

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ,
РАДИАЦИОННОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»

На правах рукописи

Ахунова Алсу Рузалевна

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

4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Ефимова Марина Анатольевна

Санкт-Петербург – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 История распространения КЧС	11
1.2 Морфологическая характеристика вируса КЧС	14
1.3 Молекулярная эпизоотология КЧС.....	23
1.4 Диагностические аспекты дифференциации пестивирусов	26
1.5 Технологические методы контроля вакцинного сырья вируса КЧС	32
1.6 Заключение по обзору литературы.....	33
2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	36
2.1.1 Нормативные документы	36
2.1.2 Штаммы, плазмиды и клеточные линии	37
2.1.4 Биоинформационные методы	39
2.1.5 Методы генной инженерии	41
2.1.6 Выделение и очистка рекомбинантных белков	45
2.1.7 Конструирование серологических тест-систем	50
2.1.8 Методы статистического анализа	54
2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	55
2.2.1. Дизайн антигенных композиций на основе фрагментов гликопротеинов E2 и E _{gns} вируса КЧС.....	55
2.2.2 Получение рекомбинантных белков E2 и E _{gns} в прокариотической системе экспрессии	67
2.2.3 Разработка полуколичественного ИФА для производственного контроля качества вакцинного сырья различного происхождения.....	81
2.2.4 Разработка дискриминационного ИФА для определения уровня антител к вирусу КЧС	88
2.2.5 Разработка прототипа ИХА-теста для серологической диагностики вируса КЧС	97
3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	104

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
4.1 Итоги исследований	108
4.2 Практические рекомендации	109
4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы	110
5 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	111
6 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114
7 СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	138
8 ПРИЛОЖЕНИЯ.....	142
Приложение А	142
Приложение Б.....	144
Приложение В	145
Приложение Г	147
Приложение Д	148
Приложение Е.....	150
Приложение Ж.....	151
Приложение З	153

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Классическая чума свиней (КЧС, CSF) – 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 [183].

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, BVDV) 1-4 типов, вирус пограничной болезни овец (ПБО, BDV) – входят в перечень карантинных болезней, подлежащих обязательной регистрации и оповещению Всемирной организации охраны здоровья животных (ВОЗЖ) [51, 61].

Несмотря на то, что последние вспышки КЧС на территории Российской Федерации (РФ) были зарегистрированы в 2020 г. в популяциях диких кабанов [49], 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 (дифференциация инфицированных и вакцинированных животных), что должно подтверждаться достоверными лабораторными исследованиями федерального и регионального уровня [34]. Международная практика искоренения КЧС с отказом от вакцинации и масштабной выбраковкой популяций домашних свиней может иметь экономические, социальные и этические последствия [61]. Так, стратегия вакцинации и карантинирования как основных противоэпизоотических мероприятий в РФ лишь частично ограничивает распространение вируса среди популяции домашних свиней и кабанов [2, 47].

Основным недостатком используемых живых вакцин является невозможность дифференцирования инфицированных животных от вакцинированных, что ограничивает возможность импорта продуктов животного происхождения и несет потенциальный риск рекомбинации вакцинного вируса с полевыми [117, 195, 198]. Более того, при длительном пассировании вируса, особенно в гетерологичной культуре клеток, происходят изменения его иммунобиологических свойств [17], поэтому матричные раскладки вирусов нуждаются в чувствительном и простом в интерпретации методе технологического контроля качества.

Не менее значимой проблемой является гомология представителей рода *Pestivirus* и их тесная серологическая связь, которая зачастую приводит к перекрестным реакциям сывороток [96, 164]. Вирус ВД КРС способен инфицировать свиней, а также он серопревалентен в популяциях свиней, невакцинированных от КЧС [185], что может приводить к диагностическим трудностям [209]. В этой связи идентификация актуальных контаминирующих вариантов вируса ВД КРС может быть информативной для внесения изменений в структуру рекомбинантных диагностических антигенов вируса КЧС, что позволит достоверно дифференцировать антитела, специфичные для разных представителей рода *Pestivirus*.

Актуальной задачей является разработка маркированных рекомбинантных вакцин и комплектов диагностических тест-систем. Выявление антител к гликопротеину Erns является надежным диагностическим подходом для дифференциации инфицированных животных от вакцинированных (DIVA) с использованием маркированных вакцин, которые индуцируют защитный иммунный ответ на мажорный гликопротеин E2 и при этом не вызывают сероконверсии к гликопротеину Erns [113, 126, 165].

Степень разработанности темы. В настоящее время российский рынок средств для серологической диагностики КЧС представлен ограниченным количеством наименований и включает только ИФА-тест-системы («КЧС-Серотест» (ООО «Ветбиохим»), «Набор для выявления антител к вирусу КЧС иммуноферментным методом» (ФКП «Ставропольская биофабрика»), «Набор для

выявления антител к вирусу классической чумы свиней иммуноферментным методом» (ФКП «Курская биофабрика»)), не учитывающие стратегию DIVA. Зарубежные аналоги представлены ИФА-тестами как на основе гликопротеина E2 («IDEXX CSFV Ab Test» («IDEXX», США), «VDPro[®] CSFV Ab c-ELISA» («MEDIAN Diagnostics Inc.», Южная Корея), «AsurDx[™] Classic Swine Fever (CSFV) Antibody Test Kit» («BioStone Animal Health», США)), так и на основе гликопротеина Erns («VDPro[®] CSFV Erns Ab b-ELISA» («MEDIAN Diagnostics Inc.», Южная Корея), «Pigtype CSFV Erns Ab» («INDICAL BIOSCIENCE GmbH», Германия), «AsurDx[™] Classic Swine Fever (CSFV) Erns Antibody Test Kit» («BioStone Animal Health», США)), что позволяет проводить дифференциальную диагностику.

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 выделены 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 иммуноферментную тест-систему для технологического контроля специфичности вакцинного антигена E2 вируса КЧС;
5. Разработать иммуноферментную тест-систему на основе гликопротеина E2 вируса КЧС и прототип дифференцирующего теста на основе белка Erns вируса КЧС для серодиагностики КЧС;
6. Разработать прототип иммунохроматографического теста 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 иммуноферментным 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. Последний позволит оценивать напряженность поствакцинального иммунитета в кратчайшие сроки (3-5 мин) в условиях свиноферм, а также дифференцировать поствакцинальные антитела от антител, индуцированных полевыми штаммами, что совместимо с переходом на рекомбинантные либо живые маркированные вакцины в рамках программы эрадикации КЧС. Применение ИХА-теста может быть также востребовано при экспресс-оценке безопасности (возможность реверсии к патогенному типу) вакцин на основе живых делеционных мутантов.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы выстроена согласно цели и задачам исследования и включает в себя применение биоинформационных (анализ геномов и протеомов эпизоотических штаммов и изолятов, поиск иммуногенных эпитопов, *in silico* оценка антигенности кандидатных пептидов и др.), молекулярно-генетических и генно-инженерных (клонирование генов, секвенирование ДНК, получение и трансформация компетентных клеток, оптимизация условий индукции экспрессии и др.),

вирусологических (культивирование вируса *in vivo*, титрование вируса, инфицирование культур клеток и др.), протеомных (белковый электрофорез, масс-спектрометрический анализ, ионообменная и металл-хелатная хроматография), серологических (иммуноферментный и иммунохроматографический анализы), биохимических (получение специфических антисывороток, пероксидазных и нанозолотых конъюгатов и др.) 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, 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 обладающий 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 г., на Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых аграрных образовательных и научных организаций России (1 этап – ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, 2024 г., 2 этап – ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ», г. Казань, 2024 г., 3 этап – 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 антропозоонозов 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.

Связь работы с научными программами. Исследования выполнены в рамках следующих тематик НИР госзадания ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»: «Разработка технологии производства рекомбинантной вакцины против классической чумы свиней» (2024 г., рег. № 1023041200040-7, исполнитель), «Разработка технологических подходов к производству современных вакцин против вирусных и бактериальных инфекций животных» (2025-2026 г., рег. № 125040104701-3, ответственный исполнитель), «Разработка иммуноферментных тест-систем для серологической диагностики вирусных инфекций свиней и оценки напряженности поствакцинального иммунитета на основе рекомбинантных

антигенов» (2025 г., рег. № 125040104700-6, ответственный исполнитель), грант МСХиП Республики Татарстан № 41-24 НИР «Разработка универсального экспресс-теста для серодиагностики КЧС и оценки напряженности поствакцинального иммунитета» (2024-2025 г., ответственный исполнитель).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, 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.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю, д-ру биол. наук, вед. науч. сотр. М. А. Ефимовой за постановку проблемы и всестороннюю поддержку; канд. вет. наук, вед. науч. сотр. А. Г. Галеевой; канд. биол. наук, вед. науч. сотр. Н. И. Хаммадову, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. К. С. Хаертынову, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Г. С. Кашеварову за консультативную поддержку на отдельных этапах исследования. Автор признателен сотрудникам лаборатории вирусных антропозоонозов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» за помощь и поддержку, а также за доброжелательную рабочую атмосферу.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 История распространения КЧС

Представители рода *Pestivirus* являются широко распространенными патогенами и вызывают экономически значимые заболевания, поражающие домашних и диких животных по всему миру [95]. КЧС является одной из трансграничных болезней свиней, ставящих под угрозу государственную продовольственную безопасность и наносящих крупномасштабный ущерб экономике посредством прямых (заболеваемость и смертность поголовья) и косвенных (затраты на противоэпизоотические мероприятия, торговые потери и зоонозная передача) потерь [21]. Видовая принадлежность восприимчивых животных варьируется в зависимости от вида пестивирусов: так, вирус ВД КРС и вирус ПБО, основными хозяевами которых являются жвачные животные, способны преодолевать видовые барьеры и заражать широкий круг хозяев [92], в то время как вирус КЧС имеет ограниченный круг естественных хозяев и заражает только свиней [103]. На данный момент по результатам исследований Wu с соавт. (2012), Jo с соавт. (2019) [58, 211] можно сделать вывод о возникновении новых изолятов пестивирусов, поражающих ранее нехарактерные виды млекопитающих – летучих мышей, грызунов, морских свинок и панголин.

Согласно источникам [68, 102], впервые КЧС была зарегистрирована в штатах Огайо и Индиана Соединенных Штатов Америки (США) с 1830 по 1833 гг. В первой половине XIX в. вспышки КЧС были зарегистрированы в 10 различных штатах США, а после 1860 г. болезнь быстро распространилась по всей территории страны. Первые сообщения о КЧС в Европе, в частности, о «свиной лихорадке» в Англии, относятся к 1862 г.; в 1887 г. болезнь распространилась в Швецию, Францию и Данию [69], а с 1960-х гг. – по всему миру [88]. Также сообщается, что эпизоотия заболевания, клинически схожего с КЧС, была зафиксирована во Франции в 1822 г. Не исключено, что болезнь могла быть занесена в США со свиньями из Европы [89]. В Китае КЧС впервые была выявлена в 1920-х гг., а в 1945 г. был выделен высоковирулентный штамм «Ши-Мынь», который

используется в качестве референтного для оценки вакцин [99]. По сей день, несмотря на огромные усилия по сдерживанию циркуляции вируса, по всему миру регистрируется большое количество вспышек КЧС.

В 1940-х гг. были опубликованы отчеты об эпизоотиях ВД КРС, а в 1950-х гг. – об эпизоотиях ПБО [145, 198]. В 1885 г. доктора Д.Э. Сэлмон и Т. Смит выделили организм, известный как *Bacillus suispestifer*, который, как они предполагали, был причиной возникновения КЧС [69]. Однако все попытки выработать иммунитет к полевым штаммам вируса с использованием *B. suispestifer* в качестве иммунизирующего агента закончились неудачей.

Согласно реконструкциям коэволюционной теории возникновения вируса-хозяина рода *Pestivirus*, построенных Rios с соавт. (2017), Wang с соавт. (2020), можно сделать предположения о межвидовом переходе тунисского вируса овец, который, вероятно, является общим предком как для вируса КЧС, так и для пестивируса овец (ovIT PeV), от овец к свиньям в конце XVIII в. [102, 103]. Результаты исследований Wang с соавт. (2020) показали, что свиньи могут быть восприимчивы к вирусам КЧС, Бангованны, вирусу ВД КРС 1 и 3 типов, атипичному пестивирусу свиней [103]. Практика совместного содержания животных разных видов распространялась повсеместно, что гипотетически способствовало межвидовой передаче тунисского вируса овец свиньям, поскольку первый импорт тунисских овец в Пенсильванию, США, датируется 1799 г. [73, 88].

Вакцинация является основным методом борьбы с КЧС у домашних свиней, и живые аттенуированные вакцины широко применяются во многих странах мира, что влечет за собой катастрофические последствия: изменение вирулентности и патогенности штаммов [41], риск рекомбинации вакцинного штамма вируса КЧС с полевым [34], жесткие торговые ограничения в связи с невозможностью дифференциации вакцинированных и инфицированных животных. Международная политика искоренения заболевания, включающая отказ от вакцинации и ликвидацию неблагополучных и подозреваемых в заражении популяций домашних свиней («стемпинг-аут») была реализована в Австралии в 1961 г. (искоренение КЧС путем убоя и ограничений на передвижение), в Канаде в

1963 г. (убой и вакцинация), в США в 1976 г. (убой после отказа от вакцинации в 1962 г.) [75, 76, 89]. В Европе с 1990-х гг. проводился регулярный серологический контроль поголовья, сопровождаемый «стемпинг-аутом» инфицированных и контактных животных в рамках политики невакцинации домашних свиней [179]. Массовый убой, однако, является не единственным методом искоренения КЧС: так, Уругвай в 1991 г., Чили в 1998 г., Аргентина в 2005 г. достигли благополучия с помощью вакцинации в качестве основной меры контроля [50]. Важным фактором в контроле распространения заболевания является тот факт, что процесс вакцинации без надлежащего контроля или неспособности установить стерилизующий иммунитет в стадах свиней может привести к губительным последствиям, таким как появление ускользающих вариантов штаммов КЧС и повторное возникновение заболеваний [102, 210].

КЧС остается эндемичным заболеванием для многих стран Евразии (Россия, Япония, Китай и др.), Южной и Центральной Америки (Боливия, Колумбия, Чили и др.) и стран Карибского бассейна (Куба, Доминиканская Республика, Гаити) [83]. Ситуация в Африке доподлинно неизвестна, хотя вспышки были зарегистрированы на Мадагаскаре и в Южной Африке в 2005 г. [85, 87]. По данным ВОЗЖ [83], последние вспышки КЧС были зарегистрированы в Эквадоре, Бразилии и Японии в 2024 г. Примечателен тот факт, что в Японии КЧС вновь возникла в 2018 г. после 26-летнего периода благополучия на ферме в центральной части страны – источником послужил дикий кабан, зараженный вирусом КЧС, обнаруженный погибшим недалеко от места первой вспышки в префектуре Гифу [62]. Согласно исследованиям Nishi с соавт. (2019) о последовательности генома вируса КЧС, выделенного у павшей свиньи с клиническими симптомами КЧС на свиноферме в Японии в 2018 г., вирус тесно связан с изолятами из Восточной Азии и относится к субгенотипу 2.1 [142]. Далее вирус распространился на соседние префектуры, что привело к массовому заражению диких кабанов и домашних свиней. К концу 2022 г. вирус КЧС был обнаружен у диких кабанов по всей Японии, за исключением северных (о. Хоккайдо) и южных (о. Кюсю) регионов.

Эпизоотическая ситуация, сложившаяся на данный момент в России, внушает надежду на полное искоренение инфекции, что откроет возможность получения страной или ее отдельными субъектами международного статуса благополучия [47]. По сообщениям информационно-аналитического центра Россельхознадзора [49], последние вспышки КЧС в России регистрировались в 2020 г. в Приморском крае среди диких кабанов; по состоянию на 2025 г. вспышки не регистрировались. Улучшение ситуации в популяциях домашних свиней можно связать с повсеместной вакцинацией свиней против КЧС, снижением численности поголовья в хозяйствах с низким уровнем биозащиты и усилением контроля за заболеванием [47].

Циркуляция вируса КЧС в субпопуляциях привитых животных объясняется тем, что часть поголовья остается слабоиммунной, что ведет к выделению вируса во внешнюю среду, трансплацентарной передаче вируса потомству. Все это поддерживает сохранение и длительную циркуляцию вируса в неблагополучных хозяйствах [19].

1.2 Морфологическая характеристика вируса КЧС

Возбудителем вируса КЧС является оболочечный РНК-содержащий вирус, который относится к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* [28, 90]. Согласно современной классификации, в состав данного рода входят 11 вирусов, представленных в таблице 1 [90, 183], в основном это – экономически значимые патогены парнокопытных, однако были выявлены новые виды пестивирусов (Таблица 1) [67, 123, 183].

Таблица 1 – Классификация представителей рода *Pestivirus*

№	Название	Характеристика
Таксономически утвержденные представители		
1	<i>Pestivirus A</i> (вирус диареи крупного рогатого скота 1 типа, BVDV-1)	Восприимчивые животные: семейство жвачные парнокопытные – КРС (<i>Bos sp.</i>), МРС (<i>Ovis spp.</i> , <i>Capra spp.</i>). Штаммы: NADL (ID AJ133738), Oregon C24V (ID AF091605.1), SLO/3301/2014 (ID MH899941.1).
2	<i>Pestivirus B</i> (вирус диареи крупного рогатого скота 2 типа, BVDV-2)	Восприимчивые животные: семейство жвачные парнокопытные – КРС (<i>Bos sp.</i>), МРС (<i>Ovis spp.</i> , <i>Capra spp.</i>). Штаммы: SH-28 (ID HQ258810.1), HLJ-10 (ID JF714967.1), SD-1 (ID MK599227.1).
3	<i>Pestivirus C</i> (вирус классической чумы свиней, CSFV)	Восприимчивые животные: семейство нежвачные парнокопытные – кабан (<i>Sus scrofa</i>). Штаммы: Shimen (ID AY775178.2), Alfort/187 (ID X87939.1), Eustrup (ID NC_002657.1).
4	<i>Pestivirus D</i> (вирус пограничной болезни, BDV)	Восприимчивые животные - семейство жвачные парнокопытные – МРС (<i>Ovis spp.</i> , <i>Capra spp.</i>). Штаммы: X818 (ID AF037405.1), NY1-19 (ID MW762535.1), D29/00 (ID MT648677.1).
5	<i>Pestivirus E</i> (пестивирус вилорогих антилоп, PAPeV)	Восприимчивые животные: семейство жвачные парнокопытные – вилорогая антилопа (<i>Antilocapra americana</i>). Впервые охарактеризован в США в 2005 г. [78]. Штаммы: ID AY781152.3, ID NC_024018.2
6	<i>Pestivirus F</i> (вирус Бангованна, PPeV)	Восприимчивые животные: семейство нежвачные парнокопытные – кабан (<i>Sus scrofa</i>). Первая вспышка в 2003 г. в Австралии [3, 151]. Штаммы: BuPV (ID EF100713), H482/E2/2014 (ID MH807263.1), E570/E2/2010 (ID MH807262.1).
7	<i>Pestivirus G</i> (пестивирус жирафов, GPeV)	Восприимчивые животные: семейство жвачные парнокопытные – КРС (<i>Bos taurus</i>), жирафы (<i>Giraffa camelo-pardalis</i>). Выделен в Кении в 1967 г. [144]. Штаммы: giraffe-1 H138 (ID AF144617.2)
8	<i>Pestivirus H</i> (хобиподобный пестивирус, атипичный пестивирус жвачных, HoBiPeV)	Восприимчивые животные: семейство жвачные парнокопытные – КРС (<i>Bos sp.</i>). Выделен в Швейцарии [10]. Штаммы: D32/00_HoBi (ID AB871953.1), CH-Kaho/cont (ID CH-Kaho/cont)
9	<i>Pestivirus I</i> (айдинподобный пестивирус, пестивирус овец, AydinPeV)	Восприимчивые животные: семейство жвачные парнокопытные – КРС (<i>Bos sp.</i>), МРС (<i>Ovis spp.</i> , <i>Capra spp.</i>).

№	Название	Характеристика
		Впервые обнаружен в Турции [143]. Штаммы: AydinPeV (ID JX428945), Aydin/04-TR (ID NC_018713.1).
10	<i>Pestivirus J</i> (пестивирус норвежской крысы)	Восприимчивые животные: семейство мышинные – серая крыса (<i>Rattus norvegicus</i>). Обнаружен в США в 2013 г. [110]. Штаммы: NrPV/NYC-D23 (ID NC_025677.1).
11	<i>Pestivirus K</i> (атипичный пестивирус свиней, APPeV)	Восприимчивые животные: семейство нежвачные парнокопытные – кабан (<i>Sus scrofa</i>). Впервые обнаружен в 2015 г. в США [3, 184]. Штаммы: APPV-SDHY-2022 (ID OP381297.1), USA/023005/2016 (ID MW183241.1)
Предлагаемые к утверждению представители		
12	<i>Pestivirus L</i> (вирус Линда, нейродегенеративный агент, вызывающий боковую дрожь, LindaV)	Восприимчивые животные: семейство нежвачные парнокопытные – кабан (<i>Sus scrofa</i>). Впервые обнаружен в Австрии в 2007 г. [175]. Штаммы: LINDAPeV (ID KY436034), Austria1 (ID KY436034.1).
13	<i>Pestivirus M</i> (пестивирус <i>Phocoena</i> , вирус чумы морских свиней, PhoPeV)	Восприимчивые животные: семейство морские свиньи – обыкновенная морская свинья (<i>Phocoena phocoena</i>). Впервые обнаружен в Северном море [58, 82, 159]. Штаммы: NS170385 (ID NC_077026.1), NS170386 (ID MK910228.1).
14	<i>Pestivirus N</i> (Тунисский овцеподобный пестивирус, TSV)	Восприимчивые животные: семейство жвачные парнокопытные – MPC (<i>Capra aegagrus hircus</i> , <i>Ovis gmelini aries</i>). Впервые выделен из партий заражённой вакцины против оспы овец в Тунисе в 2004 г. [107]. Штаммы: 92019/2007/AG (ID MZ664274.1).
15	<i>Pestivirus O</i> (пестивирус овец, ovIT PeV)	Восприимчивые животные: семейство жвачные парнокопытные – MPC (<i>Ovis gmelini aries</i>). Впервые выделен в Италии в 2019 г. [160]. Штаммы: Ovine/IT/1756/17 (ID MG770617.1), ovine/It/338710-2/2017 (ID MK618725.1), ovine/It/338710-3/2017 (ID MK618726.1).
16	<i>Pestivirus P</i> (пестивирус панголин Доньян, DYPV)	Восприимчивые животные: семейство ящеровые – яванский панголин (<i>Manis javanica</i>), семейство иксодовые клещи (<i>Amblyomma javanense</i>). Выделен в Китае в 2020 г. [173]. Штаммы: DYAJ1 (ID MK636874.1), DYCS (ID MK636875.1).

№	Название	Характеристика
17	<i>Pestivirus Q</i> (пестивирус грызунов, RtNn-PeV)	Восприимчивые животные: семейство мышинные – белобрюхая крыса (<i>Niviventer niviventer</i>). Был выделен в Китае [118]. Штаммы: RtNn-PestV/HuB2014 (ID KY370101.1).
18	<i>Pestivirus R</i> (пестивирус грызунов, RtAp-PeV)	Восприимчивые животные: семейство мышинные – восточноазиатская мышь (<i>Apodemus peninsulae</i>), южнокитайская лесная мышь (<i>Apodemus draco</i>), большая белобрюхая крыса (<i>Niviventer excelsior</i>), китайская белобрюхая крыса (<i>Niviventer confucianus</i>). Был выделен в Китае [118]. Штаммы: RtAp-PV/JL2014, RtNc-PV/HuB2014, RtAd-PV/SAX2015, RtNe-PV/SC2014, RtNc-PV/SAX2015.
19	<i>Pestivirus S</i> (пестивирус летучих мышей, BtSk-PeV)	Восприимчивые животные: семейство гладконосые – малая азиатская желтая летучая мышь (<i>Scotophilus kuhlii</i>), семейство подковогубые – промежуточная подковообразная летучая мышь (<i>Rhinolophus affinis</i>). Был выделен в Китае [118, 211]. Штаммы: BtSk-PV-(1-4)/GX2017, RaPestV-1.
20	<i>Pestivirus chinensis</i> (пестивирус, ассоциированный с абортами у свиней, РААРeV)	Восприимчивые животные: семейство нежвачные парнокопытные – кабан (<i>Sus scrofa</i>). Впервые выделен в Китае в 2023 г. [123]. Штаммы: SCQS (ID PP663643.1).

Примечание: референсные последовательности (Genbank ID) были получены из базы данных Национального центра биотехнологической информации Genbank (NCBI, NIH, США).

Вирионы пестивирусов имеют сферическую форму диаметром 40-60 нм, состоят из нуклеокапсида и липопротеиновой оболочки. Геном, представленный несегментированной одноцепочечной РНК длиной около 12,3 т.п.н., обладает линейной структурой, включающей 3'- и 5'-нетранслируемые области (UTR), фланкирующие одну длинную открытую рамку считывания (ORF). Порядок генов пестивирусов был определен как 5' – Npro, C, Erns, E1, E2, p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B – 3' (Рисунок 1) [53, 79, 153].

Организация генома у всех представителей рода *Pestivirus* сходна (за исключением пестивируса *Phocoena*, обнаруженного у морской свинки, в геноме которого отсутствует ген, кодирующий белок Npro) [3].

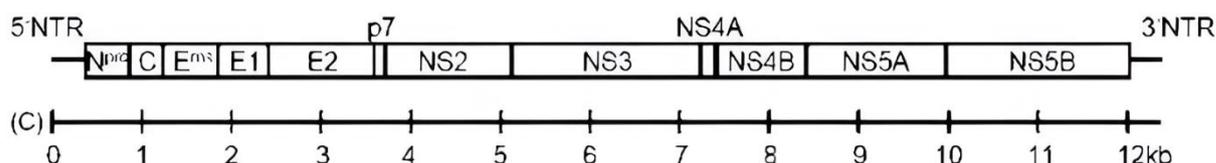


Рисунок 1 – Организация генома вируса КЧС [53]

Известно о том, что часть белков – Npro, C, Erns, E1, E2, p7, NS4B, связаны с вирулентностью вируса КЧС посредством обратной генетической модификации кДНК [197].

5'-UTR (5'-нетранслируемая область) в вирусной РНК принимает участие в репликации РНК и экспрессии вирусного белка. Чтобы индуцировать эффективную трансляцию, 5'-UTR пестивирусных РНК содержат «внутреннюю рибосомальную точку входа» (internal ribosomal entry site – IRES), которая способна напрямую рекрутировать малую субъединицу рибосомы и размещать ее в месте начала трансляции [53]. 5'-UTR консервативна, однако в ее структуре присутствуют три переменных участка [53].

Процессинг гликопротеинов начинается с расщепления между капсидным белком и предшественником Erns-E1-E2, за которым следует расщепление на С-концевом участке E2. Erns-E1-E2 расщепляется с образованием Erns-E1 и E2, а затем Erns-E1 расщепляется на Erns и E1. Расщепление между Erns и E1, а также между E1 и E2 катализируется сигнальной пептидазой хозяина в просвете эндоплазматического ретикулума. E1 и E2 содержат трансмембранные домены, в то время как Erns не содержит их и вместо этого уникальным образом прикрепляется к мембране, а также секретируется инфицированными клетками. Все три гликопротеина образуют дисульфидные комплексы: гомодимер Erns, гетеродимер E1-E2 и гомодимер E2 [195].

Гликопротеин оболочки E2 классифицируется как трансмембранный белок I типа и является основным иммуногеном всех пестивирусов, он играет важную роль в прикреплении вируса и проникновении в клетки-мишени, необходим для размножения вируса. Кроме того, он был идентифицирован как мишень для

цитотоксических Т-клеток [91, 154, 195, 198]. Молекулярная масса E2 составляет 53-55 кДа, длина последовательности – 373 аминокислоты; белок содержит 15 консервативных цистеинов и 2 дополнительных цистеина в штаммах вируса ВД КРС, которые образуют внутри- и межмолекулярный дисульфидные мостики [198]. Белок представлен в виде дисульфидсвязанного комплекса в виде гомодимера или стабильного гетеродимера со структурным белком E1. Современные исследования по картированию эпитопов показывают, что белок E2 состоит из 4 доменов – DA, DB, DC и DD, расположенных линейно от N-конца к C-концу, которые содержат по меньшей мере 14 линейных или прерывистых эпитопов [91, 101, 102].

Гликопротеин оболочки Erns имеет молекулярную массу 42-48 кДа, гликозилирован, более чем на 50% состоит из углеводов в зрелом виде и имеет длину 227 аминокислот [198]. Erns имеет вторую по величине степень консервативности аминокислот среди всех белков пестивирусов, что указывает на его важную роль в жизненном цикле возбудителя и низкую устойчивость к модификациям [67], также Erns является вторым антигеном, индуцирующим образование вируснейтрализующих антител, участвует в определении вирулентности и адаптации организма-хозяина [91, 195]. С-конец Erns не содержит трансмембранной спирали: Erns прикрепляется к мембране посредством С-конца, который сворачивается в амфипатическую спираль [195]. Известно, что Erns обладает рибонуклеазной активностью в отношении одноцепочечной и двуцепочечной РНК, при этом по структуре домена, определяющего каталитическую активность, Erns проявляет сходство с рибонуклеазами T2 растений и грибов [3].

Структура и функционал **гликопротеина E1** еще до конца не изучены. На основе структурного анализа E2 вируса ВД КРС было высказано предположение [67], что E1 является белком, несущим ещё не изученный домен слияния. Однако исследования вируса КЧС показали, что домен слияния находится в структуре E2. Три остатка цистеина в E1 являются общими для всех пестивирусов (в позициях 506, 521, 628), что указывает на их важную роль в стабилизации структуры и, возможно, в образовании гетеродимеров [67]. Определено, что E1 представляет

собой трансмембранный белок I типа и имеет молекулярную массу 25-33 кДа [195, 198].

Npro представляет собой неструктурную аутопротеазу, которая генерирует свой собственный С-конец путем аутопротеолитического расщепления вирусного полипротеина и, таким образом, С-конец основного белка, который расщепляется на своем собственном карбоксильном конце [79, 198]. Npro – основной элемент, модулирующий вирулентность, при этом не являющийся детерминантой вирулентности [88, 198]. Npro способен защищать клетки от апоптоза, подавляя выработку противовирусного интерферона IFN- α/β , нарушая работу регуляторного фактора интерферона IRF3 и передачу сигналов IRF7 [3, 198].

Нуклеокапсидный протеин С обладает РНК-шаперонной активностью и упаковывает РНК в вирионы [3]. Белок С вируса ВД КРС представляет собой неупорядоченный белок, который связывает РНК с низкой аффинностью и без четкой специфичности. Минимальный размер связывания составляет около 14 нуклеотидов на молекулу С. Белок С вируса КЧС не является необходимым для размножения вируса *in vitro*, хотя полученные в результате делеции мутанты, которые зависели от мутации второго участка в С-концевой области NS3, давали в 30-50 раз менее инфекционное потомство и были аттенуированы у животных [198].

Белок р7 представляет собой небольшой гидрофобный пептид длиной 61-62 аминокислотных остатка (а.о.) [3]. В инфицированных пестивирусом клетках р7 был обнаружен в виде отдельного белка массой около 7 кДа и как часть предшественника E2-р7 [198]. Важная роль р7 – снижение подкисления внутриклеточных пузырьков, необходимого для поздней стадии формирования инфекционного вируса-потомка [198].

NS2 – цистеиновая аутопротеаза, отвечающая за протеолиз на границе белков NS2 и NS3 [3]. У вируса ВД КРС протеазная активность NS2 обусловлена наличием каталитической триады – His1447, Glu1462 и Cys1512 [3, 198]. N-конец NS2 образуется с помощью клеточных сигнальных пептидаз, и белок остается связанным с внутриклеточными мембранами, предположительно в эндоплазматическом ретикулуме. N-концевая половина NS2 является

высокогидрофобной и, следовательно, может участвовать в связывании с мембраной. Протеолитическая активность NS2 зависит от клеточного кофактора, а именно шаперона, называемого Jiv, или его фрагмента длиной 90 а.о. – Jiv90 [162].

Аутопротеолиз NS2-3 является ключевым этапом в регуляции репликации и персистенции пестивирусов, поскольку свободный NS3 является важным компонентом репликазы, который не может быть функционально заменен необработанным NS2-3 [162, 198]. Нерасщепленный NS2–3 также выполняет важную, но недостаточно хорошо охарактеризованную функцию в морфогенезе вирионов. Также существующая зависимость репликации от нерасщепленного комплекса NS2–3 представляет собой эволюционное преимущество для пестивирусной стратегии [198].

NS3 представляет собой многофункциональный белок размером около 80 кДа [198]. Единственная аминокислотная замена позволяет NS3 функционально заменять белок С в морфогенезе вириона, поднимает вопрос о том, выполнял ли NS3 упаковочную функцию в вирусе-прототипе предков в отсутствие капсид-гена, который был приобретен на более позднем этапе эволюции и, возможно, из-за других требований у нового хозяина [198].

NS4A имеет размер около 10 кДа и содержит гидрофобную мембранную N-концевую область и С-концевой цитозольный домен. Он представляет собой кофактор для протеазы NS3. Доказана критическая роль NS4A в морфогенезе вирионов [198].

NS4B представляет собой гидрофобный белок массой около 35 кДа с неизвестной топологией мембраны, который выполняет важную, но недостаточно хорошо охарактеризованную функцию в репликации пестивирусной РНК. Согласно своим физико-химическим свойствам, NS4B является интегральным мембранным белком, локализованным на внутриклеточных мембранах [198].

NS5A имеет размер около 58 кДа и фосфорилируется клеточными киназами. NS5A вируса КЧС регулирует репликацию вирусной РНК [198].

Последним белком в пестивирусном полипротеине является **NS5B** размером около 77 кДа. NS5B имеет последовательности, характерные для РНК-зависимой

РНК-полимеразы, и проявляет полимеразную активность *in vitro*. В естественных условиях репликация вирусного генома требует согласованного действия NS3 и NS5B для синтеза вирусной РНК. Благодаря ферментативной функции NS5B также оказывает участие в морфогенезе пестивирусных вирионов [198].

3'-UTR (3'-нетранслируемая область) является первым сайтом проникновения вирусных репликаз для инициации репликации РНК-генома. 3'-UTR участвует в инициации репликации пестивирусного генома, а также в координации вирусной трансляции и репликации [53].

Жизненный цикл вируса КЧС схож с жизненными циклами других представителей семейства *Flaviviridae* (Рисунок 2) [197].

