

**О. М. НЕВОЛЬКО**, кандидат ветеринарних наук

**М. І. СУШКО, М. А. САПАЧОВА, Л. В. МАРУЩАК, С. О. П'ЯТЕНКО**

*Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ, Україна*

## ДІАГНОСТИЧНІ СХЕМИ ВИКОРИСТАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ МЕТОДІВ ПРИ АФРИКАНСЬКІЙ ЧУМІ СВИНЕЙ

*У статті наведено аналіз лабораторних методів діагностики та діагностичні схеми їх використання при африканській чумі свиней з урахуванням форми перебігу хвороби, переваг та недоліків лабораторних методів діагностики.*

*Ключові слова: Африканська чума свиней, ізоляція та ідентифікація вірусу, гемадсорбція, реакція прямої імунофлуоресценції, імуноферментний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція, імуноблотинг, імунопероксидазна реакція, реакція непрямої імунофлуоресценції, швидкі тести на виявлення антитіл.*

**Африканська чума свиней (АЧС)** - високонкалібозна вірусна хвороба, яка характеризується надгострим, гострим, підгострим та хронічним перебігом, гарячкою, явищами геморагічного діатезу шкіри та внутрішніх органів, дистрофічними і некротичними змінами у різних органах. Хворіють дикі і домашні свині незалежно від віку та породи. Смертність може сягати 100 % [1].

Незважаючи на значні кошти, час і зусилля витрачені науковцями на розробку вакцини, на даний час ефективної вакцини проти АЧС не існує. Тому основними засобами контролю та ерадикації хвороби залишаються швидка, коректна діагностика та вжиття суворих ветеринарно-санітарних заходів.

На даний час розроблена велика кількість високочутливих і високоспецифічних методів діагностики АЧС. Проте вибір конкретного методу та інтерпретацію його результатів необхідно робити з врахуванням штаму, вірулентності вірусу та форми перебігу хвороби.

Слід мати на увазі, що сироватка крові є цінним матеріалом для дослідження і постановки діагнозу на АЧС. Виявлення антитіл однозначно свідчить про інфікованість тварини, оскільки відсутня вакцина. Антитіла проти вірусу виробляються на ранній стадії хвороби (7-12 днів після інфікування) і персистують протягом тривалого періоду [2].

Діагностика АЧС повинна бути направлена, паралельно, на виявлення вірусу (самого вірусу, його антигенів, геному) та антитіл проти нього [3].

Для дослідження в лабораторію надсилають: селезінку, лімфатичні вузли, мигдалеподібну залозу, нирки, сироватку крові, стабілізовану етилендіамінтетраоцтовою кислотою (ЕДТК) кров [4].

**Мета роботи:** Аналіз сучасних лабораторних методів діагностики, розробка діагностичних схем їх використання при африканській чумі свиней з урахуванням форми перебігу хвороби, переваг та недоліків лабораторних методів діагностики.

### Ізоляція та ідентифікація вірусу АЧС. Метод гемадсорбції.

Ізоляцію вірусу проводять шляхом інфікування дослідними зразками первинної культури моноцитів або макрофагів свині. Якщо дослідний зразок містить вірус, то він буде розмножуватися в культурі клітин спричиняючи цитопатичну дію.

Ідентифікацію вірусу АЧС проводять методом гемадсорбції, який базується на здатності вірусу розмножуватися в макрофагах і викликати гемадсорбцію (прилипання еритроцитів до поверхні клітини) еритроцитів свині, утворюючи характерні «розетки» навколо інфікованих клітин.

Ізоляцію вірусу на культурі клітин та його ідентифікацію методом гемадсорбції рекомендовано, як референт-метод для підтвердження позитивних результатів отриманих реакцією прямої імунофлуоресценції (РПФ), імуноферментним аналізом (ІФА) та полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР), особливо у випадку первинного спалаху хвороби. Вірус АЧС виділений на культурі свинячих макрофагів може бути використаний для вивчення його властивостей та секвенування.

