию бессимптомно и являются, как и клещи, природным резервуаром вируса АЧС [22]. Источником возбудителя инфекции являются больные животные и вирусоносители, в особенности дикие и выжившие домашние свиньи, в организме которых вирус сохраняется до 15 мес.. Выявление животных-вирусоносителей серологическими методами весьма важно для программы борьбы с АЧС, оно сыграло важную роль в искоренении инфекции в Испании [23].

Вирус АЧС передаётся ороназальным путём, при всех видах инъекций, а также через укусы клещей [24, 25]. Вирус устойчив в окружающей среде. Его можно выделить из сыворотки крови спустя 18 мес. хранения при комнатной температуре. При 60 °С вирус

инактивируется за 30 мин [26], он чувствителен к дезинфектантам [27]. Вирус месяцами сохраняется в мясных продуктах и неопределённо долго в замороженном мясе [28, 29]. При производстве испанской вяленой свинины из заражённого сырья вирус инактивируется в процессе приготовления по разным данным в течение 112–140 сут. [30].

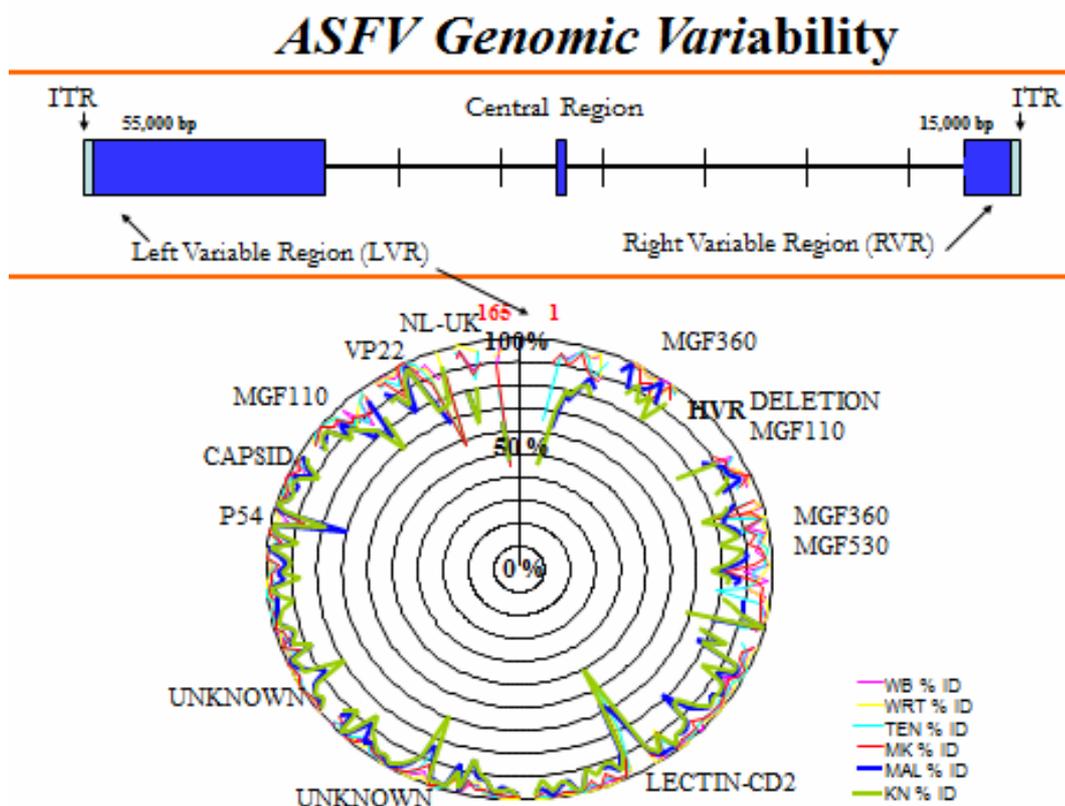


Рисунок 1. Вариабельность генома вируса Африканской чумы свиней (АЧС) (по материалам проф. Daniel Rock, США).

Инкубационный период АЧС длится от 4 до 19 сут.. Первичная репликация происходит в моноцитах и макрофагах в лимфоузлах, ближайших к месту проникновения вируса в организм. Затем вирус распространяется гематогенным и лимфогенным путём в лимфоузлы, костный мозг, селезёнку, лёгкие, печень, почки [21]. Виремия возникает через 4–8 сут. после заражения и продолжается в течение недель или даже месяцев, т.к. вируснейтрализующие антитела отсутствуют. Возникающая лимфопения предположительно связана с апоптозом. Отёк лёгких является главной причиной гибели животных, его связывают с активацией альвеолярных макрофагов [22, 31, 32]. По клиническим проявлениям АЧС зависит от вирулентности штамма, дозы и способа заражения. Болезнь может протекать в сверхострой, острой, подострой, хронической и латентной (бессимптомной) формах.

Вакцина для профилактики АЧС, на сегодняшний день, не разработана. Возможно, это связано с тем, что механизмы иммунного ответа на заражение вирусом АЧС недостаточно изучены. Вирус АЧС обладает выраженной антигенной активностью, вирусоспецифические IgM вырабатываются на 4 сут., а IgG – на 6–8 сут. после заражения [33]. Антитела сохраняются длительное время, их наличие связано с замедлением течения болезни, уменьшением уровня вирусемии, снижением летальности [34, 35]. В ранних экспериментах было показано отсутствие вируснейтрализующих антител, хотя переболевшие АЧС животные сохраняли способность вырабатывать нейтрализующие антитела в ответ на заражение другими патогенами [36].