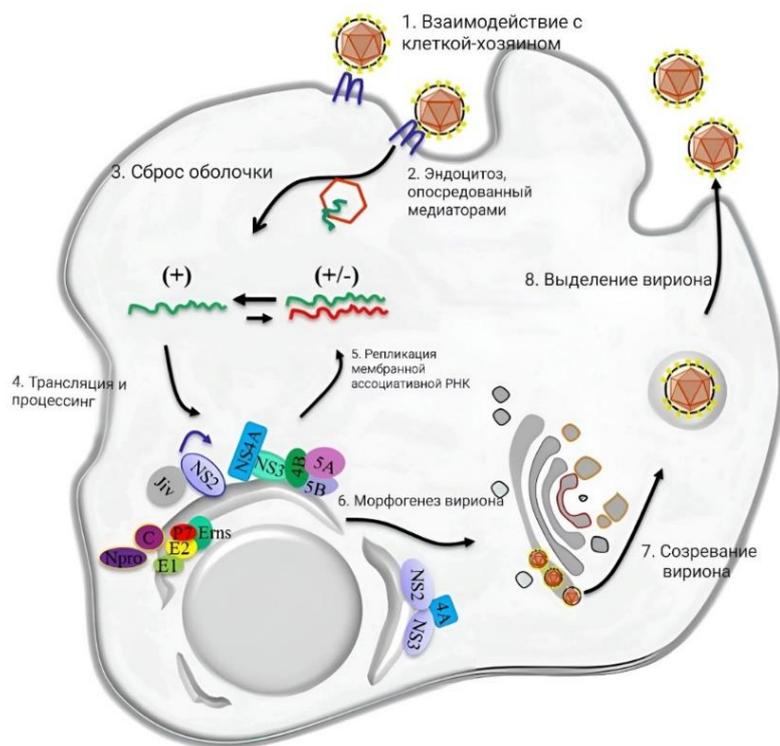


Рисунок 2 – Жизненный цикл вируса КЧС [197]

Жизненный цикл вируса КЧС начинается с процесса прикрепления и проникновения, который опосредуется гликопротеинами E1 и E2 [80]. Shi с соавт. (2016) провели изучение процесса проникновения вируса КЧС в клетки – инфицирование происходит посредством рН-, динамин- и холестерин-зависимого

клатрин-опосредованного эндоцитоза, который требует Rab5 и Rab7 [125]. Далее слияние мембран опосредуется гликопротеинами в зависимости от pH и запускается подкислением [197]. Для интернализации вируса ВД КРС также требуется активный клатрин-зависимый эндоцитоз и низкий уровень pH в эндосомах [125]. Отдельные источники [57, 120] сообщают, что пептиды $^{818}\text{SPIGWTVIEC}^{828}$ и $^{869}\text{CKWGGNWTCV}^{878}$ белка E2 вируса КЧС опосредуют слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной.

После слияния вирусной оболочки и плазматической мембраны клетки вирусный нуклеокапсид высвобождается в цитозоль инфицированных клеток, где происходит трансляция, которая приводит к образованию полипротеина и запуску репликации вирусного генома. Репликация вируса требует синтеза комплементарной РНК(-), которая используется в качестве матрицы для дальнейшего синтеза РНК(+). Затем NS2–3, наряду с кофактором NS4A, опосредует морфогенез вириона [174]. Вирионы высвобождаются из клетки-хозяина после созревания инфекционных частиц.

Резюмируя, все зрелые белки (за исключением Npro) и предшественника NS2–3 необходимы для жизненного цикла вируса КЧС, в то время как NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B необходимы для репликации РНК вируса КЧС [174].

1.3 Молекулярная эпизоотология КЧС

Филогенетический анализ продемонстрировал связь между генотипами штаммов вируса КЧС и их географическим происхождением [141]. Вирус КЧС является наименее изменчивым представителем рода *Pestivirus*; так, во время длительных эпизоотий он отличается относительной стабильностью, и можно прогнозировать лишь незначительные изменения в структуре генома [158]. Сообщалось о штаммах, классифицированных как новые субгенотипы – штаммы субгенотипа 1.4 на Кубе, которые изначально определяли как 1.2 [87].

Исследователями со всего мира были проведены исследования молекулярной эпизоотологии вируса КЧС, включая анализ изолятов из Азии [84, 99, 135, 139, 186], Южной Америки [54, 178, 180], Европы [86, 182], России [44, 167, 206]. Штаммы

вируса КЧС подразделяются на три генотипа и более тринадцати подтипов (1.1–1.4, 2.1–2.5, 3.1–3.4), было установлено, что штаммы, относящиеся к генотипу 1, являются наиболее вирулентными, в то время как штаммы со средней или низкой вирулентностью относятся к генотипам 2 и 3 [99]. Генотип 2 является глобально доминирующим, и его представители демонстрируют более высокую генетическую изменчивость, чем другие генотипы [127]. Молекулярная эпизоотология субгенотипов 2.1 вируса КЧС обширна и подразделяется на доминирующий подсубгенотип (2.1b, 2.1c, 2.1h, 2.1i и 2.1j), второстепенный подсубгенотип (2.1d и 2.1g) и молчаливый подсубгенотип (2.1a, 2.1e и 2.1f) [140]. Gong с соавт. (2016) провели широкие исследования в области секвенирования и филогенетического анализа гена E2 изолятов вируса КЧС субгенотипа 2.1 (Таблица 2) [140].

Таблица 2 – Генетическое разнообразие субгенотипа 2.1 [140]

Наименование подсубгенотипа	Распространение	Примечание
Доминирующие подсубгенотипы		
2.1b	Китай, Израиль, Южная Корея, Россия, Монголия	Распространение в период 1998-2014 г. Штаммы: Amur/2013/WB (ID KP711403.1), 1087/09 (ID HM587974.1), NEBZ (ID GU592790.1)
2.1c	Китай и страны Юго-Восточной Азии (Лаосская Народно-Демократическая Республика, Таиланд)	Распространение в период 1998-2013 г. Штаммы: GXNN2 (ID AY450279.1), GD68/2011 (ID KT853118.1), GD24/2011 (ID KT853117.1)
2.1h	Китай, Южная Корея, Литва, Великобритания и Индонезия	Распространение в период 1993-2012 г. Штаммы: CW2002 (ID AF521712.1), GXNN-7/06 (ID EF369437.1), GXXY-2/06 (ID EF369435.1)
2.1i	Китай, Израиль	Распространение в период 1999-2013 г. Штаммы: GD41/2011 (ID KT853116.1), 1176/09 (ID HM587980.1), GXLA-1/12 (ID KC502864.1)
2.1j	Китай, Россия	Распространение в период 2000-2014 г. Штаммы: Primorie/2012/WB (ID KP711405.1), AnH41 (ID KC989055.1), LiaoNJZF9 (ID KC988977.1)

Наименование подсубгенотипа	Распространение	Примечание
Второстепенные подсубгенотипы		
2.1d	Индия	Распространение в период 2011-2013 г. Штаммы: AS/Guwahati-G4 (ID LC000002.1), ML/RRTC-B14 (ID LC000001.1), CSF/MZ/LUN/421 (ID JQ907575.1)
2.1g	Италия, Хорватия, Китай	Распространение в период 1992-2011 г. Штаммы: Italian s7D2 (ID L36171.1), CSF0670 (ID KF233945.1), GD19/2011 (ID KT853112.1)
Молчаливые подсубгенотипы		
2.1a	Китай, Лаосская Народно-Демократическая Республика, Германия, Нидерланды, Бельгия и Италия	Распространение в период 1996-2007 г. Штаммы: GXBB-3/06 (ID EF369443.1), L119 (ID AY283667.1)
2.1e	Китай	Распространение в период 1979-1997 г. Штаммы: 281/Cd-SC/97 (ID EF421693.1), SCCD1/79 (ID KT427515.1)
2.1f	Китай	Распространение в период 1998-2002 г. Штаммы: 291/SX/98 (ID EF421696.1), 8161/Mu-SC/99 (ID EF421695.1)

Так, доминантные подсубгенотипы распространены по меньшей мере в течение 15 лет и обнаружены в нескольких странах, второстепенные подсубгенотипы в настоящее время циркулируют в ограниченных регионах, молчаливые подсубгенотипы не выявлялись в течение последних 8 лет, хотя они вызывали предыдущие вспышки КЧС [140].

Субгенотип 2.3 был разделен на подсубгенотипы 2.3.1 и 2.3.2 в ходе исследований Blome с соавт. (2010) о ситуации с заболеваниями вирусом КЧС и молекулярной эпизоотологии в странах Юго-Восточной Европы [86].

Изоляты 1 генотипа присутствовали в Южной Америке и России [161]. В Аргентине, Бразилии, Колумбии и Мексике распространен субгенотип 1.1; в Гондурасе и Гватемале преобладает субгенотип 1.3; субгенотип 1.4 был обнаружен в Кубе [90]. В Китае в основном распространены штаммы, относящиеся к генотипу 2 [127]; подгенотипы 2.2 и 2.3 менее распространены, чем подгенотип 2.1.

В России в 1990-х гг. были идентифицированы изоляты 1 генотипа, тогда как во время более поздних вспышек (2007-2014 г.) сообщалось преимущественно о субгенотипах 2.1 и 2.3 [206]. В Приморском крае у диких кабанов обнаруживался вирус КЧС субгенотипа 2.1d, соответственно, можно утверждать, что он стал эндемичным для популяции диких кабанов Приморского края. Этот же субгенотип эндемичен в Китае и Юго-Восточной Азии, и можно предполагать, что изначально именно из Китая вирус был занесен на территорию Дальневосточного федерального округа России [44].

Распространение 3 генотипа наблюдается преимущественно в Азии [161]. An с соавт. (2018) работали над эволюционной динамикой вируса КЧС в Южной Корее [135]. Отмечается, что с 2000 г. заметна смена 3 генотипа на 2 генотип, который включает подгенотипы 2.1b (2002-2013) и 2.1d (2011-2017) [135].

Мало что известно о ситуации с КЧС в Африке; исключением является вспышка 2005 г. в Южной Африке, которая была вызвана штаммами субгенотипа 2.1 [90].

Известно, что иммунизация свиней против КЧС является скорее вынужденной мерой, неспособной прекратить вирусоносительство в ранее инфицированном стаде [89].

Таким образом, несмотря на то, что КЧС является РНК-содержащим вирусом, для него характерна относительно низкая скорость эволюции по сравнению с другими вирусами такого типа, проявляющими высокую эволюционную изменчивость. Тем не менее, происходят естественные процессы мутаций, рекомбинаций, особенно в условиях массовой вакцинации, что ведет к появлению генетических разнообразий.

1.4 Диагностические аспекты дифференциации пестивирусов

Согласно классификации ВОЗЖ, КЧС, ВД КРС и ПБО входят в перечень карантинных болезней, подлежащих обязательной регистрации и оповещению [83].

Одним из наиболее действенных способов контроля и ликвидации КЧС в эндемичных странах является применение кандидатных вакцин, соответствующих

стратегии DIVA, позволяющей дифференцировать инфицированных и вакцинированных животных. Принцип DIVA в сочетании с маркерной вакциной (субъединица E2) и соответствующих им тест-систем основан на выявлении у животных, инфицированных полевыми штаммами, антител на отдельные вирусные белки, не входящие в состав вакцины.

Серологическая диагностика КЧС заключается в выявлении нейтрализующих антител к структурным белкам E2, Erns и неструктурного белка NS3 [1]. Однако в связи со сходством представителей рода пестивирусов между собой на молекулярно-биологическом и структурно-морфологическом уровнях, высокий процент идентичности и перекрестно реагирующие сыворотки затрудняют диагностику и эффективность вакцинации против КЧС [3, 70, 95, 96, 190]. Инфицирование свиней пестивирусами жвачных – в большей степени вирусом ВД КРС [14, 71, 98, 134, 185] и вирусом ПБО – [152, 168] не вызывает яркого симптомокомплекса, но циркуляция этих пестивирусов среди поголовья затрудняет дифференциальную диагностику КЧС [1, 100, 128, 137, 191]. Вирус ВД КРС также является известным контаминантом производственных клеточных линий [33, 105, 106, 109, 208], в частности, клеток свиного происхождения, используемых для производства биологических продуктов и проведения диагностических тестов в отношении вируса КЧС [1, 212]. Таким образом, необходим постоянный мониторинг популяции свиней не только на наличие вируса КЧС, но и на наличие других пестивирусов [96].

Течение КЧС зависит от штаммовых вариаций вируса и характеристик организма-хозяина, из которых наибольшее значение имеют возраст животных, вирулентность вируса и время инфицирования (пре- или постнатальный период). Имеет место одновременное заражение несколькими вирусами [56, 69, 93, 94, 177], что связано с длительной персистенцией данных возбудителей в стадах, что также влияет на выраженность клинических признаков.

Клинические признаки в зависимости от течений заболевания охарактеризованы следующим образом [9, 83, 88]:

- Острая форма болезни, чаще встречаемая у молодых свиней и характеризующая более вирулентные штаммы, сопровождается лихорадкой (до 41 °С), истощением, диареей, рвотой, абортами у супоросных свиноматок, кожными кровоизлияниями, не исчезающими при надавливании. Признаки поражения центральной нервной системы: подергивание отдельных групп мышц, манежные движения, параличи задних конечностей, нервное возбуждение, апатия и сонливость. Острое течение болезни длится до 10 дней, после чего восприимчивые животные погибают либо болезнь переходит в подострую форму.

- Подострое течение болезни характеризуется поражением органов дыхания и пищеварения, отмечаются лихорадка, кашель, диарея. Восприимчивые животные худеют, ослабевают и передвигаются с трудом. Подострое течение болезни длится до 21 дня, после чего восприимчивые животные погибают либо болезнь переходит в хроническую форму.

- Хроническое течение болезни, вызываемые менее вирулентными штаммами, характеризуется диареей, сменяющейся запором, энтеритами, конъюнктивитами, пневмонией, прогрессирующим истощением. Хроническое течение болезни длится до 59 дней, после чего восприимчивые животные погибают либо выздоравливают.

- Исход трансплацентарного заражения зависит от срока беременности и вирулентности вируса. Заражение на ранней стадии беременности может привести к выкидышам, мертворождению, мумификации и порокам развития. Однако заражение примерно на 50-70-й день может привести к заражению поросят, которые в дальнейшем остаются серонегативными и постоянно выделяют вирус. У данных поросят наблюдаются задержка роста, истощение, конъюнктивит, дерматиты и диарея. Иногда возникает врожденный тремор. Животные в конечном итоге погибают.

В связи с вариабельностью клинических форм и посмертных поражений КЧС, часто схожих с проявлениями других заболеваний свиней, актуальным

является подтверждение диагноза лабораторными методами диагностики [147, 187].

Согласно Ветеринарным правилам [9] диагноз на КЧС считается установленным при выделении возбудителя и/или обнаружение его генетического материала, не относящегося к вакцинным штаммам, либо при обнаружении антител к возбудителю, не связанных с вакцинацией. Антитела впервые обнаруживаются через 2-3 недели после заражения и сохраняются у выживших животных на протяжении всей жизни [147].

Выделение вируса в культуре клеток – «золотой стандарт» – классический метод диагностики вируса КЧС на чувствительных производственных клеточных линиях (ПКЛ) (РК-15, СК-6). Поскольку вирус КЧС не является цитопатогенным, его рост в системе клеточных культур подтверждается с помощью нескольких иммунологических методов, таких как иммунофлуоресценция или пероксидазный анализ с использованием окрашивания поли- или моноклональными антителами [83].

Флуоресцентный тест на антитела (Fluorescent Antibodies Test, FAT) – экспресс-тест, который может быть использован для обнаружения антигена вируса КЧС в криостатных срезах миндалин, селезенки, почек, лимфатических узлов или дистальных отделов подвздошной кишки, окрашенных непосредственно иммуноглобулином против вируса КЧС, конъюгированным с флуоресцентной меткой. При работе с ФИТЦ-конъюгатами поликлональных антител рекомендуется применять свободные от контаминации клеточные линии и фетальную бычью сыворотку [32]. Учитывая проблему повсеместной контаминации производственных клеточных линий вирусом ВД КРС, повысить специфичность метода возможно путем применения ФИТЦ-конъюгатов моноклональных антител либо антител, полученных на рекомбинантные антигены.

ОТ-ПЦР в реальном времени широко используется для выявления вирусного агента в дифференциальной диагностике, поскольку положительные результаты могут быть получены в случаях, когда выделение вируса или другие методы дают отрицательные результаты [115]. Преимущество ПЦР-диагностики заключается в

возможности диагностики как у стада в целом, так и у отдельного животного. Существует множество вариантов методов ПЦР для выявления инфекционных агентов [130]. Недостатками ОТ-ПЦР в реальном времени являются высокая стоимость и сложность из-за одновременного термоциклирования и флуоресцентного обнаружения, возможен неправильный дизайн олигонуклеотидов, не учитывающий гомологию с ВД КРС, ложноположительные результаты, вызванные лабораторным загрязнением образцов или оборудования, или вызванные ингибиторами ПЦР в образце или разрушенной РНК [26]. Были проведены исследования на возможность применения методов ОТ-ПЦР-РВ в дифференциации вакцинированных и инфицированных животных [97], подтверждающие их состоятельность.

Тест на нейтрализацию вируса – «золотой стандарт» выявления антител, исключая возможность перекрестной реактивности с другими представителями пестивирусов. Однако данный тест не способен различать антитела, обусловленные полевой инфекцией КЧС, и антитела, образовавшиеся в результате иммунизации маркированными вакцинами.

Наиболее распространенным методом диагностики является *иммуноферментный анализ (ИФА)*, позволяющий в быстрые сроки провести исследование большого количества образцов. Устанавливается факт наличия специфических антител при помощи соответствующих им антигенов либо антивидовых антител, конъюгированных с ферментом-меткой.

Двойной дифференцирующий вариант ИФА для диагностики КЧС является одним из основных инструментов серодиагностики, соответствующих стратегии DIVA. Исследования на антитела к E_{gns} играют решающую роль в дифференциации между животными, инфицированными вирусом, и животными, которые были вакцинированы маркерной вакциной (DIVA), вызывая защитный иммунный ответ, специфичный для E₂, но без антител, специфичных для E_{gns} вируса КЧС. Данная тест-система [55, 124] позволяет обнаружить инфицирование вирусом КЧС и дифференцировать животных, вакцинированных маркерной вакциной на основе E₂-субъединицы. Ведутся разработки [55, 201] для решения проблемы

перекрестной реактивности с антителами против пестивирусов жвачных (вторая стратегия DIVA) – использование дискриминационного ИФА. Дифференцирующие тест-системы представляют собой перспективное направление в диагностике КЧС, а также альтернативу традиционной дифференцировке антител с помощью теста на нейтрализацию вируса.

Группой исследователей [132] были проведен анализ имеющихся на тот момент тест-систем на основе рекомбинантных белков E2 и Erns, оценена их специфичность, чувствительность и пригодность для DIVA-диагностики.

Тесты ИФА, основанные на полноразмерном белке E2 вируса КЧС, не способны дифференцировать антитела против вируса КЧС от антител против ВД КРС, что приводит к ложноположительным результатам. Проблема перекрестной реактивности с гомологичными представителями пестивирусов можно решить с помощью усечения белков [60]. ИФА-тесты на основе Erns и усеченного пептида E2 [109, 205] показали высокую чувствительность и специфичность, перекрестной реакции в исследуемых сыворотках не наблюдалось.

Секвенирование нового поколения позволяет быстро определять полноразмерные последовательности, но из-за ограниченного доступа и высокой стоимости применение таких методов ограничено.

В последние десятилетия можно увидеть модернизацию и появление новых методик диагностики КЧС, отличающиеся более высоким уровнем чувствительности и специфичности [52, 114, 187, 201].

Разрабатываются новые способы индикации вирусной РНК в клетках и тканях – *ViewRNA ISH* [52], демонстрирующие большую чувствительность и специфичность, в сравнении стандартных методик, таких как FAT и иммунохроматографического анализа (ИХА).

Тест на нейтрализацию вируса в сыворотке (serum neutralization test, SNT) на основе люциферазы [114] может заменить обычные SNT в качестве высокопроизводительного теста на антитела к пестивирусам.

Метод иммунохроматографического анализа (ИХА) предназначен для экспресс-индикации вируса КЧС в «полевых» условиях, сохраняя при этом

чувствительность и специфичность реакции [111, 187]. ИХА на основе E2 может быть использован для раннего выявления антител к КЧС и для разработки рационального протокола иммунизации на более ранних этапах. Так, ИХА-тест может использоваться для дифференциации инфицированных и вакцинированных животных [59]. ИХА на основе растительных рекомбинантных белков [113] продемонстрировал высокую чувствительность при выявлении антител к вирусу КЧС E2 и Eгns даже при низких титрах нейтрализующих антител, а также исключал перекрестную реактивность с антителами к другим пестивирусам.

Таким образом, несмотря на постоянное развитие средств диагностики КЧС и появлении коммерческих и внутрилабораторных диагностических наборов, необходимо повышать чувствительность, специфичность и автоматизацию тест-систем. Актуальным является возможность проведения анализа в полевых условиях. Важно разработать метод DIVA-диагностики, который не будет давать перекрестной реакции с антителами, вызванными другими пестивирусами.

1.5 Технологические методы контроля вакцинного сырья вируса КЧС

Контроль вакцинного сырья является важной частью процесса производства вакцин, обеспечивая их безопасность и эффективность. Согласно требованиям ВОЗЖ, в отношении рабочих посевных вирусов должны контролироваться следующие критерии качества: уровни репликации в культуре клеток, фактический выход вируса и его стабильность [83]. При длительном пассировании вируса, особенно в гетерологичной культуре клеток, происходят изменения его иммунобиологических свойств [17].

Длительное культивирование ПКЛ с использованием вирусосодержащих сывороток без их надлежащего тестирования на контаминацию приводит к производственным потерям и некорректной интерпретации данных в исследованиях механизмов взаимодействия вируса с клеткой [15]. Так, в исследованиях [22] выявлено, что при непрерывном пассировании вирулентность вируса становится выше, тем самым снижая протективную эффективность вакцин.

Технологический контроль вакцинного сырья возможно проводить с помощью количественного сэндвич-варианта ИФА, РИФ и ПЦР-диагностики [12, 13, 24, 30, 35, 65]. Возможно использование таких методов, как определение белка по М. Брэдфорду [72], однако невысокая чувствительность затрудняет диагностику [12].

Возможность прямой визуализации антигена вируса КЧС методом РИФ в окрашенных клетках позволяет достоверно определить инфекционный титр вируса [32].

Методы ПЦР отличаются специфичностью, чувствительностью и быстротой. Однако, поскольку целью обнаружения является вирусная нуклеиновая кислота, сама технология не позволяет различать инфекционные и неинфекционные вирусы. Поэтому в результатах всегда присутствуют ложноположительные сигналы [213].

В работе Баборенко и соавт. (2020) [35] показано, что разработанный ими конкурентный жидкофазный вариант ИФА может использоваться на промежуточных этапах лабораторного контроля при изготовлении антигена вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) для определения активности вакцинного полуфабриката.

ИФА имеет ряд ограничений, в частности, возможности увеличения чувствительности метода ограничиваются фоном анализируемого соединения, субстратной специфичностью фермента и аффинностью антител; наличие в тестируемых образцах кофакторов, ингибиторов и стимуляторов активности ферментов; возможное изменение каталитической активности фермента при его конъюгировании с антигеном [12].

Подытоживая, технологический контроль вакцинного сырья занимает важную роль в производстве биопрепаратов, обеспечивая безопасность, эффективность и соблюдение международных стандартов.

1.6 Заключение по обзору литературы

Острые и хронические вирусные инфекции представителей семейства *Suidae* оказывают беспрецедентное влияние на мировую продовольственную

безопасность. Первоочередную значимость для стабилизации эпизоотической ситуации приобретают меры, направленные на предотвращение проникновения возбудителей на новые территории, а также на недопущение их дальнейшего укоренения и распространения [14], одной из которых является проведение специфической профилактики.

Россия в настоящее время входит в число мировых лидеров по производству свинины, однако для включения в глобальный рынок необходимо получение официального статуса свободы от КЧС через процедуру декларации, предписанную ВОЗЖ [8, 34]. За последние годы неблагополучие по КЧС сместилось из центральных регионов России в приграничные восточные регионы, при этом тренд циркуляции вируса в популяциях диких кабанов неизменно прогрессирует. Согласно оценкам исследователей, в долгосрочной перспективе прогнозируется сохранение данной ситуации наряду со спорадиями в популяциях домашних свиней [20, 44].

Для борьбы с КЧС долгие годы использовались высокоэффективные и безопасные живые аттенуированные вакцины [29, 46, 122]. Однако основным недостатком этих вакцин является отсутствие возможности дифференцировать инфицированных животных от вакцинированных.

Известно, что в процессе контроля качества рекомбинантных вакцин необходимо проводить оценку их физико-химических свойств, в частности, молекулярной массы, электрофоретической подвижности, хроматографического профиля и иммунохимической характеристики их отдельных структурных единиц [11, 23]. Не менее актуальным является вопрос комплектации подобных вакцин точными и экспрессными диагностикумами, позволяющими проводить оценку напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу КЧС. Оптимальным методом для индикации вирусспецифических антител, на наш взгляд, является ИФА, зарекомендовавший себя в качестве ценного диагностического инструмента [193].

Таким образом, в последние годы развитие методов молекулярно-генетического анализа и редактирования геномов вирусов значительно повлияло на

исследования в области разработки вакцин. Так, все больше отходят от использования традиционных вакцин для специфической профилактики ряда особо опасных и экономически значимых болезней в сторону генетического редактирования и молекулярного клонирования, позволяющих создавать различные модифицированные вирусы и рекомбинантные белки, которые могут быть использованы в разработке биопрепаратов для вакцинопрофилактики и диагностикумов.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1.1 Нормативные документы

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

– СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» [39];

– Кодекс здоровья наземных животных ВОЗЖ (OIE Terrestrial manual), «Рекомендации по болезням списка МЭБ и другим важным для международной торговли болезням», глава 3.9.2 «Инфекция вирусом классической чумы свиней» [83];

– Приказ Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 29.09.2020 № 850 «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов классической чумы свиней» [9];

– Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.11.2023 № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований» [37];

– Руководящие принципы ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) 2.0 – набор рекомендаций по улучшению стандартов отчетности для исследований на животных [199];

– Указания Американской ассоциации ветеринарной медицины (AVMA) по эвтаназии животных [68].

2.1.2 Штаммы, плазмиды и клеточные линии

Перечень штаммов микроорганизмов, плазмидных векторов и клеточных линий, использованных в работе, представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Штаммы, плазмиды и клетки эукариот, использованные в работе

Наименование	Характеристики	Источник / происхождение
Штаммы вирусов		
Вирус КЧС (<i>Pestivirus C</i>), штамм «Ши-Мынь»	Генотип 1.1; Genbank ID AY775178.2. Репродуцируется на ПКЛ почек эмбриона свиньи (РК-15), титр – 5,25 lg LD ₅₀ /см ³ , стерилен в отношении бактерий, грибов и вирусов-контаминантов	Государственная коллекция микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Галещенская биофабрика, 1976 г.)
Вирус болезни Ауески (<i>Suid herpesvirus 1</i>), штамм «Арский»	Генотип 1; Репродуцируется на ПКЛ невриномы Гассерова узла крысы (НГУК), титр – 6,5 lg ТЦД ₅₀ /см ³ , стерилен в отношении бактерий, грибов и вирусов-контаминантов	Государственная коллекция микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (ФГБУ «ВГНКИ», 1977 г.)
Вирус ВД КРС (<i>Pestivirus B</i>), штамм «NADL»	Генотип 1; Genbank ID NC_001461.1. Репродуцируется на ПЛК легкого эмбриона коровы (ЛЭК), титр – 5,5 lg ТЦД ₅₀ /см ³ , стерилен в отношении бактерий, грибов и вирусов-контаминантов	Государственная коллекция микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (ЦВЛ МСХ Великобритании, 1979 г.)
Вирус бешенства (<i>Rabies virus</i>), штамм «Овечий ГНКИ»	Генотип 1; Репродуцируется на ПКЛ почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/13), титр – 5,0 lg ТЦД ₅₀ /см ³ , антигенная специфичность (индекс нейтрализации антирабической референс-сыворотки) не ниже 4,0 lg ТЦД ₅₀ /см ³	Государственная коллекция микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (ФГБУ «ВГНКИ», 1981 г.)
Вирус бешенства (<i>Rabies virus</i>), штамм «CVS»	Генотип 1; Репродуцируется на ПКЛ почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/13), инфекционная активность на белых мышах не ниже 4,0 lg ТЦД ₅₀ /см ³ , антигенная специфичность (индекс нейтрализации	Государственная коллекция микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (ФГБУ «ВГНКИ», 2010 г.)

Наименование	Характеристики	Источник / происхождение
	антирабической референс-сыворотки) не ниже 3,0 lg ТЦД ₅₀ /см ³	
Штаммы бактерий		
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Генотип F ⁻ , ompT, hsdSB (rB ⁻ , mB ⁻), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, (Cmr)	«Novagen», США
<i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	Генотип F ⁻ , ompT, hsdSB(rB ⁻ , mB ⁻), gal, dcm (DE3), pRARE2 (CamR)	«Novagen», США
<i>E. coli</i> DH5α	Генотип Δ(argF-lac)169, φ80dlacZ58(M15), ΔphoA8, glnX44(AS), deoR481, rfbC1, gyrA96(NalR), recA1, endA1, thiE1, hsdR17	«Novagen», США
Плазмиды		
pET-28a(+)	Гексагистиридиновый тег, сайт связывания тромбина, устойчивость к канамицину	«Novagen», США
Клетки эукариот		
Клетки почки эмбриона свиньи (PK-15)	Культивируется на среде Игла-МЕМ с 10 % ФБС; кариотип: модальный класс хромосом 46-50, интервал изменчивости 36-75. Стерильна в отношении бактерий, грибов и микоплазм	Коллекция культур клеток млекопитающих ФГБНУ «ФЦТРБ- ВНИВИ» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2007 г.)

Вирусологические методы. Все работы с патогенами вирусного происхождения проводились в условиях лаборатории вирусных антропоозонозов (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). Перечень патологического материала, используемого в ходе работы описан в таблице 4.

Таблица 4 – Патологический материал, используемый в ходе работы

Наименование	Количество проб	Источник / происхождение
Сыворотка крови свиней	249 / 48	Свиноводческие фермы и комплексы Республики Татарстан / питомник ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»
Селезенка свиньи, павшая от КЧС	15	Виварий ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

Культивирование вируса КЧС. Культивирование вируса КЧС производилось на культурах клеток РК-15 согласно протоколам, предусмотренным главой 3.8.3. «Кодекса здоровья наземных животных» (ВОЗЖ), п. В «Диагностические техники».

Выделение и очистка нативного антигена вируса КЧС. В качестве образцов сравнения использовали нативный антиген вируса КЧС, полученный из культуральной жидкости, осветленной низкоскоростным центрифугированием, сконцентрированной ультрацентрифугированием в 30 % растворе сахарозы (120000 g, 4 ч, плюс 4 °С) и разделенной в 30-60 % градиенте плотности сахарозы, как описано в работе Kumar с соавт. (2019) [133].

2.1.4 Биоинформационные методы

Анализ геномов целевых возбудителей. Для анализа использовали последовательности геномов и протеомов эпизоотически значимых и вакцинных штаммов и изолятов целевых возбудителей, депонированных в базе данных Национального центра биотехнологической информации Genbank (NCBI, NIH, США) (таблица 5).

Таблица 5 – Перечень использованных в работе последовательностей целевых возбудителей

Возбудитель	Представители отдельных филогенетических групп
Вирус КЧС (<i>Pestivirus C</i> , <i>Flaviviridae</i>)	<p><u>Генотип 1.1:</u> Shimen (ID AY775178.2), CSFV-GZ-2009 (ID HQ380231.1), C-ZJ-2008 (ID HM175885.1), C-ZJ-2008 (ID HM175885.1), HEBZ (ID GU592790.1), Alfort/187 (ID X87939.1), HCLV (ID AF531433.1), Riems (ID AY259122.1)</p> <p><u>Генотип 1.2:</u> Baker A (ID MZ643986.1)</p> <p><u>Генотип 1.3:</u> CSF0650 (ID JX028200.1), CSF0306 (ID JQ411570.1)</p> <p><u>Генотип 1.4:</u> csf0705 Margarita (ID jx028201.1), CSF1057 Santiago de Cuba (ID JX028203.1)</p> <p><u>Генотип 2:</u> Eystrup (ID NC_002657.1)</p> <p><u>Генотип 2.1a:</u> Paderborn (ID AY072924.1), Zj0801 (ID FJ529205.1), 96TD (ID AY554397.1)</p> <p><u>Генотип 2.1b:</u> 0406/CH/01/TWN (ID AY568569.1), CSFV-JXNC01-2015 (ID KX064281.1), C/HVRI (ID AY805221.1)</p> <p><u>Генотип 2.1c:</u> HNSD-2012 (ID JX218094.1), GXF29/2013 (ID KP233070.1), HNLV-2011 (ID JX262391.1)</p>

Возбудитель	Представители отдельных филогенетических групп
	<p><u>Геномун 2.1d</u>: JSZL (ID KT119352.1), HuN23/2013 (ID KP233071.1)</p> <p><u>Геномун 2.2</u>: Bergen (ID KJ619377.1), ND20 (ID MH979232.1), CSFV_IND/UK/LAL-290 (ID KC851953.1)</p> <p><u>Геномун 2.3</u>: Alfort/Tüebingen (ID J04358.2), CSFV/2.3/dp/CSF864/2007/BG/Jambul (ID HQ148062.1), CSFV/2.3/dp/CSF0821/2002/HR/Novska (ID HQ148061.1)</p> <p><u>Геномун 3.4</u>: 94.4/IL/94/TWN (ID AY646427.1), CSF0309 Kanagawa (ID JQ411571.1)</p>
Вирус ВД КРС (<i>Pestivirus A, B, Flaviviridae</i>)	<p><u>Геномун 1a</u>: NADL (ID AJ133738), 303 (ID EF683556.1), ufms3 (ID EF683555.1), Oregon C24V (ID AF091605.1), USMARC-55477 (ID KP941586.1), SD1 (ID M96751);</p> <p><u>Генотип 1b</u>: Osloss (ID M96687), Manas-1 (ID EU555288), QHQL-311 (ID KJ578873), ZY (ID MT179846.1), ZD1 (ID MT179841.1), ZD2 (ID MT179842.1), ZD3 (ID MT179843.1), ZD4 (ID MT179844.1);</p> <p><u>Геномун 1i</u>: 2186 (ID JQ920104.1), 2415 (ID JQ920215.1), 23-13 (ID FJ493484.1);</p> <p><u>Геномун 1d</u>: 71-24 (ID KF205313), 10JJ-SKR (ID KC757383), BJ1201 (ID KT943518.1), ZD5 (ID MT179845), SER (ID MT179840.1), LD (ID MT179836.1);</p> <p><u>Геномун 1g</u>: 10/08 (ID JN715004), 48/08 (ID JN715036);</p> <p><u>Геномун 1h</u>: UM/126/07 (ID LT631725), GZ412 (ID KU351589);</p> <p><u>Геномун 1e</u>: 89-05 (ID KF205319), Carlito (ID KP313732);</p> <p><u>Геномун 1k</u>: SuwanCp (ID KC853440.1), SuwaCp (ID AF117699);</p> <p><u>Геномун 1f</u>: J (ID AF298067), W (ID AF298073).</p>

Поиск иммуногенных эпитопов и вторичных структур. Поиск иммуногенных эпитопов осуществлялся по базе данных «The Immune Epitope Database» (IEDB, США). Антигенность кандидатных пептидов для включения в состав диагностических композиций анализировали при помощи ресурса «Vaxign 2.0» («Violin», США) при пороговом значении $\text{cutoff} \geq 0,4$. Поиск трансмембранных доменов и сигнальных пептидов осуществляли при помощи онлайн-ресурсов TMHMM 2.0 и SignalP 5.0 (DTU Health Tech, Дания). Прогнозирование сайтов N- и O-гликозилирования осуществляли при помощи сервисов NetNGlyc – 1.0 и DictyOGlyc – 1.1 (DTU Health Tech, Дания) при установленных стандартных параметрах. Анализ консервативности эпитопов был проведен с помощью программы BLASTn (NCBI, NIH, США) на основе локального выравнивания генов против геномов представителей рода *Pestivirus*. При оценке гомологии

нуклеотидных последовательностей учитывались показатели идентичности, охвата и значимости выравнивания (E-value <0,05). Основные физико-химические характеристики белков (аминокислотный состав, молекулярную массу, теоретическую изоэлектрическую точку (pI), коэффициент экстинкции, расчетный период полураспада *in vivo*, алифатический индекс (АИ), индекс нестабильности (ИН), индекс гидроксипатичности GRAVY) определяли с помощью инструмента «ProtParam Tool» («ExPASy», Швейцария). Гомологическое моделирование полноразмерной структуры полипептида производили при помощи сервиса Swiss-Model («SIB», Швейцария).

