

Латышев О.Е.^{1,2}, Елисеева О.В.^{1,2}, Гребенникова Т.В.^{1,2}, Верховский О.А.², Цибезов В.В.^{1,2}, Черных О.Ю.³,
Джайлиди Г.А.⁴, Алипер Т.И.^{1,2}

Тест-система на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени для обнаружения африканской чумы свиней

¹ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава России, 123098, г. Москва; ²АНО «НИИ диагностики и профилактики болезней человека и животных», 123098, г. Москва; ³ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория», 352380, Краснодарский край, г. Кропоткин; ⁴Государственное управление ветеринарии Краснодарского края, 350020, Краснодарский край, г. Краснодар

Представлены результаты разработки диагностического теста на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) для обнаружения ДНК африканской чумы свиней (АЧС) в патологическом материале, а также в культуральной жидкости. Определены высокая чувствительность и специфичность обнаружения ДНК в органах и тканях животных, не уступающая применяемому в странах Евросоюза референтному набору реагентов для определения ДНК АЧС методом ПЦР-РВ. Выбрана более быстрая и эффективная методика выделения ДНК с использованием колонок mini spin Quick-gDNA™ MiniPrep по сравнению с методом выделения ДНК на неорганическом сорбенте. Показана высокая корреляция результатов обнаружения ДНК АЧС методом ПЦР-РВ и результатов обнаружения антигена вируса АЧС методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), полученных с помощью тест-системы ИФА «АЧС-SEROTEST/INGEZIM PPA COMRAC». Разработанная тест-система может быть использована различными ветеринарными службами для эффективного мониторинга вируса АЧС с целью локализации, ликвидации и предупреждения дальнейшего распространения болезни.

Ключевые слова: африканская чума свиней; полимеразная цепная реакция в реальном времени; конкурентный иммуноферментный анализ.

Real-time PCR kits for the detection of the african swine fever virus

Latyshov O. E.^{1,2}, Eliseeva O. V.^{1,2}, Grebennikova T. V.^{1,2}, Verkhovskiy O. A.², Tsibezov V. V.^{1,2}, Chernykh O. Yu.³,
Dzhailidi G. A.⁴, Aliper T. I.^{1,2}

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia; ²Diagnostic and Prevention Research Institute for human and animal diseases, 123098, Moscow, Russia; ³Kropotkin territorial veterinary laboratory, 352380, Kropotkin, Russia; ⁴State Veterinary Department of Krasnodar region, 350020, Krasnodar, Russia

The results obtained using the diagnostic kit based on real-time polymerase chain reaction to detect the DNA of the African Swine Fever in the pathological material, as well as in the culture fluid, are presented. A high sensitivity and specificity for detection of the DNA in the organs and tissues of animals was shown to be useful for detection in the European Union referentiality reagent kits for DNA detection by real time PCR of ASFV. More rapid and effective method of DNA extraction using columns mini spin Quick gDNA™ MiniPrep was suggested and compared to the method of DNA isolation on the inorganic sorbent. High correlation of the results of the DNA detection of ASFV by real-time PCR and antigen detection results ASFV by competitive ELISA obtained with the ELISA SEROTEST/INGEZIM COMRAC PPA was demonstrated. The kit can be used in the veterinary services for effective monitoring of ASFV to contain, eliminate and prevent further spread of the disease.

Key words: african swine fever virus; real-time polymerase chain reaction; competitive ELISA.

Введение

Африканская чума свиней (АЧС) является высококонтагиозным вирусным заболеванием диких и домашних свиней всех пород и возрастов. Обладает способностью к быстрому распространению за пределы национальных границ, наносит огромный экономический ущерб свиноводству с серьезными социально-экономическими последствиями, имеет большое значение для международной торговли животными и животноводческой продукцией [1–3].

