

Вирус африканской чумы свиней: персистенция и диагностика

УДК 636.4:578:612.017.1:577.083

doi: 10.15389/agrobiology.2016.4.459rus

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ХРОНИЧЕСКОЙ И БЕССИМПТОМНОЙ ФОРМ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**А.Д. СЕРЕДА, О.А. ДУБРОВСКАЯ, А.Р. ИМАТДИНОВ, О.М. СТРИЖАКОВА, А.П. ВАСИЛЬЕВ, И.П. СИНДРЯКОВА, А.В. ЛУНИЦИН**

Африканская чума свиней (АЧС, возбудитель — вирус африканской чумы свиней, African swine fever virus, ASFV, семейство *Asfarviridae*, род *Asfivirus*) может протекать сверхостро, остро, подостро, хронически и бессимптомно. В начале эпизоотий болезнь, как правило, проявляется в острой форме, но со временем обычно переходит в хроническую или бессимптомную. Через 7-10 сут после заражения выжившие свиньи вырабатывают вирусоспецифические антитела, которые сохраняются в течение длительного времени. Есть основания предполагать, что в результате многократного пассирования вируса АЧС в популяциях диких кабанов европейских стран в обозримом будущем могут появиться изоляты, вызывающие не острую форму болезни, как в настоящее время, а хроническую или бессимптомную. Нами предпринято сравнительное изучение особенностей лабораторной диагностики хронической и бессимптомной форм АЧС с целью выявления наиболее эффективных методов обнаружения носителей вируса при хроническом или бессимптомном течении инфекции для обоснования тактики диагностических и мониторинговых исследований. Для этого в лабораторных условиях воспроизвели указанные формы болезни, предварительно подобрав соответствующие штаммы или варианты вируса АЧС. Хроническую форму болезни наблюдали у свиньи, которой инокулировали аттенуированный вариант вируса АЧС Ставрополь 01/08 А₄С₂/9к (после 33-го пассажа) в дозе 10⁶ ГАЕ₅₀. На 5-7-е сут после инокуляции регистрировали характерные для хронической формы инфекции угнетенное состояние и повышение температуры тела животного до 40,5 °С. В сыворотке крови свиньи противовирусные антитела регистрировали с 7-х сут. После ее убоя на 21-е сут в реакции гемадсорбции вирус АЧС в низких титрах был выявлен в пробах тканей селезенки и подчелюстных лимфоузлов, но не обнаруживался в печени и легких. Наличие вирусной ДНК по результатам полимеразной цепной реакции (ПЦР) установили только в пробе ткани подчелюстных лимфоузлов. Во всех исследованных органах методом иммуноблоттинга антитела определялись в титрах 1:20-1:160. В бессимптомной форме АЧС протекала у кабана-сеголетка, которому внутримышечно ввели аттенуированный штамм вируса АЧС МК-200 в дозе 10⁷ ГАЕ₅₀. В сыворотке крови дикого кабана противовирусные антитела регистрировали с 8-х сут. После его убоя на 25-е сут характерных для АЧС патологоанатомических признаков не наблюдали, в пробах исследованных органов вирус АЧС в реакции гемадсорбции и его ДНК по результатам ПЦР не обнаруживались. Вирусоспецифические антитела в пробах печени, селезенки, легких, подчелюстных лимфоузлов определялись в иммуноблоттинге в разведениях 1:40-1:320. Таким образом, возможность выявления антител в пробах селезенки, легких, печени значительно облегчает мониторинг АЧС при проведении ограничительных мероприятий, особенно среди диких кабанов, добытых в охотхозяйствах. Животные, последовательно инфицированные слабовирулентным, а затем вирулентным изолятами вируса АЧС, могут выживать. При этом удается диагностировать болезнь как в ПЦР, так и серологическими методами. Для лабораторной диагностики хронической и бессимптомной форм АЧС, а также проведения мониторинговых исследований следует применять серологические методы.

Ключевые слова: африканская чума свиней, АЧС, хроническая и бессимптомная формы болезни, лабораторная диагностика, иммуноблоттинг.