#### Переваги методу:

- Метод є високочутливим і високоспецифічним, оскільки це єдиний вірус свиней, який здатний викликати гемадсорбцію.

#### Недоліки методу:

- Існує незначна кількість штамів вірусу, які не спричиняють гемадсорбції. Такі штами виявляють ПЛР або РПФ досліджуючи осад клітин.
- Метод ізоляції вірусу на культурі клітин не придатний для дослідження великої кількості зразків, із-за його трудомісткості.
- Необхідності від одного до трьох днів для отримання результатів. Крім того може знадобитися два додаткових пасажі для виявлення малої кількості вірусу і до 10 днів для отримання результатів.
- Зразки патологічного матеріалу, які піддалися аутолізу не придатні для дослідження, оскільки вони мають цитотоксичну дію на культуру клітин.
- Необхідна лабораторія з 3-м рівнем біобезпеки, для культивування вірусу.

### Реакція прямої імунофлуоресценції

Принцип методу полягає в мікроскопічному виявленні антигенів вірусу, в мазках відбитках або криозрізах органів, специфічними антитілами, які мічені флуоресцентним барвником. Антигени вірусу мають вигляд флуоресціюючих гранул або тілець включень, які знаходяться в цитоплазмі інфікованих клітин.

#### Переваги методу:

- Метод має високу чутливість при надгострому перебігу АЧС (діагностична чутливість 76-100 %, діагностична специфічність 99,9 %).
- Швидкий метод (за 2-3 години можна отримати результат).

#### Недоліки методу:

- При гострому, підгострому і хронічному перебігу чутливість методу знижується до 40 % в зв'язку з формуванням комплексу антиген-антитіло між антигенами вірусу і антитілами, які виробляються в організмі проти них, в результаті чого блокується взаємодія між антигенами вірусу і діагностичними, міченими флуоресцентним барвником антитілами.
- Не придатний для дослідження великої кількості зразків.
- Зразки патологічного матеріалу, які піддалися аутолізу не придатні для дослідження.

### **Виявлення антигену вірусу АЧС методом ІФА**

Метод оснований на сендвіч варіанті методу ІФА. Суть метода полягає в тому, що в лунки полістеролового планшета, на дні яких знаходяться адсорбовані моноклональні антитіла до вірусного білку VP73, додають дослідні зразки, якщо зразок містить антиген вірусу, то він зв'яжеться з моноклональними антитілами. Після промивання додають вторинні моноклональні антитіла до вірусного білку VP73 (специфічні до різних епітопів), які зв'язані з пероксидазою. Якщо лунка містить зафіксований антиген (моноклональними антитілами), то кон'югат (моноклональні антитіла зв'язані з пероксидазою) зв'яжеться з ним і після додавання відповідного субстрату, пероксидаза розщепить його з утворенням забарвлення.

#### **Переваги методу:**

- Придатний для дослідження великої кількості зразків.

#### **Недоліки методу:**

• Метод придатний лише для діагностики надгострої форми АЧС, при підгострій і хронічній формі його чутливість різко знижується, в зв'язку з формуванням комплексу антиген-антитіло між антигеном вірусу і антитілами, які виробляються в організмі проти них.

### **Виявлення геному вірусу АЧС**

Для виявлення геному вірусу АЧС використовують ПЛР. Суть методу полягає в ампліфікації фрагменту ДНК вірусу АЧС (висококонсервативного і наявного у всіх генотипів вірусу АЧС) до детектуючого рівня.

#### **Переваги методу:**

- Висока чутливість і специфічність (діагностична чутливість нижче 1 ГАД<sub>50</sub> (гемадсорбуюча одиниця), діагностична специфічність 99,9%)
- ПЛР дає можливість виявити вірус АЧС усіх відомих генотипів, включаючи віруси, які не спричиняють гемадсорбції та низьковірулентні віруси.
- ПЛР можна виявити вірус навіть тоді, коли це не вдається методом ізолювання вірусу на культурі клітин (наприклад, в зразках, які піддалися процесам аутолізу, в зразках від тварин, які переохворіли АЧС та є клінічно здоровими).