Описано 22 генотипа вируса АЧС. На рис. 2 представлена дендрограмма, иллюстрирующая филогенетическое родство различных генотипов вируса АЧС. Филогенетическое родство определено методами секвенирования и сравнения первичных последовательностей генов различных полевых изолятов вируса АЧС и референс-штаммов вируса. Исследования по генотипированию, проведенные ранее, показали, что наиболее вероятным источником вируса АЧС для стран Европы, стали страны западного побережья Африки от Анголы на юге до Сенегала на севере [37].

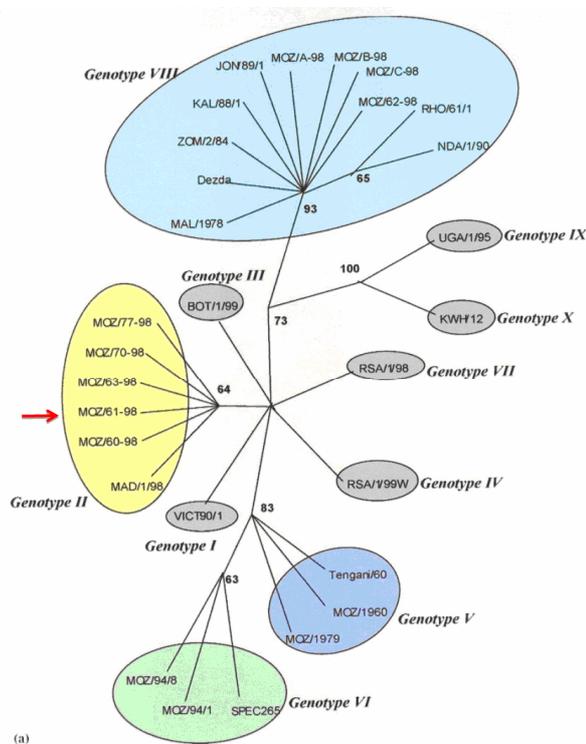


Рисунок 2. Дендрограмма, иллюстрирующая филогенетическое родство различных генотипов вируса Африканской чумы свиней (АЧС). Стрелкой отмечен второй генотип, распространенный в Юго-Восточной Африке (Замбия, Мозамбик, Мадагаскар), Грузии, Армении, Азербайджане и России (любезно предоставлена проф. Trevor Drew, VLA, Великобритания).

В настоящее время, затруднительно назвать первоисточник, давший начало географически чрезвычайно широко представленному 1-му генотипу. Вспышки,

вызванные этим генотипом, охватывают значительный временной промежуток 1959–2000 гг.. Девять генотипов представлены на африканском континенте. Вспышки АЧС, происходившие в 1996–2000 гг. в Западной Африке, были вызваны генетически близкими вирусами, принадлежащими 1-му генотипу, тогда как на Мадагаскаре, Южной Африке и в Ботсване – различными друг от друга генотипами – 2-м, 3-м, 4-м и 7-м, соответственно. В 2010 г. был проведен филогенетический анализ полноразмерных последовательностей генома 11 изолятов вируса АЧС, выделенных в различные годы на африканском континенте. Авторами было установлено, что наиболее вариабельным является левый концевой регион генома вируса АЧС [38]. Кроме того, разделение на генотипы на основе анализа полноразмерного генома позволило распределить исследуемые вирусные изоляты по 5 группам в отличие от 10 групп при анализе последовательности р72 [39].

Вирус, выявленный в Грузии в 2007 г., относится к генотипу II, который циркулирует в Мозамбике, Мадагаскаре и Замбии (рис. 2) [40, 41]. Его геном содержит 189 344 п.н., имеет 166 открытых трансляционных рамок. Проведение филогенетического анализа на базе 125 консервативных цистронов показало наиболее близкое сходство со штаммом Mkuzi 1979 [42]. Калабеков И.М. с соавт. (2010) представили результаты генотипирования 9 изолятов вируса АЧС, выделенных в 2007–2008 гг. при эпизоотических вспышках в Абхазии, Южной Осетии, Армении и различных регионах Российской Федерации на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка гена р72 и полноразмерного гена, кодирующего белок р54 [40].

Очевидно, что филогенетический анализ и молекулярно-генетический анализ близких по структуре генов позволяет изучать связи между вирусами и их распространением в пространстве и времени.

Лабораторное подтверждение АЧС необходимо, т.к. клинические проявления болезни имеют сходство с симптомами классической чумы и целого ряда вирусных и бактериальных болезней. В случае подозрения на АЧС, в лабораторию доставляют следующие образцы: кровь с добавлением антикоагулянта (EDTA), сыворотку, селезёнку, лёгкое, почку, лимфатические узлы. В настоящее время, в ряде стран, включая Россию, разработаны эффективные современные лабораторные методы диагностики АЧС [43–45]. Сегодня имеется много диагностических методов разного типа: вирусологический (выявление вируса и вирусных белков), молекулярный (выявление вирусной ДНК) и серологический (выявление специфических противовирусных антител) (табл. 1). Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) подробно описывает диагностические протоколы OIE 2008, 2010 [46].

