

Ахунова Алсу Рузалевна

**РАЗРАБОТКА DIVA-СОВМЕСТИМЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ  
ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ  
КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в лаборатории вирусных антропозоонозов федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

**Научный руководитель – Ефимова Марина Анатольевна,**  
доктор биологических наук.

**Официальные оппоненты: Капустина Ольга Владимировна,**  
доктор ветеринарных наук, доцент,  
ФГБНУ «Федеральный научный центр –  
Всероссийский научно-исследовательский  
институт экспериментальной ветеринарии имени  
К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской  
академии наук», лаборатория иммунологии,  
ведущий научный сотрудник;

**Алексеев Константин Петрович,**  
кандидат биологических наук,  
ООО «Ветбиохим», отдел НИР, главный  
специалист по новым технологиям.

**Ведущая организация –** Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Защита состоится «23» апреля 2026 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.034.01 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д. 5, тел. 8(812) 388-36-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СПбГУВМ по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5., и на официальном сайте <http://spbguvm.ru>.

Автореферат разослан: «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Кузнецова Надежда Викторовна

## 1. Общая характеристика работы

**Актуальность.** Классическая чума свиней (КЧС) – высококонтагиозное вирусное заболевание, сопровождающееся гипертермией, геморрагическим синдромом, некротическими поражениями пищеварительного тракта, высокой летальностью. Заболеванию подвержены популяции домашних и диких свиней независимо от возраста и породы; животные-реконвалесценты остаются вирусоносителями (Сергеев В. А., 2018; Postel A., 2021; Оганесян А. С., 2022).

Возбудителем заболевания является оболочечный РНК-содержащий вирус, который относится к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*. Род *Pestivirus* включает в себя 11 видов, в частности, вирус КЧС, вирус вирусной диареи крупного рогатого скота (ВД КРС), вирус пограничной болезни овец (ПБО) – входят в перечень карантинных болезней, подлежащих обязательной регистрации и оповещению Всемирной организации охраны здоровья животных (Глотов А. Г., 2015; Gongal G., 2022; Аноятбекова А. М., 2023).

Несмотря на то, что последние вспышки КЧС на территории Российской Федерации (РФ) были зарегистрированы в 2020 г. в популяциях диких кабанов, страна до сих пор не имеет статуса зоны, свободной от КЧС, что препятствует включению в глобальный рынок экспорта свинины. Для признания благополучия по КЧС необходим отказ от вакцинации в течение не менее одного года при условии отсутствия вспышек заболевания или наличие возможности дифференцировать привитых свиней от зараженных (стратегия DIVA – Differentiating Infected and Vaccinated Animals), что должно подтверждаться достоверными лабораторными исследованиями федерального и регионального уровня (Алексеев К. П., 2019). Международная практика искоренения КЧС с отказом от вакцинации и масштабной выбраковкой популяций домашних свиней может иметь экономические, социальные и этические последствия (Сергеев В. А., 2018; Чернышев Р. С., 2025). Так, стратегия вакцинации и карантинирования как основных противоэпизоотических мероприятий в РФ лишь частично ограничивает распространение вируса среди популяции домашних свиней и кабанов (Шевцов А. А., 2021).

**Степень разработанности темы.** В настоящее время российский рынок средств для серологической диагностики КЧС представлен ограниченным количеством наименований и включает только ИФА-тест-системы, не учитывающие стратегию DIVA.

**Цель диссертационной работы** – разработать DIVA-совместимые тест-системы для экспресс-диагностики КЧС, а также методы технологического контроля вакцинного сырья с применением технологий рекомбинантных ДНК.

Для достижения поставленной цели были обозначены следующие **задачи**:

1. Провести биоинформационный анализ гликопротеинов E2 и Erns вируса КЧС для поиска основных иммунодоминантных пептидов;
2. Идентифицировать варианты вируса ВД КРС – контаминанты производственных клеточных линий свиного происхождения;
3. Сконструировать прокариотические (на основе *E. coli*) системы экспрессии рекомбинантных антигенов E2 и Erns вируса КЧС для серологической диагностики КЧС;
4. Разработать полуколичественную иммуоферментную тест-систему для технологического контроля специфичности вакцинного антигена E2 вируса КЧС;
5. Разработать иммуоферментную тест-систему на основе гликопротеина E2 вируса КЧС и прототип дифференцирующего теста на основе белка Erns вируса КЧС для серодиагностики КЧС;
6. Разработать прототип иммуохроматографического теста (ИХА) для экспресс-диагностики КЧС, совместимого со стратегией DIVA.

**Научная новизна работы.** Впервые были разработаны генетические конструкции, кодирующие модифицированные антигены вируса КЧС с высокой плотностью расположения В-клеточных эпитопов и содержанием мотивов большинства КЧС-специфических доменов, не имеющие гомологии с другими представителями рода *Pestivirus*. Впервые были сконструированы и депонированы в Государственную коллекцию микроорганизмов штаммы *E. coli* – продуценты рекомбинантных антигенов E2 и Erns для дифференциальной диагностики КЧС. Впервые в РФ были разработаны полуколичественная ИФА-тест-система для контроля качества рекомбинантного вакцинного сырья, а также прототип ИХА-теста для серологической диагностики КЧС в соответствии со стратегией DIVA и не обладающий кросс-реактивностью к антителам к вирусу ВД КРС.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Разработан «Набор для определения антител к вирусу классической чумы свиней иммуоферментным методом «КЧС-ИФА» (ТУ 21.10.60-009-00492374-2025) и «Тест-система «КЧС ИХА»» (ТУ 21.10.60-009-00492374-2024) на основе рекомбинантных антигенов прокариотического происхождения.

**Методология и методы исследования.** Методология диссертационной работы выстроена согласно цели и задачам исследования и включает в себя применение биоинформационных, молекулярно-генетических, генно-инженерных, вирусологических, протеомных, серологических, биохимических методов исследования, а также статистического анализа.