Возбудитель АЧС – вирус, ранее относящийся к семейству *Iridoviridae*, в настоящее время является единственным представителем рода *Asfivirus* семейства *Asfarviridae*. Это единственный ДНК-содержащий арбовирус, геном которого представлен двуспиральной ДНК размером от 170 до 190 т.п.н. [1, 4–7]. Вирус устойчив к воздействию различных физических и химических факторов и может сохраняться в трупах свиней, биологическом материале и объектах внешней среды до 5 мес. Заражение животных происходит при совместном содержании больных и здоровых свиней, а также при контакте с дикими кабаном. Течение болезни может быть сверхострое, острое, подострое и хроническое. Вирусносительство длит-

ся до двух лет и более. Из организма животного вирус выделяется с мочой, фекалиями, секретом конъюнктивы, носовой и ротовой слизью, загрязняя корм, воду, окружающие предметы, воздух и совместно обитающих животных [3, 8–10].

Для выявления вирусносителей и резервуара вируса в дикой природе следует проводить ежемесячные мониторинговые исследования каловых масс диких кабанов на наличие возбудителя. Необходимо систематически исследовать пробы почвы и воды свиноводческих хозяйств, соседствующих с очагами инфекции, а также пробы с совместно обитающих животных, которые могут являться механическими переносчиками вируса [3, 11].

Первичная диагностика АЧС включает выделение вируса в культуре клеток, идентификацию методом реакции прямой иммунофлюоресценции и выявление вируса методом биопробы. Такие методы являются длительными, дорогостоящими и требуют особых условий проведения и содержания животных, а также навыков оператора [9].

На сегодняшний день актуальной является проблема совершенствования методов диагностики АЧС, направленных на оперативное выявление очагов возбудителя и путей

распространения инфекции [11]. Быстрая и своевременная диагностика АЧС является определяющим фактором комплекса ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий, направленных на локализацию, ликвидацию и предупреждение дальнейшего распространения болезни [12, 13]. Применение высокочувствительного молекулярного метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) позволяет быстро и эффективно выявить ДНК АЧС в различном биологическом материале.

Цель исследования – разработать диагностическую тест-систему на основе ПЦР-РВ для быстрого и эффективного выявления ДНК вируса АЧС в органах и тканях от больных, павших или вынужденно убитых свиней, а также от диких животных.

Материалы и методы

Вирусы, исследуемые образцы. В работе использовали вирулентные штаммы вируса АЧС и образцы органов и тканей от животных, предоставленные ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория» Краснодарского края (г. Кропоткин) и Европейской референтной лабораторией OIE (Мадрид, Испания). Также использовали вакцинный штамм КС, предоставленный проф. В.А. Сергеевым; цирковирус свиней 2-го типа (ЦВС-2) штамм *ISU-31*, вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС), штаммы *Lelystad*, *NADC-2*, предоставленные В. Менгелингом (NADC, Iowa, США). В качестве положительного контроля ПЦР-РВ применяли рекомбинантную плазмиду, содержащую фрагмент гена белка VP72 вируса АЧС.

Праймеры и зонды. Последовательности синтетических олигонуклеотидов (праймеров и зонда) для амплификации и выявления фрагмента ДНК АЧС разрабатывали с использованием компьютерных программ Assembly Lign (Oxford Molecular Group PLC, США), Amplify, версия 1.0 (University of Wisconsin, США); Oligo, версия 4.0 (США). Зонд метили на 5'-конце флюорофором FAM и на 3'-конце гасителем флюоресценции BHQ1.

Выделение вирусной ДНК. Выделение ДНК АЧС из биологических образцов проводили с использованием неорганического сорбента, применяемого в диагностических наборах «ООО Ветбиохим» (Россия), и набора для выделения ДНК на колонках *mini spin Quick-gDNA™ MiniPrep* (Zymo Research, США).