Африканская чума свиней (АЧС) — контагиозная септическая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и высокой летальностью. К АЧС восприимчивы домашние свиньи и дикие кабаны независимо от породы и возраста. Болезнь может протекать сверхостро, остро, подостро, хронически и бессимптомно. Вызывает болезнь крупный, покрытый оболочкой цитоплазматический вирус (вирус АЧС, African swine fever virus, ASFV; семейство *Asfarviridae*, род *Asfivirus*) с двухцепочечной ДНК — единственный представитель *Asfarviridae*, отличительная особенность которого заключается в значительном плюралитете биологических и генетических свойств (1-3). Поскольку вакцины против АЧС не разработаны, для ликвидации и пре-

дупреждения распространения болезни применяются тотальный убой свиней в так называемой первой угрожаемой зоне, а также жесткие карантинные мероприятия во второй угрожаемой зоне (4). Для принятия решений о ликвидации вспышек АЧС важное значение имеет лабораторная диагностика: выделение вируса и его идентификация в реакции гемадсорбции, выявление вирусного генома методом ПЦР, определение вирусных антигенов в прямой реакции иммунофлуоресценции или с помощью твердофазного иммуноферментного анализа, распознавание вирусоспецифических антител с использованием непрямой реакции иммунофлуоресценции, непрямой твердофазной иммуноферментной реакции, в непрямой иммунопероксидазной реакции, методом иммуноблоттинга (5-8).

Есть все основания предполагать, что в результате многократного пассирования вируса АЧС в популяциях диких кабанов европейских стран в обозримом будущем могут появиться изоляты, вызывающие не острую форму болезни, как в настоящее время, а хроническую или бессимптомную. Свиньи, которые выживают после инфицирования, обычно через 7-10 сут после заражения вырабатывают вирусоспецифические антитела, которые сохраняются в течение длительного времени (9, 10). Следовательно, обнаружение специфических антител против вируса АЧС может быть ключевым в диагностике хронической и бессимптомной форм болезни. Именно на выявлении и последующем забое серопозитивных свиней базировалась стратегия по искоренению АЧС на Иберийском полуострове (11). Уже после ликвидации АЧС в Испании и Португалии была разработана ПЦР, которая в настоящее время нашла широкое применение в лабораторной практике (12).

В настоящей работе нами представлены результаты сравнительного лабораторного исследования органов, крови и сывороток крови животных с использованием различных методов. Оно предпринято в связи с необходимостью определить наиболее эффективные способы обнаружения носителей вируса при хронической и бессимптомной формах АЧС и обосновать тактику диагностических и мониторинговых мероприятий. Для этого в лабораторных условиях воспроизводили указанные формы болезни, предварительно подобрав соответствующие штаммы или варианты вируса АЧС.

Целью работы стала диагностика хронической и бессимптомной форм африканской чумы свиней с применением реакции гемадсорбции (РГАд), серологических тестов — реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ-ИФА) и иммуноблоттинга (ИБ), а также ПЦР.

Методика. Домашних свиней породы крупная белая (живая масса 30-50 кг) получили из сектора подготовки подопытных животных (Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии — ВНИИВ-ВиМ), кабан-сеголеток был приобретен в охотхозяйстве «Покровское» (Владимирская обл.). Условия кормления и содержания соответствовали нормам и требованиям, предусмотренным для животных указанных возрастных групп; забой проводили гуманным способом.

Использовали вирулентный штамм Мозамбик-78 вируса АЧС (М-78, V генотип, III сероиммунотип) с активностью 6,5-7,5 lg ГАЕ₅₀/см³, аттенуированный штамм МК-200 с активностью 7,0-7,5 lg ГАЕ₅₀/см³ (получен в результате селекции из вирулентного штамма М-78) и аттенуированный вариант штамма Ставрополь 01/08 (II генотип, VIII сероиммунотип) с инфекционным титром 6,0-6,5 lg ГАЕ₅₀/см³ (после 33-го пассажа в перевиваемой культуре клеток А4С2/9к) (13, 14). Вирусы были получены из Музея штаммов ВНИИВВиМ.