### **Положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Рекомбинантные штаммы *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET28a/E2 и BL21(DE3)pLysS/pET28a/Erns, экспрессирующие усеченные пептиды E2 и Erns вируса КЧС для дифференциальной серодиагностики, соответствующей стратегии DIVA, не имеющие гомологии с другими представителями рода *Pestivirus*;
2. Иммуноферментная тест-система для полуколичественного определения антигена вируса КЧС, позволяющая достоверно осуществлять производственный контроль качества рекомбинантного вакцинного сырья;
3. Иммуноферментная тест-система на основе гликопротеина E2 вируса КЧС, позволяющая достоверно выявлять антитела к вирусу КЧС в сыворотках крови свиней, и прототип дифференцирующего теста на основе белка Erns;
4. Прототип иммунохроматографического теста на основе антигенов E2 и Erns в бесприборном кассетном варианте, не обладающего кросс-реактивностью к антителам к ВД КРС.

**Достоверность результатов.** Представленные результаты исследований получены с использованием современной научно-технической базы, их достоверность подтверждается многократными воспроизводимыми экспериментами. Экспериментальные данные статистически достоверны, обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения «GraphPad Prism 7.0» («GraphPad Software Inc.», США), «MedCalc» («MedCalc Software Ltd», Бельгия).

**Апробация результатов.** Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» за 2023-2025 гг., на Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых аграрных образовательных и научных организаций России (ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина», г. Москва, 2024 г.), на международной научно-практической конференции «Современные проблемы и достижения зооветеринарной науки» (ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ», г. Казань, 2024 г.), на международной научно-практической конференции «Обеспечение технологического суверенитета АПК: подходы, проблемы, решения» (ФГБОУ ВО «УрГАУ», г. Екатеринбург, 2024 г.), на международных научно-практических конференциях «Инновационные решения актуальных вопросов биологической, токсикологической и радиационной безопасности для АПК» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, 2024-2025 г.).

**Место выполнения работы и личный вклад соискателя.** Работа выполнена в период с 2023 по 2025 гг. в лаборатории вирусных антропоозонозов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Масс-спектрометрический анализ белков выполнен на базе ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России ст. науч. сотр., канд. хим. наук А. С. Гладчуком. Автором диссертации совместно с

научным руководителем определены цель и задачи исследования, сформулированы выводы. Личный вклад диссертанта заключался в анализе и обработке литературных данных, выполнении лабораторных исследований, получении и обработке статистических данных, подготовке публикаций.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, и 4 статьи, опубликованные в сборниках материалов конференций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц и 26 рисунков, включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследований», «Обсуждение результатов», «Выводы», списки сокращений, использованной литературы (всего 213 источников, из них 164 на иностранных языках) и иллюстративного и табличного материала.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Диссертация соответствует паспорту научной специальности: 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных по пунктам 4, 7, 19.

## **2. Основное содержание работы**

### **2.1 Материалы и методы исследования**

#### **2.1.1 Нормативные документы**

При работе с ПБА, объектами генной инженерии и лабораторными животными руководствовались нормативными документами и международными стандартами.

#### **2.1.2 Штаммы, плазмиды и клеточные линии**

В работе были использован следующий перечень штаммов микроорганизмов, плазмидных векторов и клеточных линий – штамм «Ши-Мынь» вируса КЧС, штамм «Арский» вируса болезни Ауески, штамм «NADL» вируса ВД КРС, штамм «Овечий ГНКИ» и «CVS» вируса бешенства, штамм *E. coli* BL21 (DE3), штамм *E. coli* Rosetta 2(DE3), штамм *E. coli* DH5 $\alpha$ , плаزمида pET-28a(+), клетки почки эмбриона свиньи (PK-15).

#### **2.1.3 Вирусологические методы**

Все работы с патогенами вирусного происхождения проводились в условиях лаборатории вирусных антропоозоонозов (санитарно-эпидемиологическое заключение на проведение экспериментальных и диагностических работ с ПБА II-IV групп патогенности № 77.ПЧ.01.000.М.000077.11.22 от 16.11.2022).

#### **2.1.4 Биоинформационные методы**

Для анализа геномов целевых возбудителей использовали последовательности 70 геномов и протеомов эпизоотически значимых и вакцинных штаммов и изолятов целевых возбудителей, депонированных в базе данных Национального центра биотехнологической информации Genbank (NCBI, NIH, США).

#### **2.1.5 Методы генной инженерии**

Фрагменты нуклеотидных последовательностей генома вируса КЧС, кодирующие белки E2 и Erns, были оптимизированы по кодонам без изменения аминокислотного состава и синтезированы на аутсорсе (ЗАО «Евроген», Россия). Фрагменты генов E2 и Erns были клонированы в векторы pET-28a(+) по сайтам рестрикции *BamHI/EcoRI*. Идентичность созданных конструкций подтверждали секвенированием ДНК по Сэнгеру и рестрикционным анализом.

#### **2.1.6 Выделение и очистка рекомбинантных белков**

Размороженную клеточную массу штамма-продуцента ресуспендировали в лизирующем буфере и разрушили при помощи ультразвукового гомогенизатора «Vandelin Sonopuls HD 2070».

Протокол проведения металл-хелатной аффинной хроматографии заключался в следующем: супернатант дезинтегрированного лизата подвергали аффинной хроматографии на колонке с сефарозой, содержащей никель-нитрилтриуксусную кислоту (Ni-NTA) («Qiagen», США) по стандартному протоколу (Бондарюк Е. В., 2014).

Выделение телец включения (ТВ) и рефолдинг нерастворимой фракции белков проводили путем лизиса и соникации клеточного осадка, солюбилизации ТВ, экстракции белка и его рефолдинга в различных условиях, инициирующих ренатурацию белка в биологически активную форму. Об успешности рефолдинга судили по обнаружению через 18-20 ч ренатурированных мономерных форм целевого белка, а также по степени мутности раствора, свидетельствующей об агрегации.

Дополнительно идентификацию белков осуществляли путем сопоставления экспериментально полученных фрагментных масс-спектров обнаруженных пептидов с теоретическими, находящимися в базе данных, посредством программного обеспечения «Peaks Studio X+» (версия 8.5, «Bioinformatics Solutions Inc.»), Канада).

### **2.1.7 Конструирование серологических тест-систем**

**Постановка иммуноферментного анализа.** Схемы проведения антигенного/антительного вариантов ИФА следующие: сенсибилизация иммуноглобулинами против вируса КЧС/рекомбинантным антигеном в концентрациях от 10 до 200 мкг/мл на 0,02 М КББ в течение 16-20 ч при 4 °С либо 3 ч при 37 °С, 3-хкратная отмывка 0,01 М ФБР-Т, внесение образцов анализируемых антигенов/сывороток в разведении 1:10 на ФБР-Т, 1 ч при 37 °С, 3-хкратная отмывка 0,01 М ФБР-Т, внесение конъюгата и инкубация 1 ч при 37 °С, 3-хкратная отмывка 0,01 М ФБР-Т, проявка субстратным раствором ТМБ в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте и остановка реакции 0,1 М раствором серной кислоты с последующим спектрофотометрическим учетом результатов при длине волны 450 нм.

