

3. Щербаков А.В., Перевозчикова Н.А., Дрыгин В.В. Методические указания по индикации генома и штаммовой дифференциации вируса ящура методом полимеразной цепной реакции и секвенированием гена VP1 // Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных методом полимеразной цепной реакции. — Владимир, 1998. — С. 31–41.

4. Щербаков А.В., Тимина А.М. Филогенетический анализ изолятов вируса ящура, вызвавших вспышки болезни в России и Монголии в 2010 г. // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2011. — Т. 9. — С. 5–11.

5. Щербаков А.В., Тимина А.М., Зиняков Н.Г. Филогенетический анализ изолятов вируса ящура, вызвавших вспышки болезни в России в 2013 году // Ветеринария. — 2014. — № 7. — С. 22–25.

6. Эпизоотическая ситуация по ящуру типа Азия-1 в России в 2005 году и анализ эффективности мер борьбы / К.Н. Груздев, Т.З. Байбиков, В.Н. Герасимов [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2006. — Т. 4. — С. 3–19.

7. Application of RT-PCR and nucleotide sequencing in foot-and-mouth disease diagnosis / A. Sherbakov, N. Lomakina, V. Drygin, A. Gusev // The Veterinary Quarterly. — 1998. — Vol. 20, № 2. — P. 32–34.

8. Beard C.W., Mason P.W. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus // J. Virol. — 2000 — Vol. 74, № 2. — P. 987–991.

9. Beck E., Strohmaier K. Subtyping of european foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination // J. Virol. — 1987. — Vol. 61. — P. 1621–1629.

10. Comparative sequence analysis of representative foot-and-mouth disease virus genomes from Southeast Asia / N.F. Abdul-Hamid, M. Firat-Saraç,

A.D. Radford [et al.] // Virus Genes. — 2011. — Vol. 43, № 1. — P. 41–45.

11. Emergence of a pandemic strain of foot-and-mouth disease virus serotype O / N.J. Knowles, A.R. Samuel, P.R. Davies [et al.] // European Commission for the control of FMD. Session of the Research Group of the Standing Technical Committee Borovets, Bulgaria, 5–8 September, 2000. — P. 20–31.

12. Genetic basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease serotype A viruses from the Middle East / S. Upadhyaya, G. Ayelet, G. Paul [et al.] // Vaccine. — 2014. — Vol. 32, № 5. — P. 631–638.

13. Knowles N.J., Samuel A.R. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus // Virus Res. — 2003. — Vol. 91, № 1. — P. 65–80.

14. Preliminary molecular analysis of FMD virus isolates collected on territories of Russia and the CIS in 1993–1994 / V.V. Drygin, A.V. Scherbakov, N.A. Perevozchikova, A.A. Gusev // Europ. Commis. FMD. Vienna. Austria, 19–22 September 1994. — Rome, 1994. — P. 8.

15. Recent spread of a new strain (A-Iran-05) of foot-and-mouth disease virus type A in the Middle East / N.J. Knowles, M.H. Nazem Shirazi, J. Wadsworth [et al.] // Transbound Emerg Dis. — 2009. — Vol. 56, № 5. — P. 157–169.

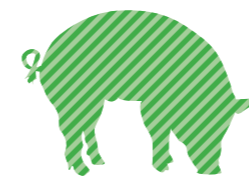
16. Recent spread of FMD virus serotype Asia 1 / J.F. Valarcher, N.J. Knowles, N.P. Ferris [et al.] // Vet. Record. — 2005. — July 2. — P. 30.

17. Samuel A.R., Knowles N.J. / Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes) // J. Gen. Virol. — 2001. — Vol. 82, № 3. — P. 609–621.

18. <http://www.foot-and-mouth.org>.

19. [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation).

20. [http://www.wrlfmd.org/fmd\\_genotyping](http://www.wrlfmd.org/fmd_genotyping).



## БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ SWINE DISEASE

УДК 619:616.98:578.842.1:616-078

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ p30, pK205R И pB602L В СЕРОДИАГНОСТИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

М.Р. Якупов<sup>1</sup>, А.С. Яковлева<sup>2</sup>, А.В. Щербаков<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ведущий ветеринарный врач, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mapat.89@mail.ru

<sup>2</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: yakovleva\_as@arriah.ru

<sup>3</sup> заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

### РЕЗЮМЕ

Экспрессией в *E. coli* получены рекомбинантные белки p30, pK205R и pB602L вируса африканской чумы свиней. На основе рекомбинантных антигенов разработан непрямой вариант иммуноферментного анализа для обнаружения антител к вирусу африканской чумы свиней. Диагностическая специфичность тест-систем pK205R- и pB602L-ИФА составляла 99,8%, p30-ИФА — 99,5%. На референтной панели положительных сывороток диагностическая чувствительность составляла 100% для p30-ИФА и pK205R-ИФА и 94,12% — для pB602L-ИФА. При исследовании сывороток от экспериментально и естественно инфицированных животных p30-ИФА и pK205R-ИФА превосходили по чувствительности коммерческие тест-системы и были сравнимы с иммуноферментным анализом, который Всемирная организация здравоохранения животных рекомендует для серодиагностики африканской чумы свиней. Международные слепительные испытания по диагностике африканской чумы свиней подтвердили высокую специфичность и чувствительность тест-систем p30-ИФА и pK205R-ИФА.

Ключевые слова: африканская чума свиней, иммуноферментный анализ, рекомбинантные белки, антитела.

### ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) — вирусная болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, цианозом кожи и обширными геморрагиями во внутренних органах. Для АЧС характерно многообразие форм течения болезни: от сверхострой и острой со 100% летальностью до хронической.

АЧС эндемична в Африке, Сардинии (Италия), а с 2007 г. в Закавказье и России. Экономический ущерб, наносимый АЧС, складывается из прямых потерь по радикальной ликвидации болезни, ограничений в международной торговле и измеряется сотнями миллионов долларов.

Возбудитель АЧС — крупный оболочечный вирус семейства *Asfarviridae*, рода *Asfivirus*. Геном вируса АЧС, представленный двухцепочечной ДНК длиной 170–192 тысячи пар нуклеотидов, кодирует до 150 белков, из них не менее 28 являются структурными [1].

В связи с тем, что эффективные и безопасные вакцины против АЧС не разработаны, борьба с болезнью ведется путем ее диагностики и ликвидации очагов заболевания.

Лабораторная диагностика АЧС основана на выявлении возбудителя болезни или антител к нему в крови и органах инфицированных животных. Методы прямого обнаружения вируса (выделение на культуре клеток, РПИФ, ПЦР) являются приоритетными для диагностики сверхострых и острых форм АЧС. Серологические методы предпочтительны для диагностики подострых и хронических форм болезни, обнаружение антител к вирусу АЧС является основным способом выявления животных, инфицированных низковирулентными штаммами [3].

В качестве основного метода серологической диагностики АЧС Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ) рекомендует иммуноферментный анализ (ИФА), где в качестве антигена используются частично очищенные препараты белков вируса АЧС, выращенного в культуре клеток MS (далее МЭБ-ИФА) [6]. Получение такого антигена трудно стандартизировать, и оно связано с биологическими рисками. Кроме того, при высокой чувствительности МЭБ-ИФА его специфичность относительно невысока [4]. В связи с этим активно ведутся исследования по получению и использованию в серодиагностике АЧС рекомбинантных антигенов, которые биологически безопасны,

более технологичны в приготовлении и обеспечивают более высокую специфичность ИФА. К настоящему времени описано применение в серодиагностике АЧС нескольких рекомбинантных белков: р54 [7, 8], р30 [9, 12], рр62 [5], р10, р72, рА104R, рС44L, рСР312R [13], рК205R и рВ602L [10].