Подготовку проб сывороток и 10 % суспензий органов, постановку

реакции РГАд, определение вирусоспецифических антител методом непрямого ТФ-ИФА и РНИФ проводили согласно ГОСТ 28573-90 «Свиньи. Методы лабораторной диагностики африканской чумы» и инструкций, прилагаемых к соответствующим тест-системам. Перечисленные серологические тесты и ПЦР осуществляли с применением коммерческих наборов. ИБ выполняли с использованием экспериментальных образцов тест-системы для серодиагностики африканской чумы свиней методом иммуоблоттинга, изготовленных на основе рекомбинантного белка р30 вируса АЧС (15, 16). Все тест-системы произведены во ВНИИВВиМ.

Результаты. Хроническую и бессимптомную формы АЧС воспроизводили с помощью полученных аттенуированных штамма и варианта, относящихся к различным гено- и сероиммунотипам (17, 18).

Свинье № 1 внутримышечно однократно вводили аттенуированный вариант вируса АЧС Ставрополь 01/08 А₄С₂/9к в дозе 10^{6,0} ГАЕ₅₀. На 5-7-е сут после инокуляции регистрировали угнетенное состояние животного и повышение температуры тела до 40,5 °С, характерные для хронической формы инфекции. В РНИФ через 7 сут титр вирусоспецифических антител в сыворотке крови животного составлял 1:2, на 9-е сут — 1:8, на 14-е сут — 1:64 и на 21-е сут — 1:64. Методом ИБ антитела к белку р30 вируса АЧС выявляли на 7-е сут в разведении 1:4, на 9-е сут — 1:32, на 14-е сут — 1:128 и на 21-е сут — 1:1024. После убоя на 21-е сут в реакции РГАд вирус АЧС в низких титрах обнаруживался в пробах ткани селезенки и подчелюстных лимфоузлов, но не был идентифицирован в печени и легких. В ПЦР присутствие вирусной ДНК подтвердили только в пробе ткани подчелюстных лимфоузлов. Во всех исследованных органах методом ИБ антитела определялись в титрах 1:20-1:160 (табл. 1).

1. Результаты использования разных методов диагностики африканской чумы свиней при исследовании органов животных после инокуляции аттенуированными штаммами ASFV

Животное, штамм, срок после инокуляции	Орган	РГАд, ГАЕ ₅₀	ПЦР	ИБ, титр антител
Свинья № 1, штамм Ставрополь 01/08 А ₄ С ₂ /9к (33-й пассаж), 21-е сут	Печень	Нет	NEG	1:20
	Селезенка	10 ^{1,5}	NEG	1:160
	Легкие	Нет	NEG	1:160
	Лимфоузлы подчелюстные	10 ^{3,5}	19,24	1:160
Дикий кабан, штамм МК-200, 25-е сут	Печень	Нет	NEG	1:80
	Селезенка	Нет	NEG	1:40
	Легкие	Нет	NEG	1:40
	Лимфоузлы подчелюстные	Нет	NEG	1:320
Контроль	Положительный образец	10 ^{7,0}	11,40	1:160
	Отрицательный образец	Нет	NEG	Нет

Примечание. ASFV — African swine fever virus, РГАд — реакция гемадсорбции, ИБ — иммуоблоттинг; в ПЦР образец считали положительным при величине порогового цикла (Ct) менее 33, отрицательным (NEG) — при отсутствии значений Ct.

Бессимптомную форму АЧС наблюдали у кабана-сеголетка, которому внутримышечно однократно ввели аттенуированный штамм вируса АЧС МК-200 в дозе 10^{7,0} ГАЕ₅₀. В РНИФ специфические антитела к вирусу АЧС выявляли на 8-е сут в разведении 1:2, на 14-е сут — 1:64 и на 24-е сут — 1:1024. Методом ИБ антитела к белку вируса АЧС р30 обнаруживали на 8-е сут в разведении 1:8, на 14-е сут — 1:512 и на 24-е сут — 1:2048. При патологоанатомическом исследовании после убоя на 25-е сут характерных для АЧС изменений у животного не наблюдали, в пробах органов в РГАд вирус АЧС не обнаружили. Вирусную ДНК в ПЦР также не выявили. Методом ИБ антитела определялись во всех протестированных образцах органов в титрах 1:40-1:320 (см. табл. 1).