Оптимизация проведения ПЦР-РВ. Реакцию для наработки фрагмента ДНК проводили в объеме 25 мкл. Реакционная смесь для ПЦР-РВ содержала 5 мкл ДНК, 10 пмоль каждого праймера, 5 пмоль зонда, 0,25 мМ каждого dNTP, 1,25 ед. Taq-полимеразы, 10 мМ Tris-HCl (рН 9,0), 50 мМ KCl, 0,1% Triton X-100, 1,5 мМ MgCl₂. ПЦР-РВ проводили на приборе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия). Использовали следующий температурный режим: 50°C – 2 мин; 95°C – 10 мин; затем 40 циклов, включающих денатурацию при температуре

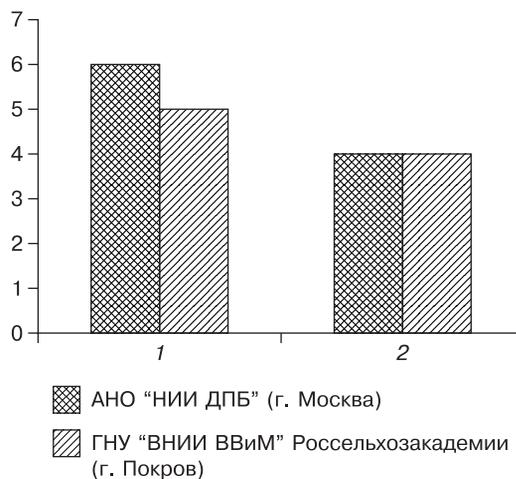


Рис. 1. Выявление ДНК АЧС в образцах органов и тканей животных.

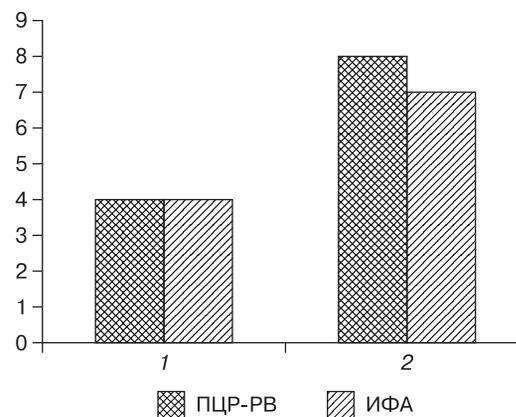


Рис. 2. Выявление вируса АЧС в образцах органов и тканей животных с помощью ПЦР-РВ и конкурентного ИФА. Здесь и на рис. 2: 1 – селезенка, 2 – кровь.

95°C в течение 15 с, отжиг праймеров при температуре 58°C в течение 1 мин. Регистрацию флюоресцентного сигнала специфического продукта амплификации проводили при 58°C на канале FAM. Результаты отображались на экране монитора компьютера в виде графика зависимости интенсивности сигнала флюоресценции от номера цикла реакции.

Результаты и обсуждение

Африканская чума свиней наряду с высокой контагиозностью обладает способностью быстро принимать размер эпизоотии и наносит огромный экономический ущерб свиноводству. В связи с этим основным критерием при ликвидации очага инфекции является оперативность постановки диагноза и реализации противоэпизоотических мероприятий. Стратегия контроля и искоренения АЧС включает в том числе раннее распознавание, лабораторное подтверждение и мониторинг АЧС в дикой природе.

Высокочувствительный метод ПЦР-РВ позволяет быстро и эффективно выявлять возбудителя АЧС при вспышке инфекции, на ранних стадиях болезни, при неярко выраженной клинической картине, а также хронических носителей при мониторинге АЧС.

В процессе разработки тест-системы на основе ПЦР-РВ для выявления ДНК АЧС были подобраны специфические праймеры и зонд, оптимизирован температурно-временной режим проведения ПЦР-РВ.

Быстрота и эффективность выявления ДНК являются основным критерием постановки диагноза. В связи с этим для выделения ДНК АЧС из патматериала применяли твердофазный метод выделения на неорганическом сорбенте и

Таблица 1

Сравнительная чувствительность с использованием культурального вируса АЧС

Исследуемый материал	Разработанная тест-система ПЦР-РВ	Референтный набор реагентов (ОИЕ, Мадрид, Испания)
Культуральный вирус АЧС:		
исх.	+	+
10-1	+	+
10-2	+	+
10-3	+	+
10-4	+	+
10-5	+	+
10-6	+	+
10-7	+	+
10-8	+	+
10-9	-	-
10-10	-	-