**Синтез наночастиц коллоидного золота.** Синтез наночастиц коллоидного золота (НчКЗ) с различными диаметрами осуществляли по модифицированному методу Туркевича-Френса (Frens G., 1973). Контроль размерности и гомогенности частиц осуществляли методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

**Получение конъюгатов на основе наночастиц коллоидного золота.** Конъюгирование белков с НчКЗ осуществляли модифицированным методом нековалентной сшивки. Эффективность иммобилизации контролировали при помощи количественного ИФА, определяя концентрацию сорбируемых белков до внесения в золь и в надсадке после центрифугирования.

**Постановка иммунохроматографического анализа.** Исследуемый анализ наносили в объеме 100 мкл на тест-полоску или в окно для образца на пластиковой тест-кассете, после чего инкубировали тест-систему в течение 3-5 мин при комнатной температуре и проводили учет реакции по визуальной регистрации иммуноокрашенных комплексов разных оттенков бордового цвета.

### **2.1.8 Методы статистического анализа**

Применяли параметрические и непараметрические методы анализа выборок варьирующих переменных. Для вычислительных операций и построения графиков использовали программное обеспечение «Statistica 6.0» («StatSoft», США) и Microsoft Excel. Использовали пакет статистического программного обеспечения «MedCalc» для анализа кривых ROC. Анализ и визуализацию данных масс-спектрометрии проводили с помощью программного обеспечения «Peaks Studio X+».

## 2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.2.1. Дизайн антигенных композиций на основе фрагментов гликопротеинов E2 и Erns вируса КЧС

Для анализа были использованы последовательности 70 геномов и протеомов эпизоотически значимых и вакцинных штаммов и изолятов вируса КЧС (*Pestivirus C*) из базы данных Genbank. Был проведен поиск основных иммуногенных эпитопов с подтвержденной иммуногенностью для целевых животных – свиней. Согласно данным BLAST-анализа, проведенного относительно протеомов эпизоотически значимых штаммов и изолятов вируса КЧС, уровень гомологии данной последовательности разных штаммов варьирует на уровне от 89,0 % до 98,5 %.

Степень биологического сходства вирусов ВД КРС и КЧС создает проблему для идентификации вирусного материала, так как возбудитель ВД КРС – широко распространенный скрытый контаминант клеточных культур (Алексеев С. В., 2013). В связи с тем, что вирус ВД КРС культивируется на клетках свиного происхождения (РК-15) и многие средства для профилактики и диагностики КЧС имеют культуральное происхождение, необходимо проводить тщательный контроль контаминации производственных клеточных линий.

Было обнаружено, что во всех пассажных линиях РК-15 присутствует контаминация ВД КРС (Рисунок 1).

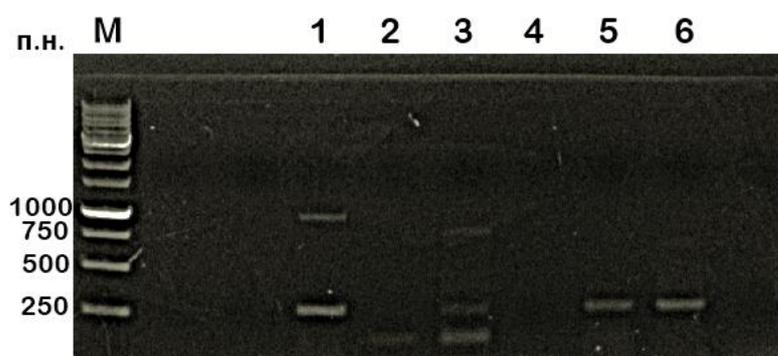


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации вариантов вируса ВД КРС – контаминантов различных пассажных линий РК-15.

Примечание: треки: М – маркер длин ДНК «1 kb DNA ladder» (ЗАО «Евроген», Россия), треки 1, 3, 5, 6 – результаты амплификации образцов разных пассажных линий ПКЛ РК-15

Согласно результатам секвенирования высококонсервативной 5'-UTR нетранслируемой области, контаминант всех пассажных линий РК-15 принадлежит к субгенотипу 1a. Результаты секвенирования контаминанта РК-15/1 по гену E2 показали высокую гомологию аминокислотной последовательности по отношению к таковому большинству эпизоотически значимых и вакцинных штаммов и

изолятов вируса КЧС. При дизайне антигенной композиции на основе E2 необходимым условием является отсутствие эпитопов, гомологичных с ВД КРС.

Были оптимизированы параметры адаптации кодонов и GC-состав. Так, дикие типы генов E2 и Erns содержали редкие кодоны, которые могут отрицательно сказываться на экспрессии, поэтому последовательности были оптимизированы. Для повышения стабильности мРНК гена также было уменьшено содержание GC-пар.

Таким образом, анализ разработанных конструкций с использованием биоинформационных веб-инструментов показывает ее стабильность и отрицательный индекс GRAVY, отмечается оптимальный расчетный период полураспада для экспрессии в дрожжевых и прокариотических системах, высокая плотность расположения В-клеточных эпитопов и содержание антигенных мотивов большинства КЧС-специфических доменов, не имеющие гомологии с другими представителями пестивирусов.

### **2.2.2 Получение рекомбинантных белков E2 и Erns в прокариотической системе экспрессии**

**Создание экспрессионных векторов.** Сконструированные нуклеотидные последовательности были клонированы в состав экспрессионного вектора pET-28a(+). Трансформацию экспрессирующего штамма *E. coli* BL21(DE3) производили методом теплового шока в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  с селекцией клонов.

После соникации клеточных осадков и скрининге растворимости было установлено, что оба штамма обеспечивают достаточно высокие уровни экспрессии целевых белков, соответствующих своим расчетным молекулярным массам: для E2 – 22 кДа, для Erns – 13,7 кДа. E2 был представлен как растворимой, так и нерастворимой формами, тогда как Erns обнаруживался преимущественно в нерастворимой форме.