При появлении в природе слабовирулентных изолятов и их распро-

странении среди восприимчивого поголовья существует вероятность выживания животных при последующем заражении гомологичным вирулентным изолятом (19-21). В подобных случаях также необходимо знать возможности лабораторных методов диагностики АЧС.

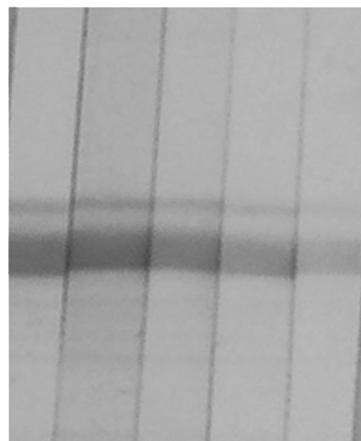
В этой связи свиньям № 2 и № 3 внутримышечно вводили аттенуированный штамм вируса АЧС МК-200 в дозе $10^{6,0}$ ГАЕ₅₀. В течение 16 сут после введения вируса клинических признаков болезни не регистрировали. На 17-е сут животным ввели вирулентный штамм вируса АЧС М-78 в дозе $10^{3,0}$ ГАЕ₅₀. У свиньи № 2 в период с 22-х по 24-е сут наблюдали характерные для АЧС клинические признаки: угнетенное состояние, повышение температуры тела до 41,3 °С, отсутствие аппетита, геморрагии на ушах и брюхе. У свиньи № 3 до 24-х сут клинические признаки болезни отсутствовали, поэтому на 25-е сут ее повторно заразили штаммом М-78 в дозе $10^{5,0}$ ГАЕ₅₀. В период с 28-х по 30-е сут у нее отмечали лихорадку до 41,4 °С, угнетенное состояние, отсутствие аппетита, геморрагии на ушах и брюхе. В период проявления клинических признаков животным № 2 и № 3 внутримышечно вводили по 20 см³ фосфонуксусной кислоты, чтобы гарантировать выживание. После уоя на 38-е сут отбирали пробы органов для исследования (табл. 2).

2. Результаты использования разных методов диагностики африканской чумы свиней при исследовании органов животных, последовательно инокулированных аттенуированным (МК-200) и вирулентным (М-78) штаммами ASFV

Животное	Орган	ПЦР	Титр антител		
			непрямой ТФ-ИФА	РНИФ	ИБ
Свинья № 2	Печень	21,05	1:320	1:20	1:640
	Селезенка	26,06	1:320	1:40	1:320
	Легкие	21,05	1:320	1:80	1:640
	Лимфоузлы подчелюстные	NEG	1:160	1:40	1:320
Свинья № 3	Печень	25,95	1:160	1:20	1:320
	Селезенка	23,57	1:160	1:20	1:320
	Легкие	25,66	1:320	1:40	1:640
	Лимфоузлы подчелюстные	NEG	1:80	1:40	1:160
Контроль	Положительный образец	23,35	1:160	1:20	1:160
	Отрицательный образец	NEG	Нет	Нет	Нет

Примечание. ASFV — African swine fever virus, ТФ-ИФА — твердофазный иммуноферментный анализ, РНИФ — реакция непрямой иммунофлуоресценции, ИБ — иммуноблоттинг; в ПЦР образец считали положительным при величине порогового цикла (Сt) менее 33, отрицательным (NEG) — при отсутствии значений Сt.

1:20 1:40 1:80 1:160 1:320



Блоттограмма титрования вирусоспецифических антител в 10 % суспензии ткани подчелюстных лимфоузлов свиньи № 3, последовательно инокулированной аттенуированным (МК-200) и вирулентным (М-78) штаммами ASFV (указаны разведения пробы).

По данным ПЦР вирусный геном выявлен в исследованных органах за исключением подчелюстных лимфоузлов. В пробах всех органов детектировали вирусоспецифические антитела. Их наивысшие титры выявлены в пробах легких. По аналитической чувствительности метод ИБ превосходил РНИФ, его результаты были наглядными и легко документировались (рис.).