Специфичность разработанной тест-системы

Исследуемый материал	Разработанная тест-система ПЦР-РВ	Референтный набор реагентов (OIE, Мадрид, Испания)
Культура клеток:		
зараженная АЧС	+	+
зараженная КЧС	-	-
зараженная ЦВС-2	-	-
зараженная РРСС	-	-
20% суспензия:		
селезенка № 1	+	+
лимфоузлы	+	+
селезенка № 2	+	+
почка	+	+
Цельная кровь	+	+
20% суспензия селезенки № 3	+	+
20% суспензия селезенки № 4	+	+

его модификацию с применением спин-колонок на силикагелевой матрице. Определили, что модификация метода выделения ДНК с применением спин-колонок более эффективна, чем выделение на неорганическом сорбенте, поскольку существенно ускоряет процесс выделения, снижает потери и увеличивает выход суммарной ДНК. Также эта методика проста в исполнении и требует меньшего количества реагентов и расходных материалов. В дальнейшем в работе использовали ДНК АЧС, выделенную данным способом.

В случае хронического течения инфекции, а также при инфекциях смешанной этиологии, особенно в сочетании с классической чумой свиней (КЧС), необходима высокая чувствительность и специфичность детекции ДНК АЧС.

Исследование чувствительности разработанной ПЦР тест-системы проводили с использованием 10-кратных разведений культурального вируса АЧС. Пределом чувствительности считали последнее разведение вируса, при котором наблюдается увеличение роста кривой флуоресценции. При оценке чувствительности выяснили, что разработанная тест-система выявляет ДНК АЧС в разведении до 10^{-8} . Также провели сравнение чувствительности разработанной тест-системы с референтным набором реагентов для определения ДНК АЧС методом ПЦР-РВ (OIE, Испания). Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что чувствительность разработанной тест-системы не уступает международной референтной системе выявления ДНК АЧС.

При исследовании специфичности разработанной тест-системы использовали культуральный вирус АЧС, а также культуральные вирусы, вызывающие сходные по клиническими признакам заболевания, такие как КЧС, ЦВС-2, РРСС; цельную кровь и 20% суспензию органов от больных, павших и вынужденно убитых свиней. Исследование специфичности проводили в сравнении с референтным набором реагентов (OIE, Испания). Установили 100% специфичность выявления вируса АЧС (табл. 2).

С помощью разработанной тест-системы провели исследование 19 образцов органов и тканей животных, в том числе цельной крови от здоровых и больных свиней, и 20% суспензии селезенки от больных, павших и вынужденно убитых свиней. В качестве сравнения использовали тест-систему для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР-РВ производства ГНУ «ВНИИ ВВиМ Россельхозакадемии» (г. Покров). Результаты представлены на рис. 1.

Также сравнили результаты обнаружения ДНК АЧС методом ПЦР-РВ с результатами обнаружения антигена вируса АЧС методом конкурентного ИФА, полученными с помощью тест-системы ИФА «АЧС-СЕРОТЕСТ/INGEZIM РРА СО-МРАС». Исследования проводили с использованием панели образцов, описанной выше.

Полученные результаты продемонстрировали высокую корреляцию с данными конкурентного ИФА (рис. 2).

При проведении исследований разработанная тест-система на основе ПЦР-РВ производства АНО «НИИ ДПБ» (Россия) показала высокую степень обнаружения ДНК АЧС в различном материале от животных.

В результате исследований разработана диагностическая тест-система на основе метода ПЦР-РВ, которая отличается высокой активностью и специфичностью. Тест-система успешно прошла комиссионные испытания, зарегистрирована в РФ, организовано ее серийное производство. Данная тест-система может применяться в широкой ветеринарной практике для эффективного мониторинга вируса АЧС с целью локализации, ликвидации и предупреждения дальнейшего распространения болезни.