При экспрессии вирусных белков в *E. coli* накопление химерного продукта в большинстве случаев происходит в виде ТВ в связи с тем, что сложные белки образуют агрегаты неактивного целевого продукта с включением балластных соединений клетки-производителя. С целью оптимизации параметров экспрессии и увеличения выхода растворимого белка мы применяли различные способы индукции, оценивая при этом количество и степень растворимости целевого продукта. Так, продукцию растворимых удалось достичь лишь при снижении концентрации ИПТГ (0,1 мМ) и культивировании при пониженной температуре (25 °С), однако суммарный выход белка при этом снижался в 4-7 раз. При уровне экспрессии 28-30 мг белка на 1 л культуры более 70 % продукта аккумулировалось в ТВ. При индукции экспрессии гликопротеина Erns было установлено, что более

90 % целевого белка экспрессируется преимущественно в нерастворимой форме (в виде ТВ).

Несмотря на то, что в рассматриваемой системе экспрессии невозможно избежать образования ТВ, восстановить биологическую активность белков можно путем подбора оптимальных методик солюбилизации телец-включения, экстракции белка и дальнейшего его рефолдинга.

Было установлено, что при добавлении в лизирующий буфер мочевины в концентрации 6 М, увеличении времени лизиса до 2 ч и последующем озвучивании большая часть белка переходит в растворимую форму, при этом эффективно связываясь с сорбентом, предварительно уравновешенным аналогичным буфером. Связавшиеся белки также элюировали возрастающими (до 300 мМ) концентрациями имидазола. На заключительном этапе очистки белков был проведен диализ против убывающих концентраций мочевины: 1,5 М, 0,5 М, 0,1 М. После этого ренатурированный белок был пригоден для проведения серологических реакций (Рисунок 2).

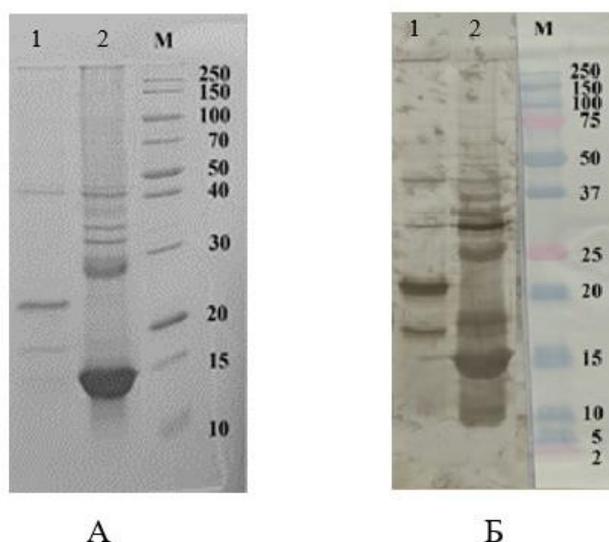


Рисунок 2 – Оценка специфичности рекомбинантных белков E2 и Erns.  
Примечание: А – электрофореграмма, окрашивание по Кумасси, треки: 1 – ТВ E2; 2 – ТВ Erns; М – маркер молекулярной массы белков PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, 5-250 кДа («Thermo FS», США);  
Б – вестерн-блоттинг, треки: 1 – ТВ E2; 2 – ТВ Erns; М – маркер молекулярных масс Precision Plus Dual Xtra, 2-250 кДа («Bio-Rad», США)

По результатам анализа ВЭЖХ-МС/МС были достоверно идентифицированы 23 пептида, относящихся к белку E2, и 11 пептидов, относящихся к белку Erns. Схемы покрытия аминокислотных последовательностей представлены на рисунке 3.

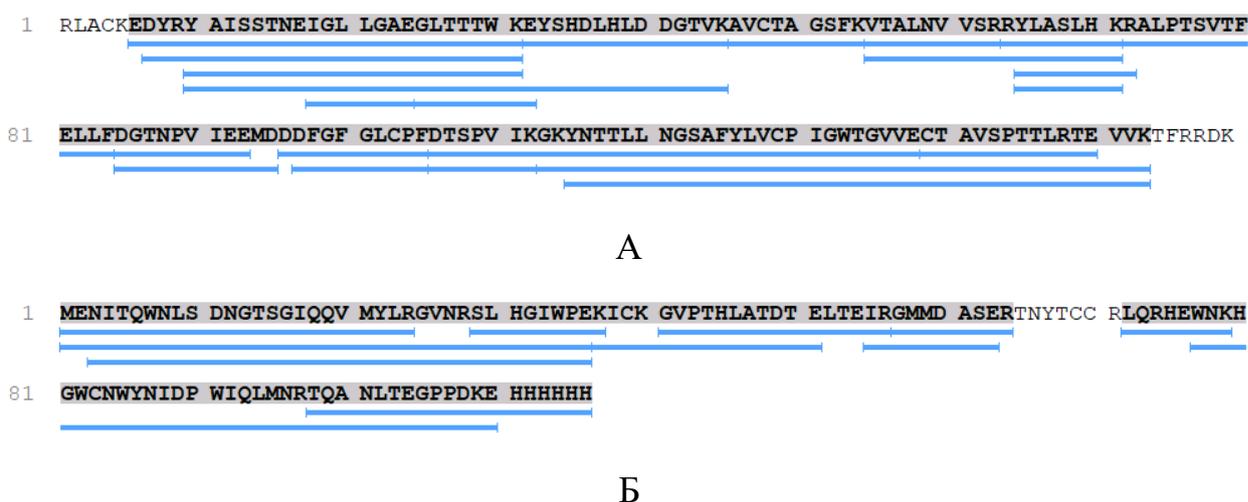


Рисунок 3 – Схемы покрытия аминокислотных последовательностей гликопротеинов E2 (А) и Erns (Б) по результатам обработки данных, полученных в ходе ВЭЖХ-МС/МС анализа гидролизатов белка.

Примечание: синими отрезками отмечены обнаруженные пептиды

Согласно представленным схемам, степень покрытия эталонных последовательностей составила 93 % для белка E2 и 94 % для белка Erns. Таким образом, по данным результатам можно сделать вывод о подлинности рекомбинантных аналогов антигенов вируса КЧС.

В ходе оценки пригодности рекомбинантных антигенов для серологической диагностики была подтверждена правильность фолдинга полипептида Erns и стерическая доступность его ключевых эпитопов, позволяющих специфически связываться с антителами к КЧС, а также подтверждается антигенная активность рефолдированного E2.