Таблица 1. Методы лабораторной диагностики Африканской чумы свиней (АЧС) [46].

Выявление вируса	Характеристики	
Реакция гемадсорбции (РГАд)	Вирус АЧС выделяют на первичных макрофаговых культурах свиней. ВАЧС способен вызывать инфекцию и самореплицироваться естественным путём в культурах лейкоцитов периферийной крови свиней, где он вызывает не только цитопатический эффект в зараженных макрофагах, но и характерный гемадсорбционный эффект (РГАд) и клеточный лизис. Под микроскопом наблюдаются розетки красных кровяных телец, фиксирующихся на лейкоцитах. Техника гемадсорбции остается наиболее специфическим и высокочувствительным методом идентификации ВАЧС, так как ни один из других свиных вирусов такого эффекта не дает. Хотя гемадсорбция требует времени и больших затрат сравнительно с другими методами диагностики (получение результатов требует 5–10 сут.), тем не менее он остается предпочтительной техникой перед другими, более скорыми методами диагностики. Важно отметить, что некоторые штаммы ВАЧС не способны к РГАд. В этом случае для подтверждения присутствия вируса обращаются к дополнительным анализам клеточного осадка посредством ПЦР или иммунофлуоресценции.	Техника РГАд используется в настоящее время только в Референтных лабораториях. РГАд требует 3–10 сут..
Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)	Техника иммунофлуоресценции основывается на выявлении вирусных антигенов в ответ на окрашивание срезов, приготовленных в криостате, или калькирования тканей с анти-АЧС с добавлением флуоресцентного изотиоцината (FITC). Это очень простой, быстрый и чувствительный метод, который также может применяться в случае с клеточными культурами, зараженными пульпой из органов и тканей от подозреваемых на болезнь свиней. Под микроскопом зараженные клетки содержат цитоплазмические включения. При инфекции на продвинутой стадии специфическое свечение может принять зернистый вид. Если инфекция датируется более, чем 10 сут., когда появляются антитела, они могут заблокировать взаимодействие с конъюгатом, что дает ложноотрицательный результат. По этой причине РИФ используют параллельно с исследованиями на выявление антител (непрямая иммунофлуоресценция, ИФА, иммуноблоттинг).	Рекомендуется использовать технику РИФ только тогда, когда отсутствует возможность постановки ПЦР или когда опыт её постановки ещё не наработан. Не следует забывать, что любой отрицательный результат должен подтверждаться, для чего рекомендуется параллельно осуществлять тест на выявление антител. РИФ требует 75 мин.
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	ПЦР – высокочувствительная и специфическая техника, которая позволяет подтвердить присутствие вируса путём амплификации вирусной ДНК, содержащейся в пробе. Техника ПЦР использует затравки, соответствующие хорошо сохраняющемуся участку генома, что позволяет обнаруживать большую часть известных штаммов ВАЧС, как гемадсорбирующих, так и не гемадсорбирующих. Эта техника в настоящее время используется Справочными лабораториями для постановки вирусологического диагноза и подтверждения присутствия АЧС. Она может применяться как к пробам ткани, так и серопробам, взятым у животных с клиническими признаками болезни, поскольку продолжается вирусемия. Таким образом, техника ПЦР может использоваться для выявления присутствия вируса в крови со второго дня инфекции и до нескольких недель.	В настоящее время ПЦР – широко используемая техника для целей этиологической диагностики, однако она требует хорошей подготовленности лабораторных специалистов. ПЦР требует от 5 до 6 ч.
Иммуноферментный анализ (ИФА)	Для диагностики АЧС также были адаптированы такие методы, как сэндвич-ИФА (sandwich ELISA) и иммуноблоттинг. Однако они используются реже, так как, несмотря на свою повышенную чувствительность на ранней стадии инфекции, она сильно падает через 9–10 сут. после начала инфекции. Это объясняется тем, что происходит блокировка антителами, как то было указано выше в случае с РИФ.	Широкого использования ИФА для определения антигена не приобрел. Эта техника занимает 3 ч.
Выявление антител	Характеристики	
Реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ)	РНИФ – быстрая техника, показывающая высокую чувствительность и специфичность, при которой происходит реакция специфических антител, присутствующих в сыворотке или экссудате на клеточном покрове, зараженном вирусом АЧС. Реакция проявляется при добавлении иодопротейна А или флуоресцентно меченного второго антитела Anti-IgG свиньи. Если клеточный слой содержит положительные образцы на участках, близких к ядру, наблюдается свечение, которое соответствует точкам репликации ВАЧС.	Техника РНИФ используется не очень широко в настоящее время. Коммерческие реактивы в торговле отсутствуют. Эта техника требует 2 ч.
Иммуноферментный анализ (ИФА)	ИФА – метод, используемый для массовых профилактических и эпизоотических исследований. В применяемой в настоящее время технике ИФА используют растворимый антиген, содержащий большую часть вирусных протеинов АЧС. ИФА – высокочувствительный и специфический, быстрый, легкий метод. Разработан метод ИФА с неинфицированными реактивами, в котором в качестве вирусных антигенов применяются рекомбинантные протеины р32, р54 и рр72. Тестирование с помощью ИФА демонстрирует высокую чувствительность и специфичность, позволяющая исследовать плохо сохранившуюся сыворотку.	ИФА широко используется в настоящее время. В продаже имеются диагностические наборы для постановки этого теста. ИФА требует 2 ч.
Иммуноблоттинг	Иммуноблоттинг – техника, при которой вирусные протеины АЧС переносят на нитроцеллюлозные фильтры, выполняющие функцию антигенных полос, на которых происходит реакция подозрительной сыворотки с помощью конъюгата протеина А/пероксидазы для выявления специфических антител. Техника иммуноблоттинг а используется для определения реактивности антител, присутствующих в сыворотке при контакте с различными протеинами, специфически производимыми вирусом африканской чумы свиней. Специфичность, чувствительность и объективный характер иммуноблоттинга делают его идеальной техникой серологической диагностики.	Диагностические наборы для этой техники в продаже отсутствуют. Реактивы производятся в некоторых Референтных Лабораториях Европейского союза и МЭБ. Иммуноблоттинг – превосходная техника для серологического подтверждения в случае сомнительных результатов. Эта техника требует 3 ч.