Цель данной работы состояла в том, чтобы экспрессией в *E. coli* получить рекомбинантные белки р30, рК205R и рВ602L, разработать на их основе непрямой вариант ИФА и сравнить р30-, рК205R- и рВ602L-ИФА между собой и с коммерческими тест-системами для серодиагностики АЧС.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирусы.** Как источник ДНК вируса АЧС использовали российский изолят «Оренбург-2008».

**Выделение вирусной ДНК** осуществляли методом аффинной сорбции на стекловолнокистых фильтрах.

**ПЦР.** Для проведения ПЦР собирали реакционную смесь, которая содержала 5 мкл 10× буфера для ПЦР, 3 мМ Mg<sup>2+</sup>, 0,2 мМ dNTPs, 2 ед. Taq ДНК-полимеразы, по 10 пмоль праймеров, 5 мкл раствора ДНК и воду до конечного объема 50 мкл. Реакцию проводили в ДНК-амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия). Программа включала 3 мин начальной денатурации при 94 °С и 35 циклов ПЦР: 30 сек. денатурации при 94 °С, 30 сек. отжига праймеров при 55 °С и 40 сек. элонгации при 72 °С. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 2,0% агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА.

**Молекулярное клонирование** ампликонов осуществляли по общепринятым методикам [1].

**Экспрессия и очистка рекомбинантных белков.** Культивирование *E. coli* проводили в орбитальном шейкере при 150 об/мин и 37 °С. Для индукции экспрессии в культуру клеток, достигшую логарифмической фазы роста, добавляли IPTG (Promega, США). Уровень экспрессии и размер рекомбинантных белков определяли с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле (ПААГ).

Очистку рекомбинантных белков проводили методом металл-хелатной хроматографии, используя в качестве сорбента His-Select Nickel Affinity Gel (Sigma, США).

**Сыворотки крови свиней.** Референтные сыворотки, содержащие антитела к вирусу АЧС, были получены из референтной лаборатории Европейского союза по АЧС (ASF-URL, CISA-INIA, Мадрид, Испания). Положительную референтную сыворотку (код в каталоге — ASF-CP) применяли в качестве положительного контроля в ИФА. Референтную панель сывороток (код в каталоге — ASF-Ref-1) использовали для оценки диагностической чувствительности ИФА.

Сыворотки от свиньи, экспериментально инфицированной полевым российским изолятом вируса АЧС, выделенным в ходе вспышки АЧС в Псковской области в 2014 г., были предоставлены сотрудниками референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ». Свинья вышла после заражения изолятом «Антоново 07/14» и на 32 сут. после первого инфицирования была заражена вирусом АЧС повторно.

Полевые сыворотки от естественно инфицированных вирусом АЧС домашних свиней были получены из ООО «ПХ «Лазаревское» Тульской области, где в январе 2014 г. была зарегистрирована вспышка АЧС.

Для определения диагностической специфичности ИФА в качестве заведомо отрицательных применяли сыворотки крови от племенных свиней, ввезенных в РФ из стран Европейского союза, свободных от АЧС.

**ИФА.** Разработка ИФА на основе рекомбинантных белков р30, рК205R и рВ602L являлась предметом исследований, условия проведения анализа описаны в разделе «Результаты и обсуждение».

ИФА с коммерческим набором INGENASA INGEZIM RPA COMPAC (Ingenasa, Испания) проводили в соответствии с инструкцией к тест-системе.

**Статистическая обработка данных.** Диагностическую чувствительность и специфичность ИФА вычисляли по формулам, рекомендованным МЭБ:

$$D_{\text{чув}} = (\text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО})) \times 100\%;$$

$$D_{\text{специ}} = (\text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП})) \times 100\%,$$

где ИП — истинно положительный результат;

ЛО — ложноотрицательный результат;

ИО — истинно отрицательный результат;

ЛП — ложноположительный результат [3].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Получение рекомбинантных белков.** Гены СР204L, К205R и В602L амплифицировали методом ПЦР, используя ДНК российского изолята вируса АЧС. В реакции применяли праймеры, содержащие сайты рестрикции Bam HI и Hind III. После обработки соответствующими рестриктазами ампликоны клонировали в экспрессирующий плазмидный вектор под T5-промотор.

В результате трансформации рекомбинантными плазмидами компетентных клеток JM109 *E. coli* получили клоны, экспрессирующие рекомбинантные белки р30, рК205R и рВ602L вируса АЧС. Молекулярный вес рекомбинантных белков соответствовал расчетному (рис. 1).

С целью повышения выхода рекомбинантных белков проведены эксперименты по оптимизации условий экспрессии и очистки. В результате оптимизации всех параметров удалось получить очищенные препараты

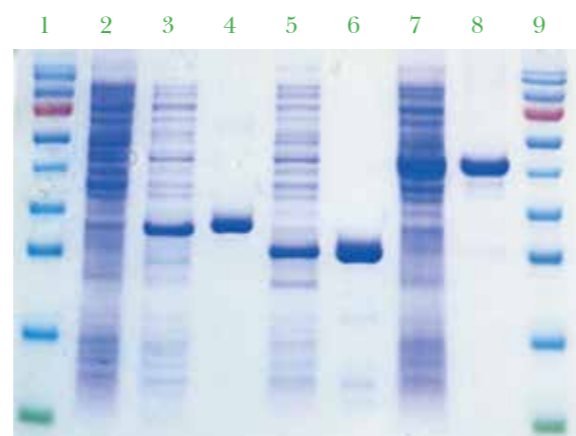


Рис. 1. Экспрессия в *E. coli* рекомбинантных белков р30, К205R и рВ602L вируса АЧС, анализ в 12% ПААГе. 1 и 9 — маркер молекулярной массы белков (Fermentas); 2 — лизат нерекомбинантного штамма *E. coli* (отрицательный контроль); 3, 5 и 7 — экспрессия в *E. coli* рекомбинантных белков р30, рК205R и рВ602L соответственно; 4, 6 и 8 — очищенные препараты рекомбинантных белков р30, рК205R и рВ602L соответственно