#### **Недоліки методу:**

- В наслідок високої чутливості можлива перехресна контамінація між зразками.
- Для методу необхідне коптовне обладнання.

### **Виявлення антитіл методом ІФА**

#### **Непрямий метод**

Суть метода полягає в тому, що дно лунок полістеролового планшета сенсibiliзують антигеном вірусу АЧС, потім в лунки додають дослідні зразки. Після промивання додають кон'югат (моноклональні антитіла, специфічні до комплексу антиген-антитіло, зв'язані з пероксидазою). Якщо дослідний зразок містить антитіла, то вони зв'яжуться з антигеном вірусу, який сенсibiliзований на дні лунок, утворюючи комплекс антиген-антитіло. З утвореним комплексом антиген-антитіло зв'яжеться кон'югат і після додавання відповідного субстрату, пероксидаза розщепить його з утворенням забарвлення.

Діагностична специфічність методу 97,3%, діагностична чутливість методу 95,8%.

#### **Блокуючий метод ІФА**

Суть метода полягає в тому, що в лунки, на дні яких адсорбований антиген вірусу АЧС, додають дослідні зразки, якщо зразок містить специфічні антитіла до вірусу АЧС, то вони зв'яжуться з антигеном, таким чином блокуючи зв'язування кон'югату (моноклональні антитіла, специфічні до антигену адсорбованого на дні лунок, зв'язані з пероксидазою), який додається в лунки на наступному етапі постановки методу. Зв'язування кон'югату з антигеном вірусу АЧС виявляють додаванням відповідного субстрату. Таким чином лунка з дослідним зразком, який містить антитіла до вірусу АЧС, не матиме забарвлення внаслідок блокування адсорбованого антигену, антитілами дослідного зразка, і неможливості приєднання кон'югату, який містить пероксидазу, необхідну для розщеплення субстрату і утворення забарвлення.

Діагностична специфічність методу 98%, діагностична чутливість методу 98%.

#### **Перевага методу:**

- Висока чутливість і специфічність методу.
- Можна дослідити велику кількість зразків за короткий час.

#### **Недоліки методу:**

- При дослідженні сироватки неналежної якості можуть бути хибно-позитивні результати.

### **Імуноблотинг**

Суть методу полягає в тому, що білки вірусу розділяють в поліакриламідному гелі, після чого їх переносять на нітроцелюлозний папір за допомогою постійної сили струму. Нітроцелюлозний папір розрізають на стріпи, кожен з яких містить білки вірусу, які розділені за молекулярною масою (IP 23.5, IP 25, IP 25.5, IP 30, IP 31, IP 34 та IP 35x10<sup>-3</sup>).

Стріпи поміщають у спеціальні ванночки, додають дослідні зразки. Якщо дослідний зразок містить антитіла специфічні до вірусу АЧС, то вони взаємодітимуть з різними вірусними білками, які знаходяться на нітроцелюлозному стріпі, формуючи комплекс антиген-антитіло. З утвореним комплексом антиген-антитіло зв'яжеться кон'югат (поліклональні антитіла зв'язані з пероксидазою) і після додавання відповідного субстрату, пероксидаза розщепить його з утворенням характерно забарвлених смужок, у місцях, де знаходяться відповідні білки. Результати дослідного зразка порівнюють з контролем.

#### **Переваги методу:**

- Висока чутливість, дає можливість виявити антитіла на 7-9 день після інфікування.

#### **Недоліки методу:**

• Не придатний для великої кількості досліджень, оскільки на приготування стріпів з вірусними антигенами необхідна значна кількість часу.