При использовании реакции иммунофлуоресценции [47], в случае подострой и хронической форм течения болезни чувствительность метода снижается до 40 % из-за присутствия антител. Метод гемадсорбции [11, 48] обладает высокой чувствительностью, но не выявляет все штаммы вируса АЧС. Разработка и внедрение метода полимеразной цепной реакции с олигонуклеотидами, специфичными консервативному участку генома, позволяет выявлять все штаммы вируса АЧС с высокой чувствительностью.

В табл. 1 обобщены методы, используемые в настоящее время для целей диагностики АЧС, описаны их преимущества и недостатки, а также отмечены те из них, которые являются рекомендуемыми. При первом обследовании рекомендуется обращаться более, чем к одной технике диагностики. В любом случае, следует всегда ставить тесты параллельно, что позволяет одновременно обнаружить вирус и антитела. Наиболее часто используемыми сегодня методами являются: полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующим секвенированием и непрямой иммуноферментный анализ (ИФА) или иммуноблоттинг. На рис. 3 изображена схема, иллюстрирующая наиболее часто используемые в настоящее время лабораторные протоколы для выявления вируса АЧС и антител к нему.

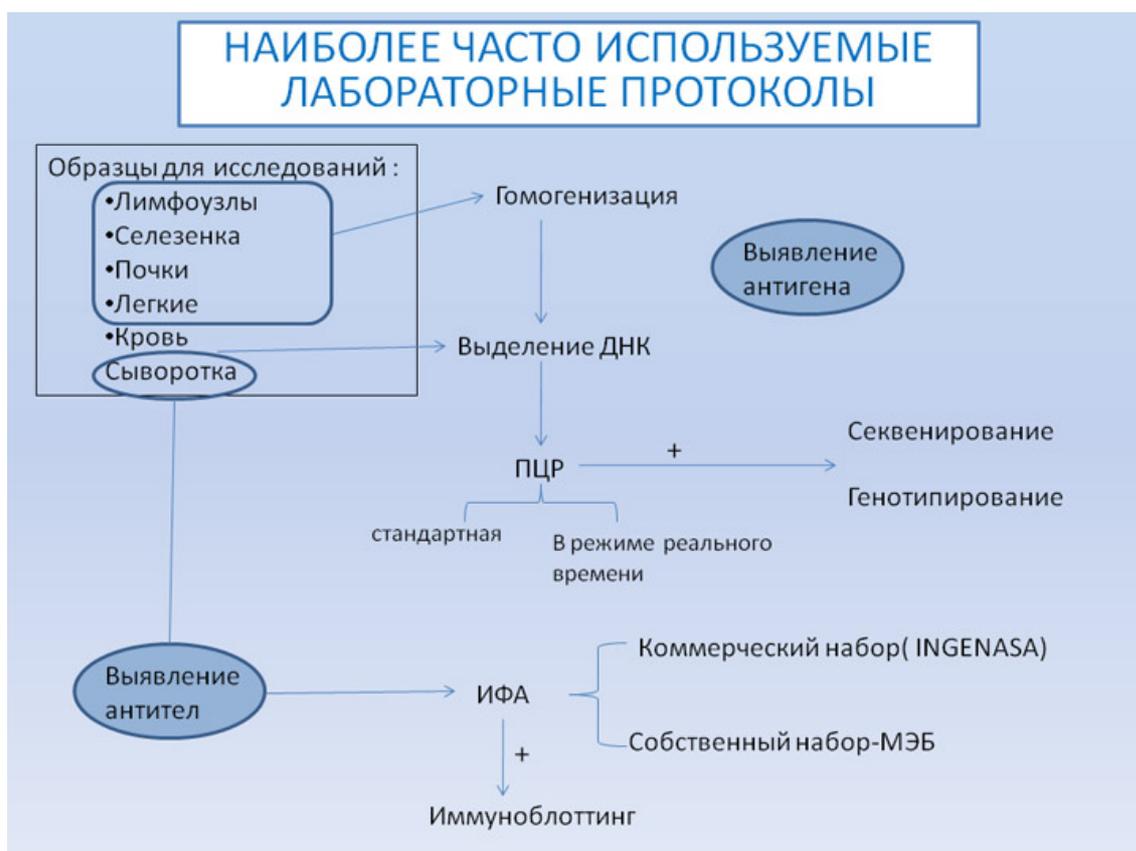


Рисунок 3. Наиболее часто используемые лабораторные протоколы для определения вируса Африканской чумы свиней (АЧС) и антител к нему (по материалам проф. José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, Мадрид, Испания).