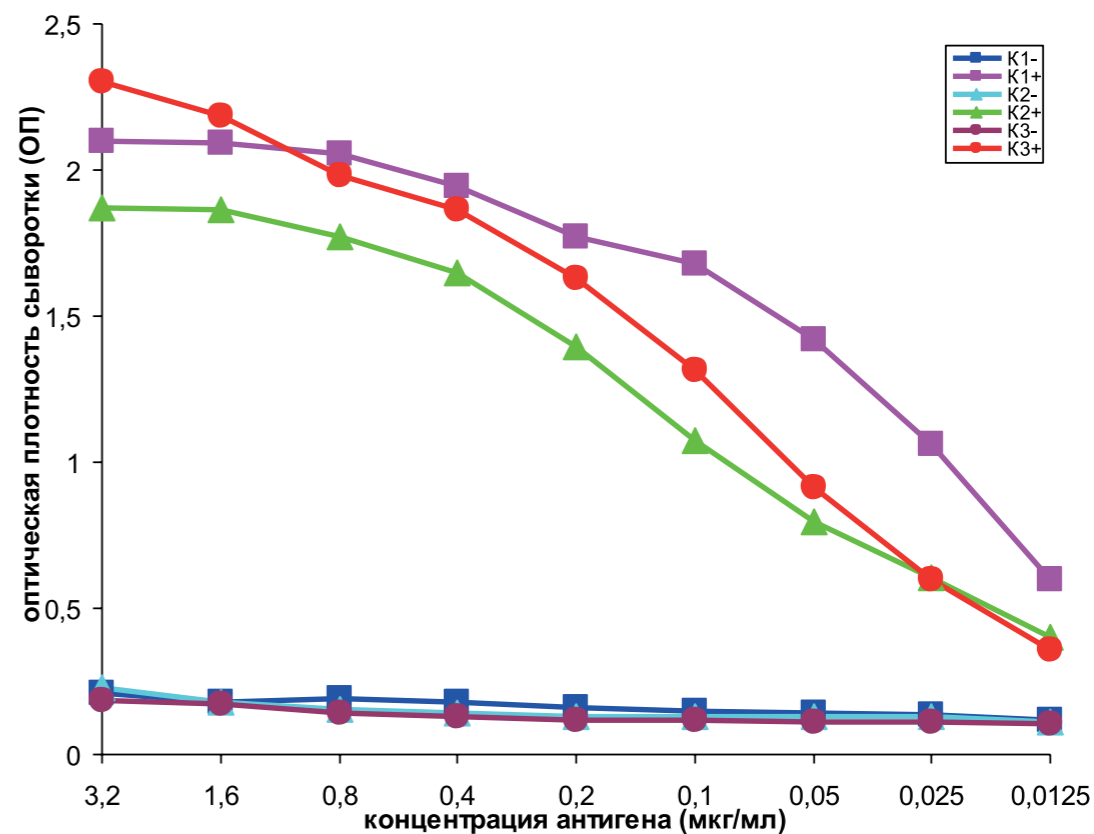


Рис. 2. Антигенная активность рекомбинантных белков рК205R (K1), рВ602L (K2) и р30 (K3) вируса АЧС в непрямом варианте ИФА с контрольными сыворотками крови свиней

рекомбинантных белков с высокой концентрацией. Выход очищенного протеина со 100 мл культуры *E. coli* составил 1,75 мг для р30, 1,5 мг — для рК205R и 2 мг — для рВ602L.

Антигенную активность рекомбинантных белков проверяли в непрямом варианте ИФА с контрольными сыворотками свиней, взятыми в разведении 1:20. Зависимость средней оптической плотности контрольных сывороток от концентрации рекомбинантных антигенов представлена на рис. 2. Все три белка обладали выраженной антигенной активностью.

**Разработка р30-, рК205R- и рВ602L-ИФА.** На основе рекомбинантных антигенов р30, рК205R и рВ602L разработан непрямой вариант ИФА для выявления антител к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней. В процессе работы определены оптимальные условия реакции: рабочая концентрация антигенов, разведение сывороток и конъюгата, состав блокирующего раствора, температурно-временной режим для каждого этапа ИФА. Также были определены допустимые значения оптической плотности контрольных сывороток, позитивно-негативный порог и воспроизводимость результатов ИФА.

В результате оптимизации всех параметров была принята следующая схема постановки непрямого варианта ИФА. В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл рекомбинантного белка в рабочем разведении в 0,05М карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,6) и инкубировали 16–18 ч при +4 °С. Затем планшеты отмывали 3 раза буфером PBST (на 1 л раствора: NaCl — 8,0 г; KCl — 0,2 г; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 2,8 г; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 0,2 г; Tween-20 — 0,05%; рН 7,3). Лунки планшетов блокировали 3% раствором молока в PBST, внося по 100 мкл раствора в каждую из

них, и инкубировали 1 ч при 37 °С. Планшеты отмывали 3-кратно раствором PBST. Тестируемые сыворотки, разведенные 1:20 в блокирующем буфере, вносили в объеме 100 мкл на лунку и инкубировали в термостатируемом шейкере 1 ч при 37 °С. Повторяли отмывку планшетов, вносили конъюгат (Sigma, США) в рабочем разведении и инкубировали в тех же условиях. После отмывки вносили субстрат АВТС, через 10–15 мин останавливали реакцию добавлением 1% раствора додецилсульфата натрия и учитывали результаты реакции на спектрофотометре при длине волны 405 нм. Значения процента позитивности (ПП) исследуемых проб определяли по формуле:

$$(\text{ОП пробы} - \text{ОП К}^-) / (\text{ОП К}^+ - \text{ОП К}^-) \times 100\%,$$

где ОП пробы — оптическая плотность исследуемой сыворотки;

ОП К<sup>-</sup> — оптическая плотность отрицательной контрольной сыворотки;

ОП К<sup>+</sup> — оптическая плотность положительной контрольной сыворотки.

Сыворотки считали отрицательными, если ПП был меньше 20%, положительными — при ПП больше или равном 25% и сомнительными при ПП больше 20%, но меньше 25%.

**Определение аналитической специфичности и чувствительности ИФА.** Аналитическую специфичность ИФА проверяли на сыворотках крови свиней, содержащих антитела к вирусам классической чумы свиней, репродуктивно-респираторного синдрома, цирковирусу свиней 2 типа, гриппа, болезни Ауески, парвовирусной инфекции. Все сыворотки показали отрицательный результат в рК205R-, рВ602L- и р30-ИФА.

Для проверки аналитической чувствительности ИФА приготовили серию 2-кратных разведений референтной положительной сыворотки. Предельное разведение сыворотки, в котором были выявлены анти-



Таблица 1  
Результаты ИФА с референтной панелью сывороток

№ пробы	Статус пробы (сыворотки)	Изолят вируса АЧС	Тест-система		
			р30-ИФА	рК205R-ИФА	рВ602L-ИФА
1	отрицательная	-	-3,01%	-2,54%	-1,19%
2	положительная	E75/E70 (SPAIN)	<b>115,18%</b>	<b>128,48%</b>	<b>138,47%</b>
3	положительная	E75/E70 (SPAIN)	<b>106,23%</b>	<b>51,07%</b>	<b>47,97%</b>
4	положительная	Ken05.Tk1 (KENYA)	<b>97,14%</b>	<b>85,39%</b>	<b>33,82%</b>
5	отрицательная	-	-2,54%	-1,18%	-1,54%
6	слабоположительная	E75/E70	<b>98,33%</b>	<b>45,16%</b>	<b>36,98%</b>
7	положительная	E75/E70 (SPAIN)	<b>108,75%</b>	<b>130,17%</b>	<b>135,21%</b>
8	слабоположительная	E75/E70	<b>86,58%</b>	<b>46,15%</b>	<b>36,58%</b>
9	отрицательная	-	-2,94%	-1,15%	-2,38%
10	положительная	E75/E70	<b>69,39%</b>	<b>63,38%</b>	<b>39,46%</b>
11	положительная	E75/E70	<b>104,71%</b>	<b>122,62%</b>	<b>103,50%</b>
12	положительная	E75/E70	<b>65,92%</b>	<b>62,93%</b>	<b>39,07%</b>
13	сильноположительная	NHV/L60	<b>96,81%</b>	<b>80,17%</b>	<b>38,80%</b>
14	положительная	NHV/L60	<b>83,37%</b>	<b>75,73%</b>	5,29%
15	сильноположительная	NHV/L60	<b>113,64%</b>	<b>94,10%</b>	<b>40,24%</b>
16	сильноположительная	NHV/L60	<b>103,00%</b>	<b>118,47%</b>	<b>76,04%</b>
17	отрицательная	-	0,68%	1,16%	-4,92%
18	отрицательная	-	0,29%	0,97%	-6,49%
19	сильноположительная	NHV/L60	<b>112,96%</b>	<b>114,51%</b>	<b>76,16%</b>
20	сильноположительная	NHV/L60	<b>100,29%</b>	<b>58,99%</b>	<b>63,78%</b>
21	положительная	NHV/L60	<b>107,93%</b>	<b>99,71%</b>	<b>44,08%</b>
22	положительная	NHV/L60	<b>71,85%</b>	<b>107,25%</b>	<b>98,86%</b>

р30-, рК205R- и рВ602L-ИФА: ПП>25% — положительный результат, ПП<20% — отрицательный результат, 20%<ПП<25% — сомнительный результат.