В специальной литературе представлены сведения об ограниченных сроках вирусо-выделения из проб крови и органов в случае инокуляции свиньям штаммов, аттенуированных в лабораторных услови-

ях. Так, у животных, которым внутримышечно вводили аттенуированные штаммы вируса АЧС ФК-32/135 или Е-70МС в дозах $10^{6,5}$ - $10^{7,5}$ ГАЕ₅₀, выявляли инфекционный вирус только в отдельных случаях на 4-7-е сут в сыворотке крови и в 10 % суспензии ткани селезенки в титрах 1,0-2,0 lg ГАЕ₅₀/см³ (22).

Изучение распределения и накопления штамма ФК-32/135 вируса АЧС в органах и тканях свиней после инокуляции внутримышечно или аэрозольно в дозах $10^{6,5}$ - $10^{7,0}$ ГАЕ₅₀ достоверно показало, что на 7-е сут вирус сохранялся только в легких, бронхиальном и средостенном лимфоузлах, а через 10 сут выделялся только из околушного лимфоузла. В более отдаленные сроки из органов и тканей животных инфекционный вирус выделить не удалось (23). Исследование распределения вируса АЧС у подсвинков, внутримышечно инокулированных аттенуированным штаммом МК-200 в высокой дозе $10^{8,50}$ ГАЕ₅₀, показало, что на 7-14-е сут он обнаруживался в крови и 10 % суспензиях тканей печени, селезенки, легких, подчелюстного и бронхиального лимфатических узлов в титрах 3,0-4,0 lg ГАЕ₅₀/см³. На 21-30-е сут после инокуляции вирус находили только в пробах крови, 10 % суспензии ткани печени и селезенки в титрах 1,0-1,5 lg ГАЕ₅₀/см³ (24). Через 2 мес из проб крови животных вирус выделить не удалось (25). Все эти данные достоверно свидетельствуют, что благодаря действию механизмов защиты, индуцированных аттенуированными штаммами вируса АЧС, количество инфекционного вируса и его компонентов в органах свиней может быть значительно снижено за относительно короткий период.

Таким образом, наши исследования показали, что через 3 нед после заражения животных аттенуированными штаммом или вариантом вируса АЧС получить надежный положительный результат в РГАД (выявление инфекционного вируса) или ПЦР (обнаружение вирусной ДНК) затруднительно (возможны ложноотрицательные результаты). В этом случае достоверный диагноз обеспечивают серологические тесты, которые позволяют выявить вирусоспецифические антитела в образцах крови и органов домашних свиней и диких кабанов. Возможность обнаружения антител в тканях селезенки, легких, печени значительно облегчает мониторинг АЧС при проведении ограничительных мероприятий, особенно при исследовании диких кабанов, добытых в охотхозяйствах. При этом тест-система для серодиагностики АЧС методом ИБ обладает преимуществами — высокой аналитической чувствительностью и не нуждается в специальном приборном обеспечении. Применение серологических методов в перспективе можно расширить за счет анализа образцов слюны животных (26). На территориях, где зарегистрирована эпизоотия АЧС, вероятно одновременная циркуляция как слабовирулентных, так и вирулентных гомологичных изолятов вируса. Животные, последовательно инфицированные слабовирулентным, а затем вирулентным изолятом, могут выживать. При этом инфицированных животных удается выявить как в ПЦР, так и серологическими методами.