Сочетанное использование нескольких методов выявления антигена и антител позволяет рассчитать срок инфекции. Обнаружение антигена при отсутствии антител может свидетельствовать об инфекции менее 10–12 сут.. Идентификация антител может позволить также идентифицировать животных-носителей, так как они часто наблюдаются при длительной инфекции АЧС.

Выявление специфических к вирусу АЧС антител представляется важнейшей задачей. Во-первых, вакцины против АЧС не существует, следовательно, присутствие антител всегда является надежным свидетельством инфекции. Во-вторых, выработка антител происходит рано, и антитела сохраняются длительное время. В связи с этим, серологический мониторинг важен в системе мер борьбы с АЧС. На сегодняшний день, для серологических исследований применяют метод непрямой иммунофлуоресценции, непрямого твердофазного иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга [46].

При искоренении АЧС в Испании первоначально проводили скрининг всех сывороток с помощью ИФА, с последующей проверкой положительных образцов иммуноблоттингом с использованием нитроцеллюлозных полосок, содержащих вирусные полипептиды с молекулярными массами 23–35 кДа [49]. При проведении исследований исследователи столкнулись с проблемой ложноположительных и ложноотрицательных результатов в ИФА. Было установлено, что ложноположительные результаты были получены при неправильном хранении сывороток, а ложноотрицательные результаты – из-за отсутствия антител на представляемые в ИФА вирусные эпитопы [50]. Исследования антигенной активности взаимодействия рекомбинантного белка р72 с антителами сывороток инфицированных АЧС свиней показали, что 100 нг рекомбинантного белка достаточно для четкого определения позитивной сыворотки от негативной методом ИФА [51].

В АНО «НИИ диагностики и профилактики болезней человека и животных» совместно с испанской фирмой Ingenaza разработан отечественный набор для выявления антител к белку р72 вируса АЧС в сыворотках крови свиней конкурентным методом ИФА. Этот набор не уступает по чувствительности наборам на основе рекомбинантных белков за счет высокой концентрации хроматографически очищенного специфического антигена и использования моноклональных антител [52].

Показана эффективность использования рекомбинантного белка р30 для ИФА, а рекомбинантного белка р54 для иммуноблоттинга, что объясняется значительным количеством линейных и конформационных эпитопов, содержащихся в этих белках [53].

Актуальной также является разработка и совершенствование лабораторных методов экспресс-диагностики АЧС – создания иммунохроматографических тест-систем, позволяющих осуществить предварительную постановку диагноза в полевых условиях за 10–15 мин..

Основной проблемой, затрудняющей идентификацию и дифференциацию изолятов и штаммов вируса АЧС с использованием серологических реакций или методом биопробы, является наличие негемадсорбирующих вирулентных и авирулентных вариантов, а также изменчивость вируса. При минимальной концентрации возбудителя обнаружение его существующими модификациями серологических методов является затруднительным.

В последние годы, получили широкое развитие молекулярные методы выявления ДНК АЧС, такие как ПЦР, ПЦР в реальном времени. Они являются чувствительными, специфичными и занимают сравнительно мало времени от обработки проб до получения результата. Такие методы анализа генома как рестрикционный анализ, молекулярная гибридизация, полимеразная цепная реакция и секвенирование позволяют непосредственно исследовать структуру генома АЧС, изучить генетическую вариабельность, установить генетическую взаимосвязь штаммов вируса АЧС, проводить ретроспективный анализ геномов изолятов, выделенных в течение различного периода времени.

Для быстрого выявления вируса в пробах крови при острой и подострой формах заболевания могут быть использованы методы детекции вируса с использованием ПЦР и ПЦР в реальном времени [45, 54, 55].

Существует ряд зарубежных тест-систем на основе однораундовой ПЦР с последующей рестрикцией [54] на основе ПЦР в реальном времени [45, 55].

Разработаны отечественные тест-системы на основе ПЦР и ПЦР в реальном времени для выявления ДНК вируса АЧС: АНО «НИИ диагностики и профилактики болезней человека и животных» совместно с ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России [21], ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, компании Интерлабсервис. Тест-система АНО «НИИ диагностики и профилактики болезней человека и животных» с высокой чувствительностью определяет ДНК вируса АЧС в крови, селезёнке, печени и мышечных тканях от латентно инфицированных, больных и павших животных, при этом, сокращено время анализа за счёт использования для выделения хроматографических колонок. При таком методе выделения, без потери чувствительности, время выделения сокращается более чем в 4 раза по сравнению с существующими Российскими тест-системами. Кроме того, комплектация тест-систем максимально приближена к европейскому стандарту.

АЧС, в первую очередь, дифференцируют от следующих болезней: классической чумы свиней, рожистого воспаления, сальмонеллёза, острого пастереллёза, стрептококковой инфекции, болезни Ауески, лептоспироза, дерматита с синдромом нефропатии свиней, мультисистемного послеотъёмного синдрома истощения, а также отравления кумарином [46]. При этом, используют методы выявления антигена вируса АЧС, такие, как ПЦР и ПЦР в реальном времени, РНИФ, ИФА. Наборы фирм Ingenaza и Idex, основанные на конкурентном

ИФА с моноклональными антителами к р72 позволяют выявлять наличие вируса в титрах 2–3 lg(TCID₅₀)/мл, что сопоставимо с чувствительностью ПЦР, но в 10 раз меньше таковой при ПЦР в реальном времени. Высокая чувствительность указанного теста объясняется тем, что в инфицированных клетках происходит гиперпродукция основного капсидного белка р72.