тела к вирусу АЧС, составляло 1:640 для рК205R-ИФА, 1:1280 для р30-ИФА и 1:320 для рВ602L-ИФА. Таким образом, самую высокую аналитическую чувствительность продемонстрировал р30-ИФА, у рВ602L-ИФА она была самой низкой.

Определение диагностической специфичности и чувствительности ИФА. Для определения диагностической специфичности ИФА тестировали 1000 заведомо отрицательных на АЧС сывороток крови от свиней, ввезенных в РФ из стран Западной Европы, свободных от АЧС. При этом в рК205R-ИФА и рВ602L-ИФА было получено по 2 ложноположительных результата, а в р30-ИФА — 5 ложноположительных результатов. Таким образом, специфичность рК205R-ИФА и рВ602L-ИФА составляла 99,8%, специфичность р30-ИФА — 99,5%.

Чувствительность ИФА проверяли с использованием референтной панели сывороток, предназначенной для валидации методов серологической диагностики АЧС. Панель была предоставлена референтной лабораторией Европейского союза по АЧС (ASF-URL, CISA-INIA, Мадрид, Испания) и включала 22 образца: 17 положительных и 5 отрицательных на АЧС. В р30- и рК205R-

ИФА антитела к вирусу АЧС были выявлены во всех положительных образцах, в рВ602L-ИФА положительная сыворотка № 14 продемонстрировала отрицательный результат (табл. 1). Следовательно, диагностическая чувствительность р30- и рК205R-ИФА на референтной панели сывороток составила 100%, а чувствительность рВ602L-ИФА — 94,12%.

Таким образом, в результате сравнительных исследований было установлено, что рВ602L-ИФА уступает рК205R-ИФА и р30-ИФА как по аналитической, так и по диагностической чувствительности. Кроме того, в процессе работы у рекомбинантного белка рВ602L выявился еще один недостаток: при хранении он довольно быстро терял антигенную активность. Из-за этой нестабильности при хранении его приходилось регулярно «перетитровать», т.е. заново определять рабочую концентрацию. В отличие от белка рВ602L, рекомбинантные антигены рК205R и р30 отличались хорошей стабильностью при хранении. Учитывая все это, из трех разработанных тестов для дальнейшей работы были отобраны два: р30-ИФА и рК205R-ИФА. Оба теста показали на референтной панели 100% чувствительность, а их специфичность превышала 99%.

Сравнение р30- и рК205R-ИФА с коммерческими наборами. Одна из задач данной работы заключалась в сравнении разработанных тест-систем с коммерче-

Таблица 2  
Результаты исследования сывороток крови от свиньи, экспериментально зараженной вирусом АЧС

ДПИ	Тест-система			
	р30-ИФА	рК205R-ИФА	ВНИИВВиМ АЧС-ИФА	INGENASA
4	-3,15	-9,34	0,106	38,4
9	<b>65,19</b>	<b>53,66</b>	<b>0,270</b>	<b>66,7</b>
12	<b>74,59</b>	<b>67,43</b>	<b>0,300</b>	<b>82,0</b>
16	<b>74,80</b>	<b>69,14</b>	<b>0,328</b>	<b>80,8</b>
21	<b>92,53</b>	<b>70,42</b>	<b>0,453</b>	<b>88,5</b>
24	<b>95,73</b>	<b>72,88</b>	н.и.	<b>87,3</b>
40	<b>106,41</b>	<b>88,36</b>	<b>0,6009</b>	<b>93,5</b>
43	<b>105,66</b>	<b>89,64</b>	<b>0,6107</b>	<b>96,8</b>
50	<b>115,27</b>	<b>80,35</b>	н.и.	<b>97,4</b>
63	<b>119,75</b>	<b>102,88</b>	<b>1,0559</b>	<b>100,0</b>

р30- и рК205R-ИФА: ПП>25% — положительный результат, ПП<20% — отрицательный результат, 20%<ПП<25% — сомнительный результат; INGENASA: <40% — отрицательный результат, >40% но <50% — сомнительный результат, >50% — положительный результат; ВНИИВВиМ АЧС-ИФА: положительный контроль — 1,874, отрицательный контроль — 0,118. Пробы с ОП в 2,5 и более раз выше отрицательного контроля, т.е. более 0,295, — положительные, менее 0,295 — отрицательные; ВНИИВВиМ АЧС-ИФА для перепроверки сыворотки на 9 ДПИ в новой серии набора: положительный контроль — 1,407, отрицательный контроль — 0,10095. Пробы с ОП в 2,5 и более раз выше отрицательного контроля, т.е. более 0,252 — положительные, менее 0,252 — отрицательные; н.и. — не исследовали.

скими наборами для серодиагностики АЧС. Сравнительный анализ чувствительности тест-систем проводили с использованием сывороток крови от свиньи, экспериментально инфицированной вирусом АЧС. В р30- и рК205R-ИФА антитела к вирусу АЧС были выявлены во всех пробах, отобранных на 9–63 дни после инфицирования (ДПИ) (табл. 2). Аналогичные результаты были получены с использованием набора INGENASA INGEZIM PPA COMPAC (Ingenasa, Испания). В «Наборе для иммуоферментной диагностики африканской чумы свиней (ВНИИВВиМ АЧС-ИФА Ат/Аг)» (ГНУ ВНИИВВиМ, г. Покров, Россия) в сыворотке, отобранной на 9 ДПИ, изначально антитела не обнаруживались, но при повторном исследовании набором другой серии сыворотка показала слабоположительный результат (данные, полученные с использованием этой тест-системы, предоставлены сотрудником референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» Першиным А.С.).

Исследования полевых сывороток крови. В январе 2014 г. были получены 18 проб сыворотки крови свиней из очага АЧС (ООО «ПХ «Лазаревское» Тульской области). Во всех 18 пробах методом ПЦР была обнаружена ДНК вируса АЧС. Это подтверждает, что кровь была взята от зараженных животных. Антитела к вирусу АЧС были обнаружены в 14 пробах с использованием р30-ИФА и в 13 пробах с использованием рК205R-ИФА (табл. 3). Сходные результаты (12 положительных проб) были получены в МЭБ-ИФА (результаты МЭБ-ИФА предоставлены сотрудником референтной лаборатории МЭБ по АЧС (Мадрид, Испания) Линой Мур). А вот с применением коммерческого набора INGENASA INGEZIM PPA COMPAC (Ingenasa, Испания) антитела к вирусу АЧС удалось обнаружить только в 2 пробах. Низкая

чувствительность INGENASA, а также разночтения по некоторым пробам (№№ 1, 2, 6, 11, 12 и 14) между р30-, рК205R-ИФА и МЭБ-ИФА в данном случае, очевидно, объясняются тем, что уровень антител к вирусу АЧС в полевых сыворотках был очень низким, поскольку с момента заражения животных до отбора проб прошло мало времени.

Оценка р30-ИФА и рК205R-ИФА в международных сравнительных испытаниях. В 2013 г. р30-ИФА и рК205R-ИФА были применены в международных сравнительных испытаниях по диагностике АЧС, организованных референтной лабораторией по АЧС Европейского союза (URL-CISA-INIA, Мадрид, Испания). В ходе испытаний был правильно определен инфекционный статус всех закодированных сывороток [2]. Результаты испытаний подтверждают, что разработанные тест-системы р30-ИФА и рК205R-ИФА являются чувствительными, специфичными и позволяют достоверно определять антитела к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней.