### 2.2.3 Разработка полуколичественного ИФА для производственного контроля качества вакцинного сырья различного происхождения

Для контроля сырья для производства рекомбинантных субъединичных вакцин также необходим доступный и эффективный метод определения концентрации специфического белка.

**Оптимизация протокола постановки ИФА.** На первом этапе исследований нами были отработаны условия постановки ИФА. Постановку непрямого ИФА осуществляли с использованием выборки образцов, включающей рабочие посевные вирусы (n=72), нативного гликопротеина E2 вируса КЧС (n=24), патологический материал свиней, экспериментально зараженных вирусом КЧС (n=15), и биомассу штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET28a/E2 на разных этапах процесса экспрессии белка (n=34).

В результате исследований было выявлено, что оптимальная сенсibiliзирующая концентрация вирус-специфических антител составляет

30 мкг/мл ( $\approx 300$  нг на лунку). Выбор режима сенсibilизации (3 ч при 37 °С или 12-16 ч при 4 °С) не приводил к статистически значимым различиям в ОП анализов. Оптимальная концентрация конъюгата составила 2 мкг/мл ( $\approx 20$  нг на лунку), что соответствует разведению исходного конъюгата 1:3200.

#### Определение аналитических характеристик тест-системы.

Для дифференциации специфических и неспецифических реакций тестировали заведомо положительные и заведомо отрицательные образцы, для которых рассчитывали среднеарифметическую оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм (ОП<sub>450</sub>). Для положительных образцов данное значение составило 1,492 оптических единиц (ОЕ), для отрицательных – 0,126 ОЕ. Вычисленный позитивно-негативный порог (ПНП), отражающий верхний предел для отрицательных образцов, был равен 0,146 ОЕ, тогда как нижний предел для положительных образцов достигал 0,296 ОЕ. Промежуточные значения рассматривались как сомнительный результат.

Для определения чувствительности тест-системы антигены (нативный и рекомбинантный гликопротеины E2) вносили в лунки сенсibilизированных планшетов в разведениях от 1:10 до 1:20480 и анализировали согласно оптимизированному протоколу ИФА (Рисунок 4).

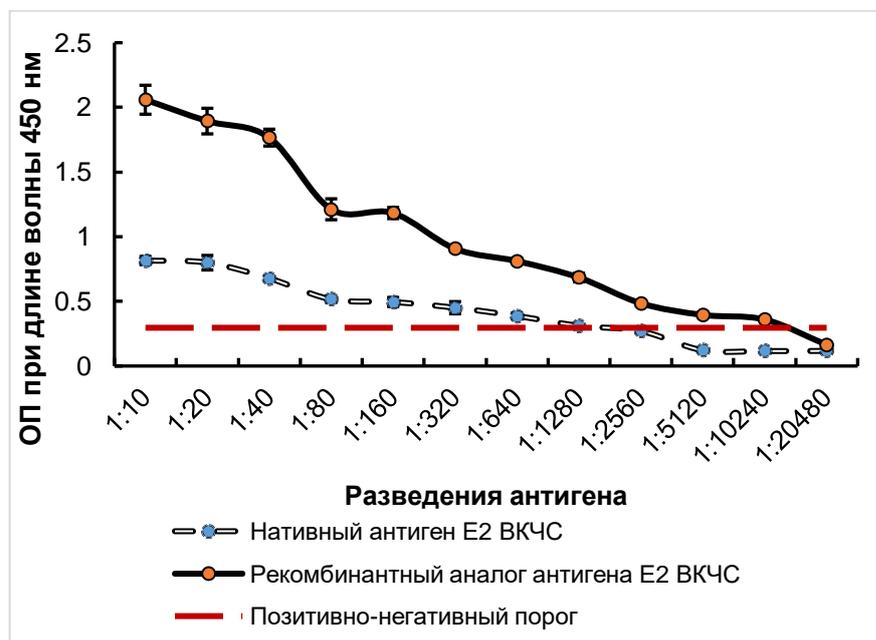


Рисунок 4 – Определение аналитической чувствительности ИФА.

Примечание: Красной линией обозначен нижний порог положительных значений (0,296 ОЕ)

Выявили, что предел аналитической чувствительности тест-системы по концентрации белка составляет 85 нг/мл, по инфекционному титру вируса – 1,2 lg ККИД<sub>50</sub>/мл.

Для оценки диагностической эффективности тест-системы нами была проанализирована выборка из более 200 образцов сырья, используемого в производстве иммунобиологических препаратов, и 30 отрицательных (гетерологичных) образцов, каждый из которых был исследован в трипликатах. Результаты демонстрируют 100 % специфичность. Примечательно также то, что тест-система позволила установить факт экспрессии рекомбинантного гликопротеина в прокариотической системе и дифференцировать его локализацию: так, биомасса штамма-продуцента *E. coli* до индукции экспрессии не проявляла антигенной активности, однако образцы надосадка биомассы (среда LB) после индукции специфически реагировали с анти-КЧС глобулинами в предельном титре 1:20, а непосредственно клетки после обработки лизирующим раствором обладали активностью, сопоставимой с таковой нативного гликопротеина E2.

**Валидация методики.** Достоверность результатов, полученных с применением тест-системы, оценивали при помощи ROC-анализа. При исследовании антигенов самую высокую диагностическую чувствительность (100 %) с 95 % доверительным интервалом (ДИ) между 93,4 и 100% в сочетании с самой высокой специфичностью 99,54 % (95 % ДИ: 97,4 – 100%) наблюдали при значении cutoff 0,283. Значения площади под ROC-кривой (AUC) – 0,999; стандартная ошибка – 0,000892; 95 % доверительный интервал – от 0,985 до 1,000; Z-статистика – 559,441; уровень значимости P (площадь = 0,5) < 0,0001. Индекс Юдена: индекс J – 0,9954; ассоциированный критерий > 0,283.

Результаты валидации свидетельствуют о том, что разработанная тест-система позволяет достоверно производить производственный контроль качества рекомбинантного вакцинного сырья.

#### **2.2.4 Разработка дискриминационного ИФА для определения уровня антител к вирусу КЧС**

Первой задачей при разработке дискриминационного ИФА явилось конструирование ИФА-теста для серодиагностики КЧС, основанного на применении усеченного пептида E2.