ЛИТЕРАТУРА

- Dixon L.K., Costa J.V., Escribano J.M. The *Asfarviridae*. In: *van Regenmortel M.H.V., ed. Virus taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2000; 150–65.
- Arias M., Martinez Escribano J.A., Sanchez-Vizcaino M. *African swine fever*. *Med. Vet.* 1986; 3: 333–59.
- Sanchez-Vizcaino J.M., Leman A.D., Straw B.E. *African swine fever*. In: *Diseases of swine. 8th ed. Iowa: Iowa State Univ. Press; 1999; 8: 93–102.*
- Virus taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Inc.; 2005; 135–43.
- Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.A. *Asfarviridae and Iridoviridae*. *Vet. Virol.* 1999; 3: 293–300.
- Dixon L.K., Costa J.V., Escribano J.M. In *Swine fever: classical swine fever and African swine fever*. *Vet. Clin. North Am.* 2000; 18: 431–51.
- Dixon L.K., Twigg S.R., Baylis S.A. Nucleotide sequence of a55 kbp region from the right end of the genome of a pathogenic African swine fever virus isolate. *J. Gen. Virol.* 1994; 75: 1655–84.
- Colgrove G.S., Haelterman E.O., Coggins L. Pathogenesis of African swine fever in young pigs. *Am. J. Vet. Res.* 1969; 30: 1343–59.
- African swine fever*. Et. Epid. Diag. Pr. and C. Ref. W. Org. for An. H. 2009.
- Argilaguat J.M., Perez-Martin E., Nofrarias M. DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. *PLoS One*. 2012; 7(9): e40942.
- Moura A., McManus C.M., Bernal F.E.M., Melo C.B. An analysis of the 1978 African swine fever outbreak in Brazil and its eradication. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Spiz.* 2010; 29(3): 549–63.
- African swine fever. Manual of diagnostic tests and vaccines*. World Organization for Animal Health; 2004.
- Алипер Т.И., Забережный А.Д., Гребенникова Т.В. Африканская чума свиней в Российской Федерации. Вопросы вирусологии. 2012; Приложение 1: 127–36.

Поступила 11.10.13

REFERENCES

- Dixon L.K., Costa J.V., Escribano J.M. The *Asfarviridae*. In: *van Regenmortel M.H.V., ed. Virus taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2000; 150–65.
- Arias M., Martinez Escribano J.A., Sanchez-Vizcaino M. *African swine fever*. *Med. Vet.* 1986; 3: 333–59.
- Sanchez-Vizcaino J.M., Leman A.D., Straw B.E. *African swine fever*. In: *Diseases of swine. 8th ed. Iowa: Iowa State Univ. Press; 1999; 8: 93–102.*
- Virus taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Inc.; 2005; 135–43.
- Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.A. *Asfarviridae and Iridoviridae*. *Vet. Virol.* 1999; 3: 293–300.
- Dixon L.K., Costa J.V., Escribano J.M. In *Swine fever: classical swine fever and African swine fever*. *Vet. Clin. North Am.* 2000; 18: 431–51.
- Dixon L.K., Twigg S.R., Baylis S.A. Nucleotide sequence of a55 kbp region from the right end of the genome of a pathogenic African swine fever virus isolate. *J. Gen. Virol.* 1994; 75: 1655–84.
- Colgrove G.S., Haelterman E.O., Coggins L. Pathogenesis of African swine fever in young pigs. *Am. J. Vet. Res.* 1969; 30: 1343–59.
- African swine fever*. Et. Epid. Diag. Pr. and C. Ref. W. Org. for An. H. 2009.
- Argilaguat J.M., Perez-Martin E., Nofrarias M. DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. *PLoS One*. 2012; 7(9): e40942.
- Moura A., McManus C.M., Bernal F.E.M., Melo C.B. An analysis of the 1978 African swine fever outbreak in Brazil and its eradication. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Spiz.* 2010; 29(3): 549–63.
- African swine fever. Manual of diagnostic tests and vaccines*. World Organization for Animal Health; 2004.
- Aliper T., Zaberzhnyy A., Grebennikova T. African swine fever in Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2012; Suppl.: 127–36. (in Russian)

Received 11.10.13