Методы молекулярной диагностики позволяют быстро и эффективно выявить возбудитель, как на ранних стадиях болезни, так и при неясно выраженной клинической картине [55–59]. Кроме того, методы молекулярной диагностики позволяют выявить хронических носителей, а также дифференцировать возбудителей, при сходной клинической картине. Своевременная дифференциальная диагностика КЧС и АЧС максимально значима, поскольку позволяет определить наличие инфекционного агента на начальных этапах развития болезни и выработать оптимальную стратегию борьбы с данным заболеванием.

Таблица 2. Нормы и рекомендации МЭБ и другие нормативные положения по профилактике и планам борьбы с АЧС [46].

Международные нормы	Санитарный кодекс наземных животных 2010, Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ), глава 15.1.
	Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных, Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ), глава 2.1.12.
Нормы Европейского Союза	Решение 2003 / 422 / СЕ Комиссии от 26 мая 2003 г. об апробации диагностического руководства по африканской чуме свиней.
	Директива 2002 / 60 / СЕ Совета от 27 июня 2002 г., устанавливающая положения по борьбе с африканской чумой свиней во изменение директивы 92 / 119 / СЕ, посвящённой болезни Тешена и Африканской чуме свиней

В АНО «НИИ диагностики и профилактики болезней человека и животных» совместно с ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России разработана также тест-система для выявления и дифференциации вирусов АЧС и КЧС методом ПЦР. Тест-система проходит апробацию в широком производственном испытании.

Диагностические исследования – это один из важнейших пунктов в планах срочного реагирования для борьбы с АЧС. В табл. 2 резюмированы нормативные положения, выработанные МЭБ и Европейским Союзом в том, что касается предупреждения и планов борьбы с АЧС.

Очевидно, что раннее выявление болезни – наилучшее решение в деле защиты здоровья животных, при этом, оно представляет собой наиболее сложную составляющую любой эффективно действующей системы надзора за болезнью. Научные достижения последних

десятилетий обеспечили разработку методов лабораторной диагностики АЧС, обладающих не только высокой чувствительностью и специфичностью, но и быстрых в осуществлении. Большинство национальных и международных Референтных и региональных диагностических лабораторий располагает методами, позволяющими ставить точный диагноз всего за несколько часов. Между тем, время, необходимое для обнаружения болезни на месте или, по крайней мере, выявления подозрения на нее – представляет пока основную трудность [46]. Следовательно, оперативная и эффективная постановка диагноза позволяет сдерживать распространение инфекции и без промедления обратиться к мерам борьбы, т.к. эти факторы более других важны для понимания эволюции болезни и решения проблемы по её искоренению.

Литература.

1. *Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., et al.* Virus taxonomy, 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virol. 1995; Supplement 10.
2. United States Department of Agriculture (USDA), 2011. Russian Federation. Global Agricultural Information Network, Report RS1144, 2011. Foreign Agriculture Services. www.thepigsite.com, 2011. Доклад размещён на сайте: <http://www.thepigsite.com/articles/3624/russian-federation-livestock-and-products-annual-2011>.
3. *Львов Д.К., Альховский С.В., Щелканов М.Ю.* Асфарвирусы (Asfarviridae). В кн.: Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Ред.: академик РАН Д.К. Львов. М.: МИА, 2013; 152–154.
4. *Suárez C., Gutiérrez-Berzal J., Andrés G., Salas M.L., Rodríguez J.M.* African swine fever virus protein p17 is essential for the progression of viral membrane precursors toward icosahedral intermediates. J. Virol. 2010; 84 (15) : 7484–7499.
5. *Ogata H., Toyoda K., Tomaru Y., Nakayama N., Shirai Y., et al.* Remarkable sequence similarity between the dinoflagellate-infecting marine virus and the terrestrial pathogen African swine fever virus. Virol. J. 2009; 6 : 178.
6. *Loh J., Zhao G., Presti R.M., Holtz L.R., Finkbeiner S.R., et al.* Detection of novel sequences related to African Swine Fever virus in human serum and sewage. J. Virol. 2009; 83 (24) : 13019–13025.
7. *Arias M., Sánchez-Vizcaíno J.M.* African Swine Fever Eradication: The Spanish model. Trends in Emerging Viral Infections of Swine. 2002; 133–139.