При оптимизации протокола постановки ИФА была установлена концентрация сенсibiliзирующего антигена, оптимальное разведение тестируемых сывороток и разведение антивидового пероксидазного конъюгата составили 2 мкг/мл, 1:20 и 1:10000 соответственно. При применении «Coating Stabilizer and Blocking buffer» при обработке сенсibiliзированных планшетов удавалось добиться максимального снижения фонового сигнала до 70,2 % (в образцах, классифицируемых как ложноположительные в протоколе без блокировки).

**Определение позитивно-негативного порога.** Для положительных образцов данное значение составило 1,397 ОЕ, для отрицательных – 0,13 ОЕ. Вычисленный ПНП, отражающий верхний предел для отрицательных образцов, был равен 0,174 ОЕ, тогда как нижний предел для положительных образцов достигал 0,24 ОЕ. Промежуточные значения рассматривались как сомнительный результат.

Критерии разграничения результатов реакции определялись согласно величине коэффициента ингибиции ( $K_{инг}$ ):

$$K_{инг} = ((A_{450}ОП_{ср} - A_{450}K_{-ср}) / (A_{450}K_{+ср} - A_{450}K_{-ср})) \times 100 \%$$

В случае, если величина  $K_{инг}$  не превышала 40 %, пробу считали отрицательной, если превышала – положительной.

Предел аналитической чувствительности тест-системы по концентрации белка составляет  $\approx 190$  нг/мл, что соответствует разведению глобулина 1:2560.

В ходе работы была проанализирована выборка из 173 иммунных и 76 нормальных полевых сывороток свиней. Результаты демонстрировали высокую специфичность.

**Валидация методики при помощи ROC-анализа.** Полученные первичные данные также были обработаны с применением инструментов ROC-анализа. При исследовании сывороток крови свиней самую высокую диагностическую чувствительность (98,27 %) с 95 % ДИ между 95,0 и 99,6 % в сочетании с самой высокой специфичностью 93,42 % (95 % ДИ: 85,3 - 97,8 %) наблюдали при значении cutoff 0,1995. Здесь мы предусмотрели зону сомнительных результатов, а порог отсечки составил 40 %. Значения площади под ROC-кривой (AUC) – 0,951; стандартная ошибка – 0,0197; 95 % доверительный интервал – от 0,916 до 0,974; Z-статистика – 22,887; уровень значимости P (площадь = 0,5) < 0,0001. Индекс Юдена: индекс J – 0,9169; ассоциированный критерий >0,1995.

Результаты валидации свидетельствуют о том, что разработанная тест-система на основе рекомбинантного гликопротеина E2 при установленных параметрах позволяет достоверно выявлять антитела к вирусу КЧС в сыворотках крови иммунизированных и инфицированных свиней.

**Конструирование прототипа дифференцирующего теста для серодиагностики КЧС на основе белка Erns вируса КЧС.**

**Оптимальные концентрации специфических компонентов.** Было установлено, что сенсibiliзирующая концентрация антигена Erns составила 3 мкг/мл ( $\approx 30$  нг на лунку); прочие условия сенсibiliзации и проведения реакции были аналогичны описанным ранее.

Для оценки пригодности тест-системы к дифференциальной диагностике вируса КЧС был проведен непрямой ИФА с сыворотками свиней,

иммунизированных традиционными вакцинами, применяемыми на территории России, а также рекомбинантным гликопротеином E2 производства ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Таблица 1).

Таблица 1 – Результаты исследования сывороток свиней на наличие антител к Erns в непрямом ИФА

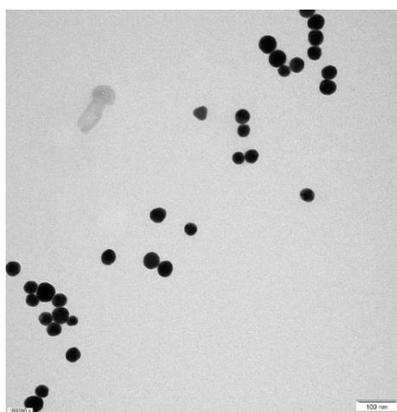
Наименование образца	Диапазон S/P	Интерпретация результата
Сыворотки интактных свиней (n = 3)	0,15 – 0,25	Отрицательный
Позитивно-негативный порог	0,4	< 0,4 – отрицательный 0,4 – 0,5 – сомнительный > 0,5 – положительный
Сыворотки свиней, иммунизированных вакциной «КС» (ООО «Ветбиохим») (n = 24)	0,65 – 1,2	Положительный
Сыворотки свиней, иммунизированных вакциной «ЛК-ВНИИВВиМ» (n = 6)	0,7 – 1,1	Положительный
Сыворотки свиней-реконвалесцентов после экспериментального заражения вирусом КЧС (n = 3)	0,8 – 1,5	Положительный
Сыворотки свиней, иммунизированных рекомбинантным гликопротеином E2 (n = 12)	0,19 – 0,35	Отрицательный

По данным в таблице установлено, что рекомбинантный гликопротеин Erns позволяет выявлять специфические антитела в сыворотках свиней, иммунизированных традиционными (живыми аттенуированными) вакцинами, а также в сыворотках реконвалесцентов, при этом результаты исследования сывороток свиней, иммунизированных гликопротеином E2, интерпретированы как отрицательные. Полученные результаты подтверждают принципиальную возможность дифференцирования при помощи полученного рекомбинантного антигена Erns переболевших животных от животных, иммунизированных только гликопротеином E2 в монорежиме.

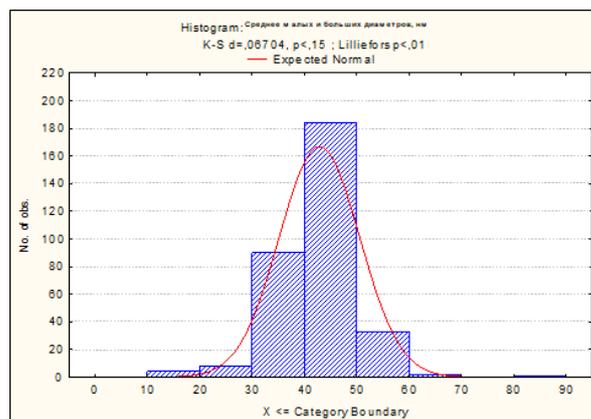
### 2.2.5 Разработка прототипа ИХА-теста для серологической диагностики вируса КЧС

Задачей заключительного этапа исследований явилось конструирование прототипа ИХА-теста с возможностью применения дополнительного (дискриминирующего) антигена.