### **Імунопероксидазна реакція**

Суть методу полягає в тому, що лінію культури клітин Vero інфікують адаптованим до культури клітин штамом вірусу АЧС (Ва71V). Вірус розмножується і експресує свої білки в цитоплазму клітини і на поверхню клітинної мембрани. Моношар клітин

фіксують сумішшю метанолу з ацетоном і в подальшому використовують, як антиген для виявлення антитіл проти вірусу АЧС. В лунки з культурою клітин додають дослідні зразки. Якщо дослідний зразок містить антитіла до вірусу АЧС, то вони зв'язуються з вірусними антигенами, в цитоплазмі і на поверхні клітини, формуючи комплекс антиген-антитіло. Потім до лунок додають кон'югат (поліклональні антитіла зв'язані з пероксидазою), який зв'язується з комплексом антиген-антитіло і при додаванні відповідного субстрата, пероксидаза розщепить його з утворенням характерного забарвлення цитоплазми клітин.

**Переваги методу:**

- Висока чутливість та специфічність.
- Легка інтерпретація результатів.
- Можливість дослідження великої кількості зразків.

**Недоліки методу:**

- Значні затрати часу на приготування планшетів з інфікованою культурою клітин.
- Короткий термін зберігання підготовлених планшетів.

**Реакція непрямой імунофлуоресценції**

Метод оснований на зв'язуванні антитіл, проти вірусу АЧС, з вірусними антигенами, які експресуються на поверхні клітин інфікованої культури клітин адаптованим вірусом АЧС, з утворенням комплексу антиген-антитіло, який виявляють за допомогою поліклональних антитіл мічених флуоресцентним барвником. Позитивні зразки мають специфічну флуоресценцію біля ядра інфікованих клітин.

**Переваги методу:**

- Висока чутливість та специфічність.
- Можливість дослідження великої кількості зразків.

**Недоліки методу:**

- Значні затрати часу на приготування планшетів з інфікованою культурою клітин.
- Короткий термін зберігання підготовлених планшетів.
- Важча, в порівнянні з імунопероксидазною реакцією, інтерпретація результатів.

**Швидкі тести для виявлення антитіл**

Тести оснований на методі прямої імунохроматографії з використання моноклональних антитіл проти білку VP73 вірусу АЧС.

Тест являє собою пластиковий каркас з двома вікнами:

- Вікно для внесення зразків: містить білок VP73 і контрольний білок, які покриті кольоровими латексними частинками.
- Вікно для обліку результатів: має тестову зону (Т), в ділянці якої адсорбовано білок VP73 вірусу АЧС та контрольну зону, в ділянці якої адсорбовано моноклональні антитіла специфічні до контрольного білку.

Якщо дослідний зразок містить антитіла проти білку VP73 вірусу АЧС, то вони будуть взаємодіяти з білком VP73, який покритий червоними частинками латексу. Комплекс білок-антитіло-латекс буде рухатися вздовж мембрани і знову взаємодіяти з білком VP73, який адсорбований в тестовій зоні, в результаті чого в ділянці тестової зони з'явиться червона/рожева смужка. Появасиньої смужки в контрольній зоні, свідчить про правильне проведення тесту.

**Переваги методу:**

- Швидкість отримання результатів.

**Недоліки методу:**

- Нижча, в порівнянні з іншими серологічними методами, чутливість та специфічність.

**Висновки:**

При надгострій формі хвороби (викликається високовірулентними штамами вірусу, загибель через 24-48 год, після інфікування) патологічний матеріал рекомендовано досліджувати методом ПЛР, РПФ, ізоляцією та ідентифікацією на культурі клітин, якщо це первинний спалах хвороби.

За гострої форми хвороби (викликається високовірулентними штамами вірусу, загибель через 6-13 днів, можлива і на 20 день, після інфікування) патологічний матеріал рекомендовано досліджувати методом ПЛР, ізоляцією та ідентифікацією на культурі клітин, якщо це первинний спалах хвороби. Сироватки крові – ІФА, імуноблотингом, імунопероксидазною реакцією, реакцією непрямой імунофлуоресценції, швидкими тестами на виявлення антитіл.