### ВЫВОДЫ

1. На основе рекомбинантных антигенов рК205R, рВ602 и р30 разработан непрямой вариант ИФА для выявления антител к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней.
2. На референтной панели положительных сывороток диагностическая чувствительность составляла 100% для р30-ИФА и рК205R-ИФА и 94,12% — для рВ602L-ИФА. Диагностическая специфичность р30-, рК205R- и рВ602L-ИФА превышала 99%.
3. При исследовании сывороток от экспериментально и естественно инфицированных животных р30-ИФА и рК205R-ИФА превосходили по чувствительности коммерческие тест-системы и были сравнимы с МЭБ-ИФА.

Таблица 3  
Результаты исследований полевых сывороток из очага АЧС  
(ООО «ПХ «Лазаревское»)

№ сыворотки	Тест-система			
	p30-ИФА	pK205R-ИФА	INGENASA	МЭБ-ИФА
1	26,87	18,89	отр.	отр.
2	36,27	21,46 (сомн.)	отр.	пол.
3	32,28	42,93	отр.	пол.
4	45,06	51,09	пол.	пол.
5	39,91	41,95	отр.	пол.
6	23,59 (сомн.)	39,38	пол.	отр.
7	11,09	14,55	отр.	отр.
8	41,60	38,14	отр.	пол.
9	35,12	43,02	отр.	пол.
10	17,03	16,23	отр.	отр.
11	27,94	51,09	отр.	отр.
12	13,30	13,48	отр.	пол.
13	30,60	48,43	отр.	пол.
14	32,11	42,22	отр.	отр.
15	35,30	50,91	отр.	пол.
16	54,99	54,46	отр.	пол.
17	53,84	49,14	отр.	пол.
18	31,93	55,43	отр.	пол.

p30- и pK205R-ИФА: ПП>25% — положительный результат,  
ПП<20% — отрицательный результат,  
20%<ПП<25% — сомнительный результат.

4. Результаты внутрилабораторных и международных сравнительных испытаний подтверждают, что тест-системы p30-ИФА и pK205R-ИФА являются чувствительными, специфичными и позволяют достоверно определять антитела к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
2. Тимина А.М., Якулов М.Р., Щербак А.В. Результаты участия в международных сравнительных испытаниях по диагностике африканской чумы свиней // Ветеринария сегодня. — 2015. — №1 (12). — С. 9–14.
3. African swine fever // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) / OIE. — 7th ed. — Paris, France, 2012. — Vol. 2, Chapter 2.8.1. — P. 1067–1079.
4. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples / C. Cubillos, S. Gómez-Sebastian, N. Moreno [et al.] // Virus Res. — 2013. — Vol. 173, № 1. — P. 159–167.
5. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells / C. Gallardo, E. Blanco, J.M. Rodríguez [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44, № 3. — P. 950–956.
6. Escribano J.M., Pastor M.J., Sánchez-Vizcaíno J.M. Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false-positive reactions in the

serodiagnosis of African swine fever // Am. J. Vet. Res. — 1989. — Vol. 50, № 7. — P. 1118–1122.

7. High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents / J.M. Oviedo, F. Rodríguez, P. Gómez-Puertas [et al.] // J. Virol. Methods. — 1997. — Vol. 64, № 1. — P. 27–35.

8. Highly specific confirmatory western blot test of African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54 / C.I. Alcaraz, F. Rodríguez, J.M. Oviedo [et al.] // J. Virol. Methods. — 1995. — Vol. 52. — P. 111–119.

9. Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae / D.M. Pérez-Filgueira, F. González-Camacho, C. Gallardo [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44, № 9. — P. 3114–3121.

10. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever / C. Gallardo, A.L. Reis, G. Kalema-Zikusoka [et al.] // Clin. and Vaccine Immunol. — 2009. — Vol. 16. — P. 1012–1020.

11. Sancey-Vizcaino J.M. African swine fever // Dis. of Swine / ed. B.E. Straw [et al.]. — 9th ed. — Ames, Iowa, 2006. — P. 291–298.

12. Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae / M.G. Barderas, A. Wigdorovitz, F. Merelo [et al.] // J. Virol. Methods. — 2000. — Vol. 89, № 1–2. — P. 129–136.

13. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus / A.L. Reis, R.M.E. Parkhouse, A.R. Penedos [et al.] // J. Gen. Virol. — 2007. — Vol. 88. — P. 2426–2434.

UDC 619:616.98:578.842.1:616-078

# USE OF p30, pK205R AND pB602L RECOMBINANT PROTEINS FOR AFRICAN SWINE FEVER SERODIAGNOSIS

M.R. Yakupov<sup>1</sup>, A.S. Yakovleva<sup>2</sup>, A.V. Scherbakov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Leading Veterinarian, PhD student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mapat.89@mail.ru

<sup>2</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: yakovleva\_as@arriah.ru

<sup>3</sup> Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

### SUMMARY

p30, pK205R and pB602L recombinant proteins of African swine fever (ASF) virus were generated by expression in *E. coli*. Indirect ELISA for detection of antibodies to ASF virus was developed on the base of the said recombinant proteins. Diagnostic specificity of pK205R- and pB602L-ELISA tests systems was 99,8%, p30-ELISA – 99,5%. Diagnostic sensitivity p30-ELISA/pK205R-ELISA and pB602L-ELISA was 100% and 94,12%, respectively, when the reference panel of positive sera was used. The sensitivity p30-ELISA and pK205R-ELISA used for testing sera from experimentally and naturally infected animals was found to be higher than that one of commercial test systems and comparable to the ELISA recommended by the World Animal Health Organization for ASF serological diagnosis. High p30-ELISA and pK205R-ELISA specificity and sensitivity were confirmed by results of international proficiency testings for ASF diagnosis.

**Key words:** African swine fever (ASF), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), recombinant proteins, antibodies.

The World Animal Health Organization (OIE) recommends to use enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with partially purified proteins of ASF virus propagated in MS cell culture as an antigen (hereinafter, OIE-ELISA) as the main method for serological diagnosis of ASF [6]. Preparation of such antigen is difficult to standardize as well as associated with biological risks. Moreover, though OIE-ELISA has high sensitivity its specificity is rather low [4]. Therefore, extensive investigations are carried out to develop recombinant antigens that are biologically safe, easily producible and confer high specificity to ELISA and to use them for ASF serodiagnosis. So far, use of some recombinant proteins, p54 [7, 8], p30 [9, 12], pp62 [5], p10, p72, pA104R, pC44L, pCP312R [13], pK205R and pB602L for ASF serological diagnosis has been reported [10].

The works described in the paper were aimed at development of p30, pK205R and pB602L recombinant proteins by their expression in *E. coli* and development of indirect ELISA based on them and comparison of p30-, pK205R- and pB602L-ELISA against each other and with commercial test systems designed for ASF serological diagnosis.

### MATERIALS AND METHODS

**Viruses.** Russian ASF virus isolate «Orenburg-2008» was used as a source of ASF virus.

**The virus DNA extraction** was performed by affine sorption on glass fiber filters.

**Polymerase chain reaction (PCR).** A reaction mixture is prepared for PCR that contains 5 µl of 10× PCR buffer, 3 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,2 mM dNTPs, 2 units of Taq DNA-polymerase, primers (10 pmol/primer), 5 µl of DNA solution and water to bring the volume up to 50 µl. The reaction is performed in the Mastercycler DNA amplifier (Eppendorf, Germany). The procedure includes initial 3 min denaturation at 94°C and 35 PCR runs: 30 sec denaturation at 94°C, 30 sec primer annealing at 55°C and 40 sec elongation at 72°C. The reaction products were analyzed by electrophoresis in 2,0% agarose gel containing 0,001% ethidium bromide at 50 mA.