Итак, выполненные исследования показали, что приемы, основанные на обнаружении инфекционного вируса африканской чумы свиней (АЧС) по гемадсорбции или его генома в ПЦР в пробах крови или органов животных, неэффективны при диагностике и мониторинге хронической и бессимптомной форм АЧС. Их применение чревато ложноотрицательными результатами. Достоверные данные в таких случаях обеспечивают серологические методы. Анализ небольшого, от единиц до десятков, числа проб целесообразно проводить с использованием иммуноблоттинга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dixon L.K., Costa J.V., Escribano J.M., Rock D.L., Vinuela E., Wilkinson P.J. Family *Asfarviridae* /M.H.V.V. Regenmortel (ed.). London Academic Press, San Diego, CA, 2000: 159-165.
2. Серед А.Д., Балышев В.М. Антигенное разнообразие вируса африканской чумы свиней. Вопросы вирусологии, 2011, 4: 38-42.
3. Макаров В.В., Сухарев О.И., Цветнова И.В. Эпизоотологическая характеристика вируса африканской чумы свиней. Ветеринарная практика, 2013, 1(60): 6-16.
4. Khomenko S., Beltrán-Alcruado D., Rozstalnyu A., Gogin A., Kolbasov D., Pinto J., Lubroth J., Martin V. African swine fever in the Russian Federation: risk factors for Europe and beyond. EMPRES watch, 2013, 28: 1-14. Режим доступа: <http://www.fao.org/docrep/018/aq240e/aq240e.pdf>. Без даты.
5. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.8.1. African swine fever. Office International des Epizooties, Paris, France, 2012. 7th ed. Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.08.01_ASF.pdf. Без даты.
6. Sanchez - Vizcaino J.M. African swine fever diagnosis. In: African swine fever /Y. Becker (ed.). Martinus Nijhoff, Boston, USA, 1987: 63-71.
7. Вишняков И.Ф., Митин Н.И., Карпов Г.М., Куриннов В.В., Яшин А.Т. Диагностика и дифференциальная диагностика африканской и классической чумы свиней. Ветеринария, 1991, 4: 28-31.
8. Perez-Filgueira D.M., Gonzalez-Camacho F., Gallardo C., Resino-Talavan P., Blanco E., Gomez-Casado E., Alonso C., Escribano J.M. 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): 114-3121 (doi: 10.1128/JCM.00406-06).
9. Reis A.L., Parkhouse R.M.E., Penedos A.R., Martins C., Leitão A. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus. J. Gen. Virol., 2007, 88: 2426-2434 (doi: 10.1099/vir.0.82857-0).
10. Серед А.Д., Казакова А.С., Иматдинов А.Р., Колбасов Д.В. Гуморальные и клеточно-опосредованные механизмы иммунитета при африканской чуме свиней. Сельскохозяйственная биология, 2015, 50(6): 709-718 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.709eng, doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.709eng).
11. Cubillos C., Gymez-Sebastian S., Moreno N., Nunez M.C., Mulumba-Mfumu L.K., Quemboode C.J., Heath L., Etter E.M.C., Jori F., Escribano J.M., Blanco E. African swine fever virus serodiagnosis: A general review with a focus on the analyses of African serum samples. Virus Res., 2013, 173: 159-167 (doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.021).
12. Steiger Y., Ackermann M., Mettraux C., Kihm D.U. Rapid and biologically safe diagnosis of African swine fever virus infection by using polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 1992, 30(1): 1-8.
13. Malogolovkin A., Burmakina G., Titov I., Sereda A., Gogin A., Varyshnikova E., Kolbasov D. Comparative analysis of African swine fever virus genotypes and serogroups. Emerging Infectious Diseases, 2015, 21(2): 312-315 (doi: 10.3201/eid2102.140649).
14. Балышев В.М., Калантаенко Ю.Ф., Болгова М.В., Прудникова Е.Ю. Сероиммунологическая принадлежность вируса африканской чумы свиней, выделенного в Российской Федерации. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук, 2011, 5: 52-53.
15. Казакова А.С., Серед А.Д., Стрижакова О.М., Живодеров С.П., Лыска В.М., Балышев В.М., Моргунов Ю.П., Шубина Н.Г., Хухорова И.Ю., Колбасов Д.В., Гусев А.А. Тест-система для экспресс-диагностики африканской чумы свиней методом иммуноблоттинга с использованием рекомбинантного белка p30. Ветеринария, 2014, 9: 52-56.
16. Afonso C.L., Alcaraz C., Brun A., Sussman M.D., Onisk D.V., Escribano J.M., Rock D.L. Characterization of p30, a highly antigenic membrane and secreted protein of African swine fever virus. Virology, 1992, 189(1): 368-373 (doi: 10.1016/0042-6822(92)90718-5).
17. Колбасов Д.В., Балышев В.М., Серед А.Д. Итоги разработки живых вакцин против африканской чумы свиней. Ветеринария, 2014, 8: 3-8.
18. Балышева В.И., Прудникова Е.Ю., Гальнбек Т.В., Балышев В.М. Иммунобиологические свойства аттенуированных вариантов вируса африканской чумы свиней, выделенного в Российской Федерации. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук, 2015, 1-2: 65-69.
19. Ruiz - Gonzalvo F., Carnero M.E., Bruyel V. Immunological responses of pigs to partially attenuated African swine fever virus and their resistance to virulent homologous and heterologous viruses. Proc. CEC/FAO Research Seminar «African Swine Fever», Sardinia, Italy