2.1.5 Методы генной инженерии

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

Трансформация компетентных клеток. Химически компетентные клетки *E. coli* (штамм DH5 α – для наработки плазмид, штаммы BL-21(DE3), Rosetta 2(DE3) – для экспрессии) трансформировали методом теплового шока в присутствии ионов Ca²⁺. К 100 мкл стока компетентных клеток с концентрацией не менее 1 \times 10⁶ КОЕ/мл добавляли 50 нг соответствующей плазмиды, инкубировали во льду в течение 20-30 мин, после чего подвергали тепловому шоку при 42 °С в течение 2 мин. После повторной инкубации во льду в течение 2 мин к клеткам добавляли 1 мл среды Лурия-Бертани (LB) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Суспензию трансформированных клеток высевали по 100 мкл на LB-агар, содержащий канамицин в концентрации 200 мкг/мл. Выросшие клоны культивировали на аналогичной LB-Cm⁺/LB-Amp⁺ среде. Выделение плазмидной ДНК проводили при помощи набора «Plasmid MidiPrep 2.0» (ЗАО «Евроген», Россия) согласно

инструкции производителя. Концентрацию выделенной ДНК определяли с использованием спектрофотометра Nanodrop 2000 («Thermo Fisher Scientific», США) при ОП₂₆₀.

Условия культивирования штаммов-продуцентов. Питательные среды и условия культивирования штаммов *E. coli* – продуцентов рекомбинантных антигенов E2 и Erns представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Питательные среды и условия культивирования штаммов-продуцентов [45]

Питательные среды	Свойства	Условия культивирования
<u>Среда LB:</u> 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, pH 7,5±0,2 34 мкг/мл канамицина или 200 мкг/мл ампициллина	Стандартная среда; максимальная ОП ₆₀₀ = 2-3 ед	Инкубация на термошейкере «ES-20» («Biosan», Латвия) при плюс 37 °С при 180 rpm до достижения ОП ₆₀₀ 0,5-0,7 ед
<u>LB-агар:</u> 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 1,5% агара, 34 мкг/мл канамицина или 200 мкг/мл ампициллина	Стандартная среда для антибиотикоселекции	Культивирование 16-24 ч при 37 °С до роста одиночных колоний диаметром ~2–3 мм
<u>SOB (Super Optimal Broth):</u> 2% триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, NaCl, KCl, MgCl ₂ , MgSO ₄ , pH 7,0	Очень богатая среда с добавкой ионов Mg ²⁺ для достижения высокой плотности клеток; максимальная ОП ₆₀₀ = 10 ед	Инкубация на термошейкере «ES-20» («Biosan», Латвия) при плюс 37 °С при 180 rpm
<u>Аутоиндукционная среда по Studier [196]:</u> 25 mM NH ₄ SO ₄ , 50 mM KH ₂ PO ₄ , 50 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,5 % глицерола, 0,05 % глюкозы, 0,2 % α-лактозы, 1 mM MgSO ₄	Содержит глюкозу, глицерин и лактозу; максимальная ОП ₆₀₀ = 10 ед	Культивирование при 30-37 °С до насыщения ОП ₆₀₀ 4-7 ед

Экспрессия белков E2 и Erns. Экспрессию гена индуцировали добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ, «Promega», США) в диапазоне концентраций 0,1-1 мМ, после чего культивировали клетки при температуре плюс 25, 30, 37 °С в течение 3-16 ч. Дополнительно оценивали возможность

аутоиндукции экспрессии по Studier [196]; для этого ночную культуру продуцента инокулировали в объеме 0,1 % в аутоиндукционную среду. Отбор проб проводили ежечасно в течение всего периода культивирования и хранили при минус 20 °С для дальнейшей качественной и количественной оценки целевых белков.

Манипуляции с нуклеиновыми кислотами.

Выделение нуклеиновых кислот. Выделение проводили при помощи наборов «АмплиПрайм РИБО-преп» (ООО «НекстБио», Россия), «РИБО-Преп» (ФБУН «НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия) согласно инструкциям производителей.

Дизайн олигонуклеотидных праймеров. Поиск нуклеотидных последовательностей для разработки специфичных праймеров, фланкирующих целевые гены вирусов КЧС и ВД КРС, осуществлялся по базам Национального Центра Биоинформатики (NCBI, NIH, США). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей и поиска консервативных участков была использована программа «VectorNTI 10» (<https://catalog.invitrogen.com>). Последовательности олигонуклеотидов подбирались вручную. Для анализа свойств праймеров использовалась программа «Oligo Analyzer 3.1» (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/default.aspx>).

Комплементарность праймеров соответствующим генам оценивали с помощью программы «Primer-BLAST» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Постановка ПЦР. Постановку ПЦР осуществляли на амплификаторе С1000 с оптическим блоком CFX96 («Bio-Rad», США). Условия проведения ПЦР для детекции различных генов представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Условия проведения ПЦР для детекции различных локусов геномной ДНК

Целевой ген	Олигонуклеотиды, 3' → 5' (позиция в геноме)	Реакционная смесь (на 1 пробу объемом 10 мкл):	Программа амплификации
Ген <i>E2</i> вируса КЧС	Fp gaagaacctgaaggctgcgacac Rp cctgtcctgcctcttcaataaааа	Специфические праймеры – по 0,3 мкл, смесь dNTP – 0,2 мкл, Taq-полимераза – 0,3 мкл, ПЦР-буфер – 1 мкл, MMLV-ревертаза – 0,2 мкл, вода деионизированная – 5,7 мкл (ЗАО «Евроген», Россия), ДНК-матрица – 2 мкл	1) Денатурация ДНК при 95 °С в течение 5 мин; 2) 35 циклов, состоящих из: 30 с при 94 °С; 30 с при 54 °С; 45 с при 72 °С. 3) 10 мин при 72 °С.
Ген <i>Erns</i> вируса КЧС	Fp caccatggcggaаааatatcaccagtggaacctgagcgc Rp ctctcgagcgcgtacgcgccgaaccaggttttgc		1) Денатурация ДНК при 95 °С в течение 5 мин; 2) 35 циклов, состоящих из: 15 с при 94 °С; 30 с при 60 °С; 30 с при 72 °С
Область 5'UTR вируса ВД КРС [108]	Fp atgccatagtaggactagc Rp ctccatgtccatgtacag		Аналогично гену <i>E2</i>
Ген <i>E2</i> вируса ВД КРС [181]	Fp tgggtggccttatgagac Rp cccatcatcactatttcacc		1) Денатурация ДНК при 95 °С в течение 5 мин; 2) 35 циклов, состоящих из: 30 с при 94 °С, 30 с при 55 °С, 90 с при 72 °С

Электрофорез в агарозном геле. Учёт результатов ПЦР проводили методом электрофоретического разделения в 1,3 % агарозном геле в TBE-буфере (89 мМ триса, 89 мМ борной кислоты, 2 мМ ЭДТА, pH 8,0) с бромистым этидием при напряжении 0,6 В/см² в течение 30 мин с последующим детектированием в УФ-свете. В качестве стандарта при определении длин полученных ампликонов использовали маркер «GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder» («Thermo Fisher Scientific», США) с линейкой фрагментов от 250 до 10000 п.о.

Секвенирование по Сэнгеру. Ферментативно очищенные продукты ПЦР секвенировали на аутсорсе (ЗАО «Евроген», Россия) на автоматическом секвенаторе 3500xL Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) с использованием праймеров для амплификации. Гомологичные нуклеотидные последовательности анализируемых локусов определяли методом множественного выравнивания с последовательностями штаммов и изолятов соответствующих возбудителей, депонированными в базе данных Genbank, применяя программное обеспечение MEGA 11.0 («Mega Software», США). Эволюционные дистанции между последовательностями рассчитывали при помощи стандартных методов молекулярной филогенетики.

2.1.6 Выделение и очистка рекомбинантных белков

Электрофорез в полиакриламидном геле. Электрофоретическое разделение белков проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях по Laemmli (1979) [163]. В работе использовали 5 % концентрирующий и 15 % разделяющий гели (таблица 8). В качестве маркеров молекулярных масс белков использовали «Precision Plus Protein™ Dual Color Standards» и «Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards» («Bio-Rad», США). Электрофорез проводили при напряжении 140 В в электродном буфере (таблица 9) с использованием камеры «Mini-PROTEAN® Tetra» («Bio-Rad», США). После проведения электрофореза гели выдерживали в фиксирующем растворе в течение 15 мин, затем окрашивали раствором Кумасси R-250 в течение 1 ч и выдерживали в отмывающем буфере с нагревом до удаления фона (таблица 9).

Таблица 8 – Состав гелей для SDS-электрофореза (на 10 мл геля)

<i>Концентрирующий гель, мл</i>		<i>Разделяющий гель 15%, мл</i>	
Акриламид смесь с бисакриламидом 37.5 : 1 раствор 30%	1,64	Акриламид смесь с бисакриламидом 37.5 : 1 раствор 30%	5,0
0,5 М трис-НСl, рН 6,8	1,26	1,5 М трис-НСl, рН 8,8	3,75
SDS, 10 %	0,1	SDS, 10 %	0,1
APS, 10 %	0,1	APS, 10 %	0,1
TEMED	0,01	TEMED	0,03
dH ₂ O	6,8	dH ₂ O	1,05

Таблица 9– Растворы для проведения SDS-электрофореза

<i>А. 5× трис-глициновый буфер, рН 8,3, 1 л</i>		<i>Б. Фиксирующий раствор, 100 мл</i>	
Трис	15,14 г	Ледяная уксусная кислота	10 мл
Глицин	93,81 г	Изопропанол	25 мл
SDS, 0,5 %	50 мл	dH ₂ O	65 мл
dH ₂ O	до 1 л		
<i>В. Окрашивающий раствор, 1 л</i>		<i>Г. Отмывающий раствор, 200 мл</i>	
Кумасси R-250	0,25 г	Ледяная уксусная кислота	14 мл
Ледяная уксусная кислота	500 мл	Изопропанол	50 мл
Этанол	75 мл	dH ₂ O	136 мл
dH ₂ O	425 мл		
<i>Д. Буфер для нанесения образцов, 10 мл</i>			
0,5 М трис-НСl, рН 6,8		2,0 мл	
14,5 М β-меркаптоэтанол		0,28 мл	
SDS, 10 %		4 мл	
100× бромфеноловый синий		0,1 мл	
Глицерол		4 мл / 5 г	

Иммуноблот (вестерн-блоттинг). Перенос гелей на нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) (Supported nitrocellulose membrane, 0,45 μm, 30 cm x 3 cm roll, Bio-Rad) осуществляли по методике, предложенной Towbin H. (1979) [207] во влажном варианте.

Диспергирование клеток штаммов-продуцентов. Размороженную клеточную массу ресуспендировали в 1 мл лизирующего буфера (25 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 0,5 М NaCl, 10 мМ имидазола, 5 % глицерола, 1 мМ фенилметилсульфонил фторид (PMSF)). Разрушение клеточных стенок штамма-продуцента произвели при помощи ультразвукового гомогенизатора «Bandelin Sonopuls HD 2070» («Bandelin»),

Германия) при 100 % амплитуде 3 цикла по 1 минуте озвучивания с интервалом 60 с между циклами, образец при этом находился на льду. Клеточный дебрис осаждали при 4000 g в течении 40 мин при 4 °С.

Металл-хелатная аффинная хроматография. Протокол проведения хроматографии заключался в следующем: супернатант дезинтегрированного лизата подвергали аффинной хроматографии на колонке (Econo-Pac[®] Chromatography Columns, BioRad) с сефарозой, содержащей никель-нитрилтриуксусную кислоту (Ni-NTA) («Qiagen», США) по стандартному протоколу [38]. После связывания и промывки колонки буфером (50 mM трис-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM имидазола, pH 6,0) целевые белки извлекали при помощи элюирующего буфера (50 mM трис-HCl, 100 mM NaCl, 300 mM имидазола, pH 7,8). Элюированные фракции объединяли и диализовали против аналогичного буфера без добавления имидазола, после чего осаждали в центрифужном концентраторе «Sartorius Vivaspin» («Vivaspin», Германия) с номинальным отсечением по молекулярной массе 30 кДа. Очищенные образцы закладывали на хранение при минус 20 °С для дальнейшего качественного анализа. Отдельные модификации протокола рассмотрены в соответствующих подразделах раздела «Результаты собственных исследований» диссертационной работы.

Рефолдинг денатурированного белка. 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. Относительное содержание растворимого белка определяли путем сравнительной денситометрии зон ПААГ, соответствующих целевому белку по электрофоретической подвижности, в треках исследуемого образца и образца сравнения (солюбилизата ТВ) при помощи программного обеспечения «ImageLab 6.0» («Bio-Rad», США).

Высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Образцы телец включения антигенов E2 и Erns суспендировали в 8 М растворе мочевины с добавлением дитиотреитола (ДТТ) до конечной концентрации 10 мМ и инкубировали при перемешивании в течение 30 минут при 37 °С. Образцы, разбавленные в 4 раза деионизованной водой, подвергали ферментативному гидролизу эндопротеиназами GluC, AspN, LysC («New England Biolabs», Великобритания) при 37 °С в течение ночи. Для очистки и концентрирования образцов использовали твердофазную экстракцию. Анализ полученных гидролизатов проводили методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием аппаратного комплекса на основе ВЭЖХ хроматографа 1290 Infinity II (Agilent Technologies, США), соединенного с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром с возможностью разделения по ионной подвижности timsTOF Pro (Bruker Daltonik GmbH, США), оснащенного источником ионизации электрораспылением Apollo II.

Хроматографическое разделение проб осуществляли в соответствии с условиями, представленным в таблице 10.

Таблица 10 – Условия хроматографического разделения

Параметр	Значение
Колонка	ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution High Definition, 2,1x150 mm, 2,8 µm (Agilent Technologies, США)
Температура термостата колонки	40°C
Скорость потока	200 мкл/мин
Объем вводимой пробы	5 мкл
Состав элюентов	Фаза А – 0,1% (об./об.) водный раствор муравьиной кислоты; Фаза Б – 0,1% (об./об.) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле
Режим элюирования	Градиентный 2% Б (0-1 мин), 2-50% Б (1-25 мин), 50-85% Б (25-30 мин), 85% Б (30-35 мин), 85%-2% Б (35-37мин), 5% Б (37-47 мин)

Регистрацию масс-спектров осуществляли в соответствии с условиями, представленным в таблице 11.

Таблица 11 – Условия работы масс-спектрометра

Параметр	Значение
Режим ионизации	положительный
Режим сбора данных	PASEF
Диапазон m/z	100-1700
Диапазон $1/K_0$	0,6-1,6 В•с/см ²
Ramp Time	100 мс
Source	
Смещение концевой пластины (End Plate Offset)	500 В
Напряжение на капилляре	4500 В
Давление небулайзера	2,5 бар
Осушающий газ	азот
Скорость потока осушающего газа	6 л/мин
Температура осушающего газа	200°С
MS/MS	
Количество рамп (PASEF Number of PASEF ramps)	10
Целевая интенсивность (Target intensity)	20000
Порог интенсивности (Intensity threshold)	2000
Энергия столкновения (Collision energy)	20 эВ ($1/K_0 - 0,6 \text{ В}\cdot\text{с}/\text{см}^2$) 59 эВ ($1/K_0 - 1,6 \text{ В}\cdot\text{с}/\text{см}^2$)
Ширина изоляции (Isolation width)	2 (m/z 700,0) 3 (m/z 800,0)

Примечание: PASEF – спектрометрия с параллельным накоплением и последовательной фрагментацией; MS/MS – тандемная масс-спектрометрия.

Идентификацию белков на основании данных, полученных по результатам ВЭЖХ-МС/МС анализа гидролизатов исследуемых белков, осуществляли с использованием программного обеспечения «Peaks Studio X+» (версия 8.5, «Bioinformatics Solutions Inc.», Канада) при следующих настройках: база данных – Erns или E2 в зависимости от исследуемого образца (базы Erns и E2 были созданы вручную на основании предполагаемой последовательности полипротеина вируса КЧС); фермент – Trypsin, GluC, LysC/AspN (указывался соответствующий фермент для каждого из проанализированных образцов); число пропущенных ферментом сайтов расщепления – 1; ошибка массы прекурсора – 15 ppm; ошибка фрагмента иона – 0,1 Да.

2.1.7 Конструирование серологических тест-систем

Получение гипериммунных сывороток. Схемы получения гипериммунных сывороток от лабораторных животных-доноров представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Схемы получения гипериммунных сывороток к антигенам вируса КЧС

Животное / иммуноген	Схема иммунизации
Овцы романовской породы (n=3) живой массой 45-50 кг / нативный антиген вируса КЧС	<ul style="list-style-type: none"> – 4-кратное введение инактивированного антигена в дозе 25 мкг/кг живой массы с интервалом 14 сут в смеси с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ, «Thermo Fisher Scientific», США) в/м в область медиальной поверхности бедра в суммарном объеме 5 см³; – Взятие крови – из яремной вены в объеме 200-250 мл через 14 сут после заключительной иммунизации при достижении титров сыворотки в ИФА не менее 1:2500
Свиньи крупной белой породы (n=6) в возрасте 7-8 мес живой массой 50-60 кг / цельновирионный антиген вируса КЧС (вакцина против КЧС живая культуральная сухая «ВНИИЗЖ-КЧС» + последующее заражение вирусом КЧС, штамм «Ши-Мынь», в дозе 5 lg LD ₅₀)	<ul style="list-style-type: none"> – Однократное введение вакцины согласно инструкции в дозе 1000 ПД₅₀; – Контрольное заражение высокопатогенным штаммом вируса КЧС; – Тотальное взятие крови через 21 день после контрольного заражения; – Определение уровня специфических антител в ИФА («КЧС-СЕРОТЕСТ», ООО «Ветбиохим»)
Кролики породы советская шиншилла (n=6) живой массой 2,5-3 кг / рекомбинантные антигены E2 и Erns	<ul style="list-style-type: none"> – Двукратное введение хроматографически очищенных антигенов в дозе 50 мкг в смеси с адъювантом «Montanid ISA 201» (ФКП «Щелковский биокомбинат»); – Взятие крови – из краевой ушной вены в объеме 20-30 мл через 21 сут после заключительной иммунизации при достижении титров сыворотки в ИФА не менее 1:640

Выделение и очистка специфических иммуноглобулинов. Выделение γ -глобулиновой фракции проводили методом преципитации насыщенным раствором сульфата аммония. К охлажденной сыворотке крови при постоянном помешивании добавляли насыщенный раствор сульфата аммония из расчета 50 % конечного насыщения, осадок промывали 2,78 М раствором сульфата аммония, далее выполняли растворение отмытого осадка и диализ против стартового буфера

(0,025 М трис-НСl буфера, рН 7,8) с последующей хроматографической очисткой с ДЭАЭ целлюлозой. Белковые профили фракций определяли методом аналитического электрофореза в 7% ПААГ по Laemmli последующим окрашиванием коллоидным раствором Кумасси G-250. Оценка серологической активности и специфичности полученных иммуноглобулинов осуществлялась методом непрямого ИФА.

Получение пероксидазных конъюгатов. Конъюгаты специфических антител с пероксидазой хрена («Sigma Aldrich», США) получали периодатным методом по Nakane [171] с отдельными модификациями.

Постановка иммуноферментного анализа. Состав растворов, применяемых для постановки непрямого ИФА, и схемы проведения реакций представлены в таблицах 13, 14.

Таблица 13 – Буферные растворы и реактивы, применяемые для постановки ИФА

<i>А. 0,01 М фосфатно-буферный раствор (ФБР), рН 7,4, 1,2 л</i>	<i>Б. 0,1 М карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ), рН 9,5, 1 л</i>
Натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный (Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O) 2 г	Карбонат натрия (Na ₂ CO ₃) 0,33 г
Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH ₂ PO ₄) 0,2 г	Гидрокарбонат натрия (NaHCO ₃) 0,57 г
Хлорид натрия (NaCl) 8,5 г	dH ₂ O до 1 л
dH ₂ O до 1,2 л	
<i>В. Субстрат, 10 мл</i>	<i>Г. 0,01 М фосфатно-буферный раствор с Tween-20 (ФБР-Т), рН 7,4, 1 л</i>
3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) 10 мл	Tween-20 0,05 мл
	0,01 М ФБР, рН 7,4 до 1 л
<i>Д. 0,1 М раствор серной кислоты, 100 мл</i>	
Серная кислота (H ₂ SO ₄) 96% 0,56 мл	
dH ₂ O до 100 мл	

Таблица 14 – Схемы постановки ИФА

Этап	Компонент	
	Антигенный вариант	Антительный вариант
Сенсибилизация	Иммуноглобулины против вируса КЧС от 10 до 200 мкг/мл на 0,02 М КББ (рН 9,5), 100 мкл, 16-20 ч при 4 °С либо 3 ч при 37 °С	Рекомбинантный антиген в концентрации от 10 до 200 мкг/мл на 0,02 М КББ (рН 9,5), 100 мкл, 16-20 ч при 4 °С либо 3 ч при 37 °С
3-х кратная отмывка	0,01 М ФБР-Т (рН 7,4), 250 мкл	
Внесение образцов	Анализируемые антигены в разведении 1:10 на ФБР-Т, 100 мкл, 1 ч при 37 °С	Анализируемые сыворотки в разведении 1:10 на ФБР-Т, 100 мкл, 1 ч при 37 °С
3-х кратная отмывка	0,01 М ФБР-Т (рН 7,4), 250 мкл	
Внесение конъюгата	Специфический конъюгат в концентрации от 0,1 до 10 мкг/мл (разведения от 1:100 до 1:3200) на ФБР-Т, 100 мкл, 1 ч при 37 °С	Антивидовой пероксидазный конъюгат на ФБР-Т, 100 мкл, 1 ч при 37 °С
3-х кратная отмывка	0,01 М ФБР-Т (рН 7,4), 250 мкл	
Проявка	Субстратный раствор ТМБ, 100 мкл, 15 мин при комнатной температуре в темноте	
Остановка реакции с спектрофотометрическим учетом результатов при длине волны 450 нм	0,1 М раствор серной кислоты, 100 мкл	

Интерпретацию результатов ИФА и калибровку конструируемых тест-систем проводили в соответствии с рекомендациями Н.В. Залесских и соавт. в работе «Система внешнего и внутреннего контроля качества в иммуноферментном анализе» [40].

Синтез наночастиц коллоидного золота. Синтез наночастиц коллоидного золота (НчКЗ) с различными диаметрами осуществляли по модифицированному методу Туркевича-Френса [138]. Для этого в плоскодонную колбу объемом 250 мл наливали 95 мл дистиллированной воды, после закипания добавляли 1 мл 1 % золотохлористоводородной кислоты (HAuCl_4) (ООО «Аурат», Россия), выдерживали 2 мин, затем в зависимости от желаемого размера частиц приливали к раствору различные объемы 1 % цитрата натрия, после чего наблюдали

преходящее синеватое окрашивание, сменяющееся красным, свидетельствующее о нуклеации частиц и коалесценции зародышей [5, 7].

Контроль размерности и гомогенности частиц осуществляли методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Для этого образцы наносили на медные сеточки с полимерной подложкой (пиолоформ) в объеме 10 мкл и высушивали. Просмотр подготовленных образцов осуществляли в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100СХ (JEOL Ltd., Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении от $\times 40000\times$ до $\times 200000$. Измерения проводили в морфометрической программе с открытым исходным кодом «Fiji» («ImageJ», США) [189].

Получение конъюгатов на основе наночастиц коллоидного золота. Конъюгирование белков с НчКЗ осуществляли модифицированным методом нековалентной сшивки. Для этого проводили диализ глобулинов против 0,005 М карбонатного буфера (рН 8,2), корректировали рН золя до 9,0 при помощи 0,2 М K_2CO_3 . Далее к 10 мл золя приливали необходимый по стабилизирующей концентрации объем глобулина и инкубировали 30 мин с покачиванием. По завершении инкубации смесь центрифугировали при 18000 g в течение 30 мин, осадок отмывали в 0,01 М ФБР (рН 7,4) и ресуспендировали в стабилизирующем буфере, содержащем 0,02 М трис основной (рН 8,2), 1% сахарозы, 1% БСА, 0,01 % азида натрия. Эффективность иммобилизации контролировали при помощи количественного НИФА, определяя концентрацию сорбируемых белков до внесения в золь и в надосадке после центрифугирования.

Постановка иммунохроматографического анализа. Постановку ИХА осуществляли в прямом варианте по схемам, изложенным в соответствующих разделах главы «Результаты» диссертационной работы. Исследуемый аналит 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

Для обработки результатов исследований использовали стандартные статистические методы, используемые в биологии. 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+» (версия 8.5, «Bioinformatics Solutions Inc.», Канада).

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

Поиск экспериментально подтвержденных эпитопов вируса КЧС.

Внесение изменений в исходную последовательность целевого белка при дизайне композиций дает возможность повысить эффективность экспрессии, выделения и очистки рекомбинантного белка. Грамотный дизайн обеспечивает адекватный аминокислотный состав вставки и позволяет повысить точность диагностических средств.

Для анализа были использованы последовательности 70 геномов и протеомов эпизоотически значимых и вакцинных штаммов и изолятов вируса КЧС (*Pestivirus C*), депонированных в базе данных Национального центра биотехнологической информации Genbank (NCBI, NIH, США). Относительно данных последовательностей на сервере базы данных IEDB нами был проведен поиск основных иммуногенных эпитопов в геноме КЧС с подтвержденной иммуногенностью для целевых животных – свиней (Таблица 15).

Таблица 15 – Мажорные эпитопы вируса классической чумы свиней (штамм «Ши-Мынь»)

№	Эпитоп, позиция в протеоме	Характеристика	Источник
1	⁹⁸⁵ FNYAKTLKKNKY ⁹⁹⁹ EPR	Достаточно консервативный эпитоп среди всех пестивирусов	Костина и др., 2009 [18]
2	⁸⁹⁵ WCGFDFNEPDGLPHY ⁹⁰⁹	Эпитоп гликопротеина E2	
3	⁸³⁴ TTLRTEVVKTFRREK ⁸⁴⁸	Высококонсервативный эпитоп вируса КЧС, отличаются высокой вариабельностью среди других представителей рода <i>Pestivirus</i>	
4	⁸⁴² KTFRREKPFPHRMDC ⁸⁵⁶		
5	⁹⁹⁵ YYEP ⁹⁹⁸	Родоспецифичный эпитоп	Meng Yu et al., 1996 [136]
6	⁸²⁹ TAVSPTTLR ⁸³⁷	Вируснейтрализующий иммунодоминантный эпитоп, инвариантен среди всех известных штаммов вируса КЧС и значительно отличается от гомологичных	M Lin et al., 2000 [104]

№	Эпитоп, позиция в протеоме	Характеристика	Источник	
		последовательностей, кодируемых другими пестивирусами		
7	⁷⁷² LFDG ⁷⁷⁸ TNP	Консервативный В-клеточный эпитоп, расположенный на границе между доменами В/С и А	Wu-Ping Peng et al., 2008 [150]	
8	⁷⁷⁴ DGXNP ⁷⁷⁸	Эпитоп, встречаемый только у штаммов 1 генотипа	Chao Tong et al., 2014 [202]	
9	⁷⁷¹ LLFD ⁷⁷⁴	Консервативный эпитоп	Chang et al., 2010 [63]	
10	⁷⁵³ RYLASLHKKALPT ⁷⁶⁵	Консервативный эпитоп	Chia-Yi et al., 2012 [64]	
11	¹⁴¹ AVSP ¹⁷⁰ TTLRTEVVKTFRRDKPFP ¹⁷⁰ HRMDCVTT	Эпитоп гликопротеина E2	Li et al., 2011 [156]	
12	¹⁰¹ LAEGPPVKECAVTCRYD ¹³⁰ KDADINVVTQARN	Эпитоп гликопротеина Erns		
13	¹⁹ AMYL ²⁷ RGISR	Эпитоп с перекрестной реактивностью между КЧС и ВД КРС	Denis Meyer et al., 2012 [172]	
14	³¹ GIWPEKICK ³⁹	Эпитоп гликопротеина Erns		
15	⁶⁴ TNYTCC ⁷² KLQ			
16	⁸⁸ DPWIQLMNR ⁹⁶	Эпитоп с перекрестной реактивностью между КЧС, ВД КРС, ПБО		
17	¹²¹ DVNVVTQAR ¹²⁹			
18	¹³⁶ TGCKKG ¹⁴⁴	Перекрестная реактивность ВД КРС, ПБО		
19	¹⁵⁴ PCNFNV ¹⁶² SVE			
20	¹⁹⁹ RVTSWL ²⁰⁴			Перекрестная реактивность КЧС, ВД КРС, ПБО
21	²¹³ KRLEGRSKTW ²²²			
22	²⁸ SLHGIWPE ³⁵	Эпитопы вируса КЧС		Christmann et al., 2001 [129]
23	⁷⁵ EWNKHGW ⁸³ WC			
24	¹¹⁴ CRYDKNTDVNV ¹²⁴		Zhang et al., 2006 [81]	
25	¹¹⁶ YDKNTDVNV ¹²⁴		Min Lin et al., 2010 [148]	
26	¹²⁷ QARNRPTT ¹³⁴			
27	¹⁴⁵ SFAGTVIE ¹⁵²			
28	¹⁶¹ VEDILY ¹⁶⁶			
29	²⁵⁴ HECLIG ²⁵⁹	Эпитоп гликопротеина E2	Huiling Xu et al., 2021 [74]	
30	⁸ YRYAIS ¹³			
31	⁸⁴⁴ CFRREKPFPHRMDCVTT ⁸⁶⁵ TVENED	В-клеточные линейные эпитопы гликопротеина E2	Zhou B. et al., 2011 [170]	
32	⁶⁹³ CKEDYRYAISSTNEIGLL ⁷¹⁶ GAG			

№	Эпитоп, позиция в протеоме	Характеристика	Источник
33	⁸¹⁸ CPIGWTGVIEC ⁸²⁸	Эпитоп гликопротеина E2	Fernández-Sainz et al., 2014 [120]
34	⁸⁶⁹ CKWGGNWTCV ⁸⁷⁸	Эпитоп гликопротеина E2	Holinka L.G. et al., 2016 [57]

Согласно данным BLAST-анализа, проведенного относительно 70 протеомов эпизоотически значимых штаммов и изолятов вируса КЧС, уровень идентичности данной последовательности разных штаммов варьирует на уровне от 89,0 % до 98,5 %.

Молекулярно-генетическая характеристика вариантов вируса диареи КРС – контаминантов производственных клеточных линий свиного происхождения. Вирусы ВД КРС и КЧС серологически тесно связаны. Степень биологического сходства создает проблему для идентификации вирусного материала от животных, так как возбудитель ВД КРС – широко распространенный скрытый контаминант клеточных культур, используемых в промышленности и лабораторной практике [33, 155]. Методы выявления случайных контаминаций ВД КРС в образцах вируса КЧС с использованием поликлональных гипериммунных сывороток, конъюгированных с любым из флуоресцентных красителей или ферментов, являются недостаточно точными [155]. Этим определяется необходимость создания специфических для КЧС серологических анализов, способных эффективно отличать антитела к КЧС от антител к ВД [60].

Контроль качества клеточных линий сегодня приобретает особое значение. В ряде случаев ВД КРС рассматривается как эндемичный патоген для отдельных регионов и даже стран, а инфицированность поголовья КРС в отдельных хозяйствах достигает 70-90% [1]. Цитопатогенные пестивирусы вызывают в культурах клеток видимые изменения, обусловленные явлением апоптоза клеток, и обычно выбраковываются уже на первых пассажах [25, 26]. Нецитопатогенные штаммы вируса ВД КРС часто контаминируют культуры клеток, фетальную сыворотку и другие биологические продукты, полученные от КРС [25, 26]. Инфицирование нецитопатогенным ВД чаще всего вызывает хроническую

инфекцию без видимых морфологических нарушений клеток, которые могут препятствовать росту и репликации вируса, что создает неверные результаты и затрудняет его обнаружение неспецифическими морфологическими методами [131].

В связи с тем, что вирус 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. Присутствие ВД в ПКЛ может значительно затруднить диагностику, осуществление технологического контроля качества вакцинного сырья, способствуя получению ложноположительных результатов.

Основная клеточная линия, применяемая для культивирования производственных/вакцинных штаммов вируса КЧС – линия почки эмбриона свиньи (РК-15). По результатам исследования методом ОТ-ПЦР было обнаружено, что во всех пассажных линиях ПКЛ РК-15 присутствует контаминация ВД КРС (Рисунок 3).

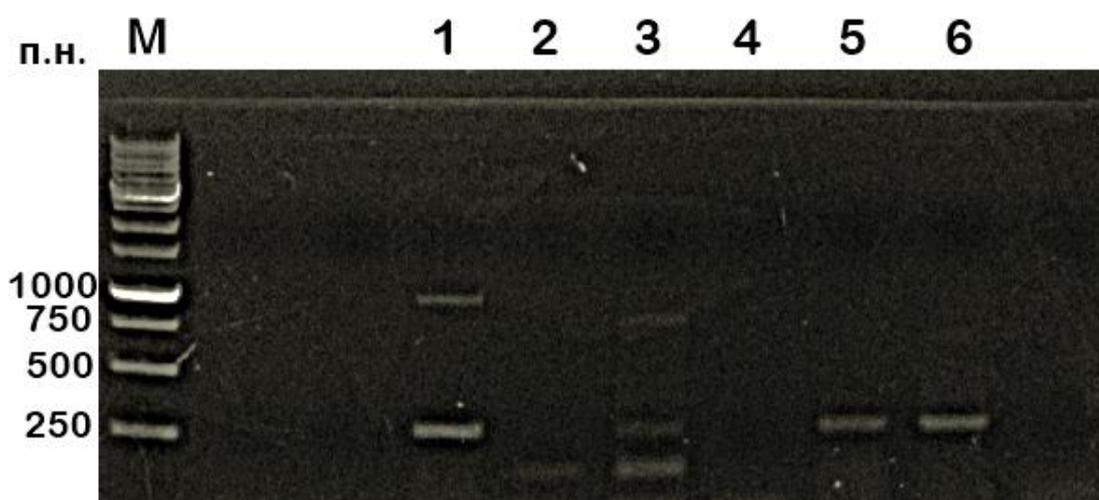


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов амплификации вариантов вируса ВД КРС – контаминантов различных пассажных линий РК-15.