**Molecular cloning** of amplicons was performed using common methods [1].

**Expression and purification of recombinant proteins.** *E. coli* was cultivated in orbital shaker at 150 rpm and 37°C. IPTG (Promega, USA) was added to induce expression in log-phase cell culture. The level of expression and sizes of recombinant proteins were determined by 12% polyacrylamide gel electrophoresis.

### INTRODUCTION

African swine fever (ASF) is a viral disease of pigs characterized by fever, cyanosis of skin and extensive hemorrhages of internal organs. Clinical ASF forms range from hyperacute and acute forms causing 100% lethality to chronic form.

ASF is endemic in Africa, Sardinia (Italia) and in Transcaucasia and Russia from 2007. Economic losses due to ASF include direct costs associated with the disease eradication, restrictions in international trade and amount to million dollars.

ASF agent is an enveloped virus of *Asfarviridae* family, *Asfivirus* genus. The ASF virus genome is a double-stranded DNA of 170–192 kbp which encodes up to 150 proteins including at least 28 structural proteins [11].

Due to lack of efficient and safe vaccines against ASF the control of the disease is carried out by its diagnosis and outbreak eradication.

Laboratory ASF diagnosis is based on detection of the disease agent and antibodies against it in blood and organs from infected animals. Methods of direct virus detection (virus isolation in cell culture, direct immunofluorescence test, PCR) are preferred for diagnosis of hyperacute and acute forms of ASF. Serological tests are preferable for diagnosis of subacute and chronic forms of the disease and detection of antibodies to ASF virus is the main tool for identification of animals infected with low virulent virus strains [3].



The recombinant proteins were purified by metal-chelate chromatography using His-Select Nickel Affinity Gel (Sigma, USA) as a sorbent.

**Porcine sera.** Reference sera containing antibodies to ASF virus were obtained from the EU Reference Laboratory for ASF (ASF-URL, CISA-INIA, Madrid, Spain). Positive reference serum (catalogue code – ASF-CP) was used as positive control in ELSIA. Reference panel of sera (catalogue code – ASF-Ref-1) was used for ELISA diagnostic sensitivity assessment.

Sera from a pig experimentally infected with Russian ASF virus isolate recovered in ASF outbreak occurred in the Pskov Oblast in 2014 were provided by staff members of the FGBI «ARRIAH» Reference Laboratory for ASF. The pig survived after infection with «Antonovo 07/14» virus isolate and was re-infected with ASF virus on day 32 after first infection.

Field sera from naturally ASF infected pigs were obtained from OOO «PKh «Lazarevskoe pig farm», Tula Oblast, where ASF outbreak was reported in January 2014.

To determine ELISA diagnostic specificity sera collected from breeding pigs imported to the Russian Federation from ASF-free EU member states were used as known negative sera.

**Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** Development of ELISA based on p30, pK205R and pB602L recombinant proteins was the subject of our investigations. The ELISA procedure is described in Results and Discussion section.

The ELISA using INGENASA INGEZIM PPA COMPAC test kit (Ingenasa, Spain) was performed in accordance with its manufacturer's instructions.

**Statistical processing of data.** ELISA diagnostic sensitivity and specificity were calculated using the OIE recommended formulas:

$$D_{\text{sensitivity}} = (TP / TP + FN) \times 100\%;$$

$$D_{\text{specificity}} = (TN / TN + FP) \times 100\%,$$

where TP – true positive result;

FN – false negative result;

TN – true negative result;

FP – false positive result [3].

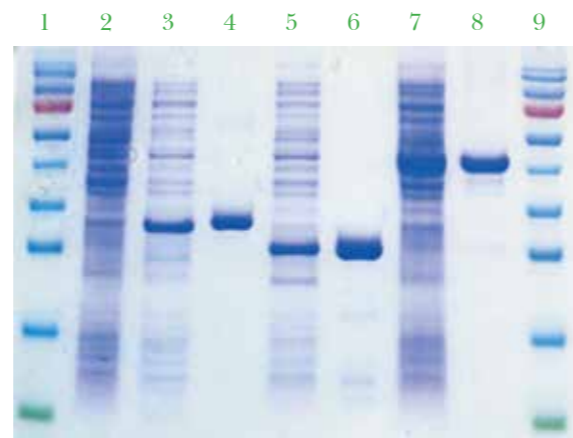
## RESULTS AND DISCUSSION

**Production of recombinant proteins.** CP204L, K205R and B602L genes were PCR amplified using DNA of Russian ASF virus isolate. Primers containing Bam HI и Hind III restriction sites were used for PCR. Amplicons previously treated with appropriate restriction enzymes were cloned in the expression plasmid vector downstream to T5 promoter.

Transformation of *E. coli* JM109 competent cells by recombinant plasmids resulted in generation of clones expressing p30, pK205R and pB602L recombinant proteins of ASF virus. Molecular weights of recombinant proteins corresponded to the estimated ones (Fig. 1).

Experiments aimed at the optimization of expression and purification conditions were carried out to increase the yield of the recombinant proteins. Purified highly concentrated recombinant protein preparations were successfully produced owing to the optimization of all parameters. The yields of purified protein per 100 µl of *E. coli* culture were as follows: 1,75 µg of p30, 1,5 µg of pK205R and 2 µg of pB602L.

The recombinant proteins were tested for their antigenicity with indirect ELISA using control porcine sera at 1:20 dilution. Relationship between mean optical density of control sera and recombinant antigen concentration



**Fig. 1.** Expression of p30, K205R and pB602L recombinant proteins of ASF virus in *E. coli*, analysis in 12% polyacrylamide gel  
1 and 9 – protein molecular weight marker (Fermentas);  
2 – *E. coli* non-recombinant strain lysate (negative control);  
3, 5 and 7 – expression of p30, pK205R and pB602L recombinant proteins, respectively, in *E. coli*;  
4, 6 and 8 – purified p30, pK205R and pB602L recombinant proteins, respectively.

is given in Fig. 2. All three proteins had pronounced antigenicity.

**Development of p30-, pK205R- and pB602L-ELISA.** Indirect ELISA for detection of antibodies to ASF virus in porcine virus was developed on the base of p30, pK205R and pB602L. Optimal conditions of the assay was determined: working antigen concentration, serum and conjugate dilution, composition of blocking solution, temperatures and timing of each ELISA step. Also, acceptable optical densities of control sera and cut-off value and reproducibility of the ELISA results were determined.

Based on the optimization results the following indirect ELISA procedure was established. Recombinant protein at working dilution in 0,05M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9,6) was added to each well of a plate (100 µl per well) and incubated at +4°C for 16–18 hours. Then, plates were washed three times with PBST buffer (NaCl – 8,0 g; KCl – 0,2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2,8 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,2 g; Tween-20 – 0,05% per litre of the solution; pH 7,3). The wells were blocked with PBST supplemented with 3% milk solution: 100 µl of the solution were added to each well and the wells were incubated at 37°C for 1 hour. The plates were washed with PBST three times. Tested sera diluted at 1:20 in blocking buffer were added to wells (100 µl per well) and incubated at 37°C in thermostatic shaker for 1 hour. Then, the plates were again washed and conjugate (Sigma, USA) at working dilution was added. The plates were incubated under the same conditions. After washing ABTS substrate was added and the reaction was stopped by adding 1% sodium dodecyl sulfate solution 10–15 later. The results were read by spectrophotometer at 405 nm. Positiveness percentage of (PP) was calculated using the following formula:

$$(OD \text{ of sample} - OD C^-) / (OD C^+ - OD C^-) \times 100\%,$$

where OD of sample – optical density of tested serum;  
OD C<sup>-</sup> – optical density of negative control serum;

OD C<sup>+</sup> – optical density of positive control serum.