За підгострої форми хвороби (викликається штамами вірусу середньої вірулентності, загибель через 15-45 днів, після інфікування) патологічний матеріал рекомендовано досліджувати методом ПЛР, ізоляцією та ідентифікацією на культурі клітин, якщо це первинний спалах хвороби. Сироватки крові – ІФА, імуноблотингом, імунопероксидазною реакцією, реакцією непрямой імунофлуоресценції, швидкими тестами на виявлення антитіл.

За хронічної форми хвороби (викликається штамами вірусу середньої та низької вірулентності) патологічний матеріал рекомендовано досліджувати методом ПЛР. Сироватки крові – ІФА, імуноблотингом, імунопероксидазною реакцією, реакцією непрямой імунофлуоресценції, швидкими тестами на виявлення антитіл.

Усі сироватки крові, які були досліджені в ІФА, як позитивні або сумнівні, обов'язково повинні бути досліджені одним із підтверджуючих методів (імуноблотинг, імунопероксидазна реакція, реакція непрямой імунофлуоресценції)

За підгострої та хронічної формах перебігу хвороби важливими є серологічні методи, оскільки тварини можуть перехворювати і залишатися носіями вірусу. Таких тварин необхідно швидко виявляти і знищувати для попередження поширення хвороби.

Необхідно пам'ятати, що методи, які направлені на виявлення антигенів вірусу (РПФ, ІФА-антиген), ефективні лише для діагностики надгострого перебігу хвороби. За гострому, підгострому і хронічному перебігу чутливість їх різко знижується в зв'язку з формуванням комплексу антиген-антитіло між антигенами вірусу і антитілами, які виробляються в організмі проти них.

**Список використаної літератури:**

1. Африканська чума свиней: еволюція та експансія. Науково-практичне видання/уклад: В. А. Прискока, В. М. Горжесв, В. О. Загребельний. К.: ДНДІЛДВСЕ, 2012. 167 с.
2. Ana Luisa Reis, R. M. E. Parkhouse, Ana Raquel Penedos, Carlos Martins and Alexandre Leitaо Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus Journal of General Virology (2007), 88, P. 426–2434.
3. OIE. May 2012, posting date. Chapter 2.8.1. African swine fever. In manual of diagnostics tests and vaccines for terrestrial animals 2012/ Word Organization for Animal Health, Paris, France // [http://www.oie.int/fileadmin/ Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.08.01\\_ASF.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.01_ASF.pdf)

**ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СХЕМЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ**

**СВИНЕЙ** / О. М. Неволько, Н. И. Сушко, М. А. Сапачова, Л. В. Марущак, С. О. Пятенко

*В статье представлен анализ лабораторных методов диагностики та диагностические схемы их использования при африканской чуме свиней с учетом формы протекания болезни, преимуществ и недостатков лабораторных методов диагностики.*

*Ключевые слова: Африканская чума свиней, изоляция та идентификация вируса, гемадсорбция, метод прямой иммунофлуоресценции, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, иммуноблоттинг, иммунопероксидазная реакция, реакция непрямой иммунофлуоресценции, быстрые тесты на определения антител.*

**DIAGNOSTICS SCHEMES OF USING LABORATORY METHODS FOR AFRICAN SWINE FEVER** / О. М. Nevolko, М. І. Sushko, М. А. Sapachova, L. V. Marushchak, S. O. Pyatenko

*The article presents analysis of laboratory methods of diagnostics and diagnostics schemes of their use for African swine fever with taking into account advantages and disadvantages of the laboratory methods of diagnostics.*

*Keywords: African swine fever, isolation and identification of a virus, haemadsorption, fluorescent antibody test, Enzyme-linked immunosorbent assay, polymerase chain reaction, Immunoblotting test, immunoperoxidase test, Indirect fluorescent antibody test, quick test for detection of antibodies.*

**Рецензент** - доктор ветеринарных наук **В. А. Прискока**.

Рукопис надійшов 16.09.2014 року.