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 установлено, что контаминант всех пассажных линий РК-15 принадлежит к субгенотипу 1a (Рисунок 4).

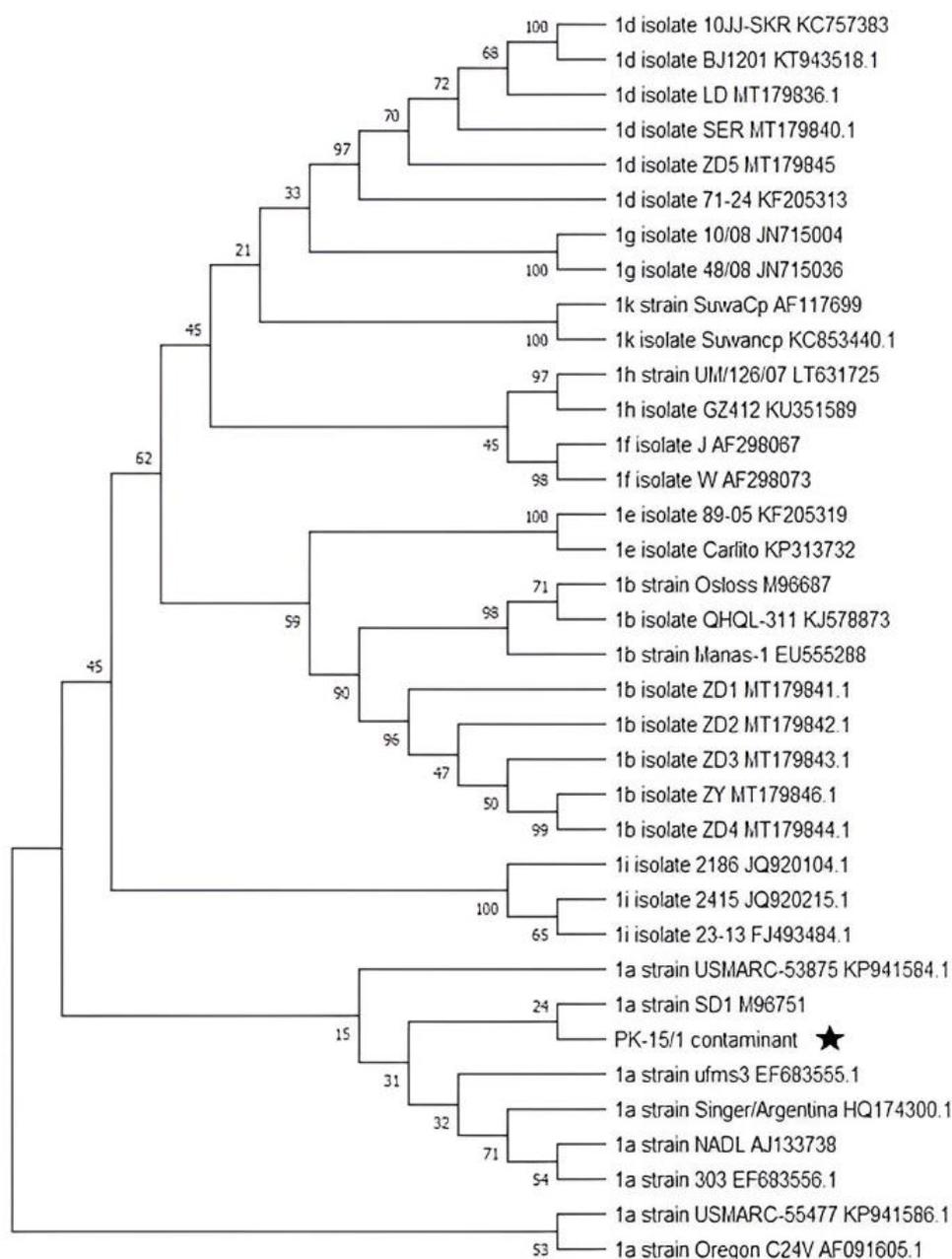


Рисунок 4 – Филогендрограма, отображающая генетическую близость исследуемого контаминанта и известных прототипных штаммов BVDV-1.

Примечание: топология древа восстановлена методом maximum likelihood, матрица генетических расстояний рассчитана методом минимальной эволюции. Указаны индексы статистической поддержки узлов (бутстрэп-тест для 1000 реплик)

Антигенная структура гликопротеина E2 состоит из четырех доменов [101], которые содержат по меньшей мере 14 линейных или прерывистых эпитопов. По данным исследований [101, 149, 169], белки E2 вирусов КЧС и ВД КРС имеют сходную антигенную топологию – домен D/A ВД КРС соответствует домену В/С КЧС, а домен DB соответствует домену D/A КЧС. Домены В/С и D/A представляют собой две независимые структурные единицы. Эпитопы домена В/С в основном неконсервативны среди различных генотипов КЧС и, таким образом, отвечают за антигенную специфичность, тогда как белковая последовательность домена D/A относительно консервативна в пределах различных генотипов КЧС [101, 149]. Эпитопы, участвующие в нейтрализации вируса, представляют собой наиболее важные мишени для антигенной эволюции под давлением отбора, оказываемого вакцинами [101].

Результаты секвенирования контаминанта РК-15/1 по гену E2 показали высокую идентичность аминокислотной последовательности (89,9 – 92,8%) по отношению к таковому большинству эпизоотически значимых и вакцинных штаммов и изолятов вируса КЧС (Рисунок 5).

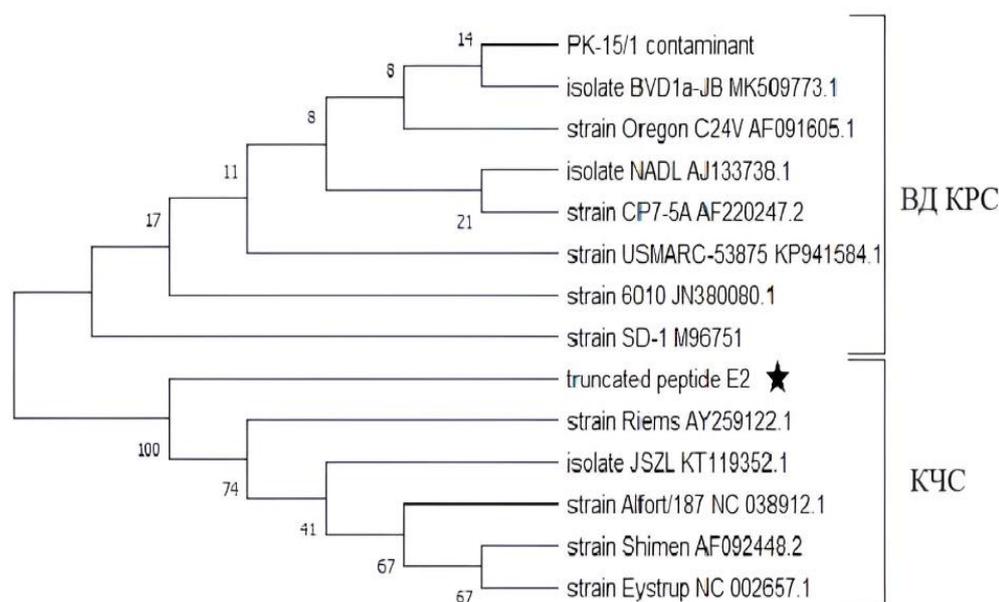


Рисунок 5 – Коэффициент антигенного сходства усеченного пептида E2 КЧС к штаммам и изолятам ВД КРС 1a субгенотипа и КЧС.

Примечание: топология древа восстановлена методом *minimum evolution*, матрица генетических расстояний рассчитана методом минимальной эволюции.

Указаны индексы статистической поддержки узлов (бутстрэп-тест для 1000 реплик)

Среди структурных и неструктурных белков вируса КЧС к индукции специфических антител способны E2, Erns и NS3 [165, 205], в результате чего были созданы коммерчески доступные тесты на их основе. Поскольку E2 является основной мишенью для нейтрализующих антител [209], тесты на его основе широко используются для серодиагностики и оценки эффективности вакцинации против КЧС. Однако тесты на основе полноразмерного E2 не позволяют дифференцировать антитела к вирусу КЧС от антител к вирусу ВД КРС. Анализ протеомов различных штаммов и изолятов вируса КЧС показал, что участок 690–865 а.о. в структуре E2 соответствует важным антигенным областям (домены I/II или DA/DB), а консервативные аминокислотные последовательности этих доменов из ВД КРС и вируса КЧС E2 не идентичны [101, 194]. В настоящее время сообщалось о непрямом ИФА для специфического обнаружения антител против КЧС на основе укороченного E2, экспрессируемого в клетках млекопитающих, который не давал перекрестной реакции с сыворотками против вируса ВД КРС [60].

Предыдущие исследования показали, что белки вирусов КЧС и ВД КРС, полученные как в прокариотических, так и в эукариотических системах экспрессии, использовались в качестве антигенов для диагностических ИФА [60, 112, 205]. Хотя биологическая активность гликопротеинов Erns и E2, экспрессируемых в *E. coli*, может быть неоправданной ввиду отсутствия необходимых посттрансляционных модификаций (ПТМ), использование в диагностике их усеченных вариантов может иметь преимущество, заключающееся в экономичности и диагностической эффективности.

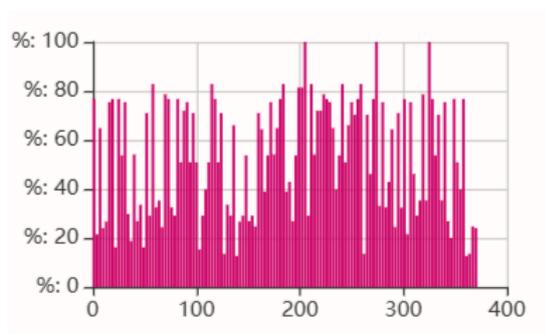
Дизайн антигенных композиций на основе фрагментов белков E2 и Erns.

Для создания большинства точных и эффективных средств диагностики КЧС и технологического контроля вакцинного сырья необходимо получение рекомбинантных антигенов E2 и Erns, т.к. Erns (ранее называемый gp44/48) и E2 (ранее называемый gp55) находятся на внешней поверхности вирионов вируса КЧС и взаимодействуют с клеточными рецепторами для обеспечения проникновения в клетки-хозяева, и таким образом определяют клеточный тропизм и специфичность пестивирусов к хозяину. Выявление антител к гликопротеину Erns является надежным диагностическим подходом для дифференциации инфицированных животных от вакцинированных рекомбинантной субъединичной вакциной (DIVA). Гомодимер Erns является как вирион-ассоциированным, так и секретируемым, в связи с этим он обнаруживается на поверхности инфицированных пестивирусом клеток и в культуральной среде [165]. Erns не содержит потенциального домена, охватывающего мембрану, однако его С-концевой домен может транслоцировать полноразмерный белок через мембраны эукариотических клеток [90].

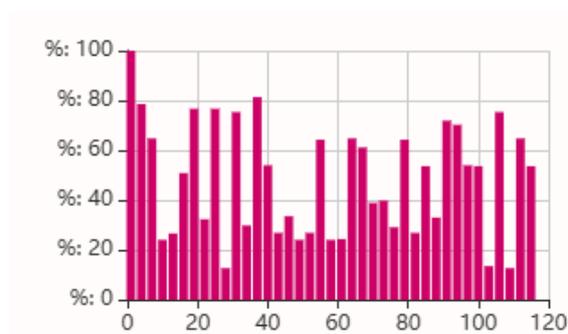
При дизайне антигенной композиции на основе E2 необходимым условием является отсутствие эпитопов, гомологичных с ВД КРС; к композиции на основе Erns таких требований не предъявляется.

Также 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 таким образом, чтобы индекс CAI (Codon Adaptation Index) был

близок к единице. В результате оптимизации САІ для последовательности гликопротеина E2 был повышен с 0,7 до 0,81 (Рисунок 6). Для повышения стабильности мРНК гена также было уменьшено содержание GC-пар – с 55,46 % до 52,52 % (Рисунок 7).

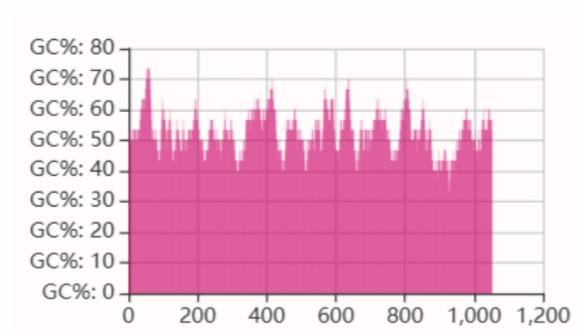


До оптимизации (0,7)

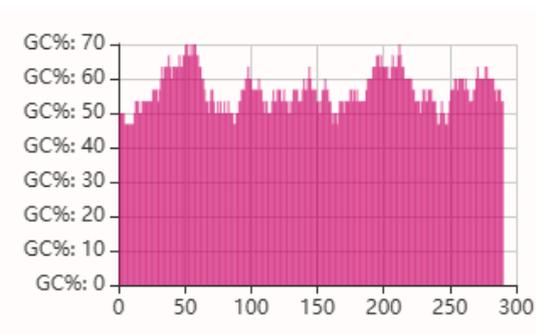


После оптимизации (0,81)

Рисунок 6 – Распределение частоты использования кодонов по длине последовательности гена E2



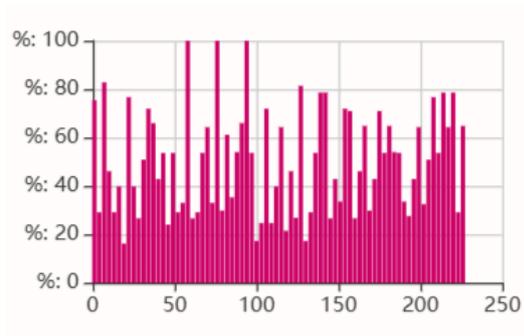
До оптимизации (55,46 %)



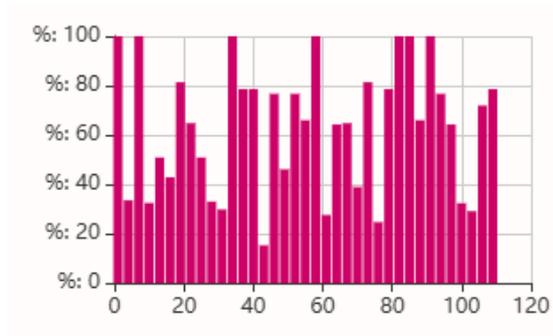
После оптимизации (52,52 %)

Рисунок 7 – Оптимизация GC-состава нуклеотидной последовательности гена E2

В результате оптимизации САІ для последовательности гена Erns был повышен с 0,69 до 0,8 (Рисунок 8). Для повышения стабильности мРНК гена также было уменьшено содержание GC-пар – с 53,6 % до 52,73 % (Рисунок 9).

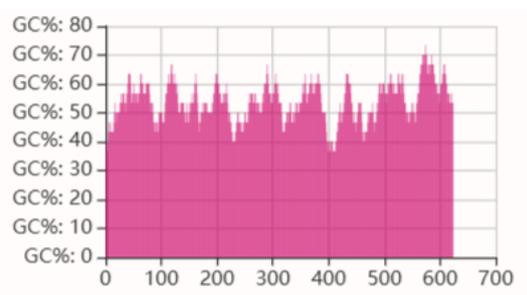


До оптимизации (0,69)

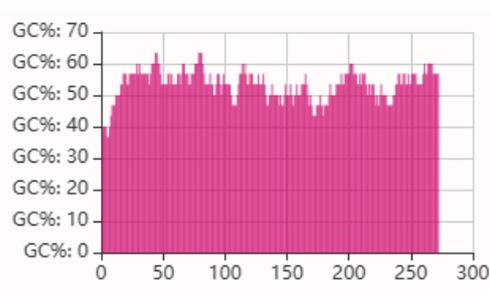


После оптимизации (0,8)

Рисунок 8 – Распределение частоты использования кодонов по длине последовательности гена Erns



До оптимизации (53,6 %)



После оптимизации (52,73 %)

Рисунок 9 – Оптимизация GC-состава нуклеотидной последовательности гена Erns

Поскольку гликопротеины Erns и E2 являются основными иммуногенами вируса КЧС, в настоящее время диагностические тесты разрабатываются на их основе.

На основании данных, изложенных в главе 1.2, нами был выполнен дизайн усеченных белков E2 и Erns (таблица 16, рисунок 10) [4].

Таблица 16 – Карта аминокислотных последовательностей
мажорных гликопротеинов вируса КЧС

Протеин	Последовательность
Гликопротеин E2 GenBank ID: KT953611.1	LACKEDYRYALSSTNEIGLLGAGGLTTTWEELYSHDLQLNDGT VKAICVAGSFKVTALNVVSRRYLASLHKGALLTSVTFELLFD GTNPSTEEMGDDDFGFLCPFDTSPPVVKGYNTTLLNGSAFYL VCPIGWTGVIECTAVSPTTLRTEVVKTFRREKPFPHRMDCVT TTVENEDLFYCKLGGNWT CVKGEPVVYTGGOVKQCKWCGFDF NEPDGLPHYPIGKCILANETGYRIVDSTDCNRDGVVISAEGS HECLIGNTTVKVHASDERLGPMPKRPKEIVSSAGPVRKTSCT FNYAKTLKNKYEPKDSYFQOYMLKGEYQYWFDDVTDHRSD YFAEFVVLVVVALLGGRYVLWLIVTYIVLTEQLA
Гликопротеин Erns GenBank ID: MZ869067.1	ENITQWNLSDNNGTSGVQQAMYL RGVN RSLHGIWPEKICKGVP THLATDELTEIRGMMDASERTNYTCRRLQRHEWNKHGWCNW YNIDPWIQLMNRTOANLTEGPPDKECAVTCRYDKDADVNVVT QARNRPTTLTGCKKGNF SFAGTVIEGPCNF NVSVEDILYGD HECGSLFQDTALYLLDGMTNTIERARQGAARVTSWLGRLST TGKCLERGSKTWFGAYA

Примечание: **XXX** – трансмембранные домены, **XXX** – сайты N-гликозилирования, **XXX** – сайты O-гликозилирования, XXX – мажорные иммуногенные эпитопы

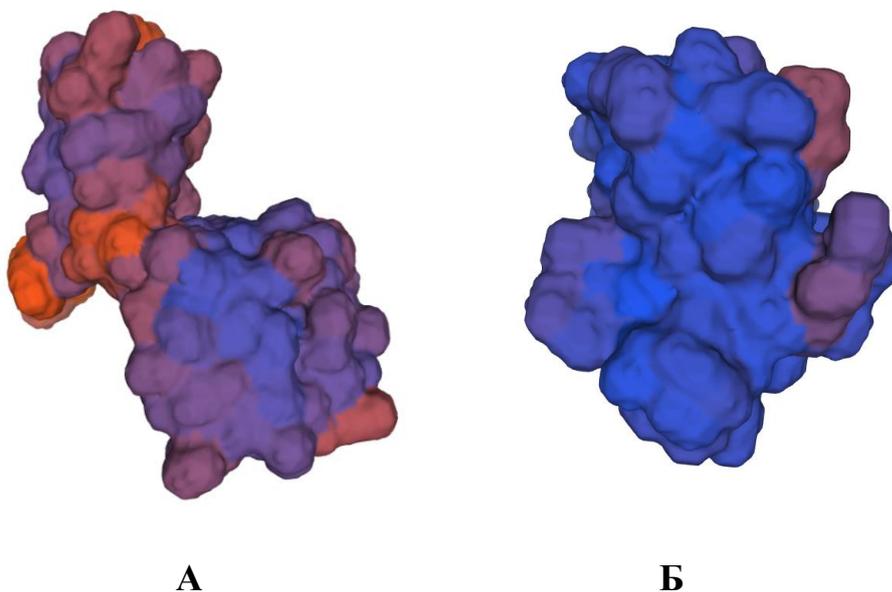


Рисунок 10 – Структуры полипептидов E2 и Erns вируса КЧС.
Примечание: А – трехмерная модель усеченного пептида E2;
Б – трехмерная модель усеченного пептида Erns

Нами были определены основные физико-химические характеристики данных полипептидов, отображенные в таблице 17.

Таблица 17 – Физико-химические характеристики полипептида

Показатель	E2	Erns
Средняя молекулярная масса, г/моль	12924.8	12875.39
Теоретическая изоэлектрическая точка, pИ	7.82	6.07
Коэффициент экстинкции, $M^{-1} \times cm^{-1}$	13370	37980
Период полураспада	30 часов (ретикулоциты млекопитающих, <i>in vitro</i>) >20 часов (дрожжи, <i>in vivo</i>) >10 часов (кишечная палочка, <i>in vivo</i>)	
Алифатический индекс	82,33	63.82
Индекс нестабильности	47.08	33.11
Индекс гидропатичности (GRAVY)	-0.041	-0.843

Таким образом, анализ разработанных конструкций с использованием биоинформационных веб-инструментов показал ее стабильность и отрицательный индекс GRAVY, что характеризует рекомбинантные продукты как потенциально гидрофильные. Также следует отметить оптимальный расчетный период полураспада для экспрессии в дрожжевых и прокариотических системах. Также были определены участки в протеоме с высокой плотностью расположения В-клеточных эпитопов и содержанием антигенных мотивов большинства КЧС-специфических доменов, не имеющие гомологии с другими представителями пестивирусов. Так, был проведен дизайн усеченных пептидов E2 и Erns, соответствующих стратегии DIVA, для дифференциальной диагностики КЧС.

2.2.2 Получение рекомбинантных белков E2 и Erns в прокариотической системе экспрессии

Создание экспрессионных векторов. Сконструированные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные композиции на основе гликопротеинов E2 и Erns, были оптимизированы по кодонам для экспрессии в *E. coli* без изменения аминокислотного состава и синтезированы на аутсорсе (ЗАО «Евроген»), после чего клонированы в состав экспрессионного вектора pET-28a(+) по сайтам рестрикции *Bam*HI/*Eco*RI и *Xho*I/*Nco*I соответственно. Правильность этапов клонирования подтвердили секвенированием по Сэнгеру. Описания векторов представлены на рисунке 11.

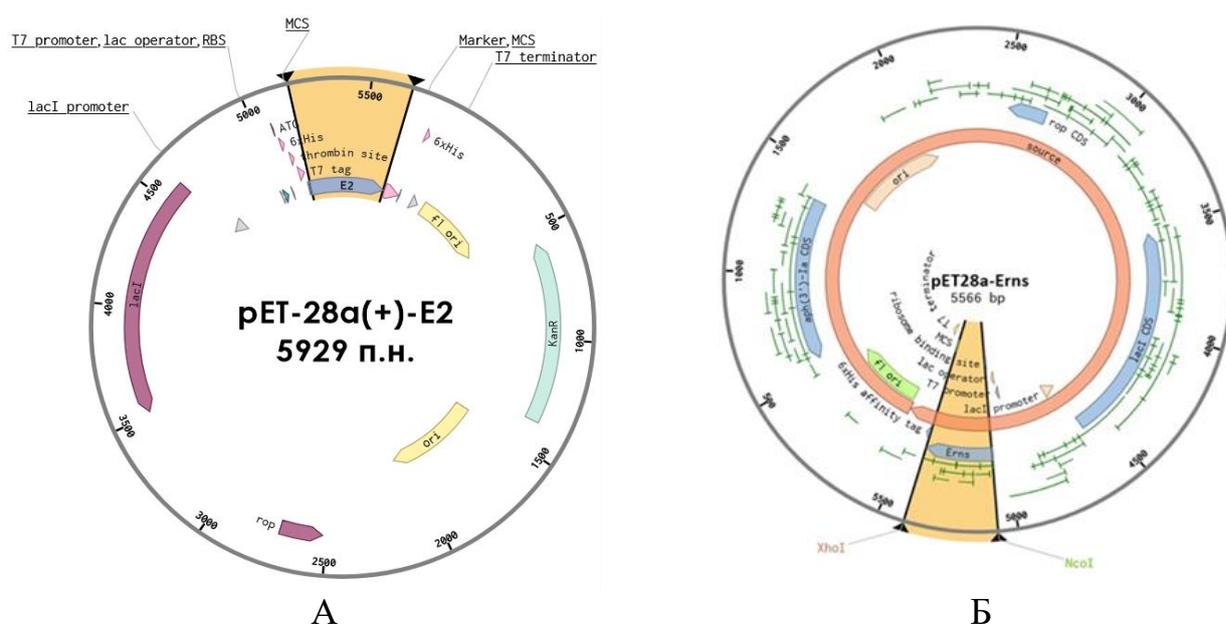


Рисунок 11 – Описание векторов гликопротеинов E2 и Erns вируса КЧС. Примечание: А – физическая карта плазмидного вектора pET-28a(+)-E2, содержащего ДНК гена E2 вируса КЧС; Б – физическая карта плазмидного вектора pET-28a(+)-Erns, содержащего ДНК гена Erns вируса КЧС

Трансформацию экспрессирующего штамма *E. coli* BL21(DE3) производили методом теплового шока в присутствии ионов Ca^{2+} , селекция клонов

осуществлялась на агаризованной среде Лурия-Бертани (LB) по Lennox с добавлением антибиотика (50 мкг/мл канамицина, «Панэко», Россия) [48].

Оценку функциональности рекомбинантных штаммов проводили по результатам электрофореза после трансляции целевого белка, полученного при следующих стандартных условиях: ОП₆₀₀ культуры штамма-продуцента – 0,7 ед., индукция ИПТГ в концентрации 1 мМ, постиндукционное культивирование при плюс 37 °С и 180 rpm в течение 5 ч. Результаты представлены на рисунке 12.

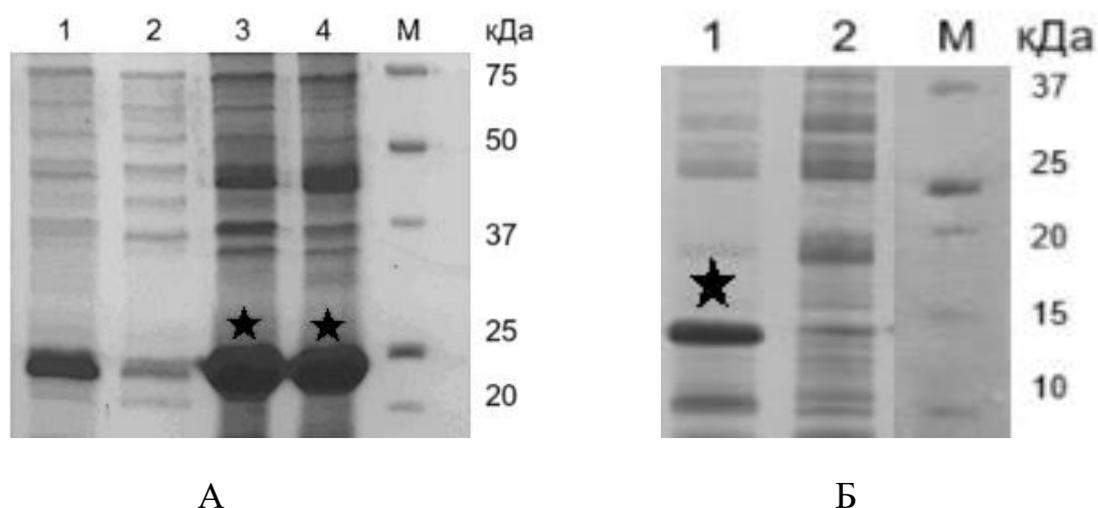


Рисунок 12 – Электрофореграмма клеточных лизатов штаммов – продуцентов E2 и Erns вируса КЧС.

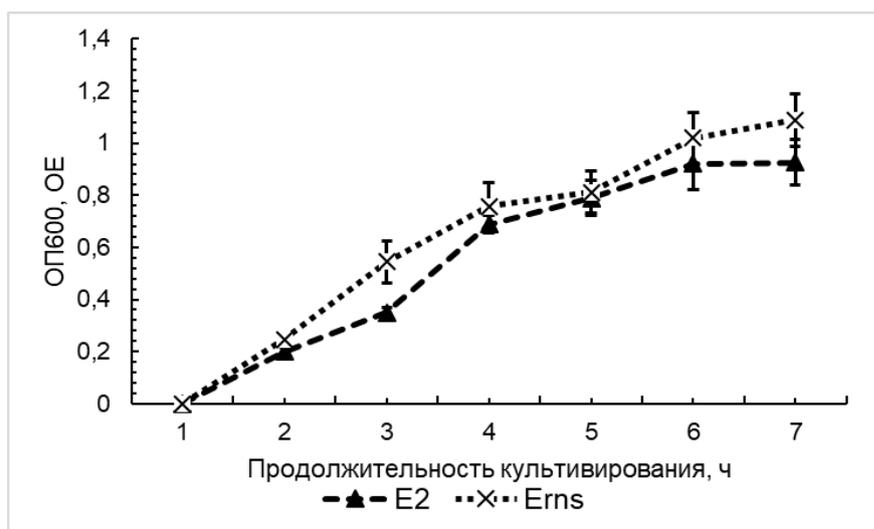
Примечание: А – усеченный пептид E2 вируса КЧС, треки: 1 – суммарный лизат неиндуцированных клеток штамма BL-21(DE3)pLysS/pET28a/E2, 2 – растворимая фракция rE2, 3, 4 – лизат осадка, содержащего тельца включения (нерастворимая фракция), М – маркер молекулярных масс Precision Plus Dual Xtra, 2-250 кДа («Bio-Rad», США); Б – усеченный пептид Erns вируса КЧС, треки: 1 – лизат клеток штамма-продуцента после индукции; 2 – лизат клеток штамма *E. coli* BL21(DE3)pLysS, содержащего плазмиду pET28a(+) без вставки; М – маркер молекулярных масс Precision Plus Dual Xtra, 2-250 кДа («Bio-Rad», США). Целевая фракция обозначена знаком ★.

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

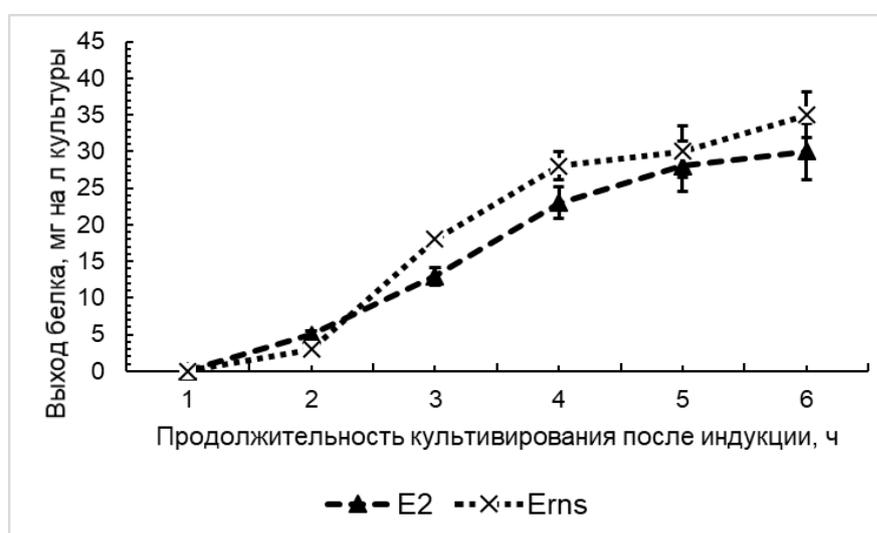
нерастворимой форме, характеризуясь большим количественным выходом по сравнению с E2. В качестве контроля использовали лизат клеток штамма BL21(DE3)pLysS, содержащих плазмиду pET28a(+) без вставки. В клеточных лизатах неиндуцированного штамма-продуцента признаки базальной экспрессии отсутствовали.

При экспрессии вирусных белков в *E. coli* накопление химерного продукта в большинстве случаев происходит в виде телец включения в связи с тем, что сложные белки образуют агрегаты неактивного целевого продукта с включением балластных соединений клетки-продуцента. Гетерогенная экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli* часто сопровождается агрегацией белков, которые сохраняют вторичную и третичную структуру и могут демонстрировать некоторую степень биологической активности [77, 200]. Получение растворимого белка включает в себя лизис клеток, выделение и солюбилизацию ТВ в присутствии денатурантов либо поверхностно-активных веществ с последующим рефолдингом, что инициирует ренатурацию белка в биологически активную форму [27, 30, 38].

Оптимизация условий культивирования штаммов-продуцентов E2 и Erns. Проблемы агрегации и нерастворимости белков возможно решить изменениями условий культивирования штамма: индукция при субоптимальной температуре, вариации концентраций ИПТГ, использование аутоиндукционной среды, изменение концентрации хаотропных агентов и т.д [45]. Для решения данной задачи нами были рассчитаны кинетические параметры роста штаммов-продуцентов и динамика накопления целевых продуктов клетками (Рисунок 13).



А



Б

Рисунок 13 – Количественные характеристики культивирования штаммов – продуцентов рекомбинантных гликопротеинов вируса КЧС.
Примечание: А – кинетика роста штаммов, Б – динамика накопления целевого продукта.

Исходя из полученных данных, максимальный выход целевого продукта наблюдается спустя 6 ч культивирования после индукции.

С целью оптимизации параметров экспрессии и увеличения выхода растворимого белка мы применяли различные способы индукции, оценивая при этом количество и степень растворимости целевого продукта (Таблица 18).

Таблица 18 – Эффективность различных условий экспрессии рекомбинантных антигенов

Условия экспрессии	Эффективность экспрессии E2		Эффективность экспрессии Erns	
	Средний выход белка, мг/л	Растворимость	Средний выход белка, мг/л	Растворимость
Индукция 1 мМ ИПТГ, культивирование в течение 5 ч при плюс 37 °С	28-30	частично растворим	30-32	частично растворим
Индукция 0,5 мМ ИПТГ, культивирование в течение 5 ч при плюс 37 °С	22	частично растворим	25	частично растворим
Индукция 0,1 мМ ИПТГ, культивирование в течение 5 ч при 37 °С	4-6	растворим	6-7	растворим
Индукция 1 мМ ИПТГ, культивирование в течение 16-18 ч при 25 °С	6-7	растворим	26-28	частично растворим
Аутоиндукция по Studier	26	частично растворим	28	частично растворим

Данные, представленные в таблице, показывают, что все рассматриваемые варианты индукции экспрессии позволяли получить продукцию растворимого rE2 лишь при снижении концентрации ИПТГ и культивировании при пониженной температуре, однако суммарный выход белка при этом снижался в 4-7 раз. Таким образом, 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 телец включения). При применении общепринятых методических подходов к повышению выхода растворимого белка (например, индукция синтеза при субоптимальных температурах [30]) доля растворимой белковой фракции не превышала 20 %, а также ввиду замедления роста бактериальной культуры значительно снижался и общий выход рекомбинантного белка. Для решения этой проблемы были оптимизированы условия выделения белка из солюбилизованных телец включения, при которых общий выход растворимого белка составил 20-22 мг на 1 л бактериальной культуры.