Для получения стабильных неагрегирующих частиц коллоидного золота применяли метод Френса. Электронная микрофотография полученных НчКЗ, а также гистограмма их распределения по размерам представлена на рисунке 5.



А



Б

Рисунок 5 – (А) Фрагмент изображения НчКЗ на электронной микрофотографии; (Б) Гистограмма распределения частиц по размерам

Анализ полученных препаратов с помощью электронной микроскопии продемонстрировал высокую гомогенность размеров частиц и близость их формы к сферической: длина большей оси составила  $37 \pm 8$  нм, меньшей оси –  $30 \pm 5$  нм, средний диаметр полученных частиц составил  $42,44 \pm 7,48$  нм.

В связи с тем, что ИХА-тест для обнаружения вирусспецифических антител может быть реализован в нескольких вариантах, которые отличаются порядком формирования окрашенных иммунокомплексов на рабочей мембране, нами были рассмотрены традиционная и обратная схемы, ранее изложенные в работе Сотникова Д. В. (Сотников Д. В., 2016) и адаптированные к нашей системе иммуноанализа (Таблица 2).

Таблица 2 – Схемы постановки ИХА

Компоненты	Традиционная схема	Обратная схема
Аналит	Антитела в тестируемом образце сыворотки	
Конъюгат на основе НчКЗ	С антивидовыми антителами	С антигеном E2
Аналитическая зона	Иммобилизованный антиген E2 (классический вариант) Иммобилизованный антиген Erns (дифференцирующий вариант)	Иммобилизованные антивидовые антитела
Контрольная зона	Антивидовые антитела	КЧС-специфические поликлональные антитела

Исходя из данных вариантов ИХА, мы определили стабилизирующие концентрации антивидовых антител и антигенов E2, Erns: для представленных НчКЗ со средним диаметром 42 нм они составили 5 мкг/мл, 20 мкг/мл и 40 мкг/мл соответственно. Данные концентрации обеспечивали стабильность НчКЗ в растворах с высокой ионной силой и были применены при конъюгировании методом простой нековалентной сшивки.

Для оценки пригодности конъюгатов для диагностических целей были изготовлены два типа аналитических мембран (по схемам, изложенным в таблице 22), на которые в виде полос либо дотов были нанесены специфические компоненты. Первичная оценка показала, что применение обратной схемы ИХА с конъюгатом на основе антигена Е2 обеспечивало проявление ярко окрашенных дискретных полос либо дотов (Рисунок 6), тогда как при тестировании традиционной схемы регистрировались ложноположительные результаты образцов, классифицированных по результатам ИФА как отрицательные либо сомнительные.



Рисунок 6 – Первичная оценка диагностической эффективности конъюгата в обратной схеме ИХА.

Это может быть связано с ограничениями традиционной схемы ИХА, например, с ослаблением взаимодействия присутствующими в образце неспецифическими антителами, тогда как иммобилизация специфических антигенов на поверхности НчКЗ, предлагаемая в обратной схеме, позволяет связать все специфические антитела в образце, тем самым исключая конкуренцию специфических и неспецифических антител (Сотников Д. В., 2016). Применение конъюгата на основе Erns в обратной схеме ИХА было менее эффективным: неспецифических взаимодействий не наблюдалось, однако чувствительность реакции значительно понизилась.

При дальнейшей оптимизации ИХА-теста нами была выявлена оптимальная концентрация антивидовых антител – 10 нг/см<sup>2</sup> рабочей мембраны, кратность пропитки подложки конъюгатом – двукратная с исходной концентрацией 50 мкг/мл, разведения образцов – 1:1 – 1:50. Температура и время сенсibilизации, время высушивания подложек после пропитки конъюгатом – не влияют на аналитические характеристики тест-системы.

### 3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

#### 3.1 Итоги исследований

1. В протеоме вируса КЧС определены участки с высокой плотностью расположения В-клеточных эпитопов (для гликопротеина E2 локализуются на участках 8-13, 141-170, 254-259, 818-828, 844-865, 869-878, 985-999 а.о.; для гликопротеина Erns – 31-39, 64-72, 101-130 а.о.) и содержанием антигенных мотивов большинства КЧС-специфических доменов, не имеющие гомологии с другими представителями пестивирусов (829-837, 834-848, 842-856 а.о.). Проведенный дизайн усеченных пептидов E2 и Erns позволяет осуществить дифференциальную диагностику КЧС, что соответствует стратегии DIVA.

2. 1. Результаты секвенирования вируса ВД КРС – контаминанта перевиваемых клеточных линий свиного происхождения – по высококонсервативной области 5'UTR и фрагменту гена E2, определили его как субгенотип 1a. Его аминокислотная последовательность продемонстрировала высокую степень идентичности (от 89,9 до 92,8 %) с таковой у большинства значимых в эпизоотическом отношении, а также вакцинных штаммов и изолятов вируса КЧС.

3. Сконструированы и депонированы в Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» рекомбинантные штаммы *E. coli* – продуценты аналогов гликопротеинов E2 и Erns вируса КЧС; подлинность последних подтверждена масс-спектрометрическим анализом с покрытием аминокислотных последовательностей 93 % и 94 % соответственно.

4. Разработана антигенная полуколичественная ИФА-тест-система, которая позволяет осуществлять производственный контроль качества рекомбинантного антигенного сырья с пределом чувствительности 85 нг/мл и специфичностью 99,54 % (95 % ДИ: 97,4-100 %), что составляет 0,17 % от предполагаемого содержания антигена в сенсibiliзирующем растворе и 0,085 % – от предполагаемого содержания антигена в рекомбинантной субъединичной вакцине (производства ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»).

5. Разработана антительная иммуноферментная тест-система на основе гликопротеина E2 вируса КЧС с чувствительностью 98,27 % (95 % ДИ: 95,0-99,6 %) и специфичностью 98,68 % (ДИ 92,9-100,0 %). Разработана и оценена диагностическая эффективность дискриминирующего ИФА-теста на основе гликопротеина Erns: полученные результаты подтверждают принципиальную возможность дифференцирования переболевших и традиционно иммунизированных животных (цельновирионными вакцинами) от животных, иммунизированных только гликопротеином E2 в монорежиме (маркированными вакцинами).