The sera were considered negative if PP was less than 20%, sera were considered positive if PP was greater than or equal to 25% and sera were considered inconclusive if PP is more than 20%, but less than 25%.

**Determination of ELSIA analytical specificity and sensitivity.** The ELISA was tested for its analytical specificity in porcine sera containing antibodies to classical swine fever, porcine reproductive and respiratory syndrome viruses, porcine circovirus 2, influenza Aujezsky's disease viruses and parvovirus. All sera were negative when tested with pK205R-, pB602L- and p30-ELISA.

To test ELISA for its sensitivity two-fold serial dilutions of reference positive serum were prepared. The end-point serum dilutions where ASF antibodies were detected were as follows: 1:640 for pK205R-ELISA, 1:1,280 for p30-ELISA and 1:320 for pB602L-ELISA. Thus, p30-ELISA had the highest analytical sensitivity and pB602L-ELISA demonstrated the lowest analytical sensitivity.

**Determination of ELSIA diagnostic specificity and sensitivity.** To determine ELISA diagnostic specificity 1000 sera known to be ASF negative collected from pigs imported to the Russian Federation from the ASF-free West European countries were tested. Therewith, 2 false positive results were obtained when the sera were tested with pK205R – ELISA and pB602L-ELISA and 5 false positive results were obtained when the sera were tested with p30-ELISA. Thus, pK205R-ELISA and pB602L-ELISA specificity was 99,8%, p30-ELISA specificity was 99,5%.

The ELISAs were tested for their sensitivity using the reference panel of sera designed for validation of serological methods of ASF diagnosis. The panel was provided by the EU Reference Laboratory for ASF (ASF-URL, CISA-INIA, Madrid, Spain), it contained 22 samples: 17 ASF- positive and 5 ASF- negative ones. Antibodies to ASF virus were detected in all positive sera tested with p30- and pK205R-ELISA. Positive serum № 14 was tested negative by pB602L-ELISA (Table 1). Hence, the diagnostic sensitivity of p30- and pK205R-ELISA used for testing the reference panel of sera was 100%, and pB602L-ELISA sensitivity was 94,12%.

Thus, comparative tests showed that both analytical and diagnostic sensitivities of pB602L-ELISA were inferior to those ones of pK205R-ELISA and p30-ELISA. Moreover, during investigations pB602L recombinant protein was found to have another disadvantage it rather quickly lost its antigenicity under storage. Due to such non-stability during the storage it had to be regularly «re-titrated» i.e. its working concentration was to be determined all over again. Unlike with pB602L protein, pK205R and p30 recombinant antigens were highly stable under storage. Taking all of this into account two tests, p30-ELISA and pK205R-ELISA, out of three developed ones were selected for further works. Both tests showed 100% sensitivity with reference panel and their specificity was greater than 99%.

**Comparison between p30-ELISA/pK205R-ELISA and commercial test-kits.** Comparison of the developed test-systems and commercial test-kits for ASF serological diagnosis was one of the aims of the works. Comparative analysis of the test systems for their sensitivity was performed using porcine sera from a pig experimentally infected with ASF virus. p30- and pK205R-ELISA detected antibodies to ASF virus in all serum samples collected from the pig on day 9-63 after infection (Table 2). Similar results were obtained when the samples were tested with INGENASA INGEZIM PPA COMPAC test-kit (Ingenasa, Spain). No antibodies were initially detected with the ELISA test-kit for diagnosis of African swine fever in pigs (ARRIVV&M ASF-ELISA Ab/Ag) (GSI ARRIVV&M, Pokrov, Russia) in serum collected from the pig on day 9 after infection but the said serum was found to be weakly positive when it was retested with the same test-kit of another batch (the data on tests with the

said test-kit were provided by A.S. Pershinin, staff-member of the Reference Laboratory for ASF, FGBI «ARRIAH»).

**Tests of field sera.** Eighteen serum samples from pigs were obtained from ASF outbreak (OOO «PKh Lazarevskoe», Tula Oblast) in January 2014. ASF virus DNA was detected by PCR in all 18 serum samples. It confirmed that the blood samples had been collected from infected animals. Anti-ASF antibodies were detected in 14 and 13 serum samples tested with p30-ELISA and pK205R-ELISA, respectively (Table 3). Similar results (12 positive samples) were obtained when the sera were tested with OIE-ELISA (OIE-ELISA results were provided by Lina Moor, OIE Reference Laboratory for ASF (Madrid, Spain)). However anti-ASF antibodies were detected only in 2 samples tested with INGENASA INGEZIM PPA COMPAC kit (Ingenasa, Spain). Low sensitivity of INGENASA test-kit as well as discrepancies in results of p30-, pK205R-ELISA and OIE-ELISA for some samples (№№ 1, 2, 6, 11, 12 and 14) in this particular case can be accounted for by very low ASFV antibody titres in field sera, since little time has passed since the infection of animals.

**Evaluation of p30-ELISA and pK205R-ELISA during international proficiency tests.** In 2013 p30-ELISA and pK205R-ELISA were used during international proficiency tests for ASF diagnosis organized by EU Reference Laboratory for ASF (URL-CISA-INIA, Madrid, Spain). During tests the infectious status of all coded sera was correctly determined [2]. The test results confirmed that the developed p30-ELISA and pK205R-ELISA were sensitive, specific and reliably detected antibodies to ASF virus in porcine sera.

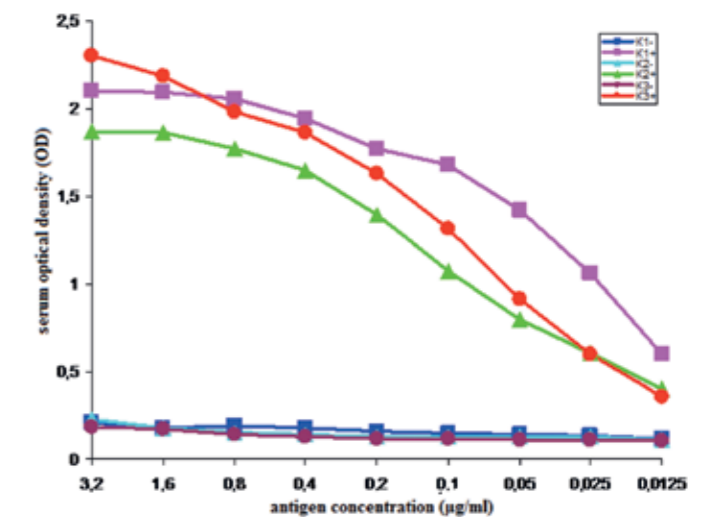
## CONCLUSIONS

1. Indirect ELISAs were developed on the base of pK205R, pB602 and p30 recombinant antigens for detection of antibodies to ASF virus in porcine sera.

2. Diagnostic sensitivity of p30-ELISA and pK205R-ELISA determined with reference panel of positive sera was 100% and diagnostic sensitivity of pB602L-ELISA was 94,12%. Diagnostic specificity of p30-, pK205R- and pB602L-ELISA exceeded 99%.