Подбор условий экстракции целевых белков из телец включения.

Несмотря на то, что в рассматриваемой системе экспрессии невозможно избежать образования телец включения, восстановить биологическую активность белков можно путем подбора оптимальных методик солюбилизации телец-включения, экстракции белка и дальнейшего его рефолдинга. Для этого нами были подобраны следующие методики лизиса и экстракции белка из ТВ (Таблица 19).

Таблица 19 – Методики выделения белков из телец-включений

Этапы	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4	
Лизис клеток	50 мМ Tris HCl, 500 мМ NaCl, 1% Тритон X-100, 1 мМ PMSF, 5 мМ β-меркаптоэтанол, pH 8,0	50 мМ трис-HCl, 200 мМ NaCl, 5 % глицерина, 2 мМ β-меркаптоэтанола, 1 мМ PMSF, 10 мМ имидазола	20 мМ Tris-HCl, 250 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF	ФС-буфер, 7 мМ β-меркаптоэтанол, 5 мМ ЭДТА	
Дезинтеграция	3 цикла по 1 минуте озвучивания на ультразвуковом гомогенизаторе «Bandelin Sonopuls» с интервалом 60 с между циклами	3 цикла по 40 с на приборе «FastPrep» («MP Biomedicals», США) в пробирках «Blue Lysing matrix» с керамическими, кремниевыми и стеклянными шариками	3 цикла по 1 минуте озвучивания на ультразвуковом гомогенизаторе «Bandelin Sonopuls» с интервалом 60 с между циклами	3 цикла по 30 секунд озвучивания на ультразвуковом гомогенизаторе «Bandelin Sonopuls» с интервалом 90 с между циклами	
Солюбилизация ТВ	8 М мочевины, 20 мМ Na ₃ PO ₄ , 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 1 мМ PMSF, 5 мМ β-меркаптоэтанол, pH 7,4	ФС-буфер, 8 М мочевины, 1 мМ PMSF, 2 мМ ЭДТА	6 М мочевины, 10 мМ Tris-HCl, 100 мМ Na ₂ HPO ₄ , pH 8,0	6 М GdnHCl, 0,1 М NaH ₂ PO ₄ , 0,01 М Tris-HCl, pH 8,0	
Хроматографическая очистка	Стартовый буфер (20 мМ Na ₃ PO ₄ , 500 мМ NaCl, 8 М мочевины, 20 мМ имидазол, pH 7,4); Элюирующий буфер (20 мМ Na ₃ PO ₄ , 500 мМ NaCl, 8 М мочевины, 500 мМ имидазол, pH 7,4)	Стартовый буфер (50 мМ трис-HCl, 100 мМ NaCl, 50 мМ имидазола, pH 6,0); Элюирующий буфер (50 мМ трис-HCl, 100 мМ NaCl, 300 мМ имидазола, pH 7,8)	Стартовый буфер (6 М мочевины, 100 мМ Na ₂ HPO ₄ , 10 мМ Tris-HCl, 50 мМ имидазола, pH 5,3); Элюирующий буфер (6 М мочевины, 100 мМ Na ₂ HPO ₄ , 10 мМ Tris-HCl, 300 мМ имидазола, pH 5,3)	Стартовый буфер (8 М мочевины, 0,1 М NaH ₂ PO ₄ , 0,01 М Tris-HCl, pH 5,9); Элюирующий буфер (8 М мочевины, 0,1 М NaH ₂ PO ₄ , 0,01 М Tris-HCl, pH 4,5)	Стартовый буфер (6 М мочевины, 100 мМ Na ₂ HPO ₄ , 10 мМ Tris HCl, 50 мМ имидазола, pH 5,3); Элюирующий буфер (6 М мочевины, 100 мМ Na ₂ HPO ₄ , 10 мМ Tris HCl, 300 мМ имидазола, pH 5,3)
Рефолдинг	ФС-буфер, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF	ФС-буфер, 0,1% твин-20, 50 мМ ацетат натрия, pH 5,5	ФС-буфер, pH 7,4	1,5 М мочевины, 50 мМ Tris-HCl, 200 мм NaCl, 10% глицерин, pH 8,0	

В методиках 1 и 2 высокая молярность мочевины в буфере (8 М) препятствовала сорбции рекомбинантных антигенов на колонку, в то время как методика, включающая 6 М мочевины, позволила добиться оптимальной сорбции, а состав денатурирующего буфера для ТВ способствовал переходу большей части белка из ТВ в растворимую фракцию. Применение гуанидина гидрохлорида не дало желаемого выхода; наилучший рефолдинг достигался в ацетатном буфере либо в пониженных концентрациях мочевины (Рисунок 14). «Мягкая солюбилизация» оказалась наиболее быстрым и эффективным методом: она позволила в течение 1-2 ч перевести большую часть белка в растворимую форму. Белок Erns, изначально экспрессирующийся в частично растворимом виде, в большей степени подвергся денатурации и впоследствии рефолдингу; более того, уже на этапе 2 растворимая фракция обладала значительным объемом. Однако для белка E2 более применима методика 1, которая, несмотря на свою длительность, более подходит данной конфигурации белка.

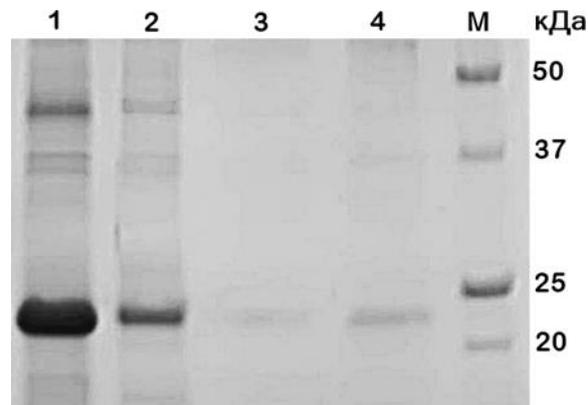


Рисунок 14 – Оценка эффективности рефолдинга rE2.

Примечание: треки: 1 – солюбилизат телец включения, 2 – rE2 после рефолдинга в 50 мМ ацетатном буфере (pH 5,5), 3 – rE2 после рефолдинга в ФБР (pH 7,4), 4 – rE2 после рефолдинга в ФБР с добавлением 2 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF, M – маркер молекулярных масс «Precision Plus Protein Unstained Standards» («Bio-Rad», США)

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 15).

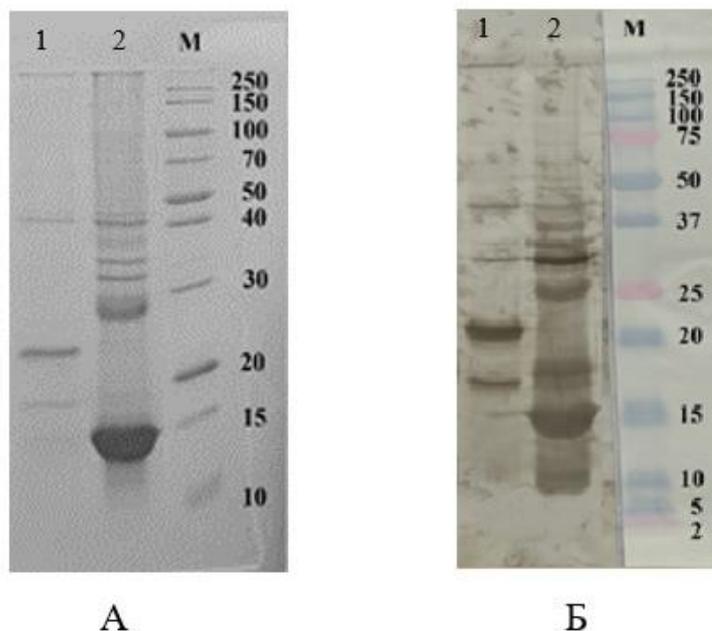


Рисунок 15 – Оценка специфичности рекомбинантных белков E2 и ErnS.
 Примечание: А – электрофореграмма, окрашивание по Кумасси, треки: 1 – ТВ E2; 2 – ТВ ErnS; М – маркер молекулярной массы белков PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, 5-250 кДа («Thermo FS», США);
 Б – вестерн-блоттинг на НЦМ, треки: 1 – ТВ E2; 2 – ТВ ErnS; М – маркер молекулярных масс Precision Plus Dual Xtra, 2-250 кДа («Bio-Rad», США)

На электрофореграмме, окрашенной по Кумасси, визуализируются основные полипептидные фракции, соответствующие своим молекулярным массам (для ТВ E2 – 22 кДа, для ТВ ErnS – 13,7 кДа). При этом выраженность минорных полос незначительна, что свидетельствует о высокой степени очистки препарата. Представленные результаты вестерн-блоттинга свидетельствуют о значительной серологической активности рекомбинантных белков E2 и ErnS.

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+.

Для белка E2 ферментативный гидролиз осуществляли следующими протеазами: трипсин, GluC, комбинация протеаз LysC и AspN (LysC/AspN). По результатам анализа были достоверно идентифицированы 23 пептида, относящихся к белку E2: 7 пептидов – для триптического гидролизата; 5 пептидов – для гидролизата, полученного в присутствии GluC; 11 пептидов – для гидролизата, полученного в присутствии LysC и AspN. Для белка Erns ферментативный гидролиз осуществляли отдельно двумя протеазами: трипсином и GluC. По результатам анализа были достоверно идентифицированы 11 пептидов, относящихся к белку Erns: 6 пептидов – для триптического гидролизата; 5 пептидов – для гидролизата, полученного в присутствии GluC. Последовательности фрагментных масс-спектров обоих гликопротеинов представлены в таблице 20, схемы покрытия аминокислотных последовательностей – на рисунке 16.

Таблица 20 – Характеристики отдельных пептидов гликопротеинов вируса КЧС, идентифицированных в ходе масс-спектрометрического анализа

Последовательность	Моноизотопная масса, Да	m/z (заряд)	Погрешность, ppm	Rt, мин	1/K ₀	Протеазы		
						Трипсин	GluC	LysC/AspN
Гликопротеин E2								
EDYRYAISSTNEIGLLGAEGLTTTWK	2887,424	963,4737 (3+)	-8,5	21,36	1,0323-1,0606			v
YAISSSTNEIGLLGAEGLTTTWK	2324,19	775,7368 (3+)	-0,6	21,62	1,0351-1,0634	v		
EYSHDLHLDDGTVK	1627,748	814,8786 (2+)	-3,2	13,89	1,0691-1,0974	v		
YNTLLNGSAFYLVCPIGWTGVVECTA VSPTTLRTEVVK	4202,143	1051,539 (4+)	-3,7	25,28	1,0414-1,0697			v
RALPTSVTFELLF	1492,829	747,421 (2+)	-1	23,67	1,0095-1,0380			v
DGTNPVIEEMD	1218,507	610,2591 (2+)	-3,1	17,43	0,8515-0,8803			v
GKYNTLLNGSAFYLVCPIGWTGVVEC TAVSPTTLRTEVVK	4387,26	1097,815 (4+)	-6,6	24,16	1,1713-1,1993			v
YAISSSTNEIGLLGAEGLTTTWKEYSHDL HLDDGTVK	3933,927	787,7911 (5+)	-2	22,43	1,0078-1,0362	v		
DTSPVIKGYNTLLNGSAFYLVCPIG WTGVVE	3541,817	1181,618 (3+)	4,1	24,32	1,1132-1,1414		v	
CTAVSPTTLRTE	1277,629	639,8212 (2+)	-0,5	13,86	0,9128-0,9415		v	
VTALNVVSRRYLASLHK	1926,116	643,0431 (3+)	-4,6	16,35	0,8837-0,9124			v
DDFGFGLCPF	1116,459	1117,461 (1+)	-4,4	25,66	1,5325-1,5598			v
AVCTAGSFK	882,4269	442,2167 (2+)	-9,2	13,26	0,7521-0,7811			v
VTALNVVSR	957,5607	479,7879 (1+)	0,6	14,98	0,8031-0,8321	v		
DTSPVIK	758,4174	759,4203 (1+)	-5,7	2,01	1,2753-1,3032			v
DGTNPVIEE	972,44	973,4539 (1+)	6,8	14,05	1,4391-1,4664		v	
DFGFGLCPF	1001,432	1002,435 (1+)	-3,7	25,87	1,4810-1,5084			v

Последовательность	Моноизотопная масса, Да	m/z (заряд)	Погрешность, ppm	Rt, мин	1/K ₀	Протеазы		
						Трипсин	GluC	LysC/AspN
YLASLHKR	986,5661	329,8632 (3+)	1,8	2,03	0,6454-0,6747	v		
YLASLHK	830,465	416,2402 (2+)	1,1	2,03	0,7729-0,8019	v		
RYLASLHK	986,5661	329,8615 (3+)	-3,4	2,05	0,6759-0,7052	v		
DYRYAISSTNEIGLLGAEGLTWWK	2758,381	920,463 (3+)	-5,1	21,65	0,9947-1,0232			v
GLTTTWKE	934,476	468,2455 (2+)	0,4	15	0,7729-0,8019		v	
IIGLLGAE	671,3854	672,3964 (1+)	5,6	18,52	1,2110-1,2389		v	
Гликопротеин Erns								
TQANLTEGPPDKENHHHHH	2221,016	741,3455 (3+)	-0,7	1,99	0,8702-0,8990	v		
GVPHTLATDELTEIR	1751,905	584,9716 (3+)	-7,1	16,1	0,6829-0,7122	v		
MENITQWNLSDNLTSGIQQVMYLRGVNRSLHGIWPE	4143,005	1036,757 (4+)	-1,5	21,72	0,9929-1,0214		v	
WNKHGWCNWNIDPWIQMLMNRQTANLTEGPPDKE	4153,932	831,7868 (5+)	-8,2	22,52	0,9678-0,9964		v	
NITQWNLSDNLTSGIQQVMYLRGVNRSLHGIWPE	3882,922	971,7379 (4+)	0	21,36	0,9655-0,9941		v	
MENITQWNLSDNLTSGIQQVMYLR	2797,316	933,4427 (3+)	-3,6	21,56	1,0021-1,0305	v		
SLHGIWPEK	1065,561	533,787 (2+)	-1,1	15,46	0,7810-0,8101	v		
KICKGVPHTLATDTE	1611,829	806,9222 (2+)	0,5	2,03	1,0498-1,0782		v	
LQRHEWVK	1109,573	555,7935 (2+)	-0,5	2,02	0,8598-0,8886	v		
GMMDASER	895,3528	448,6833 (2+)	-0,9	12,08	0,7589-0,7880	v		
IRGMMDASE	1008,437	505,2296 (2+)	7,7	13,71	0,7356-0,7647		v	

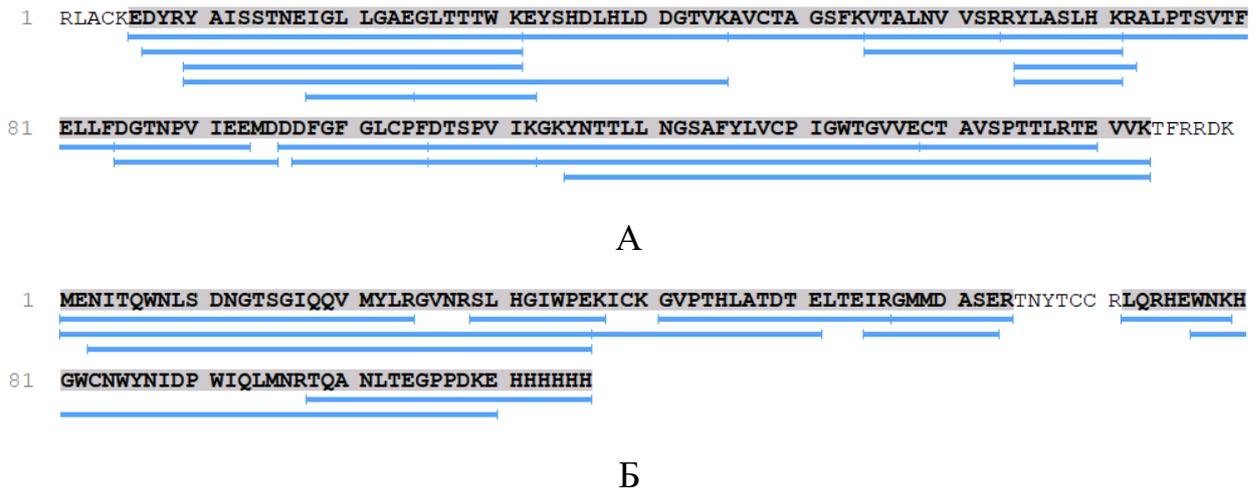


Рисунок 16 – Схемы покрытия аминокислотных последовательностей гликопротеинов E2 (А) и Erns (Б) по результатам обработки данных, полученных в ходе ВЭЖХ-МС/МС анализа гидролизатов белка.

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.

Оценка пригодности рекомбинантных антигенов E2 и Erns для серологической диагностики. Для оценки диагностической эффективности очищенных рекомбинантных белков rE2 и rErns использовали положительную контрольную сыворотку свиней – антисыворотку к вирусу КЧС, штамм «Шимень» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»). В качестве отрицательных контролей использовали нормальные сыворотки свиней (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»). Результаты детекции вирусспецифических антител представлены на рисунке 17.

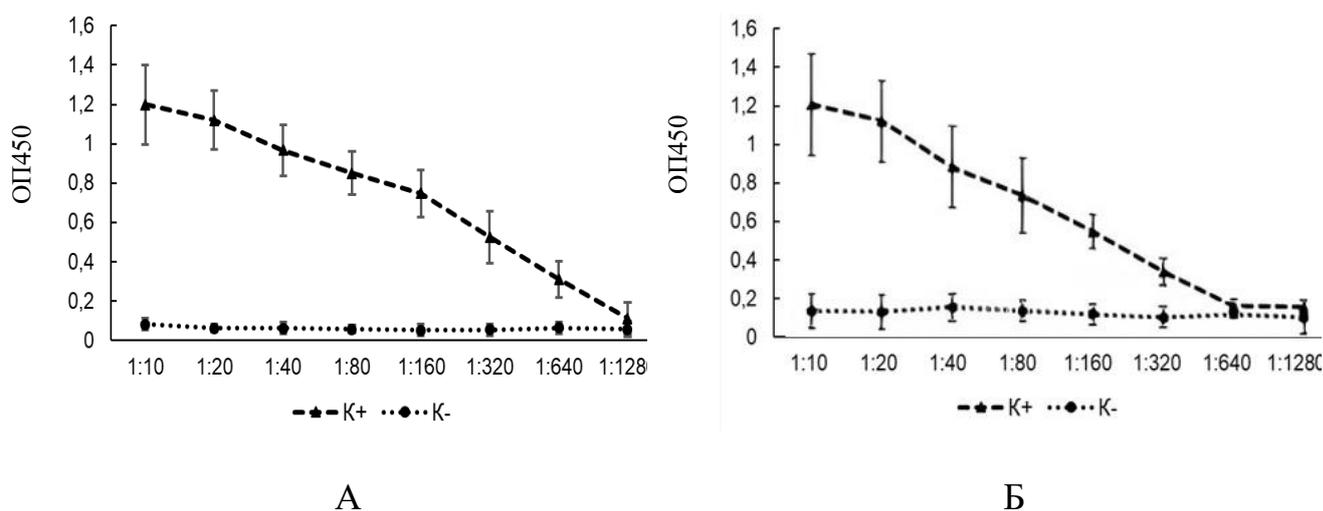


Рисунок 17 – Антигенная активность очищенных рекомбинантных белков в отношении контрольных сывороток свиней.
Примечание: А – rE2 с сенсibiliзирующей концентрацией 2 мкг/мл, Б – rEgns с сенсibiliзирующей концентрацией 2 мкг/мл

Данные, представленные на рисунке 17, свидетельствуют о правильности фолдинга rEgns и стерической доступности его ключевых эпитопов, позволяющих специфически связываться с антителами к КЧС, а также подтверждают антигенную активность рефолдированного rE2. Эти свойства делают полученные рекомбинантные антигены пригодными для применения в диагностических целях.

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

Согласно требованиям ВОЗЖ, в отношении рабочих посевных вирусов (master seed) для изготовления вакцин должны контролироваться следующие критерии качества: уровни репликации в культуре клеток, фактический выход вируса и его стабильность [83]. Для контроля сырья для производства рекомбинантных субъединичных вакцин также необходим доступный и эффективный метод определения концентрации специфического белка. Для этих целей подходят как ИФА (для рекомбинантного белка прокариотического происхождения), так и РИФ (для рекомбинантного белка эукариотического происхождения, синтезируемого стабильно экспрессирующими клеточными линиями) при условии, что тест должен проявлять минимальную перекрестную реактивность к вирусам ВД КРС и пограничной болезни овец. Одним из недостатков РИФ является риск получения ложноположительных результатов за счет серологического перекреста вируса КЧС и его ближайшего гомолога – ВД КРС – частого контаминанта культур клеток млекопитающих [32]. В связи с этим есть необходимость разработки полуколичественного ИФА для производственного контроля качества вакцинного сырья различного происхождения.

Разработку иммуноферментной тест-системы ИФА проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗЖ (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021, части 2.2.1, 2.2.4, 2.2.5).

Оптимизация протокола постановки ИФА. На первом этапе исследований нами были отработаны условия постановки ИФА при различных: температурном режиме (4 – 37 °С), длительности сенсibilизации (3 – 16 ч), концентрации сенсibilизирующих антител (10 – 200 мкг/мл), кратности отмывки планшета, концентрации специфического пероксидазного конъюгата (0,1 – 10 мкг/мл), времени проявления реакции. Постановку твердофазного непрямого ИФА осуществляли с использованием выборки образцов, включающей рабочие посевные вирусы, патологический материал свиней, экспериментально

зараженных вирусом КЧС, и биомассу штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET28a/E2 на разных этапах процесса экспрессии белка.

Определение оптимальной концентрации специфических анти-КЧС глобулинов проводили в диапазоне от 10 до 200 мкг/мл на лунку. В результате исследований было выявлено, что оптимальная сенсibiliзирующая концентрация вирус-специфических антител составляет 30 мкг/мл (≈ 300 нг на лунку). При этом обеспечивается необходимый уровень насыщения твердой фазы, тогда как меньшие концентрации приводят к снижению интенсивности реакции, большие – к многослойной сорбции антител и повышению верхнего предела ОП отрицательных контролей.

Выбор режима сенсibiliзации (3 ч при 37 °С или 12-16 ч при 4 °С) не приводил к статистически значимым различиям в ОП аналитов. Оптимальная концентрация конъюгата составила 2 мкг/мл (≈ 20 нг на лунку), что соответствует разведению исходного конъюгата 1:3200. Было установлено, что для эффективного связывания ферментативной метки с целевым иммунокомплексом достаточно 45 мин; пролонгирование инкубации более чем на 15 мин также приводило к проявлению неспецифического фона.

Время учета реакции до внесения стоп-реагента находилось в обратной зависимости от разведения конъюгата: так, при внесении конъюгата в разведении 1:3200 оно составляло 15 мин, в разведении 1:1600 – сокращалось до 5 мин, в разведении 1:800 специфическое окрашивание в лунках проявлялось в течение 1 мин.

Определение аналитических характеристик тест-системы.

Определение позитивно-негативного порога (ПНП). Для дифференциации специфических и неспецифических реакций тестировали заведомо положительные и заведомо отрицательные образцы, для которых рассчитывали среднеарифметическую ОП₄₅₀. Для положительных образцов данное значение составило 1,492 ОЕ, для отрицательных – 0,126 ОЕ. Вычисленный 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. Критерии разграничения результатов реакции определялись согласно методике, предложенной Snyder с соавт. (1983) [192], и были представлены в виде процентов реактивности, выражающих отношение разности опытного образца и отрицательного контроля к разности положительного и отрицательного контролей. Так, были установлены следующие границы пороговых значений для разрабатываемой тест-системы: при величине более 20 % результат считается положительным, менее 8 % – отрицательным, при величине в диапазоне от 8 до 20 % – сомнительным.

Определение аналитической чувствительности тест-системы. 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 18) [43].

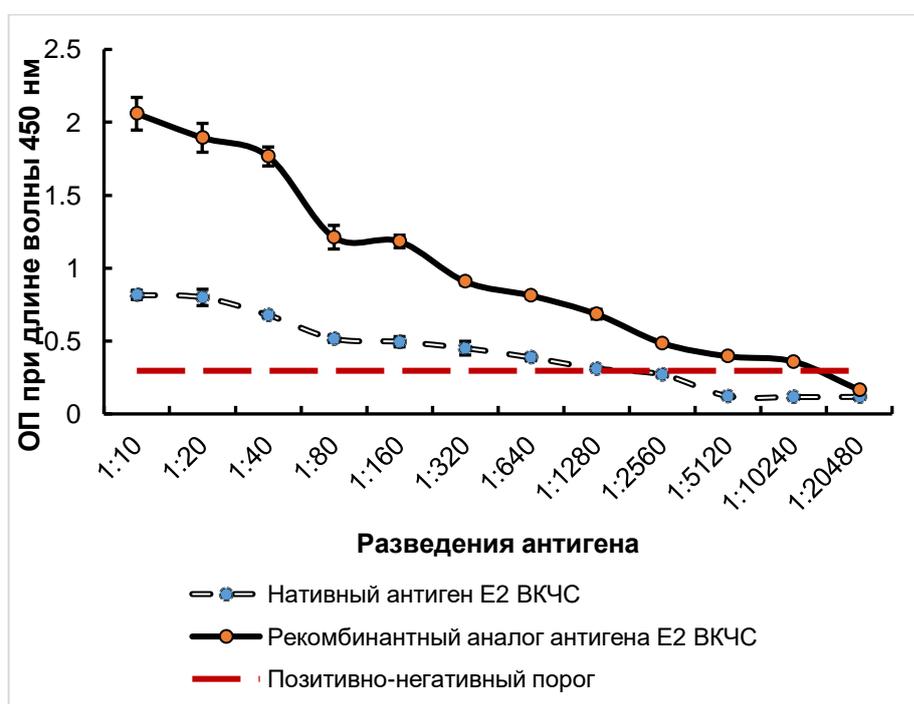


Рисунок 18 – Определение аналитической чувствительности ИФА.
Примечание: Красной линией обозначен нижний порог положительных значений (0,296 ОП)

Выявили, что предел аналитической чувствительности тест-системы по концентрации белка составляет 85 нг/мл, по инфекционному титру вируса – 1,2 lg ККИД₅₀/мл.

Оценка диагностической эффективности тест-системы. После определения оптимальных концентраций специфических компонентов нами была проанализирована выборка из 205 образца сырья, используемого в производстве иммунобиологических препаратов, и 30 отрицательных (гетерологичных) образцов, каждый из которых был исследован в трипликатах (Таблица 21).

Таблица 21 – Результаты контроля антигенной активности сырья вируса КЧС, используемого в производстве диагностических и профилактических препаратов

Характеристика образца	Количество проб, n	ОП образца, (M±m)	K _{сп}	Среднее значение титра в ИФА
Рабочий посевной вирус КЧС, штамм «Ши-Мынь» (пассажи на SPEV 472-480)	72	0,773±0,049	5,34	1:640
Нативный гликопротеин E2 вируса КЧС, выделенный по Kumar et al. [133]	24	0,816±0,026	5,68	1:1280
Осветленный гомогенат селезенки свиньи, павшей от КЧС	15	0,657±0,02	5,21	1:320
Надосадок (среда LB) биомассы штамма-продуцента <i>E. coli</i> до индукции экспрессии	12	0,127±0,02	1,01	–
Клетки биомассы штамма-продуцента <i>E. coli</i> до индукции экспрессии	12	0,144±0,065	1,14	–
Надосадок биомассы штамма-продуцента <i>E. coli</i> после индукции экспрессии	30	0,311±0,044	2,47	1:20
Клетки <i>E. coli</i> после индукции экспрессии (содержащие рекомбинантный E2)	30	0,876±0,039	6,95	1:1280
Рекомбинантный E2 после хроматографической очистки	10	2,059±0,117	16,3	1:10240
Антиген вируса бешенства, штамм «Овечий ВГНКИ»	10	0,106±0,019	0,84	–
Антиген вируса бешенства, штамм «CVS»	10	0,127±0,021	0,99	–
Антиген вируса болезни Ауески, штамм «Арский»	10	0,117±0,009	0,92	–

Примечание: K_{сп} – коэффициент специфичности

Результаты, представленные в таблице 20, демонстрируют 100 % специфичность: так, ОП всех 30 отрицательных (гетерологичных) образцов не превышала критического значения оптической плотности ($ОП_{крит}$), что свидетельствует об отсутствии кросс-реактивности. Показатели ОП всех положительных образцов были сопоставимы с результатами их исследования методом флуоресцирующих антител ($R^2 = 0,99$). 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. Это коррелирует с результатами определения полипептидного профиля антигенов: основная дискретная мажорная фракция с молекулярной массой 22 кДа четко визуализируется в аналитическом disc-электрофорезе лизата индуцированных клеток и присутствует в следовых концентрациях в питательной среде. Совокупность данных подтверждает наше предположение о том, что рекомбинантный E2 экспрессируется преимущественно в клеточную цитоплазму в нерастворимом состоянии и частично – во внешнюю среду.

В процессе испытаний тест-системы на воспроизводимость было показано, что значение стандартного отклонения при исследовании образцов одной группы не превышало 0,015 ОЕ. Также было установлено, что при исследовании неинфицированных тканей и клеток, а также нетрансформированных бактерий показатели их ОП не превышали ранее установленного верхнего предела по группе отрицательных образцов. Коэффициент вариации среди лунок одного планшета не превышал 3 %, между отдельными планшетами – 5 %, что позволяет констатировать высокую воспроизводимость.

Валидация методики. Достоверность результатов, полученных с применением тест-системы, оценивали при помощи ROC-анализа. При

вычислении величины положительной/отрицательной отсечки для непрямого ИФА на основании результатов проверки 54 положительных и 36 отрицательных проб построили диаграмму (Рисунок 19) для частоты распределения полученных показателей. Видно, что в интервале S/P от 0,2 до 0,4 располагались одновременно 1 референс-положительная и 5 референс-отрицательных проб, т.е. в этом диапазоне находились оптические плотности образцов, которые могут быть классифицированы и как ложноотрицательные, и как ложноположительные.

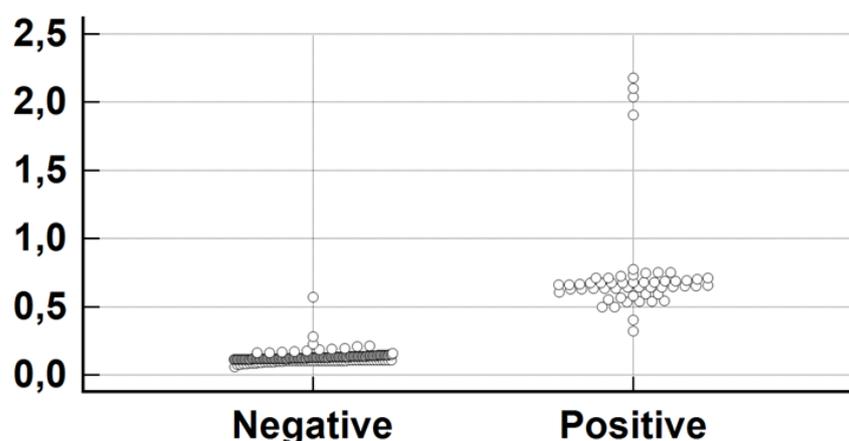


Рисунок 19 – Точечная диаграмма результатов исследования антигенов вируса КЧС и гетерологичных антигенов в ИФА-тесте (для отрицательных и положительных образцов).

Примечание: Каждая точка представляет средний показатель дубликатов анализа индивидуального образца

Чувствительность и специфичность непрямого ИФА при проверке антигенных образцов рассчитали для разных величин отсечки (Таблица 22). 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. В таблице 21 представлена часть критериев и координат ROC-анализа, рассчитанных в программе «MedCalc», с наиболее актуальными величинами отсечки в диапазоне оптимальных показателей чувствительности и специфичности.

Таблица 22 – Значения критериев и координат ROC-кривой при оценке операционных характеристик непрямого ИФА для производственного контроля вакцинного сырья

Критерий	Ч, %	95% ДИ	С, %	95% ДИ	+LR	-LR
$\geq 0,06$	100,00	93,4 - 100,0	0,00	0,0 - 1,7	1,00	
$> 0,283$	100,00	93,4 - 100,0	99,54	97,4 - 100,0	216,00	0,00
$> 0,567$	81,48	68,6 - 90,7	99,54	97,4 - 100,0	176,00	0,19
$> 0,569$	81,48	68,6 - 90,7	100,00	98,3 - 100,0	–	0,19
$> 2,179$	0,00	0,0 - 6,6	100,00	98,3 - 100,0		1,00
$\geq 0,06$	100,00	93,4 - 100,0	0,00	0,0 - 1,7	1,00	

Примечание: Ч — чувствительность, С — специфичность, ДИ — доверительный интервал, +LR и -LR — отношения правдоподобия: $+LR = Ч/(100 - С)$, $-LR = (100 - Ч)/С$. 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 (Рисунок 20)

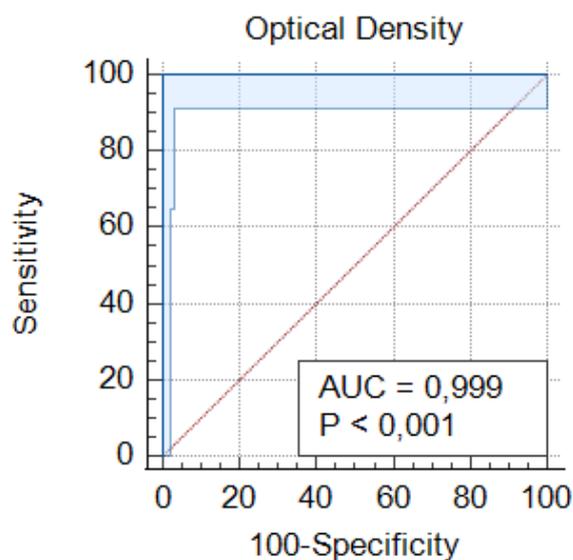


Рисунок 20 – ROC-кривая выявления рекомбинантного антигена E2 методом ИФА

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

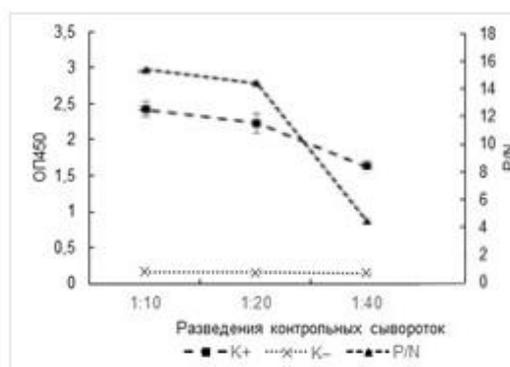
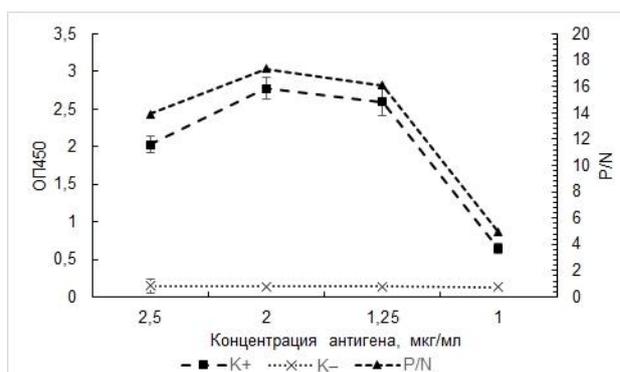
2.2.4 Разработка дискриминационного ИФА для определения уровня антител к вирусу КЧС

К DIVA-совместимым средствам диагностики вируса КЧС, которые предполагается использовать при применении маркированной вакцины, предъявляются некоторые требования: тест-система должна достоверно определять антитела к вирусу КЧС, исключая ложноположительные результаты (например, перекрестные реакции с антителами к другим пестивирусам) [201]. Дифференцирующий тест основан на обнаружении антител, специфичных к гликопротеину E_{gns} вируса КЧС, которые вырабатываются у инфицированных животных и отсутствуют у животных, вакцинированных маркированной вакциной [6].