6. Разработанный прототип ИХА-теста для экспресс-серодиагностики КЧС имеет аналитическую чувствительность  $\approx 200$  нг/мл (для антигена E2) и  $\approx 290$  нг/мл (для антигена Erns) и не обладает кросс-реактивностью к антителам к вирусу ВД КРС.

### **3.2 Практические рекомендации**

Штаммы *E. coli* – продуценты фрагментов гликопротеина E2 и Erns вируса КЧС депонированы в Отделе – Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и могут быть использованы в производстве ИФА и ИХА тест-систем для диагностики КЧС.

Разработаны и задекларированы «Набор для определения антител к вирусу классической чумы свиней иммуноферментным методом «КЧС-ИФА» (ТУ 21.10.60-009-00492374-2025) и «Тест-система «КЧС ИХА»» (ТУ 21.10.60-009-00492374-2024). Разработана и внедрена в лабораторную практику в качестве внутреннего стандарта организации ИФА-тест-система для технологического контроля специфичности рекомбинантного антигена E2, входящего в состав субъединичной вакцины против КЧС, разрабатываемой в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Описанные в диссертационной работе подходы к рекомбинантному синтезу аналогов гликопротеинов вируса КЧС в дальнейшем могут быть использованы в конструировании рекомбинантных субъединичных вакцин.

### **3.3 Перспективы дальнейшей разработки темы**

Представленные результаты открывают возможности для гетерологичной экспрессии вирусных антигенов; описанные подходы могут быть применены к процессам получения рекомбинантных антигенов возбудителей других вирусных инфекций свиней. Классический и дифференцирующий варианты ИФА-теста, а также классический моноантигенный вариант ИХА-теста могут применяться в рутинной серодиагностике; чувствительность и специфичность дифференцирующего варианта ИХА-теста могут быть повышены путем использования рекомбинантного аналога Erns эукариотического происхождения при условии решения проблемы посттрансляционных модификаций. Совокупность разработанных тест-систем может рассматриваться к применению не только в рамках стратегии DIVA, но и для осуществления «диагностики в месте оказания помощи» (Point of care – POC) – в качестве экспресс-инструментов для незамедлительного принятия решений, следуя универсальной тенденции «точного животноводства».

#### 4. Список работ, опубликованных по теме диссертации

*Статьи, опубликованные в журналах, включенных в перечень (по специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных) рецензируемых научных изданий ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ*

1. Классическая чума свиней: современные перспективы вакцинопрофилактики / **А. Р. Ахунова**, А. Г. Галеева, М. А. Ефимова, Д. Н. Мингалеев // Ветеринария Кубани. – 2024. – № 1. – С. 9-14. – DOI 10.33861/2071-8020-2024-1-9-14.

2. Экспрессия в *E. coli* маркированного рекомбинантного гликопротеина E2 вируса классической чумы свиней / А. Г. Галеева, М. А. Ефимова, К. В. Усольцев, Ш. М. Насыров, Н. И. Хаммадов, **А. Р. Ахунова** [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – 2024. – № 2. – С. 49-57. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2024.2.49.

3. Иммуноферментная тест-система для оценки напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу классической чумы свиней / Ш. М. Насыров, **А. Р. Ахунова**, И. И. Самарханов [и др.] // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. – 2024. – № 3(71). – С. 66-70. – DOI 10.31563/1684-7628-2024-71-3-66-71.

4. Твердофазная иммуноферментная тест-система для производственного контроля специфичности рекомбинантного антигена вируса КЧС / Ш. М. Насыров, **А. Р. Ахунова**, А. Г. Галеева [и др.] // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2024. – № 3(107). – С. 228-235. – DOI 10.37670/2073-0853-2024-107-3-228-235.

5. Применение прямой реакции иммунофлуоресценции в технологическом контроле матричных расплодов вируса классической чумы свиней / **А. Р. Ахунова**, Ш. М. Насыров, А. Г. Галеева [и др.] // Ветеринарный врач. – 2024. – № 3. – С. 27-33. – DOI 10.33632/1998-698X\_2024\_3\_27.

6. Получение рекомбинантного гликопротеина Erns вируса классической чумы свиней для DIVA-совместимых тест-систем / **А. Р. Ахунова**, А. Г. Галеева, Ш. М. Насыров [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2024. – № 6. – С. 21-23. – DOI 10.33861/2071-8020-2024-6-21-23.

7. Идентификация вариантов вируса вирусной диареи крупного рогатого скота – контаминантов производственных клеточных линий / А. Г. Галеева, **А. Р. Ахунова**, Н. И. Хаммадов [и др.] // Аграрная наука. – 2025. – № 391(02). С. – 64-70. – DOI: 10.32634/0869-8155-2025-391-02-64-70.

8. **Ахунова А. Р.** Применение рекомбинантных антигенов вируса классической чумы свиней в дискриминирующих серологических тестах // Ветеринарный врач. – 2025. – № 5. – С. 58-64. DOI: 10.33632/1998-698X\_2025\_5\_58.

*Статьи, опубликованные в сборниках материалов конференций:*

9. Оптимизация условий выделения и очистки растворимых форм рекомбинантных антигенов вируса КЧС / **Ахунова А. Р.**, Галеева А. Г., Николаева Ю. А., Ефимова М. А. // Материалы Международной научно-практической конференции «Инновационные решения актуальных вопросов биологической, токсикологической и радиационной безопасности для АПК». Казань. – 2024. – С. 11-14.

10. **Ахунова А. Р.** Конструирование усеченного полипептида E2 вируса классической чумы свиней для серологической диагностики // Материалы Международной научно-практической конференции «Инновационные решения актуальных вопросов биологической, токсикологической и радиационной безопасности для АПК». – Казань. – 2024. – С. 15-18.

11. **Ахунова А. Р.** Разработка DIVA-совместимых подходов к серологической диагностике классической чумы свиней // Сборник научных работ победителей и призеров Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза России. – М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2024. – С. 100-114.

12. **Ахунова А. Р.** Получение конъюгата на основе наночастиц коллоидного золота для обнаружения антител к вирусу классической чумы свиней в дифференцирующем проточном иммуноанализе // Материалы Международной научно-практической конференции «Инновационные решения актуальных вопросов биологической, токсикологической и радиационной безопасности для АПК». – Казань. – 2025. – С. 29-31.