- /P.J. Wilkinson (ed.). EUR 8466 EN. Luxemburg, Belgium, Commission of the European Communities, 1981: 206-216.
20. Vigario I.D., Terrinha A.M., Nunes J.F.M. Antigenic relationships among strains of African swine fever virus. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 1974, 45(3): 272-277 (doi: 10.1007/BF01249690).
 21. King K., Chapman D., Argilaguet J.M., Fishbourne E., Hutet E., Cariolet R., Hutchings G., Oura C.A., Netherton C.L., Moffat K., Taylor G., Le Potier M.F., Dixon L.K., Takamatsu H.H. Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunization. *Vaccine*, 2011, 29: 4593-4600 (doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.052).
 22. Непоклонов Е.А., Зеленцов В.А., Реутова Е.Г., Куринов В.В. Накопление вируса, антигенов и патолого-морфологические изменения в органах и тканях животных, привитых аттенуированными штаммами вируса АЧС 4 типа. *Мат. науч.-теор. конф. ВНИИВВиМ. Покров*, 1981: 242-244.
 23. Коромыслов Е.В. Распределение и накопление вакцинного штамма «ФК» вируса АЧС в органах и тканях свиней при различных методах вакцинации. *Тез. науч. конф. ВНИИВВиМ. Покров*, 1984: 244-246.
 24. Котельников А.П., Петров Ю.И., Зеленцов В.А., Реутова Е.Г. Распределение вируса и специфических антигенов у подсвинков, привитых вакцинным препаратом из штамма «МК». *Мат. науч.-теор. конф. ВНИИВВиМ. Покров*, 1981: 151-152.
 25. Петров Ю.И., Котельников А.П., Митин Н.И., Черятников Л.Л., Татаринцева Н.Т. Межведомственная апробация вирусвакцины из штамма МК против АЧС 3 типа концентрированной лиофилизированной. *Тез. науч. конф. ВНИИВВиМ. Покров*, 1985: 24-27.
 26. Mur L., Gallardo C., Soler A., Zimmermann J., Pelayo V., Nieto R., Sánchez-Vizcaino J.M., Arias M. Potential use of oral fluid samples for serological diagnosis of African swine fever. *Vet. Microbiol.*, 2013, 165(1-2): 135-139 (doi: 10.1016/j.vetmic.2012.12.034).

ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии,
601125 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н,
пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1,
e-mail: sereda-56@mail.ru

Поступила в редакцию
17 мая 2016 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 4, pp. 459-466

LABORATORY DIAGNOSTICS OF CHRONIC AND ASYMPTOMATIC FORMS OF AFRICAN SWINE FEVER

A.D. Sereda, O.A. Dubrovskaya, A.R. Imatdinov, O.M. Strizhakova, A.P. Vasil'ev, I.P. Sindryakova, A.V. Lunitsin

All-Russian Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 1, ul. Akademika Bakuleva, pos. Vol'ginskii, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601120 Russia, e-mail sereda-56@mail.ru