8. *Carrascosa A.L., Bustos M.J., de Leon P.* Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2011; Ch. 26 : Unit 26.14.
9. *Hess W.R., Cox B.F., Heuschele W.P., Stone S.S.* Propagation and modification of African swine fever virus in cell cultures. *Am. J. Vet. Res.* 1965; 26 : 141–146.
10. *Hurtado C., Bustos M.J., Carrascosa A.L.* The use of COS-1 cells for studies of field and laboratory African swine fever virus samples. *J. Virol. Methods.* 2010; 164 (1–2) : 131–134.
11. *Malmquist W.A., Hay D.* Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am. J. Vet. Res.* 1960; 21 : 104–108.
12. *Wilkinson P.J., Wardley R.C.* The replication of African swine fever virus in pig endothelial cells. *Br. Vet. J.* 1978; 134 (3) : 280–282.
13. *Gómez-Villamandos J.C., Hervás J., Méndez A., Carrasco L., Martín de las Mulas J., et al.* Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *J. Gen. Virol.* 1995; 76 (9) : 2399–2405.
14. *Sierra M.A., Bernabe A., Mozos E., Mendez A., Jover A.* Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. *Vet. Pathol.* 1987; 24 (5) : 460–462.
15. *Gómez-Villamandos J.C., Bautista M.J., Carrasco L., Caballero M.J., Hervás J., et al.* African swine fever virus infection of bone marrow: lesions and pathogenesis. *Vet. Pathol.* 1997; 34 (2) : 97–107.
16. *Minguez I., Rueda A., Dominguez J., Sánchez-Vizcaino J.M.* Double labeling immunohistological study of African swine fever virus-infected spleen and lymph nodes. *Vet. Pathol.* 1988; 25 : 193–198.
17. *Plowright W., Perry C.T., Peirce M.A., Parker J.* Experimental infection of the argasid tick, *Ornithodoros moubata porcinus*, with African swine fever virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1970; 31 (1) : 33–50.
18. *Ravaomanana J., Michaud V., Jori F., Andriatsimahavandy A., Roger F., et al.* First detection of African Swine Fever Virus in *Ornithodoros porcinus* in Madagascar and new insights into tick distribution and taxonomy. *Parasit. Vectors.* 2010; (3) : 115.
19. *Sanchez-Botija C.* Reservorios del virus de la Peste Porcina Africana. Investigacion del virus de la PPA en los artropodos mediante la prueba de la hemoadsorcion. *Bull OIE* . 1963; 60 : 895–899.
20. *Балышев В.М., Куринов В.В., Цыбанов С.Ж., Калантасико Ю.Ф., Колбасов Д.В. и др.* Биологические свойства вируса африканской чумы свиней, выделенного в Российской Федерации. *Ветеринария.* 2010; (7) : 25–27.
21. *Забережный А.Д., Алипер Т.И., Гребенникова Т.В., Верховский О.А., Sánchez-Vizcaino J.M., et al.* Африканская чума свиней в Российской Федерации. *Вопросы вирусологии.* 2012; (5) : 4–9.

22. *Алипер Т.И., Забережный А.Д., Гребенникова Т.В.* Африканская чума свиней в Российской Федерации. Вопросы вирусологии. 2012; Приложение 1 : 127–136.
23. *Arias M., Sánchez-Vizcaíno J.M.* Manual de diagnóstico serológico de la Peste porcina africana. Monografias INIA. 1992; 83 : 5–44.
24. *Colgrove G., Haelterman E.O., Coggins L.* Pathogenesis of African swine fever virus in young pigs. Am. J. Vet. Res. 1969; 30 : 1343–1359.
25. *Plowright W., Parker J., Staple R.F.* The growth of a virulent strain of African swine fever virus in domestic pigs. J. Hyg. (Lond). 1968; 66 (1) : 117–134.
26. *Plowright W., Parker J.* The stability of African swine fever virus with particular reference to heat and pH inactivation. Arch. Gesamte Virusforsch. 1967; 21 : 383–402.
27. *Krug P.W., Larson C.R., Eslami A.C., Rodriguez L.L.* Disinfection of foot-and-mouth disease and African swine fever viruses with citric acid and sodium hypochlorite on birch wood carriers. Vet. Microbiol. 2012; 156 (1–2) : 96–101.
28. *Pharo H., Cobb S.P.* The spread of pathogens through trade in pig meat: overview and recent developments. Rev. Sci. Tech. 2011; 30 (1) : 139–148.
29. *Wieringa-Jelsma T., Wijnker J.J., Zijlstra-Willems E.M., Dekker A., Stockhofe-Zurwieden N., et al.* Virus inactivation by salt (NaCl) and phosphate supplemented salt in a 3D collagen matrix model for natural sausage casings. Int. J. Food Microbiol. 2011; 148 (2) : 128–134.
30. *Mebus C., House C., Ruiz F.* Survival of foot-and -mouth disease, African swine fever and hog cholera virus in Spanish serrano cured hams and Iberian cured hams, shoulder and loin. Food Microbiol. 1993; 10 : 133–143.
31. *Carrasco L., Chacon M., Lara J.* Virus association with lymphocytes in acute African swine fever. Vet. Res. 1996; 27 : 305–312.
32. *Sierra M.A., Carrasco L., Gómez-Villamandos J.C., Martín de las Mulas J., Méndez A., Jover A.* Pulmonary intravascular macrophages in lungs of pigs inoculated with African swine fever virus of differing virulence. J. Comp. Pathol. 1990; 102 (3) : 323–334.
33. *Sánchez-Vizcaíno J.M., Slauson D.O., Ruiz-Gonzalvo F., Valero F.* Lymphocyte function and cell-mediated immunity in pigs with experimentally induced African swine fever. Am. J. Vet. Res. 1981; 42 : 1335–1341.
34. *Onisk D., Borca M., Kutish G., Kramer E., Irusta P., Rock D.L.* Passively transferred African swine fever virus antibodies protect swine against lethal infection. Virology. 1994; 198 : 350–354.
35. *Schlafer D.H., Mebus C.A., McVicar J.W.* African swine fever in neonatal pigs: Passive acquired protection from colostrum or serum from recovered pigs. Am. J. Vet. Res. 1984; 45 : 1367–1372.