Первой задачей данного этапа исследований явилось конструирование ИФА-теста для серодиагностики КЧС, основанного на применении усеченного рекомбинантного белка E₂.

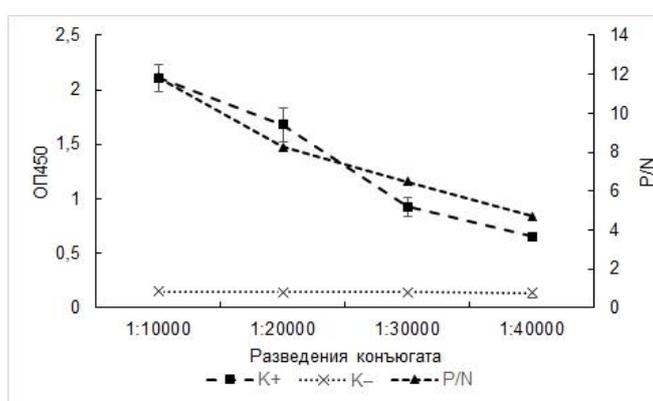
Оптимизация протокола постановки ИФА.

Оптимальные концентрации специфических компонентов. Рабочие концентрации специфических компонентов для проведения ИФА были определены методом шахматного титрования; оптимальным считалось наибольшее значение отношения ОП₄₅₀ положительного контроля к таковому отрицательному контролю (P/N) (Рисунок 21).



А

Б



В

Рисунок 21 – Оптимизация условий постановки ИФА.

Примечание: определение концентрации: А – сенсibiliзирующего антигена, Б – контрольных сывороток, В – антивиidового конъюгата

Концентрация сенсibiliзирующего антигена, оптимальное разведение тестируемых сывороток и разведение антивиidового пероксидазного конъюгата составили 2 мкг/мл, 1:10 и 1:10000 соответственно

Дополнительно при сенсibiliзации рекомбинантными антигенами были испытаны различные протоколы блокировки свободных сайтов связывания для минимизации неспецифических реакций и фоновых сигналов. Для этого применяли следующие коммерческие реагенты: «Casein Blocking Buffer 10x» («Sigma», США), «Coating Stabilizer and Blocking buffer» («Sigma», США), «Super G Blocking Buffer» («Grace Bio-Labs», США), «Blocking Reagent for ELISA» («Roche Diagnostics GmbH», Швейцария). Среди перечисленных реагентов наилучшего результата удалось достичь при применении «Coating Stabilizer and Blocking

buffer»: при обработке сенсibilизированных планшетов неразведенным буфером (вариант для лабильных антигенов) в объеме 100 мкл в течение 1 ч при 37 °С с последующей трехкратной отмывкой удавалось добиться максимального снижения фонового сигнала до 70,2 % (в образцах, классифицируемых как ложноположительные в протоколе без блокировки).

Определение позитивно-негативного порога (ПНП). Для дифференциации специфических и неспецифических реакций тестировали 100 заведомо положительных и 30 заведомо отрицательных образцов, для которых рассчитывали среднеарифметическую ОП₄₅₀. 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 (К_{инг}):

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

где: A₄₅₀ОП_{ср} – средняя оптическая плотность опытного образца;

A₄₅₀K_{-ср} – средняя оптическая плотность положительного контроля;

A₄₅₀K_{+ср} – средняя оптическая плотность отрицательного контроля.

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

Определение аналитической чувствительности. Для определения чувствительности тест-системы очищенный КЧС-специфический глобулин свиньи титровали в лунках планшета с двукратным шагом и анализировали согласно оптимизированному протоколу ИФА [16]. Результаты исследования отражены на рисунке 22.

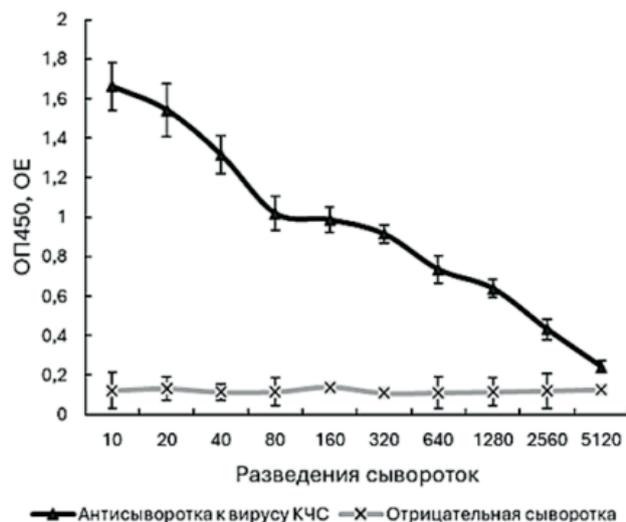


Рисунок 22 – Определение аналитической чувствительности ИФА

Из рисунка следует, что предел аналитической чувствительности тест-системы по концентрации белка составляет ≈ 190 нг/мл, что соответствует разведению глобулина 1:2560.

Оценка диагностической эффективности. В ходе работы была проанализирована выборка из 173 иммунных и 76 нормальных полевых сывороток свиней. Результаты демонстрировали высокую специфичность: так, ОП всех отрицательных сывороток не превышала показателя $ОП_{крит}$, что свидетельствует об отсутствии неспецифического связывания. В процессе испытаний тест-системы на воспроизводимость было показано, что значение стандартного отклонения при исследовании образцов одной группы не превышало 0,025 ОЕ. Коэффициент вариации среди лунок одного планшета не превышал 5 %, между отдельными планшетами – 6,3 %; разница в показателях образцов, исследованных в разных условиях (двумя операторами в течение 3 дней) не превысила 7 %, что позволяет констатировать высокие воспроизводимость и сходимость результатов.

Валидация методики при помощи ROC-анализа. Полученные первичные данные были обработаны с применением инструментов ROC-анализа. При проверке величины отсечки для разработанного ИФА на основании результатов проверки 249 проб сыворотки крови свиней построили диаграмму (Рисунок 23) распределения полученных показателей. Диаграмма свидетельствует о том, что в

интервале S/P от 0,2 до 0,4 располагались одновременно 5 референс-положительных и 5 референс-отрицательных проб, т.е. в этом диапазоне находились показатели образцов, которые могут быть классифицированы и как ложноотрицательные, и как ложноположительные. В связи с этим мы предусмотрели зону сомнительных результатов, дальнейшая работа велась с порогом отсечки 40 %.

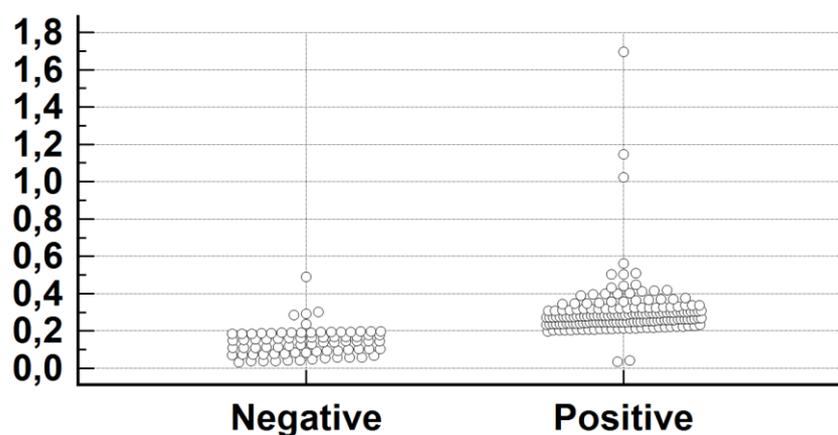


Рисунок 23 – Точечная диаграмма результатов исследования сывороток свиней в ИФА-тесте (для отрицательных и положительных образцов).

Примечание: Каждая точка представляет средний показатель дубликатов анализа индивидуального образца

Чувствительность и специфичность ИФА при проверке сывороток крови свиней рассчитали для разных величин отсечки (Таблица 23). 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.

Таблица 23 – Значения критериев и координат ROC-кривой при оценке операционных характеристик непрямого ИФА для определения антител к вирусу КЧС в сыворотке крови в зависимости от величины отсечки

Критерий	Ч, %	95% ДИ	С, %	95% ДИ	+LR	-LR
≥0,034	100	97,9 - 100,0	0	0,0 - 4,7	1	
>0,034	100	97,9 - 100,0	1,32	0,03 - 7,1	1,01	0
>0,0365	99,42	96,8 - 100,0	1,32	0,03 - 7,1	1,01	0,44
>0,04	99,42	96,8 - 100,0	5,26	1,5 - 12,9	1,05	0,11
>0,041	98,84	95,9 - 99,9	5,26	1,5 - 12,9	1,04	0,22
>0,197	98,84	95,9 - 99,9	90,79	81,9 - 96,2	10,73	0,013
>0,1985	98,27	95,0 - 99,6	90,79	81,9 - 96,2	10,67	0,019
>0,1995	98,27	95,0 - 99,6	93,42	85,3 - 97,8	14,94	0,019
>0,235	82,66	76,2 - 88,0	93,42	85,3 - 97,8	12,56	0,19
>0,236	82,66	76,2 - 88,0	94,74	87,1 - 98,5	15,71	0,18
>0,285	43,93	36,4 - 51,7	94,74	87,1 - 98,5	8,35	0,59
>0,286	43,35	35,9 - 51,1	96,05	88,9 - 99,2	10,98	0,59
>0,289	41,62	34,2 - 49,3	96,05	88,9 - 99,2	10,54	0,61
>0,291	41,62	34,2 - 49,3	97,37	90,8 - 99,7	15,82	0,6
>0,3	34,1	27,1 - 41,7	97,37	90,8 - 99,7	12,96	0,68
>0,301	34,1	27,1 - 41,7	98,68	92,9 - 100,0	25,92	0,67
>0,449	4,05	1,6 - 8,2	98,68	92,9 - 100,0	3,08	0,97
>0,492	4,05	1,6 - 8,2	100	95,3 - 100,0		0,96

Примечание: Ч — чувствительность, С — специфичность, СИ — доверительный интервал, +LR и -LR — отношения правдоподобия: $+LR = Ч/(100 - С)$, $-LR = (100 - Ч)/С$. 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 (Рисунок 24)

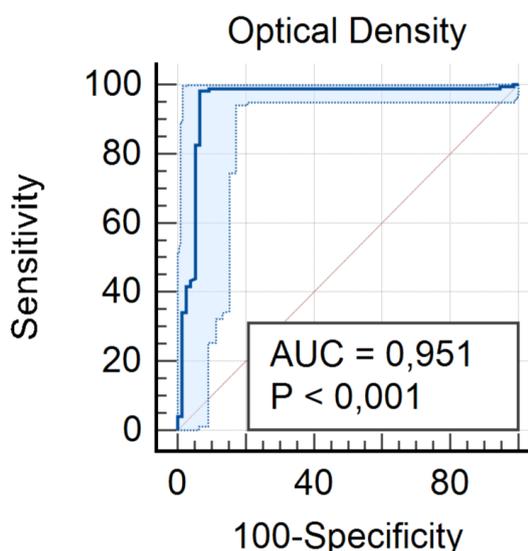


Рисунок 24 – ROC-кривая выявления антител к вирусу КЧС методом ИФА

С целью оценки относительной специфичности (Sp) и чувствительности (Se) проводили сравнение результатов, полученных при исследовании 46 сывороток свиней с применением разработанной тест-системы на основе рекомбинантного гликопротеина E2 и коммерческого набора «КЧС-СЕРОТЕСТ плюс» (ООО «Ветбиохим»). Порог отсечки положительных и отрицательных результатов в наборе «КЧС-СЕРОТЕСТ плюс» составляет 35 % согласно инструкции производителя.

В ходе исследования выявили, что число истинно отрицательных результатов в данной выборке сывороток составляет 7, число ложноположительных результатов – 1, число истинно положительных результатов – 38. Ложноотрицательных результатов не наблюдалось. Относительную специфичность (Sp) и чувствительность (Se) определяли по формулам:

$$Sp = \frac{ИО}{ИО+ЛП} \times 100 \%,$$

где: ИО – число истинно отрицательных результатов;

ЛП – число ложноположительных результатов.

$$Se = \frac{ИП}{ИП+ЛО} \times 100 \%,$$

где: ИП - число истинно положительных результатов;

ЛО – число ложноотрицательных результатов.

Так, результаты исследования относительной специфичности разработанного ИФА составили 87 %, относительной чувствительности – 100 %.

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 (≈ 30 нг на лунку); прочие условия сенсibiliзации и проведения реакции были аналогичны описанным в п. 4.1.

Оценка пригодности тест-системы к дифференциальной диагностике вируса КЧС. Для оценки данной характеристики был проведен не прямой иммуноферментный анализ с сыворотками свиней, иммунизированных традиционными вакцинами, применяемыми на территории России, а также рекомбинантным гликопротеином E2 производства ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Таблица 24) [31].

Таблица 24 – Результаты исследования сывороток свиней на наличие антител к Erns в не прямом 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. Тестирование более широкой выборки моносывороток к гликопротеину E2, в том числе полевых, в настоящее время не представляется возможным ввиду того, что маркированные вакцины не применяются в ветеринарной практике. Однако полученные результаты подтверждают принципиальную возможность дифференцирования при помощи полученного рекомбинантного антигена Erns переболевших животных от животных, иммунизированных только гликопротеином E2 в монорежиме.

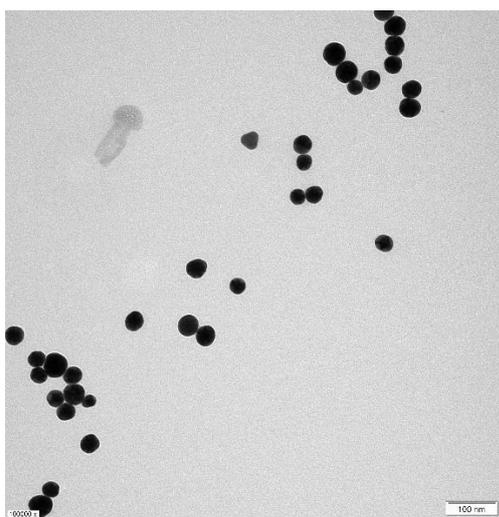
2.2.5 Разработка прототипа ИХА-теста для серологической диагностики вируса КЧС

Еще одним быстрым и надежным диагностическим инструментом в рамках стратегий контроля инфекционных заболеваний являются ИХА [166]. ИХА обеспечивает такие преимущества по сравнению с традиционными методами иммуноанализа, как доступность, быстрота, удобство для пользователя (безинструментальный учет результатов), а также высокая специфичность и чувствительность [185]. Принцип ИХА, как и ИФА, основан на биохимическом взаимодействии «антиген – антитело» – иммуноаффинном разделении: аналит (определяемое вещество), связывается со специфическим конъюгатом на основе наночастиц коллоидного золота и разделяется на основе его аффинности с антителами (или другими связывающими агентами), иммобилизованными на пористой мембране. Капиллярное действие способствует протеканию образца через мембрану, позволяя аналиту взаимодействовать с иммобилизованными антителами, которые затем можно обнаружить визуально или инструментально [46].

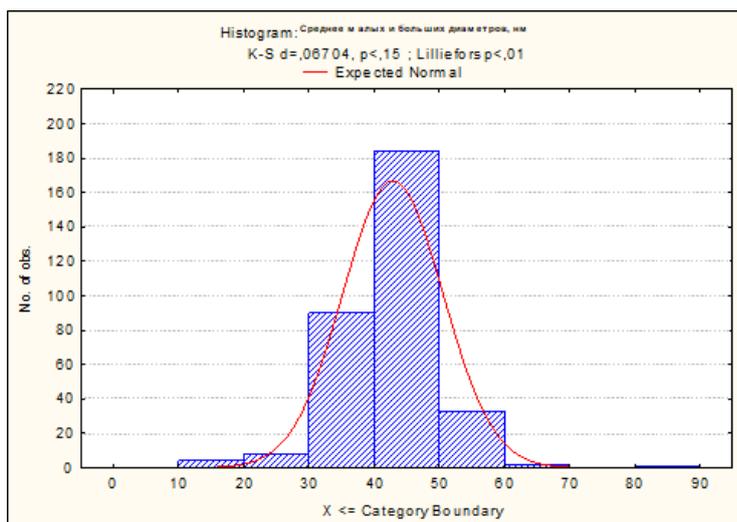
На мировом рынке имеется несколько наборов для диагностики КЧС методом ИХА: набор для экспресс-индикации антигена («Ring Biotechnology Co., Ltd», Китай), набор экспресс-индикации антител («Antibodies-online Inc.», США) и т.д. Также были разработаны опытно-лабораторные образцы ИХА-тестов для выявления антител против вируса КЧС на основе диагностических антигенов, полученных в системах экспрессии *E. coli* [116], *N. benthamiana* [113], причем последний предусматривал возможность дифференциальной диагностики. В отечественной лабораторной практике сведения о разработке подобных тестов отсутствуют, поэтому задачей заключительного этапа исследований явилось конструирование прототипа ИХА-теста с возможностью применения дополнительного (дискриминирующего) антигена.

Известно, что для достижения высоких чувствительности и специфичности иммунохроматографических реакций необходимо использовать стабильные

неагрегирующие частицы коллоидного золота с высокой степенью однородности по размерам и форме [42]. Для их получения в зависимости от желаемого размера частиц (наиболее употребимым в ИХА-тестах является размерный диапазон от 15 до 60 нм) к раствору золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК) приливали различные объемы 1 % цитрата натрия, после чего наблюдали переходящее синеватое окрашивание, сменяющееся красным, свидетельствующее о нуклеации частиц и коалесценции зародышей. Контроль гомогенности и размерных характеристик готовых НчКЗ осуществляли посредством ПЭМ: измерялись все частицы, индивидуально обнаруживаемые в зрительном поле, при условии, что граница частицы просматривается по всему периметру и не формирует слитный силуэт с соседней частицей. Электронная микрофотография полученных НчКЗ, а также гистограмма их распределения по размерам представлена на рисунке 25.



А



Б

Рисунок 25 – (А) Фрагмент изображения НчКЗ на электронной микрофотографии; (Б) Гистограмма распределения частиц по размерам (средний диаметр 42 нм)

Анализ полученных препаратов с помощью электронной микроскопии продемонстрировал высокую гомогенность размеров частиц и близость их формы к сферической: длина большей оси составила 37 ± 8 нм, меньшей оси – 30 ± 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. [42] и адаптированные к нашей системе иммуноанализа (Таблица 25).

Таблица 25 – Схемы постановки ИХА для обнаружения КЧС-специфических антител

Компоненты	Традиционная схема	Обратная схема
Аналит	Антитела в тестируемом образце сыворотки	
Конъюгат на основе НчКЗ	С антивидовыми антителами	С антигеном Е2
Аналитическая зона	Иммобилизованный антиген Е2 (классический вариант) Иммобилизованный антиген Еrns (дифференцирующий вариант)	Иммобилизованные антивидовые антитела
Контрольная зона	Антивидовые антитела	КЧС-специфические поликлональные антитела

Исходя из данных вариантов ИХА, перед нами стояла задача изготовления двух разновидностей конъюгатов на основе НчКЗ: с антивидовыми антителами (антителами кролика против свиньи) для проведения анализа по традиционной схеме и с рефолдированными рекомбинантными антигенами Е2 и Еrns – для проведения анализа по обратной схеме. Для этого мы определили стабилизирующие концентрации антивидовых антител и антигенов Е2 и Еrns: 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. После инкубирования специфических компонентов с НчКЗ при плавном перемешивании в течение 30 мин конъюгат стабилизировали добавлением 1 % БСА и осаждали при 13000 g при 10 °С в течение 30 мин для формирования плотного осадка, содержащего НчКЗ с иммобилизованными антителами либо антигенами. Надосадок с несвязавшимися компонентами удаляли, осадок ресуспендировали в 0,1 объеме ФБР и наносили на

подложки для конъюгата с 1-3-кратной пропиткой, просушивая в ламинарном потоке воздуха.

Для оценки пригодности конъюгатов для диагностических целей были изготовлены два типа аналитических мембран (по схемам, изложенным в таблице 25), на которые в виде полос либо дотов были нанесены специфические компоненты. Первичная оценка показала, что применение обратной схемы ИХА с конъюгатом на основе антигена E2 обеспечивало проявление ярко окрашенных (от фиолетового до бордового цветов в зависимости от интенсивности пропитки подложек конъюгатом) дискретных полос либо дотов (Рисунок 26), тогда как при тестировании традиционной схемы регистрировались ложноположительные результаты образцов, классифицированных по результатам ИФА как отрицательные либо сомнительные. 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 [42]. Применение конъюгата на основе E_{9ns} в обратной схеме ИХА было менее эффективным: неспецифических взаимодействий не наблюдалось, однако чувствительность реакции значительно понизилась. Предположительно это связано с тем, что отсутствие необходимых посттрансляционных модификаций в системе *E. coli* в совокупности с большим количеством сайтов гликозилирования в структуре белка не позволяет рекомбинантному аналогу данного антигена связывать антитела эквивалентно антигену E2.



Рисунок 26 – Первичная оценка диагностической эффективности конъюгата в обратной схеме ИХА.

Примечание: K+ – гипериммунная, K– – нормальная сыворотки свиней. Обозначения на кассете: S (Sample) – окошко для образца, C (control) – контрольная зона, T (test) – аналитическая (тестовая) зона

При дальнейшей оптимизации ИХА-теста нами были проведены модельные эксперименты с различными вариациями ключевых параметров тест-системы. С применением конъюгата и разных режимов иммобилизации компонентов были изготовлены мультимембранные композиты (по 20 тест-полосок на каждое значение параметра), на которых по стандартной методике ставили ИХА с контрольными образцами. При анализе результатов учитывали активность (интенсивность проявления окрашивания в контрольной полосе), их специфичность (интенсивность проявления окрашивания в тестовой полосе) и корректность постановки анализа (наличие яркой контрольной полосы вне зависимости от окрашивания тестовой).

Таким образом, оптимальная концентрация антивидовых антител составляет 10 нг/см² рабочей мембраны, при этом увеличение концентрации до 100 нг/см² не влияет на активность и специфичность анализа. При снижении концентрации до

5 нг/см² в 70 % композитов в данной группе тестовая полоса проявлялась слабо и имела бледно-розовый цвет, в более низких концентрациях не проявилась.

Однократная пропитка подложки конъюгатом с исходной концентрацией 50 мкг/мл обеспечивает цвет зон в диапазоне от бледно-розового до бледно-красного (при этом есть риск ложноотрицательных результатов), двукратная является оптимальной и позволяет достичь яркого темно-бордового окрашивания.

При определении влияния степени разведения анализируемого образца на чувствительность тест-системы контрольный положительный антиген с исходной концентрацией 100 мкг/мл был протестирован в разведениях от 1:1 до 1:800 на оптимально сенсibilизированных тест-полосках. Наибольшая интенсивность окраски достигалась при исследовании образцов в разведениях 1:1 – 1:50, менее выраженный оптический сигнал регистрировался в разведениях 1:100 – 1:400 и пропадал в разведении 1:800.

Температура и время сенсibilизации, время высушивания подложек после пропитки конъюгатом – не влияют на аналитические характеристики тест-системы.

Таким образом, прототип ИХА-теста имеет аналитическую чувствительность ≈ 200 нг/мл (для антигена E2) и ≈ 290 нг/мл (для антигена Erns), не обладает кросс-реактивностью к антителам к ВД КРС, однако при анализе образцов в разведении менее 1:10 возможны ложноположительные результаты ($\approx 10\%$), а также не удается достоверно выявлять антитела в пробах, являющиеся слабоположительными в ИФА (сопоставимость с ИФА на уровне 85,5 %). Однако истинно положительные в ИФА образцы позволяют провести экспресс-тестирование в ИХА, специфически связываясь как с антигеном E2, так и – с меньшей интенсивностью окрашивания – с Erns. Для преодоления данного ограничения необходимо заменить антиген Erns рекомбинантным аналогом эукариотического происхождения, тем самым обеспечив необходимые ПТМ, а также провести валидацию дифференцирующего варианта теста на более широкой выборке сывороток свиней, иммунизированных антигеном E2 в монорежиме.

Сконструированный опытно-лабораторный образец ИХА-теста представляет собой пластиковую тест-кассету с нитроцеллюлозной мембраной, разделенной на

две зоны – тестовую зону с иммобилизованными антивидовыми (антисвинными) антителами и контрольную зону с КЧС-специфическими поликлональными антителами; анализом служит сыворотка крови свиней. Проявление одной (контрольной) окрашенной полосы будет свидетельствовать о серонегативном статусе животных, двух (контрольной и тестовой) – о вакцинации традиционной живой цельновирионной вакциной либо (при отсутствии вакцинации в анамнезе) – об инфицировании полевым штаммом вируса КЧС. При применении рекомбинантного антигена Erns конструкция композита следующая: тестовая зона 1 (Т1) содержит антиген E2, тестовая зона 2 (Т2) – антиген Erns, контрольная зона – антивидовые антитела; в этом случае при визуализации трех полос (контрольной, Т1 и Т2) – можно говорить об иммунизации традиционной вакциной либо инфицировании животного, двух полос (контрольной и Т2) – об иммунизации рекомбинантной либо живой маркированной вакциной, дефицитной по гену Erns.

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Экстренная вакцинация живыми маркированными либо рекомбинантными субъединичными вакцинами представляет собой многообещающую стратегию контроля КЧС; так, первые живые маркированные вакцины уже доступны в Европе [66, 201]. Успешное внедрение подобных вакцин в ветеринарную практику зависит от надежных сопутствующих дифференцирующих тестов (DIVA). Поскольку индукция защитного иммунного ответа зависит от вируснейтрализующих антител против белка E2 вируса КЧС, стратегия DIVA основана на обнаружении антител, специфичных для белков Erns либо NS3, у инфицированных свиней [201].

Описан опыт зарубежных исследователей в конструировании дискриминационных серологических тестов, в частности, сообщается об опытно-лабораторных образцах ИФА-тестов с применением рекомбинантных антигенов различного происхождения [201, 205], а также аналогичных ИХА-тестов в качестве более экспрессной альтернативы [113]. Эти исследования подтвердили, что концепция двухантигенных тестов является надежной стратегией для обнаружения антител, специфичных для Erns, в отношении изолятов вируса КЧС, принадлежащих к различным генотипам. Кроме того, они позволяют обнаружить раннюю сероконверсию, что имеет преимущество по сравнению с классическим ИФА на основе E2.

Для получения диагностических рекомбинантных антигенов апробированы различные системы экспрессии: бактериальные (*E. coli* [204] и *L. plantarum* [157]), дрожжевые (*P. Pastoris* [176]), растительные (*N. tabacum* [203], *C. Reinhardtii* [188]), на основе клеток млекопитающих [15] и насекомых [146]. На наш взгляд, для биосинтеза антигенов диагностического назначения оптимальной по простоте генно-инженерных манипуляций, скорости производственных циклов, экономичности очистки является коли-экспрессия. Для создания рекомбинантных ДНК, кодирующих фрагменты усеченных пептидов E2 и Erns, нами учитывался факт перекрестной реактивности с антителами к другим пестивирусам животных [101, 149, 169]: для этих целей из аминокислотных последовательностей белков

были исключены фрагменты, кодирующие эпитопы, гомологичные таковым в структуре вируса ВД КРС. В результате на основе синтезированных последовательностей и вектора рЕТ-28a(+) были сконструированы штаммы-продуценты *E. coli*, обеспечивающие суммарную продуктивность системы до 28 мг (E2) и 30 мг (Erns) на литр бактериальной культуры. Несмотря на то, что большая часть белков экспрессировалась в виде телец включения, были подобраны протоколы хроматографической очистки в денатурирующих условиях, а также оценена эффективность «мягкой солюбилизации»; установлено, что предложенные подходы позволяют использовать диагностические антигены в рефолдированном виде, сохраняя доступность мажорных эпитопов.

В контексте получения штаммов-продуцентов актуальным становится вопрос разработки ИФА-тест-системы для контроля специфичности рекомбинантного антигена E2, применимой как в отношении его усеченного варианта, так и полноразмерного, входящего в состав антигенной композиции для конструирования рекомбинантной субъединичной вакцины. Подобные подходы к контролю технологического сырья описаны разными авторами как в отношении нативных, так и рекомбинантных антигенов [13, 36]. На основе хроматографически очищенных поликлональных антител к вирусу КЧС был создан опытно-лабораторный образец полуколичественной ИФА-тест-системы с пределом чувствительности 85 нг/мл, что составляет 0,17 % от предполагаемого содержания антигена в сенсibiliзирующем растворе и 0,085 % – от предполагаемого содержания антигена в рекомбинантной субъединичной вакцине. Данный тест рекомендуется применять в двух контрольных точках в процессе получения антигена: после отмывки солюбилизированных телец включения и после процедуры рефолдинга. Таким образом, методика позволяет подтвердить подлинность белка и оценить его приблизительное количество в препарате.

На следующем этапе исследований был сконструирован ИФА-тест на основе усеченного пептида E2 для обнаружения антител к вирусу КЧС в сыворотках крови свиней. Дополнительно предусмотрена возможность использования и оценена диагностическая эффективность дискриминирующего антигена Erns: все

исследованные сыворотки свиней, иммунизированных гликопротеином E2 в монорежиме, классифицировались в данном варианте теста как отрицательные. При этом специфического связывания обоих рекомбинантных антигенов с анти-ВД КРС глобулином, а также с полевыми сыворотками КРС, иммунных к вирусу ВД КРС, не наблюдалось.

Доказана принципиальная возможность применения рекомбинантных антигенов в двойном дифференцирующем ИХА-тесте: его чувствительность уступала ИФА-варианту, в связи с чем пробы, соответствующие в ИФА диапазону «сомнительных», классифицировались как отрицательные. По мнению Bai et al. [111], при получении диагностических антигенов в прокариотической системе экспрессии их неправильный фолдинг может значительно снизить эффективность детекции антител. Важной особенностью обоих вирусных гликопротеинов является сильное гликозилирование, но особенно влияет отсутствие надлежащих посттрансляционных модификаций на связывание антител с Erns, в котором содержится 7 предполагаемых участков N-гликозилирования [121]. Однако в нашем случае предел чувствительности ИХА-теста не превышал установленного диагностического титра, что делает его пригодным для дифференцирующей диагностики. Хотя наши исследования подтвердили достаточные чувствительность и специфичность, размер выборки был мал, поэтому в дальнейшем необходимо оценить воспроизводимость теста на широких выборках, а также испытать тест на стабильность. Сообщается о том, что на связывание КЧС-специфических антител может влиять несколько факторов, например, инфицирование различными генотипами вируса КЧС [119], низкая эффективность вакцинации, а также задержка выработки антител к вирусу КЧС, вызванная инфицированием вирусом РРСС [94]. Таким образом, для точного определения антител к вирусу КЧС необходим комплексный подход, включающий сочетание различных методов и непрерывный серологический и вирусологический мониторинг свинопоголовья.

В заключение необходимо отметить, что необходимы дальнейшие исследования для всесторонней проверки специфичности и чувствительности дифференцирующих ИФА- и ИХА-тестов в обширных популяциях в различных

полевых условиях. Поскольку в этом исследовании в основном использовались образцы сывороток, полученные из генотипа 1 вируса КЧС, оценка эффективности предлагаемых тестов в отношении различных штаммов, генотипов и его потенциальной перекрестной реактивности с антителами других свиных патогенов в дальнейших исследованиях повысит его надежность и применимость в практических стратегиях DIVA.

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 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. 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* BL21(DE3)pLysS/pET28a/E2 и BL21(DE3)pLysS/pET28a/Erns – 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 двойного ИХА-теста для экспресс-серодиагностики КЧС имеет аналитическую чувствительность ≈ 200 нг/мл (для антигена E2) и ≈ 290 нг/мл (для антигена Erns) и не обладает кросс-реактивностью к антителам к вирусу ВД КРС.

4.2 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.

4.3 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 ПТМ. 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».