Received May 17, 2016

doi: 10.15389/agrobiology.2016.4.459eng

Abstract

African swine fever (ASF) caused by African swine fever virus (ASFV) of *Asfivirus* genus, *Asfarviridae* family, can occur in peracute, acute, subacute, chronic or asymptomatic form. At early stages of epizootics, the infection usually occurs in its acute form eventually becoming chronic and/or asymptomatic. Seven to ten days post infection the survived pigs develop virus-specific antibodies which persist for a long time. An assumption is reasonable that in the near future, due to repeated passaging ASFV in wild boar populations in European countries, the ASFV isolates may appear which will cause chronic or asymptomatic rather than the acute forms of the disease. In our study we compared different tests to find those the most effective to reveal latent carriers when no apparent symptoms of the disease observed. Thus, our research was aimed at investigation of some special aspects of the laboratory diagnostics of chronic and asymptomatic forms of ASF. The chronic form of the disease was observed in a pig experimentally inoculated with an attenuated ASF virus Stavropol 01/08 A₄S₂/9k (at passage 33) at a dose of 10^{6.0} HAU₅₀. On day 5 to 7 post inoculation the signs typical of chronic forms of the infection were registered including depression and fever up to 40.5 °C. The antiviral antibody was detected in the swine blood serum from day 7. After the animal was killed on day 21, a haemadsorption assay revealed ASF virus present at low titers in spleen and mandibular lymph node samples while in liver and lung samples it was not found. Based on the results of polymerase chain reaction (PCR), the viral DNA was determined in the mandibular lymph node sample only. Furthermore, immunoblotting assay identified ASF antibody titers of 1:20 to

1:160 in all the organs examined. The asymptomatic forms of ASF were observed in a wild boar yearling which has been intramuscularly inoculated with an attenuated ASF virus strain MK-200 at a dose of $10^{7.0}$ HAU₅₀. The antiviral antibody was observed in the wild boar serum from day 8. After the animal was killed on day 25, no pathological signs typical of ASF were found, nor was ASF virus found in the organ samples examined using haemadsorption assay or its DNA was detected in PCR. In immunoblotting assay, virus-specific antibodies were identified in liver, spleen, lung and mandibular lymph node samples at dilutions of 1:40 to 1:320. The opportunity of detecting antibodies in spleen, lung and/or liver samples facilitates the monitoring for ASF to be carried out under the infection control campaigns, especially with respect to wild boars shot in game husbandries. Animals sequentially infected with an ASFV low-virulent isolate and a virulent one can survive, in which case it is quite possible to diagnose the disease using both PCR and serological methods. For making laboratory diagnosis of ASF chronic and/or asymptomatic forms, as well as carrying out monitoring studies, serological methods are recommended.

Keywords: African swine fever, chronic and asymptomatic forms of infection, laboratory diagnostics, immunoblotting.

*Адрес сайта журнала в Интернете — www.agrobiology.ru
Статьи, события, информация — 10500 просмотров за месяц
65 % — посетители из России, 11 % — из США и Канады, 24 % — из других стран*



КАРТА САЙТА

Сообщаем, что...

- В правилах оформления направлений к представлениям рукописей произошли изменения
- На сайте открыт новый раздел "Зарубежные публикации", а в разделе "Архив" нашего сайта в открытом доступе представлены полнотекстовые версии статей с 2007 года.
- С 2010 года на нашем сайте размещаются англоязычные полнотекстовые версии основной части экспериментальных статей.

Включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (Перечень ВАК) (по агрономии и лесному хозяйству, по зоотехническим и ветеринарным специальностям, а с 2007 года — также по биологическим наукам).

Динамичное развитие и высокий уровень публикаций определяют интерес к изданию и его признание в научной среде. Читатели журнала — ученые не только из России и стран СНГ, но и из Бразилии, Великобритании, Германии, Испании, Китая, Швейцарии, Японии.

С 1989 года журнал выходит двумя сериями:



Third International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development



Научные собрания



This is a web based event 25th - 27th October 2016

VACCINE ANTIGEN DELIVERY: NEW APPROACHES TO VACCINE DEVELOPMENT
(25-27 October 2016, ONLINE-INTERNATIONAL, United Kingdom)

Contact: <http://lifescienceevents.com/vaccine2016/>

Information: <http://www.globaleventslist.elsevier.com/events/2016/10/vaccine-antigen-delivery-new-approaches-to-vaccine-development/>