36. *De Boer C.J.* Studies to determine neutralizing antibody in sera from animals recovered from African swine fever and laboratory animals inoculated with African virus with adjuvants. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1967; 20 (2) : 164–179.
37. *Lubisi B.A., Bastos A.D.S., Dwarka R.M., Vosloo W.* Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa. *Arch. Virol.* 2005; 150 : 2439–2452.
38. *Villiers E.P., Gallardo C., Arias M., Melissa da Silva, Upton C., et al.* Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology* 2010; (400) : 128–136.
39. *Bastos A.D.S., Penrith M.L., Cruciere C., Edrich J.L., Hutchings G., et al.* Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch. Virol.* 2003; 148 : 693–706.
40. *Калабеков И.М., Елсукова А.А., Шендрик А.Г. и др.* Филогенетический анализ полевых изолятов вируса африканской чумы свиней. *Ветеринария.* 2010; (5) : 31–33.
41. *Rowlands R.J., Michaud V., Heath L., Hutchings G., Oura C., et al.* African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14 (12) : 1870–1874.
42. *Chapman D.A., Darby A.C., Da Silva M., Upton C., Radford A.D., Dixon L.K.* Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17 (4) : 599–605.
43. *Куринов В.В., Колбасов Д.В., Цыбанов С.Д., Калабеков И.М., Лыска В.М. и др.* Диагностика и мониторинг при вспышках африканской чумы свиней в Республиках Кавказа. *Ветеринария.* 2008; (10) : 20–25.
44. *Ronish B., Hakhverdyan M., Stahl K., Gallardo C., Fernandez-Pinero J., et al.* Design and verification of a highly reliable Linear-After-The-Exponential PCR (LATE-PCR) assay for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Methods.* 2011; 172 (1–2) : 8–15.
45. *Tignon M., Gallardo C., Iscaro C., Hutet E., Van der Stede Y., et al.* Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *J. Virol. Methods.* 2011; 178 (1–2) : 161–170.
46. *OIE.* José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, Laboratorio de Referencia de la OIE para Peste Porcina Africana, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid-Conf OIE. 2010; 159–168.
47. *Boal P., Ordás A., Sánchez-Botija C.* The diagnosis of African swine fever by immunofluorescence. *Bull OIE.* 1969; 72 : 819–839.
48. *Серёда А.Д., Балышев В.М.* Антигенное разнообразие вирусов африканской чумы свиней. *Вопросы вирусологии.* 2011; 56 (4) : 38–42.

49. *Alcaraz C.I., De Diego M., Pastor M.J., Escribano J.H.* Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to an african swine fever virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1990; (2) : 191–196.
50. *Bech-Nielsen S., Arias M.L., Panadero J., et al.* Laboratory diagnosis and disease occurrence in the current african swine fever eradication program in Spain 1989–1991. *Prevent. Vet. Med.* 1993; 17 : 225–234.
51. *Garcia-Escudero R., Andres G., Almazan F., Vinuela E.* Inducible gene expression from African swine fever virus recombinants: analysis of the major capsid protein p72. *J. Virol.* 1998; 72 : 3185–3195.
52. *Цибезов В.В., Терехова Ю.О., Баландина М.В., Латышев О.Е., Гребенникова Т.В. и др.* Разработка иммуноферментных методов диагностики африканской сумы свиней. *Ветеринария Кубани.* 2012; (1) : 20–23.
53. *Perez-Filgueira D.M., Gonzalez-Camacho F., Gallardo C., Resino-Talavan P., Blanco E., et al.* Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44 (9) : 3114–3121.
54. *Aguero M., Fernandez J., Romero L., Sanchez Mascaraque C., Arias M., Sanchez-Vizcaino J.M.* Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2003; (41) : 4431–4434.
55. *McKillen J., McMenamy M., Hjertner B., McNeilly F., Uttenthal A., et al.* Sensitive detection of African swine fever virus using real-time PCR with a 5'-conjugated minor groove binder probe. *J. Virol. Methods.* 2010; 168 (1–2) : 141–146.
56. *Eberling A.J., Bieker-Stefanelli J., Reising M.M., Siev D., Martin B.H., et al.* Development, optimization, and validation of a Classical swine fever virus real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2011; 23 (5) : 994–998.
57. *Hoffmann B., Blome S., Bonilauri P., Fernandes-Pinero J., Greiser-Wilke I., et al.* Classical swine fever virus detection: results of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction ring trial conducted in the framework of the European network of excellence for epizootic disease diagnosis and control. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2011; 23 (5) : 999–1004.
58. *Leifer I., Blome S., Beer M., Hoffmann B.* Development of a highly sensitive real-time RT-PCR protocol for the detection of Classical swine fever virus independent of the 5' untranslated region. *J. Virol. Methods.* 2011; 171 (1) : 314–317.
59. *Liu L., Xia H., Everett H., Sosan O., Crooke H.* A generic real-time TaqMan assay for specific detection of lapinized Chinese vaccines against classical swine fever. *J. Virol. Methods.* 2011; 175 (2) : 170–174.