5 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- а.о. – аминокислотные остатки
- АИ – алифатический индекс
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- В – вольт
- ВД КРС – вирусной диареи крупного рогатого скота
- ВОЗЖ – Всемирной организации охраны здоровья животных
- ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
- ДИ – доверительный интервал
- ДМСО – диметилсульфоксиде
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЗХВК – золотохлористоводородная кислота
- ИН – индекс нестабильности
- ИО - число истинно отрицательных результатов
- ИП – число истинно положительных результатов
- ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида
- ИФА – иммуноферментный анализ
- ИХА – иммунохроматографический анализ
- КББ – карбонатно-бикарбонатный буфер
- кДа – Килодальтон
- КОЕ/мл – количество колониеобразующих единиц в 1 миллилитре
- КЧС – классическая чума свиней
- ЛО – число ложноотрицательных результатов
- ЛП – число ложноположительных результатов
- ЛЭК – клетки легкого эмбриона коровы
- МЭБ – Международное эпизоотическое бюро
- НГУК – клетки невриномы Гассерова узла крысы
- НЦМ – нитроцеллюлозная мембрана

НчКЗ – наночастицы коллоидного золота

ОЕ – оптических единиц

ОП – оптическая плотность

ОТ-ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией

ОФД – о-Фенилендиамин

ПААГ – полиакриламидный гель

ПБА – патогенные биологические агенты

ПБО – пограничной болезни овец

ПД₅₀ – 50-процентная протективная доза

ПКЛ – производственных клеточных линий

ПНП – позитивно-негативного порога

ПТМ – посттрансляционные модификации

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

РИФ – реакция иммунофлюоресценции

РНК – рибонуклеиновая кислота

РРСС – репродуктивно-респираторный синдром свиней

СанПиН – санитарные правила и нормы

ТВ – тельца включения

ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида

ТЦД₅₀/см³ – титр инфекционной активности вируса (тканевая цитопатогенная доза)

УФ-свет – ультрафиолетовый свет

ФБР – фосфатно-буферный раствор

ФБР-Т – фосфатно-буферный раствор с Tween-20

ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

ФГБУ «ВГНКИ» – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»

ФГБУ «ВНИИЗЖ» – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных»

ФИТЦ – флуоресцеина изотиоцианат

ФС-буфер – фосфатно-солевой буфер

ФЦБ – фосфатно-цитратный буфер

CAI – Codon Adaptation Index

DIVA – Differentiating Infected and Vaccinated Animals

GRAVY – индекс гидроксипатичности

LB – Среда Лурия-Бертани

LD50 – средняя смертельная доза

MA – моноклональные антитела

MDBK – Madin Darby Bovine Kidney

Ni-NTA – никель-нитрилтриуксусная кислота

ORF – открытая рамка считывания

pI – теоретическая изоэлектрическая точка

PK-15 – клетки почки эмбриона свиньи

PMSF – фенилметилсульфанилфторид

POC – Point of care

ROC – Receiver Operating Characteristic

Se – относительная чувствительность

SOB – Super Optimal Broth

Sp – относительная специфичность

UTR – нетранслируемые области

6 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами / Л. В. Урываев, К. С. Ионова, А. В. Дедова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2012. – Т. 57, № 5. – С. 15-21.
2. Анализ проведения лабораторных исследований по ряду вирусных болезней свиней на территории России в 2011-2017 гг / А. А. Шевцов, О. Н. Петрова, С. Г. Ремыга [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2018. – № 1. – С. 42-48.
3. Атипичный пестивирус свиней (Pestivirus K) — новая проблема в промышленном свиноводстве (обзор) / А.М. Аноятбекова, А.Г. Южаков, М. Аноятбеков [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2023. – Т. 58. – № 2. – С. 260-273.
4. Ахунова А. Р. Конструирование усеченного полипептида E2 вируса классической чумы свиней для серологической диагностики / Ахунова А. Р. // Материалы Международной научно-практической конференции «Инновационные решения актуальных вопросов биологической, токсикологической и радиационной безопасности для АПК». – Казань, 2024. – С. 15-18.
5. Ахунова А. Р. Получение конъюгата на основе наночастиц коллоидного золота для обнаружения антител к вирусу классической чумы свиней в дифференцирующем проточном иммуноанализе / Ахунова А. Р. // Материалы Международной научно-практической конференции «Инновационные решения актуальных вопросов биологической, токсикологической и радиационной безопасности для АПК». – Казань, 2025. – С. 29-31.
6. Ахунова А. Р. Применение рекомбинантных антигенов вируса классической чумы свиней в дискриминирующих серологических тестах // Ветеринарный врач. – 2025. – № 5. – С. 58-64.
7. Ахунова А. Р. Разработка DIVA-совместимых подходов к серологической диагностике классической чумы свиней / Ахунова А. Р. // 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.

8. Вакцины и стратегия вакцинации против классической чумы свиней / Сергеев В.А., Орлянкин Б.Г., Алексеев К.П. [и др.] // Ветеринария. – 2018. – № 4. – С. 3-11.

9. Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов классической чумы свиней : утверждены приказом Минсельхоза России от 29.09.2020 г. N 580. – URL: <https://fsvps.gov.ru/files/prikaz-minselhoza-rossii-ot-29-09-2020-580-ob-u/>

10. Глотов, А. Г. Атипичные пестивирусы крупного рогатого скота (обзор) / А. Г. Глотов, Т. И. Глотова // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – № 4. – С. 399-408.

11. Дизайн антигенной композиции на основе фрагмента гликопротеина E2 вируса классической чумы свиней / А. Г. Галеева, К. В. Усольцев, Н. И. Хаммадов, Ш. М. Насыров // Ветеринарный врач. – 2024. – № 1. – С. 28-33.

12. Доронин, М. И. Молекулярно-биологические методы в системе контроля качества сырья при производстве культуральных инактивированных противоящурных и антирабических вакцин : специальность 1.5.10 : диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Доронин Максим Игоревич. – Владимир, 2022. – 378 с.

13. Доронин, М.И. Разработка тест-системы для определения концентрации рибонуклеопротеина вируса бешенства в сырье для вакцин с применением ИФА / М.И. Доронин // Национальная ассоциация ученых. – 2021. – № 72. – С. 6-10.

14. Зонирование как инструмент предупреждения и контроля болезней *Suidae* / Е. А. Краснова, Е. В. Корогодина, А. А. Глазунова [и др.] // Свиноводство. – 2023. – № 4. – С. 15-21.

15. 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. – №2. – С. 61-66.

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

17. Инфекционные и иммуногенные свойства вируса лихорадки долины Рифт в зависимости от уровня пассажей и условий хранения / Н.И. Закутский, В. И. Балышева, И. Ю. Хухорова, С. Г. Юрков // Вопросы вирусологии. – 2015. – № 2. – С. 41-43.

18. Картирование антигенных детерминант белка E2 вируса классической чумы свиней с помощью синтетических пептидов / Л. В. Костина, Е. А. Непоклонов, А. Д. Забережный [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2009. – № 3. – С. 26-30.

19. Классическая чума свиней: ретроспективный анализ эпизоотической ситуации в Российской Федерации (1996-2015 гг.) / А. С. Оганесян, А. А. Шевцов, М. А. Шибаяев [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 3(18). – С. 52-59.

20. Классическая чума свиней: ретроспективный анализ эпизоотической ситуации в Российской Федерации (2007-2021 гг.) и прогноз на 2022 г. / А. С. Оганесян, А. А. Шевцов, А. В. Щербаков [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2022. – № 11(3). – С. 229-238.

21. 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.

22. Колян, А. В. Моделирование иммунного ответа и анализ факторов эпизоотического процесса: специальность 03.01.06 : автореф. диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Колян Авет Володяевич. – Щелково, 2012. – 146 с.

23. Методические подходы к контролю качества терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированных заболеваний / А. Е. Кухаренко, Н. А. Гаврилова, И. В. Гравель [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2014. – № 4 (52). – С. 14-23.

24. Молекулярно-генетические методы контроля качества инактивированных вакцин на модели вируса Чикунгунья: подлинность штамма и полнота инактивации вируса / А. С. Оксанич, Т. Г. Самарцева, К. В. Каа [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2024. – № 3. – С. 279-293.

25. Никонова, А. А. Особенности распространения вирусной диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота на молочных комплексах и изучение противовирусной активности препаратов : специальность 06.02.02 : диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Никонова Анастасия Александровна. – Краснодар, 2018. – 116 с.

26. О контаминации клеточных культур вирусом диареи - болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (BVDV) / Л. В. Урываев, А. В. Дедова, Л. В. Дедова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153. – № 1. – С. 88-93.

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

28. Оценка иммуногенных свойств рекомбинантной субъединичной вакцины против классической чумы свиней / К. П. Алексеев, С. А. Раев, А. Г. Южаков [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2018. – Т. 16. – С. 293-305.

29. Патент № 2129443.1999 Российская Федерация, МПК А61К 39/187. Живая вакцина "КС" против классической чумы свиней и способ профилактики

классической чумы свиней : № 2129443.1999 : заявл. 15.07.1998. : опубл. 27.04.1999 / В. А. Сергеев, Е. А. Непоклонов, Т. И. Алипер, К. Н. Груздев, Бюл. № 24.

30. Получение растворимого интерферона гамма человека в системе экспрессии *Escherichia coli* при снижении температуры культивирования / Е. А. Волосникова, Т. И. Есина, Д. Н. Щербаков [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2023. – Т. 59. № 2. – С. 167-173.

31. 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.

32. 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. 29-33.

33. Проверка клеточных культур на контаминацию вирусом диареи крупного рогатого скота — необходимое условие производства биологических препаратов / С. В. Алексеенкова, Г. К. Юров, Т. В. Гальнбек [и др.] // Российский ветеринарный журнал. – 2013. – № 1. – С. 15-18.

34. Разработка и испытание образцов рекомбинантной субъединичной вакцины против классической чумы свиней / К. П. Алексеев, С. А. Раев, А. Г. Южаков [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – № 6. – С.1236-1246.

35. Разработка и применение тест-системы на основе непрямого жидкофазного блокирующего варианта ИФА для определения антигена вируса РРСС при технологическом контроле вакцинного сырья / Е. П. Баборенко, О. П. Бьядовская, Д. А. Бирюченков [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2020. – № 2. – С. 109-114.

36. Разработка иммуноферментного метода контроля качества вакцины на основе гибридного рекомбинантного белка *P. Aeruginosa* / А. В. Солдатенкова, А. М. Кудряшова, Н. Ф. Гаврилова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22, № 4. – С. 805-810.

37. Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований» от 14 ноября 2023 г. N 33. – URL: <https://www.ksma.ru/wp-content/uploads/2024/10/11.Rekomendaciya-Kollegii-Evrazijskoj-ekonomicheskoy-komissii-ot.pdf>

38. Рефолдинг и очистка рекомбинантного эктодомена рецептора эфрина A5 методом гель-фильтрации / Е. В. Бондарюк, С. Паавилайнен, О. К. Присяженко [и др.] // Труды белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2014. – Т. 9(1). – С. 129-134

39. Санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" : утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28 января 2021 года N 4. – URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/files/news/SP_infections_compressed.pdf.

40. Система внешнего и внутреннего контроля качества в иммуноферментном анализе: инф. материалы / Н. В. Залесских, И. Ф. Голубева, М. Н. Кокорева [и др.]. - Нижний Новгород, 2016. - 40 с.

41. Современное состояние генно-инженерных вакцин в свиноводстве / Р. С. Чернышев, А. Р. Шотин, А. С. Иголкин [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2025. – Т. 60. – № 2. – С. 245-270.

42. Сотников, Д. В. Определение специфических антител методом иммунохроматографии: количественные закономерности и практические приложения : специальность 03.01.04 : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Сотников Дмитрий Васильевич. – Москва, 2016. – 150 с.

43. 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.

44. Угрозы по трансграничным болезням животных для Российской Федерации на 2022-2026 годы (часть 1) / А.С. Оганесян, А.В. Мищенко, О.Н. Петрова [и др.] // Аграрный вестник Приморья. – 2022. – №1 (25). – С. 77-83.
45. Хайруллин, Р. Ф. Экспрессия рекомбинантных белков в *E.coli*: учеб. пособие / Р. Ф. Хайруллин, Р. Г. Киямова, А. А. Ризванов. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2018. – 142 с. – ISBN 978-5-00130-027-4
46. Храмцов, П. В. Стереоспецифические взаимодействия. Инструментальные и неинструментальные методы в иммуноаналитике : учебное пособие / П. В. Храмцов, М. Б. Раев, С. А. Заморина. – Пермь, 2020. – 105 с. – ISBN 978-5-7944-3590-0.
47. Шевцов, А. А. Классическая чума свиней: перспективы искоренения / А. А. Шевцов // Животноводство России. – 2021. – №10. – С. 27-30.
48. Экспрессия в *E. Coli* маркированного рекомбинантного гликопротеина E2 вируса классической чумы свиней / А. Г. Галеева, М. А. Ефимова, К. В. Усольцев, [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – 2024. – № 2. – С. 49-57.
49. Эпизоотическая ситуация по КЧС в Российской Федерации. – Текст : электронный // Россельхознадзор : [сайт]. – URL: <https://fsvps.gov.ru/ru/iac/rf/kchs> (дата обращения: 18.06.2025).
50. A Critical Review about Different Vaccines against Classical Swine Fever Virus and Their Repercussions in Endemic Regions / L. Coronado, C. L. Perera, L. Rios [et al.] // Vaccines (Basel). – 2021. – Vol. 9(2). – P. 154.
51. A multiplex RT-PCR assay for the rapid and differential diagnosis of classical swine fever and other pestivirus infections / H. Díaz de Arce, L. J Pérez, M. T Frías [et al.] // Vet Microbiol. – 2009. – Vol. 139(3-4). – P. 245-52.
52. A novel ViewRNA in situ hybridization method for the detection of the dynamic distribution of Classical Swine Fever Virus RNA in PK15 cells / Q. Zhang, L. Xu, Y. Zhang [et al.] // Virol J. – 2017. – Vol. 14(1). – P. 81.
53. A Review of Molecular Characterization of Classical Swine Fever Virus (CSFV) / H. Zhang, H.W. Cao, Z.J. Wu, Y.D. Cui // Israel Journal of Veterinary Medicine. – 2011. – Vol. 66 (3). – P. 89-95.

54. Achievements and challenges of classical swine fever eradication in Brazil / L. G. De Oliveira, I. R. H. Gatto, M. L. Mechler-Dreibi [et al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12 (11). – P. 1327.
55. Aebischer, A. Two newly developed E(rns)-based ELISAs allow the differentiation of Classical Swine Fever virus-infected from marker-vaccinated animals and the discrimination of pestivirus antibodies / A. Aebischer, M. Müller, M. A Hofmann. // *Vet Microbiol*. – 2013. – Vol. 161(3-4). – P. 274-85.
56. African swine fever virus infection in Classical swine fever subclinically infected wild boars / O. Cabezón, S. Muñoz-González, A. Colom-Cadena [et al.] // *BMC Vet Res*. – 2017. – Vol. 13., No. 1. – P. 227.
57. Alteration of a second putative fusion peptide of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus alters virus replication and virulence in swine / L. G. Holinka, E. Largo, D. P. Gladue [et al.] // *J. Virol*. – 2016. – Vol. 90. – P. 10299–10308.
58. An evolutionary divergent pestivirus lacking the Npro gene systemically infects a whale species / W. K Jo, C. van Elk, M. van de Bildt [et al.] // *Emerg Microbes Infect*. – 2019. – Vol. 8(1). – P. 1383-1392.
59. An Improved Immunochromatographic Strip Based on Plant-Derived E2 for Detection of Antibodies against Classical Swine Fever Virus / Q. Xu, Y. Sun, J. Yang [et al.] // *Microbiol Spectr*. – 2022. – Vol. 10(4). – P. e0105022.
60. An improved indirect ELISA for specific detection of antibodies against classical swine fever virus based on structurally designed E2 protein expressed in suspension mammalian cells / S. Ji, Y. Luo, T. Zhang [et al.] // *Arch Virol*. – 2018. – Vol. 163(7). – P. 1831-1839.
61. An Overview of Transboundary Animal Diseases of Viral Origin in South Asia: What Needs to Be Done? / G. Gongal, H. Rahman, K. C. Thakuri, K. Vijayalakshmy // *Vet Sci*. – 2022. – Vol. 9, No. 11. – P. 586.
62. Analysis of effective spatial range of oral vaccination against classical swine fever for wild boar / Y. Hayama, K. Sawai, Y. Murato [et al.] // *Prev Vet Med*. – 2023. – Vol. 221. – P. 106080.

63. Antigenic domains analysis of classical swine fever virus E2 glycoprotein by mutagenesis and conformation-dependent monoclonal antibodies / C.-Y. Chang, C.-C. Huang, Y.-J. Lin [et al.] // *Virus Res.* – 2010. – Vol. 149(2). – P. 183-189.
64. Antigenic mimicking with cysteine-based cyclized peptides reveals a previously unknown antigenic determinant on E2 glycoprotein of classical swine fever virus / C. Y. Chang, C. C. Huang, M. C. Deng [et al.] // *Virus Res.* – 2012. – Vol. 163(1). – P. 190-6.
65. Assessing UV Inactivation of Adenovirus 41 Using Integrated Cell Culture Real-Time qPCR/RT-qPCR / N. Ding, S. A. Craik, X. Pang [et al.] // *Water Environ Res.* – 2017. – Vol. 89(4). – P. 323-329.
66. Assessment of classical swine fever diagnostics and vaccine performance / S. Blome, A. Meindl-Böhmer, W. Loeffen [et al.] // *Rev. Sci. Tech.* – 2006. – Vol. 25. – P. 1025–1038.
67. Atypical Porcine Pestiviruses: Relationships and Conserved Structural Features / C. Riedel, H. Aitkenhead, K. El Omari, T. Rümenapf // *Viruses.* – 2021. – Vol 13(5). – P. 760.
68. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. Version 2020.0.1. Schaumburg, IL, USA: American Veterinary Medical Association, 2020. 121 p. ISBN 978-1-882691-54-8.
69. Birch, R. R. Hog Cholera Its Nature and Control. / R. R. Birch. – New York : The Macmillan Company, 1922. – P. 311.
70. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in pigs / J. Tao, J. Liao, Y. Wang [et al.] // *Veterinary Microbiology.* – 2013. – Vol. 165(3-4). – P. 185–189.
71. Bovine viral diarrhea virus: recent findings about its occurrence in pigs / L. G. de Oliveira, M. L. Mechler-Dreibi, H. M. S Almeida, I. R. H. Gatto // *Viruses.* 2020. – Vol. 12(6). – P. 600.
72. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-54.

73. Brier, C.E. Tending our vines: from the correspondence and writings of Richard Peters and John Jay / C.E. Brier // *Pennsylvania Hist. a J. mid-atlantic Stud.* – 2013. – Vol. 80. –P. 85-111.
74. Broad neutralization of CSFV with novel monoclonal antibodies in vivo / H. Xu, G. Han, Y. Lu [et al.] // *J Biol Macromol.* – 2021. – Vol. 173. – P. 513-523.
75. Brown, V. R. A Review of Classical Swine Fever Virus and Routes of Introduction into the United States and the Potential for Virus Establishment / V. R. Brown, S. N. Bevins // *Front Vet Sci.* – 2018. – Vol. 5. – P. 31.
76. Carrillo, C. Organisms of Concern but not Foodborne or Confirmed Foodborne: Classical Swine Fever Virus / C. Carrillo // *Encyclopedia of Food Safety.* – 2014. – Vol. 2. – P. 232–236.
77. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications / A. Bhatwa, W. Wang, Y. I. Hassan [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2021. – Vol. 9. – P. 630551.
78. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope / S. Vilcek, J. F. Ridpath, H. Van Campen [et al.] // *Virus Res.* – 2005. – Vol. 108(1-2). P.187-93.
79. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon / S. E. Behrens, C. W. Grassmann, H. J. Thiel [et al.] // *J Virol.* –1998. – Vol. 72(3). – P. 2364-72.
80. Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry / Z. Wang, Y. Nie, P. Wang [et al.] // *Virology.* – 2004. – Vol. 330(1). – P. 332-41.
81. Characterization of epitopes for neutralizing monoclonal antibodies to classical swine fever virus E2 and Erns using phage-displayed random peptide library / F. Zhang, M. Yu, E. Weiland [et al.] / *Arch Virol.* – 2006. – Vol. 151(1). – P. 37-54.
82. Characterization of the First Marine Pestivirus, *Phocoena Pestivirus* (PhoPeV) / L. Söder, D. Meyer, O. Isken [et al.] // *Viruses.* – 2025. – Vol. 17(1). – P. 107.

83. Classical swine fever (infection with classical swine fever virus). In: WOAHP. Terrestrial Animal Health Code. – 2022. – Chapter 3.9.2. – URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.09.02_CSF.pdf.
84. Classical swine fever in China: a minireview / Y. Luo, S. Li, Y. Sun, H. J. Qiu // *Vet. Microbiol.* – 2014. – Vol. 172 (1-2). – P. 1-6.
85. Classical swine fever in South Africa after 87 years' absence / T. Sandvik, H. Crooke, T. W. Drew [et al.] // *Veterinary Record.* – 2005. – Vol. 157(9). – P. 267–267.
86. Classical swine fever virus in South-Eastern Europe--retrospective analysis of the disease situation and molecular epidemiology / S. Blome, I. Grotha, V. Moennig, I. Greiser-Wilke // *Vet Microbiol.* – 2010. – Vol. 146(3-4). – P. 276-84.
87. Classical swine fever virus isolates from Cuba form a new subgenotype 1.4 / A. Postel, S. Schmeiser, C. L. Perera [et al.] // *Vet Microbiol.* – 2013. – Vol. 161(3-4). – P. 334-8.
88. Classical swine fever virus: the past, present and future / L. Ganges, H. R. Crooke, J.A. Bohórquez [et al.] // *Virus Res.* – 2020. – Vol. 289. – P. 198151.
89. Classical swine fever: the global situation / S. Edwards, A. Fukusho, P. C. Lefèvre [et al.] // *Vet Microbiol.* – 2000. – Vol. 73(2-3). – P. 103-19.
90. Classical Swine Fever-An Updated Review / S. Blome, C. Staubach, J. Henke [et al.] // *Viruses.* – 2017. – Vol. 9(4). – P. 86.
91. Claudia, Gabriel. Classical and African Swine Fever in Domestic Pigs and European Wild Boar: Optimization of Control Strategies and Laboratory Diagnosis : Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde / Claudia Gabriel; Ludwig-Maximilians-Universität München. – München, 2012. – P. 143.
92. Close relationship of ruminant pestiviruses and classical Swine Fever virus / A. Postel, S. Schmeiser, T. C. Oguzoglu [et al.] // *Emerg Infect Dis.* – 2015. – Vol 21(4). – P. 668-72.
93. Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses / T. Ouyang, X. Zhang, X. Liu, L. Ren // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11, No. 2. – P. 185.

94. Co-infection status of classical swine fever virus (CSFV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circoviruses (PCV2 and PCV3) in eight regions of China from 2016 to 2018 / N. Chen, Y. Huang, M. Ye [et al.] // *Infect. Genet. Evol.* – 2019. – Vol. 68. – P. 127–135.
95. Comparative Analysis of Tunisian Sheep-like Virus, Bungowannah Virus and Border Disease Virus Infection in the Porcine Host / D. Meyer, A. Postel, A. Wiedemann [et al.] // *Viruses.* – 2021. – Vol. 13(8). – P. 1539.
96. Comparison of PCR methods for detection of classical swine fever virus and other pestiviruses / K. Podgórska, K. Kamieniecka, T. Stadejek, Z. Pejsak // *Pol J Vet Sci.* – 2012. – Vol. 15, No. 4. – P. 615-20.
97. Comparison of two real-time RT-PCR assays for differentiation of C-strain vaccinated from classical swine fever infected pigs and wild boars / F. Widén, H. Everett, S. Blome [et al.] // *Research in Veterinary Science.* – 2014. – Vol. 97(2). – P. 455–457.
98. Comparison of type I and type II bovine viral diarrhoea virus infection in swine / P. H. Walz, J. C. Baker, T. P. Mullaney [et al.] // *Can J Vet Res.* – 1999. – Vol. 63(2). – P. 119-23.
99. Complete genome sequences of classical swine fever virus: Phylogenetic and evolutionary analyses / Y. Liu, A. N. Bahoussi, P.-H. Wang [et al.] // *Front Microbiol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 1021734.
100. Congenital infection of pigs with ruminant-type pestiviruses / D. J. Paton, S. H. Done // *J Comp Pathol.* – 1994. – Vol. 111(2). – P. 151–163.
101. Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhoea virus / Y. Li, J. Wang, R. Kanai, Y. Modis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – Vol. 110(17). – P. 6805-10.
102. Deciphering the emergence, genetic diversity and evolution of classical swine fever virus / L. Rios, L. Coronado, D. Naranjo-Feliciano [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7(1). – P. 17887.
103. Decrypting the Origin and Pathogenesis in Pregnant Ewes of a New Ovine Pestivirus Closely Related to Classical Swine Fever Virus / M. Wang, E. Sozzi, J. A. Bohórquez [et al.] // *Viruses.* – 2020. – Vol. 12(7). – P. 775.

104. Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum / M. Lin, F. Lin, M. Mallory, A. Clavijo // *J Virol.* – 2000. – Vol. 74(24). – P. 11619-25.
105. Detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus found contaminating commercial veterinary vaccines, cell lines, and fetal bovine serum lots originating in Mexico / N. Gómez-Romero, L. Velazquez-Salinas, J. F. Ridpath [et al.] // *Arch Virol.* – 2021. – Vol. 166(7). – P. 1999-2003.
106. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches / H. Xia, B. Vijayaraghavan, S. Belák, L. Liu // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6(12). – P. e28553.
107. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep / F. Thabti, C. Letellier, S. Hammami [et al.] // *Arch. Virol.* – 2004. – Vol. 150. – P. 215–229.
108. Detection of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 in aerosol by a real time RT-PCR assay / P. Hou, Y. Xu, H. Wang, H. He // *BMC Vet Res.* – 2020. – Vol. 16(1). – P. 114.
109. Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin / T. F. Pinheiro de Oliveira, A. A. Fonseca Jr, M. F. Camargos, A. M. de Oliveira [et al.] // *Biologicals.* – 2013. – Vol. 41(6). – P. 407-14.
110. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City / C. Firth, M. Bhat, M. A. Firth [et al.] // *mBio.* – 2014. – Vol. 5(5). – P. e01933-14.
111. Development and application of a high-sensitivity immunochromatographic test strip for detecting classical swine fever virus antibodies / Y. Bai, R. Jia, Q. Wei [et al.] // *Transbound Emerg Dis.* – 2022. – Vol. 69(4). – P. e788-e798.
112. Development of a competitive ELISA using a truncated E2 recombinant protein as antigen for detection of antibodies to classical swine fever virus / A. Clavijo, M. Lin, J. Riva [et al.] // *Res Vet Sci.* – 2001. – Vol. 70. – P. 1–7.

113. Development of a dual immunochromatographic test strip to detect E2 and Erns antibodies against classical swine fever / L. T. Huynh, E.-J. Sohn, Y. Park [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2024. – Vol. 15. – P. 1383976.
114. Development of a High-Throughput Serum Neutralization Test Using Recombinant Pestiviruses Possessing a Small Reporter Tag / M. Tetsuo, K. Matsuno, T. Tamura [et al.] // *Pathogens.* – 2020. – Vol. 9(3). – P. 188.
115. Development of a reverse transcription multiplex real-time PCR for the detection and genotyping of classical swine fever virus / Y.-L. Huang, V. F. Pang, C. H. Pan [et al.] // *J Virol Methods.* – 2009. – Vol. 160(1-2). – P. 111-8.
116. Development of an immunochromatographic strip for rapid detection of antibodies against classical swine fever virus / X. Li, L. Wang, X. Shi [et al.] // *J Virol Methods.* – 2012. – Vol. 180(1-2). – P. 32-7.
117. Different Types of Vaccines against Pestiviral Infections: "Barriers" for "Pestis" / M. Yuan, X. Yang, X. Zhang [et al.] // *Viruses.* – 2022. – Vol. 15, No. 1. – P. 2.
118. Discovery of Diverse Rodent and Bat Pestiviruses With Distinct Genomic and Phylogenetic Characteristics in Several Chinese Provinces / Z. Wu, B. Liu, J. Du [et al.] // *Front Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 2562.
119. E2 and Erns isotype-specific antibody responses in serum and oral fluid after infection with classical swine fever virus (CSFV) / L. N. Popescu, Y. Panyasing, L. Giménez-Lirola [et al.] // *Vet Microbiol.* – 2019. – Vol. 235. – P. 265-269.
129. Effect of specific amino acid substitutions in the putative fusion peptide of structural glycoprotein E2 on classical swine fever virus replication / I. J. Fernández-Sainz, E. Largo, D. P. Gladue [et al.] // *Virology.* – 2014. – Vol. 456–457. – P. 121–130.
121. Effects of glycosylation on antigenicity and immunogenicity of classical swine fever virus envelope proteins / B. K. Gavrillov, K. Rogers, I. J. Fernandez-Sainz [et al.] // *Virology.* – 2011. – Vol. 420(2). – P. 135-45.
122. Efficacy of a live attenuated vaccine in classical swine fever virus postnatally persistently infected pigs / S. Muñoz-González, M. Perez-Simó, M. Muñoz [et al.] // *Vet Res.* – 2015. – Vol. 46. – №1. – P. 78.

123. Emergence of a novel porcine pestivirus with potential for cross-species transmission in China, 2023 / L.-S. Deng, T. Xu, Z.-w. Xu [et al.] // *Vet Res.* – 2025. – Vol 56(1). – P. 32.
124. Enhanced expression of the Erns protein of classical swine fever virus in yeast and its application in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for antibody differentiation of infected from vaccinated animals / Y. Luo, L. Li, S. Austermann-Busch [et al.] // *J Virol Methods.* – 2015. – Vol. 222. – P. 22-7.
125. Entry of classical swine fever virus into PK-15 cells via a pH-, dynamin-, and cholesterol-dependent, clathrin-mediated endocytic pathway that requires Rab5 and Rab7 / B. J. Shi, C. C. Liu, J. Zhou [et al.] // *J. Virol.* – 2016. – Vol. 90. – P. 9194–9208.
126. Enzyme-linked immunosorbent assay using a virus type-specific peptide based on a subdomain of envelope protein Erns for serologic diagnosis of pestivirus infections in swine / J. P. Langedijk, W. G. Middel, R. H. Melen [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2001. – №. 39. – P. 906–912.
127. Epidemiological investigation and phylogenetic analysis of Classical Swine Fever virus in Yunnan province from 2015 to 2021 / J. Yao, L. Su, Q. Wang [et al.] // *J Vet Sci.* – 2022. – Vol. 23(4). – P. e57.
128. Epidemiology, diagnosis and control of classical swine fever: Recent developments and future challenges / A. Postel, S. Austermann-Busch, A. Petrov [et al.] // *Transbound Emerg Dis.* – 2018. – 65 (Suppl. 1) – P. 248-261.
129. Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by escherichia coli cell surface display of gene-derived random peptide libraries / A. Christmann, A. Wentzel, C. Meyer [et al.] // *J Immunol Methods.* – 2001. – Vol. 257(1-2). – P. 163–73.
130. Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of Classical swine fever virus / J.-J. Zhao, D. Cheng, N. Li [et al.] // *Vet Microbiol.* – 2008. – Vol. 126(1-3). – P. 1-10.
131. Evaluation of antibody and antigen cross-reaction in Kenyan dairy cattle naturally infected with two pestiviruses: Bovine viral diarrhea virus and classical swine

fever virus / D. Muasya, J. V. Leeuwen, G. Gitau [et al.] // *Veterinary World*. – 2022. – Vol. 15(5). – P. 1290-1296.

132. Evaluation of classical swine fever virus antibody detection assays with an emphasis on the differentiation of infected from vaccinated animals / S. Schroeder, T. von Rosen, S. Blome [et al.] // *Rev Sci Tech*. – 2012. – Vol. 31(3). – P. 997-1010.

133. Evaluation of surface glycoproteins of classical swine fever virus as immunogens and reagents for serological diagnosis of infections in pigs: a recombinant Newcastle disease virus approach / R. Kumar, V. Kumar, P. Kekungu [et al.] // *Arch Virol*. – 2019. – Vol. 164. – P. 3007-3017.

134. Evidence of bovine viral diarrhoea virus transmission by back pond water in experimentally infected piglets / K. A. Nascimento, L. Marina, Igor R.H. Gatto [et al.] // *Pesquisa Veterinária Brasileira*. – 2018. – Vol. 38(10). – P. 1896-1901.

135. Evolutionary dynamics of classical swine fever virus in South Korea: 1987-2017 / D.-J. An, S.-I. Lim, S. Choe [et al.] // *Vet Microbiol*. – 2018. – Vol. 225. – P. 79-88.

136. Fine Mapping of a C-Terminal Linear Epitope Highly Conserved among the Major Envelope Glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of Different Pestiviruses / M. Yu, L.-F. Wang, B. J. Shiell [et al.] // *Virology*. – 1996. – Vol. 222 (1). – P. 289-292.

137. First evidence of bovine viral diarrhoea virus infection in wild boars / M. N. Weber, E. H. M. Pino, C. K. Souza [et al.] // *Acta Sci. Vet*. – 2016. – Vol. 44. – P. 1–5.

138. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions / G. Frens // *Natural Physical Science*. – 1973. – № 241. – P. 20-22.

139. Genetic diversity and positive selection analysis of classical swine fever virus isolates in south China / H. Shen, J. Pei, J. Bai [et al.] // *Virus Genes*. – 2011. – Vol. 43(2). – P. 234-42.

140. Genetic diversity of subgenotype 2.1 isolates of classical swine fever virus / W. Gong, J. Wu, Z. Lu [et al.] // *Infect Genet Evol*. – 2016. – Vol. 41. – P. 218-226.

141. Genetic variability and distribution of Classical swine fever virus / M. Beer, K. V. Goller, C. Staubach, S. Blome // *Anim Health Res Rev.* – 2015. – Vol. 16(1). – P. 33-9.
142. Genome Sequence of a Classical Swine Fever Virus of Subgenotype 2.1, Isolated from a Pig in Japan in 2018 / T. Nishi, K. Kameyama, T. Kato, K. Fukai // *Microbiol Resour Announc.* – 2019. – Vol. 8. – P. e01362-18.
143. Giangaspero, M. Heterogeneity of Pestivirus Species in Asia / M. Giangaspero, S. Zhang, C. Apicella // *Advances in Microbiology.* – 2019. – Vol. 09(03). – P. 266-342.
144. Giraffe Strain of Pestivirus: Its Taxonomic Status Based on the 5'-Untranslated Region / R. Harasawa, M. Giangaspero, G. Ibata, D. J. Paton // *Microbiology and Immunology.* – 2000. – Vol. 4 (11). – P. 915–921.
145. Global Distribution and Genetic Heterogeneity of Border Disease Virus / C. Righi, S. Petrini, I. Pierini [et al.] // *Viruses.* – 2021. – Vol. 13(6). – P. 950.
146. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus expressed by baculovirus induces the protective immune responses in rabbits / H. Zhang, X. Li, G. Peng [et al.] // *Vaccine.* – 2014. – Vol. 32(49). – P. 6607-13.
147. Greiser-Wilke, I. Diagnostic methods for detection of Classical swine fever virus--status quo and new developments / I. Greiser-Wilke, S. Blome, V. Moennig // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25(30). – P. 5524-30.
148. High-resolution epitope mapping for monoclonal antibodies to the structural protein Erns of classical swine fever virus using peptide array and random peptide phage display approaches / M. Lin, H. McRae, H. Dan [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2010. – Vol. 91. – P. 2928–2940.
149. Identification of a Common Conformational Epitope on the Glycoprotein E2 of Classical Swine Fever Virus and Border Disease Virus / Y. L. Huang, D. Meyer, A. Postel [et al.] // *Viruses.* – 2021. – Vol. 13, No. 8. – P. 1655.
150. Identification of a conserved linear B-cell epitope at the N-terminus of the E2 glycoprotein of Classical swine fever virus by phage-displayed random peptide library / W.-P. Peng, Q. Hou, Z. H. Xia [et al.] // *Virus Res.* – 2008. – Vol. 135(2). – P. 267-72.

151. Identification of a novel virus in pigs--Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus / P. D. Kirkland, M. J. Frost, D. S. Finlaison [et al.] // *Virus Res.* – 2007. – Vol. 129(1). – P. 26-34.
152. Identification of a porcine pestivirus as a border disease virus from naturally infected pigs in Spain / R. Rosell, O. Cabezón, J. Pujols [et al.] // *Vet Rec.* – 2014. – Vol. 174(1). – P.18.
153. Identification of classical swine fever virus protein E2 as a target for cytotoxic T cells by using mRNA-transfected antigen-presenting cells / M. Ceppi, M. G. M. de Bruin, T. Seuberlich [et al.] // *Journal of General Virology.* – 2005. – Vol. 86(9). – P. 2525–2534.
154. Identification of E2 with improved secretion and immunogenicity against CSFV in piglets / H. Xu, Y. Wang, G. Han [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2020. – Vol. 20(1). – P. 26.
155. Identification of hog cholera viral isolates by use of monoclonal antibodies to pestiviruses / R. G. Hess, C. O. Z. Coulibaly, I. Greiser-Wilke [et al.] // *Veterinary Microbiology.* – 1988. – Vol. 16(4). – P. 315–321.
156. Identification of host cell binding peptide from an overlapping peptide library for inhibition of classical swine fever virus infection / X. Li, L. Wang, D. Zhao [et al.] // *Virus Genes.* – 2011. – Vol. 43(1). – P. 33-40.
157. Immunogenicity in Swine of Orally Administered Recombinant *Lactobacillus plantarum* Expressing Classical Swine Fever Virus E2 Protein in Conjunction with Thymosin α -1 as an Adjuvant / Y. G. Xu, X. T. Guan, Z. M. Liu [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2015. – Vol. 81(11). – P. 3745-3752.
158. Improved strategy for phylogenetic analysis of classical swine fever virus based on full-length E2 encoding sequences / A. Postel, S. Schmeiser, J. Bernau [et al.] // *Vet Res.* – 2012. – Vol. 43. – P. 50.
159. In the Search of Marine Pestiviruses: First Case of *Phocoena Pestivirus* in a Belt Sea Harbour Porpoise / I. Stokholm, N. Fischer, C. Baechlein [et al.] // *Viruses.* – 2022. – Vol. 14(1). – P. 161.

160. Isolation and Full-Length Sequence Analysis of a Pestivirus from Aborted Lamb Fetuses in Italy / E. Sozzi, A. Lavazza, A. Gaffuri [et al.] // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11(8). – P. 744.
161. Kirkland, P.D. Pestiviruses / P. D. Kirkland, M.-F. Le Potier, D. Finlaison // *Diseases of Swine*, Eleventh Edition. Hoboken, NJ, USA, 2019. P. 622–640.
162. Lackner, T. Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a cellular chaperone in proteolysis / T. Lackner, H. J. Thiel, N. Tautz // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2006. – Vol. 103(5). – P. 1510-5.
163. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – V. 227 (5259). – P. 680-685.
164. Lamothe-Reyes, Y. Host cell factors involved in classical swine fever virus entry / Y. Lamothe-Reyes, M. Figueroa, O. Sánchez // *Veterinary Research*. – 2023. – Vol. 54. – P. 15.
165. Lin, M. Antibody responses of pigs to defined Erns fragments after infection with classical swine fever virus / M. Lin, E. Trottier, J. Pasick // *Clin Diagn Lab Immunol*. – 2005. – №12. – P. 180–186.
166. Manassis, G. Point-of-Care Diagnostics for Farm Animal Diseases: From Biosensors to Integrated Lab-on-Chip Devices / G. Manassis, A. I. Gelasakis, I. Bossis // *Biosensors (Basel)*. – 2022. – Vol. 12(7). – P. 455.
167. Molecular Epidemiology of Classical Swine Fever in the Russian Federation / A. Vlasova, T. Grebennikova, A. Zaberezhny [et al.] // *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. – 2003. – Vol. 50, No. 8. – P. 363-367.
168. Molecular, biological, and antigenic characterization of a Border disease virus isolated from a pig during classical swine fever surveillance in Japan / M. Nagai, H. Aoki, Y. Sakoda [et al.] // *J Vet Diagn Invest*. – 2014. – Vol. 26(4). – P. 547-552.
169. Mollie K. Burton. Identification of cross-reactive epitope regions of bovine viral diarrhea virus and classical swine fever virus glycoproteins: submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree master of science / Mollie K. Burton. – Manhattan, Kansas, 2016. – P. 74.

170. Multiple linear B-cell epitopes of classical swine fever virus glycoprotein E2 expressed in *E. coli* as multiple epitope vaccine induces a protective immune response / B. Zhou, K. Liu, J.-C. Wei [et al.] // *Virology Journal*. – 2011. – Vol. 8. – P. 378.
171. Nakane, P. K. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation / P. K. Nakane, A. Kawaoi // *J Histochem Cytochem*. – 1974. – Vol. 22(12). – P.1084-91.
172. New insights into the antigenic structure of the glycoprotein Erns of classical swine fever virus by epitope mapping / D. Meyer, A. Aebischer, M. Müller [et al.] // *Virology*. – 2012. – Vol. 433(1). – P. 45-54.
173. Newly identified viral genomes in pangolins with fatal disease / W.-H. Gao, X.-D. Lin, Y.-M. Chen [et al.] // *Virus Evol*. – 2020. – Vol. 6(1). – P. veaa020.
174. Nonstructural proteins NS2–3 and NS4A of classical swine fever virus: essential features for infectious particle formation / H. R. Moulin, T. Seuberlich, O. Bauhofer [et al.] // *Virology*. – 2007. – Vol. 365 (2). – P. 376–389.
175. Novel Pestivirus Species in Pigs, Austria, 2015 / B. Lamp, L. Schwarz, S. Högler [et al.] // *Emerg Infect Dis*. – 2017. – Vol. 23(7). – P. 1176-1179.
176. Optimized expression of classical swine fever virus E2 protein via combined strategy in *Pichia pastoris* / D. Li, J. Wu, J. Chen [et al.] // *Protein Expression and Purification*. – 2020. – Vol. 167. – P. 105527.
177. Optimized protocol for double vaccine immunization against classical swine fever and porcine reproductive and respiratory syndrome / Z. Liu, B. Shan, C. Ni [et al.] // *BMC Vet Res*. – 2023. – Vol. 19(1). – P. 14. DOI: 10.1186/s12917-022-03559-z. Erratum in: *BMC Vet Res*. – 2023. – Vol. 19(1). – P. 38.
178. Origin and evolution of viruses causing classical swine fever in Cuba / H. D. de Arce, L. Ganges, M. Barrera [et al.] // *Virus Res*. – 2005. – Vol. 112(1-2). – P. 123-31.
179. Paton, D. J. Classical swine fever--an update / D. J. Paton, I. Greiser-Wilke // *Res Vet Sci*. – 2003. – Vol. 75(3). – P. 169-78.
180. Phylodynamics of classical swine fever virus with emphasis on Ecuadorian strains / A. D. Garrido Haro, M. Barrera Valle, A. Acosta, F. J Flores // *Transbound Emerg Dis*. – 2018. – Vol. 65(3). – P. 782-790.

181. Polymorphic genetic characterization of E2 gene of bovine viral diarrhea virus in China / Y. Lang, S. Gao, J. Du [et al.] // *Vet Microbiol.* – 2014. – Vol.174(3-4). – P. 554-559.
182. Postel, A. Classical swine fever in Europe--the current situation / A. Postel, V. Moennig, P. Becher // *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* – 2013. – Vol. 126(11-12). – P. 468-75.
183. Postel, A. Proposed Update to the Taxonomy of Pestiviruses: Eight Additional Species within the Genus Pestivirus, Family Flaviviridae / A. Postel, D. B. Smith, P. Becher // *Viruses.* – 2021. – Vol. 13, No. 8. – P. 1542.
184. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor / A. Postel, F. Hansmann, C. Baechlein [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 27735.
185. Prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus Infections in Pigs on Jeju Island, South Korea, from 2009-2019 and Experimental Infection of Pigs with BVDV Strains Isolated from Cattle / S. Choe, S.-I. Lim, G.-N. Park [et al.] // *Vet Sci.* – 2022. – Vol. 9, No. 3. – P. 146.
186. Rapid spread of classical swine fever virus among South Korean wild boars in areas near the border with North Korea / S. Choe, R. M. Cha, D. S. Yu [et al.] // *Pathogens.* – 2020. – Vol. 9 (4). – P. 244.
187. Recent Advances in the Diagnosis of Classical Swine Fever and Future Perspectives / L. Wang, R. Madera, Y. Li Ye [et al.] // *Pathogens.* – 2020. – Vol. 9(8). – P. 658.
188. Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts / D. M. He, K. X. Qian, G. F. Shen [et al.] // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2007. – Vol. 55(1). – P. 26-30.
189. Schindelin, J. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise [et al.] // *Nature Methods.* – 2012. – Vol. 9 (7). – P. 676–682.

190. Serological relationship between a novel ovine pestivirus and classical swine fever virus / C. Casciari, E. Sozzi, M. Bazzucchi [et al.] // *Transbound Emerg Dis.* – 2020. – Vol. 67(3). – P. 1406-1410.
191. Seroprevalence and risk factors for the presence of ruminant pestiviruses in the Dutch swine population / W. L. Loeffen, A. van Beuningen, S. Quak, A. R. Elbers // *Vet Microbiol.* – 2009. – Vol. 136(3-4). – P. 240-5.
192. Snyder, D. B. Rapid Serological Profiling by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. II. Comparison of Computational Methods for Measuring Antibody Titer in a Single Serum Dilution / D. B. Snyder, W. W. Marquardt, E. Russek // *Avian Diseases.* – 1983. – Vol. 27(2). – P. 474–484.
193. Spencer, K.A. Recombinant viral proteins for use in diagnostic ELISAs to detect virus infection / K. A. Spencer, F. A. Osorio, J. A. Hiscox // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25, No 30. – P. 5653-5659.
194. Structure of a pestivirus envelope glycoprotein E2 clarifies its role in cell entry / K. El Omari, O. Iourin, K. Harlos [et al.] // *Cell Rep.* – 2013. – Vol. 3(1). – P. 30-35.
195. Structures and Functions of Pestivirus Glycoproteins: Not Simply Surface Matters / Fun-In Wang, Ming-Chung Deng, Yu-Liang Huang, Chia-Yi Chang // *Viruses.* – 2015. – Vol. 7, No. 7. – P. 3506-3529.
196. Studier, F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures / F.W. Studier // *Protein Expression and Purification.* – 2005. – Vol. 41(1). – P. 207-234.
197. Studying classical swine fever virus: making the best of a bad virus / W. Ji, Z. Guo, N.-Z. Ding, C.-Q. He // *Virus Res.* – 2015. – Vol. 197. – P. 35-47.
198. Tautz, N. The Molecular Biology of Pestiviruses / N. Tautz, B. A. Tews, G. Meyers // *Adv Virus Res.* – 2015. – Vol. 93. – P. 47-160.
199. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research / N. Percie du Sert, V. Hurst, A. Ahluwalia [et al.] // *PLoS Biol.* – 2020. – Vol. 18(7). – P. e3000410.

200. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures / A. Vera, N. Gonzalez-Montalban, A. Aris, A. Villaverde // *Biotechnol Bioeng.* – 2007. – Vol. 96(6). – P. 1101-1106.
201. The double-antigen ELISA concept for early detection of Erns -specific classical swine fever virus antibodies and application as an accompanying test for differentiation of infected from marker vaccinated animals / D. Meyer, S. Fritsche, Y. Luo [et al.] // *Transbound Emerg Dis.* – 2017. – Vol. 64(6). – P. 2013-2022.
202. The Epitope Recognized by Monoclonal Antibody 2B6 in the B/C Domains of Classical Swine Fever Virus Glycoprotein E2 Affects Viral Binding to Hyperimmune Sera and Replication / C. Tong, N. Chen, X. Liao [et al.] // *J Microbiol Biotechnol.* – 2015. – Vol. 25(4). – P. 537-46.
203. The expression of classical swine fever virus structural protein E2 gene in tobacco chloroplasts for applying chloroplasts as bioreactors / H.-B. Shao, D.-M. He, K.-X. Qian [et al.] // *Comptes Rendus. Biologies.* – 2008. – Vol. 331(3). – P. 179-184.
204. The protective immune response induced by B cell epitope of classical swine fever virus glycoprotein E2 / S. Liu, C. Tu, C. Wang [et al.] // *J Virol Methods.* – 2006. – Vol. 134(1-2). – P. 125-129.
205. The recombinant Erns and truncated E2-based indirect enzyme-linked immunosorbent assays to distinguishably test specific antibodies against classical swine fever virus and bovine viral diarrhea virus / W. Yi, H. Zhu, Y. Wu [et al.] // *Virol J.* – 2022. – Vol. 19(1). – P. 121.
206. Titov, I. Genotyping of classical swine fever virus using high-resolution melt analysis / I. Titov, S. Tsybanov, A. Malogolovkin // *J Virol Methods.* – 2015. – Vol. 224. – P. 53-57.
207. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1979. – Vol. 76 (9). – P. 4350-4354.
208. Uitbraak van bovine virus diarrree op Nederlandse rundveebedrijven na vaccinatie met een met BVDV type 2 gecontamineerd BHV1 markervaccin / H. W.

Barkema, C. J. Bartels, L. van Wuijckhuise [et al.] // Tijdschr Diergeneeskd. – 2001. – Vol. 126(6). – P. 158-65.

209. Van Rijn, P. A. A common neutralizing epitope on envelope glycoprotein E2 of different pestiviruses: implications for improvement of vaccines and diagnostics for classical swine fever (CSF) / P. A. van Rijn // Vet Microbiol. – 2007. – Vol. 125(1-2). – P. 150-156.

210. Vargas, T. M. Situation of classical swine fever and the epidemiologic and ecologic aspects affecting its distribution in the American continent / Vargas Terán M., Calcagno Ferrat N., Lubroth J. // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2004. – Vol. 1026. – P. 54-64.

211. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces / Z. Wu, X. Ren, L. Yang [et al.] // J Virol. – 2012. – Vol. 86(20). – P. 10999-1012.

212. Wensvoort, G. Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine / G. Wensvoort, C. Terpstra // Res Vet Sci. – 1988. – Vol. 45(2). – P. 143-8.

213. Zhang, Y. Progress in the study of virus detection methods: The possibility of alternative methods to validate virus inactivation / Y. Zhang, S. Qu, L. Xu // Biotechnol Bioeng. – 2019. – Vol. 116(8). – P. 2095-2102.

7 СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Список таблиц

№	Наименование	Номер страницы
1	Классификация представителей рода <i>Pestivirus</i>	С. 15
2	Генетическое разнообразие субгенотипа 2.1 [140]	С. 24
3	Штаммы, плазмиды и клетки эукариот, использованные в работе	С. 36
4	Патологический материал, используемый в ходе работы	С. 38
5	Перечень использованных в работе последовательностей целевых возбудителей	С. 39
6	Питательные среды и условия культивирования штаммов-продуцентов [45]	С. 42
7	Условия проведения ПЦР для детекции различных локусов геномной ДНК	С. 44
8	Состав гелей для SDS-электрофореза (на 10 мл геля)	С. 46
9	Растворы для проведения SDS-электрофореза	С. 46
10	Условия хроматографического разделения	С. 48
11	Условия работы масс-спектрометра	С. 49
12	Схемы получения гипериммунных сывороток к антигенам вируса КЧС	С. 50
13	Буферные растворы и реактивы, применяемые для постановки ИФА	С. 51
14	Схемы постановки ИФА	С. 52
15	Мажорные эпитопы вируса классической чумы свиней (штамм «Ши-Мынь»)	С. 55
16	Карта аминокислотных последовательностей мажорных гликопротеинов вируса КЧС	С. 65
17	Физико-химические характеристики полипептида	С. 66
18	Эффективность различных условий экспрессии рекомбинантных антигенов	С. 71
19	Методики выделения белков из телец-включений	С. 73
20	Характеристики отдельных пептидов гликопротеинов вируса КЧС, идентифицированных в ходе масс-спектрометрического анализа	С. 77

№	Наименование	Номер страницы
21	Результаты контроля антигенной активности сырья вируса КЧС, используемого в производстве диагностических и профилактических	С. 84
22	Значения критериев и координат ROC-кривой при оценке операционных характеристик непрямого ИФА для производственного контроля вакцинного сырья	С. 87
23	Значения критериев и координат ROC-кривой при оценке операционных характеристик непрямого ИФА для определения антител к вирусу КЧС в сыворотке крови в зависимости от величины отсечки	С. 93
24	Результаты исследования сывороток свиней на наличие антител к Erns в непрямом ИФА	С. 95
25	Схемы постановки ИХА для обнаружения КЧС-специфических антител	С. 99

Список иллюстраций

№	Наименование	Номер страницы
1	Организация генома вируса КЧС [52]	С. 18
2	Жизненный цикл вируса КЧС [195]	С. 22
3	Электрофореграмма продуктов амплификации вариантов вируса ВД КРС – контаминантов различных пассажных линий РК-15	С. 58
4	Филодендрограмма, отображающая генетическую близость исследуемого контаминанта и известных прототипных штаммов BVVDV-1	С. 59
5	Коэффициент антигенного сходства усеченного пептида E2 КЧС к штаммам и изолятам ВД КРС 1a субгенотипа и КЧС	С. 61
6	Распределение частоты использования кодонов по длине последовательности гена E2	С. 63
7	Оптимизация GC-состава нуклеотидной последовательности гена E2	С. 63
8	Распределение частоты использования кодонов по длине последовательности гена Erns	С. 64
9	Оптимизация GC-состава нуклеотидной последовательности гена Erns	С. 64
10	Структуры полипептидов E2 и Erns вируса КЧС	С. 65
11	Описание векторов гликопротеинов E2 и Erns вируса КЧС	С. 67
12	Электрофореграмма клеточных лизатов штаммов – продуцентов E2 и Erns вируса КЧС	С. 68
13	Количественные характеристики культивирования штаммов – продуцентов рекомбинантных гликопротеинов вируса КЧС	С. 70
14	Оценка эффективности рефолдинга rE2	С. 74
15	Оценка специфичности рекомбинантных белков E2 и Erns	С. 75
16	Схемы покрытия аминокислотных последовательностей гликопротеинов E2 (А) и Erns (Б) по результатам обработки данных, полученных в ходе ВЭЖХ-МС/МС анализа гидролизатов белка	С. 79
17	Антигенная активность очищенных рекомбинантных белков в отношении контрольных сывороток свиней	С. 80
18	Определение аналитической чувствительности ИФА	С. 83
19	Точечная диаграмма результатов исследования антигенов вируса КЧС и гетерологичных антигенов в ИФА-тесте	С. 86

№	Наименование	Номер страницы
20	ROC-кривая выявления рекомбинантного антигена E2 методом ИФА	С. 87
21	Оптимизация условий постановки ИФА	С. 89
22	Определение аналитической чувствительности ИФА	С. 91
23	Точечная диаграмма результатов исследования сывороток свиней в ИФА-тесте	С. 92
24	ROC-кривая выявления антител к вирусу КЧС методом ИФА	С. 93
25	(А) Фрагмент изображения НчКЗ на электронной микрофотографии; (Б) Гистограмма распределения частиц по размерам	С. 98
26	Первичная оценка диагностической эффективности конъюгата в обратной схеме ИХА	С. 101

8 ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А



Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

Департамент ветеринарии

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11
тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vnivi@tncpko.ru ИНН – 1660022161, КПП –
166001001

Паспорт штамма

Наименование подразделения: Лаборатория вирусных антропоонозов отделения вирусологических и ультраструктурных исследований ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»	
1. Наименование штамма (род, вид) в латинской транскрипции, его инвентарный номер	<i>E. Coli</i> BL21(DE3)pLysS/pET28a/E2
1.1. Подвид, тип, субтип, генотип, серотип	F-, ompT, hsdSB (rB-, mB-), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cmr.
2. Особое обозначение штамма, присвоенное коллекцией	
3. Где, кем, когда и от животного какого вида получен данный штамм	Получен в лаборатории вирусных антропоонозов в.н.с. Галеевой А.Г., м.н.с. Ахуновой А.Р. в апреле 2024 года химической трансформацией компетентных клеток <i>Escherichia Coli</i>
4. Из какого учреждения получен штамм, дата его получения	«Novagen», 2024 (штамм-реципиент)
5. Назначение штамма в данное время (производственный, вакцинный, референтный, эталонный, эпизоотический или музейный)	Производственный
6. Характеристика штамма:	
6.1. Морфология клеток	Грамотрицательные слабоподвижные тонкие палочки с закругленными концами 1,5 - 2 мкм в длину
6.2. Культуральные свойства	На плотных средах образуют колонии в R- и S-формах. Колонии в S-формах гладкие, блестящие, полупрозрачные. На жидких средах образуют диффузное помутнение и придонный осадок.
6.3. Биохимическая активность	Хорошо усваивает глюкозу, сахарозу, лактозу, фруктозу, маннозу, ксилозу, маннит и сорбит с образованием кислоты и газа
6.4. Молекулярно-генетические характеристики штамма	
6.4.1. Данные о плазмидном составе	Бактериальный вектор pET-28a(+) содержит фрагмент гена <i>E2</i>
6.4.2. Другие имеющиеся данные	Вектор содержит 6xHis-тег
6.4.3. Ферментативные свойства	Вырабатывает индол, сероводород не образует

6.5. Серологические свойства	Экспрессируемый продукт активен в ИФА со специфическими антисыворотками
6.6. Чувствительность к противобактериальным (антибиотикам)	Устойчив к хлорамфениколу и канамицину при концентрациях в 34 мкг/мл и 50 мкг/мл
6.7. Другие свойства	
7. Способ хранения штамма, t °С, питательная среда	Хранение при плюс 4 °С в жидкой среде LB, в 20–25 % глицерине, в лиофилизированном виде при температуре минус 80 °С до одного года
8. Периодичность пересевов штамма на питательные среды (для нативных и лиофилизированных)	Лиофилизированные – ежегодно
9. Патогенность для восприимчивых животных	Непатогенен
10. Вирулентность	Авирулентен
11. Токсинообразование и тип основного токсина	Эндотоксин
12. Периодичность пассирования через организм восприимчивых животных, дата последнего пассажа	–
14. В каком виде выдается штамм (в лиофилизированном, на плотной, жидкой, полужидкой среде, в 30% глицерине), количество пробирок, ампул	В лиофилизированном виде, 5 (пять) ампул объемом по 1 см ³
15. Дополнительные сведения о штамме	Аминокислотная последовательность фрагмента гена E2: RLACKEDYRYAISSTNEIGLLGAEGLT TKEYSHDLHLDDGTVKAVCTAGSFKVTA LNVVSRRYLASLHKRALPTSVTFELFDG TNPVIEEMDDDFGFGLCPFDTSPVIKGYN TLLNGSAFYLVCPIGWTGVVECTAVSPT TLRTEVVKTFRRDK

12 апреля 2025г.

и.о. зав. лабораторией вирусных
антропоозоонозов, старший научный сотрудник,
канд. вет. наук

(подпись)

Арсланова А.Ф.



Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
 Департамент ветеринарии
 Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ
 И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ (ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ»)**

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11
 тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vnivi@mail.ru ИНН – 1660022161, КПП –
 166001001

«10» 06 2025г.

№ 154/133

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Государственная коллекция штаммов – возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ» осуществила депонирование штамма по форме «Хранение»

Депозитор: ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

Название штамма: Escherichia coli BL21(DE3)pLysS/pET28a/E2

Таксономия, описание штамма: Enterobacteriaceae / Escherichia / E. coli
семейство/ род/ вид

Штамм получен: лаборатория вирусных антропоознозов, 04.2024 г., в.н.с. Галеевой А.Г., м.н.с. Ахуновой А.Р, химической трансформацией компетентных клеток E. coli
где, когда, кем, источник выделения

Дата депонирования: 10.06.2025 г.

Орган по депонированию: ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ»

Назначение штамма: производственный

Регистрационный номер: № 154

Штамм принят «22» апреля 2025 г. в Государственную коллекцию штаммов – возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве, в лиофилизированном виде в количестве 5 (пять) ампул по 1 см³ с приложением паспорта.

Срок депонирования штамма Escherichia coli BL21(DE3)pLysS/pET28a/E2: 5 (пять) лет.

Директор ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ»

Мингалеев Д.Н.
 Ф.И.О.

И.о. начальника отдела – Государственная
 коллекция микроорганизмов

Артемьева Е.А.
 Ф.И.О.





Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Департамент ветеринарии
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11
 тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vnivi@tnpko.ru ИНН – 1660022161, КПП –
 166001001

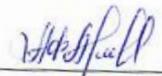
Паспорт штамма

Наименование подразделения: Лаборатория вирусных антропоонозов отделения вирусологических и ультраструктурных исследований ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»	
1. Наименование штамма (род, вид) в латинской транскрипции, его инвентарный номер	<i>E. Coli</i> BL21(DE3)pLysS/pET28a/Erns
1.1. Подвид, тип, субтип, генотип, серотип	F-, ompT, hsdSB (rB-, mB-), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cmr.
2. Особое обозначение штамма, присвоенное коллекцией	
3. Где, кем, когда и от животного какого вида получен данный штамм	Получен в лаборатории вирусных антропоонозов в.н.с. Галеевой А.Г., м.н.с. Ахуновой А.Р. в апреле 2024 года химической трансформацией компетентных клеток <i>Escherichia Coli</i>
4. Из какого учреждения получен штамм, дата его получения	«Novagen», 2024 (штамм-реципиент)
5. Назначение штамма в данное время (производственный, вакцинный, референтный, эталонный, эпизоотический или музейный)	Производственный
6. Характеристика штамма:	
6.1. Морфология клеток	Грамотрицательные слабоподвижные тонкие палочки с закругленными концами 1,5 - 2 мкм в длину
6.2. Культуральные свойства	На плотных средах образуют колонии в R- и S-формах. Колонии в S-формах гладкие, блестящие, полупрозрачные. На жидких средах образуют диффузное помутнение и придонный осадок
6.3. Биохимическая активность	Хорошо усваивает глюкозу, сахарозу, лактозу, фруктозу, маннозу, ксилозу, маннит и сорбит с образованием кислоты и газа
6.4. Молекулярно-генетические характеристики штамма	
6.4.1. Данные о плазмидном составе	Бактериальный вектор pET-28a(+) содержит фрагмент гена <i>Erns</i>
6.4.2. Другие имеющиеся данные	Вектор содержит 6xHis-тег
6.4.3. Ферментативные свойства	Вырабатывает индол, сероводород не образует

6.5. Серологические свойства	Экспрессируемый продукт активен в ИФА со специфическими антисыворотками
6.6. Чувствительность к противобактериальным (антибиотикам)	Устойчив к хлорамфениколу и канамицину при концентрациях в 34 мкг/мл и 50 мкг/мл
6.7. Другие свойства	
7. Способ хранения штамма, t °С, питательная среда	Хранение при плюс 4 °С в жидкой среде LB, в 20–25 % глицерине и в лиофилизированном виде при температуре минус 80 °С до одного года
8. Периодичность пересевов штамма на питательные среды (для нативных и лиофилизированных)	Лиофилизированные – ежегодно
9. Патогенность для восприимчивых животных	Непатогенен
10. Вирулентность	Авирулентен
11. Токсинообразование и тип основного токсина	Эндотоксин
12. Периодичность пассирования через организм восприимчивых животных, дата последнего пассажа	–
14. В каком виде выдается штамм (в лиофилизированном, на плотной, жидкой, полужидкой среде, в 30% глицерине), количество пробирок, ампул	В лиофилизированном виде, 5 (пять) ампул объемом по 1 см ³
15. Дополнительные сведения о штамме	Аминокислотная последовательность фрагмента гена <i>Erns</i> : MENITQWNLSDNLTSGIQQVMYLRGVNRS LHGIWPEKICKGVPTHLATDTLTELTEIRGMM DASERTNYTCCRLQRHEWKNHGWCNWYN IDPWIQLMNRTQANL TEGPPDKE

"22" апреля 2025 г.

и.о. зав. лабораторией вирусных
антропоознозов, старший научный сотрудник,
канд. вет. наук


(подпись)

Арсланова А.Ф.



Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
 Департамент ветеринарии
 Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ
 И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ (ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ»)**

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11
 тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vnivi@mail.ru ИНН – 1660022161, КПП –
 166001001

«10» 06 2025г.

№ 156/135

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Государственная коллекция штаммов – возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ» осуществила депонирование штамма по форме «Хранение»

Депозитор: ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

Название штамма: Escherichia coli BL21(DE3)pLysS/pET28a/Erns

Таксономия, описание штамма: Enterobacteriaceae / Escherichia / E. coli
семейство/ род/ вид

Штамм получен: лаборатория вирусных антропоозонозов, 04. 2024 г., в.н.с. Галеевой А.Г., м.н.с. Ахуновой А.Р. химической трансформацией компетентных клеток E. coli
где, когда, кем, источник выделения

Дата депонирования: 10.06.2025 г.

Орган по депонированию: ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ»

Назначение штамма: производственный

Регистрационный номер: № 156

Штамм принят «22» апреля 2025г. в Государственную коллекцию штаммов – возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве, в лиофилизированном виде в количестве 5 (пять) ампул по 1 см³ с приложением паспорта.

Срок депонирования штамма Escherichia coli BL21(DE3)pLysS/pET28a/Erns: 5 (пять) лет.

Директор ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ»



Мингалеев Д.Н.
 Ф.И.О.

И.о.начальника отдела – Государственная
 коллекция микроорганизмов

Артемьева Е.А.
 Ф.И.О.

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Департамент ветеринарии
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической
безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

ОКПД 21.10.60.196

ОКС 11.100.10



УТВЕРЖДАЮ
Директор
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»
Д.Н. Мингалеев
15 июля 2025 г.

**НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ КЛАССИЧЕСКОЙ
ЧУМЫ СВИНЕЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ МЕТОДОМ «КЧС-ИФА»**

Технические условия

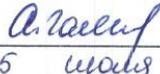
ТУ 21.10.60-009-00492374-2025

(Введены впервые)

Дата введения в действие – 2025. ~~07~~-15

РАЗРАБОТЧИКИ:

Вед. науч. сотр. лаборатории
вирусных антропозоонозов,
кандидат ветеринарных наук


15 июля 2025 г. А.Г. Галеева

Казань 2025

Продолжение на следующем листе

Продолжение титульного листа

Младший научный сотрудник ФГБНУ
«ФЦТРБ-ВНИВИ»

А. Р. Ахунова А.Р. Ахунова
15 июля 2025 г.

Младший научный сотрудник ФГБНУ
«ФЦТРБ-ВНИВИ»

Ю. А. Кузнецова Ю.А. Кузнецова
15 июля 2025 г.

Младший научный сотрудник ФГБНУ
«ФЦТРБ-ВНИВИ»

З. З. Алеева З.З. Алеева
15 июля 2025 г.

Старший научный сотрудник ФГБНУ
«ФЦТРБ-ВНИВИ»

Риш.С. Мухаммадиев Риш.С. Мухаммадиев
15 июля 2025 г.

Нормоконтроль:

Специалист по стандартизации
ОКСНОД

Р.Р. Хуснутдинова Р.Р. Хуснутдинова
15 июля 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор
ФГБНУ «ФНПРБ-ВНИВИ»
Д.Н. Мингалеев
15 июля 2025 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по использованию «Набора для определения антител к вирусу классической чумы свиней иммуноферментным методом «КЧС-ИФА» ветеринарного назначения

1. Торговое наименование: Набор для определения антител к вирусу классической чумы свиней иммуноферментным методом «КЧС-ИФА» (далее – набор).

2. Регистрационный номер тест-системы:

3. В состав набора входят:

- планшеты для ИФА с адсорбированным в лунках рекомбинантным антигеном E2 вируса КЧС;
- положительный контроль (ПК);
- отрицательный контроль (ОК);
- антитела к иммуноглобулину G (IgG) свиньи, меченные пероксидазой хрена(конъюгат);
- 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буфера с Твином 20 для промывки для планшетов (ФСБТ);
- хромоген-субстратный раствор (ТМБ);
- стоп-раствор (0,1 М раствор серной кислоты).

4. Набор предназначен для выявления антител к классической чуме свиней (КЧС) в сыворотке крови иммуноферментным методом с целью диагностики классической чумы свиней у невакцинированных животных и оценки напряженности иммунитета после вакцинации.

По своему функциональному назначению набор является диагностикумом, служащим для выявления антител к вирусу КЧС.

Тип анализируемого образца: сыворотка крови свиней.

Набор рассчитан на проведение на двух планшетах одновременного анализа 92 исследуемых (в 2 повторях) и двух контрольных сывороток (в 4 повторях). Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения нескольких серий анализов по мере поступления биоматериала.

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Департамент ветеринарии
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»
(ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

ОКПД 2 21.10.60.196

ОКС 11.100.10

УТВЕРЖДАЮ
Врио директора
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

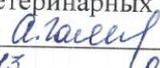
Д.Н. Мингалеев
13.08 2024 г.

**ТЕСТ-СИСТЕМА «КЧС ИХА»**

Технические условия
ТУ 21.10.60-009-00492374-2024
(Введены впервые)

Дата введения в действие – 2024- 08 - 15

РАЗРАБОТЧИКИ:

Зав. лабораторией вирусных
антропозоонозов ФГБНУ
«ФЦТРБ-ВНИВИ», ведущий
научный сотрудник, кандидат
ветеринарных наук

13.08 2024 г. А.Г. Галеева

Казань

2024

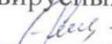
Продолжение на следующем листе

Продолжение титульного листа
ТУ 21.10.60-009-00492374-2024

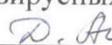
Мл. науч. сотр. лаборатории
вирусных антропозоонозов

 А.Р. Ахунова
13 08 2024 г.

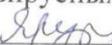
Мл. науч. сотр. лаборатории
вирусных антропозоонозов

 Г.С. Арутюнян
13 08 2024 г.

Мл. науч. сотр. лаборатории
вирусных антропозоонозов

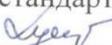
 З.З. Алеева
13 08 2024 г.

Мл. науч. сотр. лаборатории
вирусных антропозоонозов

 Г.М. Яруллина
13 08 2024 г.

Нормоконтроль:

Специалист по
стандартизации ОКСНОД

 Р.Р. Хуснутдинова
13 08 2024 г.



по использованию диагностического средства ветеринарного назначения

1. Торговое наименование: тест-система «КЧС ИХА» (далее – тест-система).
2. Регистрационный номер тест-системы:
3. Тест-система основана на иммунохроматографическом анализе (ИХА), состоит из тест-кассеты и разбавителя.
4. Тест-система предназначена для проведения дифференциальной серодиагностики классической чумы свиней (КЧС) и оценки напряженности поствакцинального иммунитета в кратчайшие сроки (от 3 до 5 мин) в сыворотке крови свиней. Каждая тест-система предназначена для качественных определений и рассчитана на проведение пяти анализов.
5. К работе с тест-системой допускаются ветеринарные специалисты различного уровня, сотрудники диагностических лабораторий и научные работники.
6. Для работы с тест-системой необходимо следующее оборудование (либо аналогичное) и материалы:
 - дозаторы переменного объема до 0,2 см³ и до 1 см³ по ГОСТ 28311-2021;
 - одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 0,2 см³ и до 1 см³;
 - штативы для дозаторов переменного объема;
 - штативы под наконечники для дозаторов переменного объема до 0,2 см³ и до 1 см³;
 - холодильник (поддерживаемая температура среднетемпературной теплоизолированной камеры должна составлять от 2 °С до 8 °С);
 - ножницы канцелярские;
 - таймер.
7. Метод определения антител к вирусу КЧС в сыворотке крови свиней при помощи иммунохроматографического анализа основан на специфическом взаимодействии антител с антигенами E2 и Erns вируса КЧС, иммобилизованными на поверхности тест-полоски. ИХА-тест представляет собой пластиковую тест-кассету с нитроцеллюлозной мембраной,