3. When sera from experimentally and naturally infected animals were tested with the said ELISA test-kits

**Fig. 2.** Antigenicity of pK205R (K1), pB602L (K2) and p30 (K3) recombinant proteins of ASF virus tested by indirect ELISA with control porcine sera



**Table 1**  
Results of testing reference panel of sera with ELISA test-systems

№ Sample	Sample status (serum)	ASF virus isolate	Test-system		
			p30-ELISA	pK205R-ELISA	pB602L-ELISA
1	negative	-	-3,01%	-2,54%	-1,19%
2	positive	E75/E70 (SPAIN)	<b>115,18%</b>	<b>128,48%</b>	<b>138,47%</b>
3	positive	E75/E70 (SPAIN)	<b>106,23%</b>	<b>51,07%</b>	<b>47,97%</b>
4	positive	Ken05.Tk1 (KENYA)	<b>97,14%</b>	<b>85,39%</b>	<b>33,82%</b>
5	negative	-	-2,54%	-1,18%	-1,54%
6	weakly positive	E75/E70	<b>98,33%</b>	<b>45,16%</b>	<b>36,98%</b>
7	positive	E75/E70 (SPAIN)	<b>108,75%</b>	<b>130,17%</b>	<b>135,21%</b>
8	weakly positive	E75/E70	<b>86,58%</b>	<b>46,15%</b>	<b>36,58%</b>
9	negative	-	-2,94%	-1,15%	-2,38%
10	positive	E75/E70	<b>69,39%</b>	<b>63,38%</b>	<b>39,46%</b>
11	positive	E75/E70	<b>104,71%</b>	<b>122,62%</b>	<b>103,50%</b>
12	positive	E75/E70	<b>65,92%</b>	<b>62,93%</b>	<b>39,07%</b>
13	strongly positive	NHV/L60	<b>96,81%</b>	<b>80,17%</b>	<b>38,80%</b>
14	positive	NHV/L60	<b>83,37%</b>	<b>75,73%</b>	5,29%
15	strongly positive	NHV/L60	<b>113,64%</b>	<b>94,10%</b>	<b>40,24%</b>
16	strongly positive	NHV/L60	<b>103,00%</b>	<b>118,47%</b>	<b>76,04%</b>
17	negative	-	0,68%	1,16%	-4,92%
18	negative	-	0,29%	0,97%	-6,49%
19	strongly positive	NHV/L60	<b>112,96%</b>	<b>114,51%</b>	<b>76,16%</b>
20	strongly positive	NHV/L60	<b>100,29%</b>	<b>58,99%</b>	<b>63,78%</b>
21	positive	NHV/L60	<b>107,93%</b>	<b>99,71%</b>	<b>44,08%</b>
22	positive	NHV/L60	<b>71,85%</b>	<b>107,25%</b>	<b>98,86%</b>

p30-, pK205R- and pB602L-ELISA: PP>25% – positive result, PP<20% – negative result, 20%<PP<25% – inconclusive result.

**Table 2**  
Results of testing sera collected from the pig experimentally infected with ASF virus

Day after infection	Test-system			
	p30-ELISA	pK205R-ELISA	ARRIVV&M ASF-ELISA	INGENASA
4	-3,15	-9,34	0,106	38,4
9	<b>65,19</b>	<b>53,66</b>	<b>0,270</b>	<b>66,7</b>
12	<b>74,59</b>	<b>67,43</b>	<b>0,300</b>	<b>82,0</b>
16	<b>74,80</b>	<b>69,14</b>	<b>0,328</b>	<b>80,8</b>
21	<b>92,53</b>	<b>70,42</b>	<b>0,453</b>	<b>88,5</b>
24	<b>95,73</b>	<b>72,88</b>	n/t	<b>87,3</b>
40	<b>106,41</b>	<b>88,36</b>	<b>0,6009</b>	<b>93,5</b>
43	<b>105,66</b>	<b>89,64</b>	<b>0,6107</b>	<b>96,8</b>
50	<b>115,27</b>	<b>80,35</b>	n/t	<b>97,4</b>
63	<b>119,75</b>	<b>102,88</b>	<b>1,0559</b>	<b>100,0</b>

p30- and pK205R-ИФА: PP>25% – positive result, PP<20% – negative result, 20%<PP<25% – inconclusive result;

INGENASA: <40% – negative result, >40% but <50% – inconclusive result, >50% – positive result;

ARRIVV&M ASF-ELISA: positive control – 1.874, negative control – 0,118.

Samples with OD that is 2,5 or more times higher than that one of negative control, i.e. more than 0,295, – positive, less than 0,295 – negative;

ARRIVV&M ASF-ELISA used for retesting the serum collected on day 9 after infection (new batch of the test kit): positive control – 1,407, negative control –

0,10095. Samples with OD that is 2,5 or more times higher than that one of negative control, i.e. more than 0,252, – positive, less than 0,252 – negative;

n/t – not tested.

**Table 3**  
Results of testing field sera from pigs in ASF outbreak (000 «PKh Lazarevskoe»)

№ Serum	Test-system			
	p30-ELISA	pK205R-ELISA	INGENASA	OIE-ELISA
1	<b>26,87</b>	18,89	neg.	neg.
2	<b>36,27</b>	21,46 (inconclusive)	neg.	<b>pos.</b>
3	<b>32,28</b>	<b>42,93</b>	neg.	<b>pos.</b>
4	<b>45,06</b>	<b>51,09</b>	<b>pos.</b>	<b>pos.</b>
5	<b>39,91</b>	<b>41,95</b>	neg.	<b>pos.</b>
6	23,59 (inconclusive)	<b>39,38</b>	<b>pos.</b>	neg.
7	11,09	14,55	neg.	neg.
8	<b>41,60</b>	<b>38,14</b>	neg.	<b>pos.</b>
9	<b>35,12</b>	<b>43,02</b>	neg.	<b>pos.</b>
10	17,03	16,23	neg.	neg.
11	<b>27,94</b>	<b>51,09</b>	neg.	neg.
12	13,30	13,48	neg.	<b>pos.</b>
13	<b>30,60</b>	<b>48,43</b>	neg.	<b>pos.</b>
14	<b>32,11</b>	<b>42,22</b>	neg.	neg.
15	<b>35,30</b>	<b>50,91</b>	neg.	<b>pos.</b>
16	<b>54,99</b>	<b>54,46</b>	neg.	<b>pos.</b>
17	<b>53,84</b>	<b>49,14</b>	neg.	<b>pos.</b>
18	<b>31,93</b>	<b>55,43</b>	neg.	<b>pos.</b>

p30- and pK205R-ELISA: PP>25% – positive result, PP<20% – negative result, 20%<PP<25% – inconclusive result.

p30-ELISA and pK205R-ELISA sensitivity were superior to that one of commercial test-kits and were comparable with that one of OIE-ELISA.

4. Results of intralaboratory and international proficiency tests confirm that p30-ELISA and pK205R-ELISA test systems are sensitive, specific and reliably detect antibodies to ASF virus in porcine sera.

### REFERENCES

- Maniatis T., Fritch E., Sambrook D. Genetic Engineering Techniques. Molecular cloning. – M.: Mir, 1984. – 480 p.
- Timina A.M., Yakupov M.R., Scherbakov A.V. Results of participation in the international proficiency tests for ASF diagnosis // Veterinary Today. – 2015. – № 1 (12). – P. 9–14.
- African swine fever // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) / OIE. – 7th ed. – Paris, France, 2012. – Vol. 2, Chapter 2.8.1. – P. 1067–1079.
- African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples / C. Cubillos, S. Gómez-Sebastian, N. Moreno [et al.] // Virus Res. – 2013. – Vol. 173, № 1. – P. 159–167.
- Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells / C. Gallardo, E. Blanco, J.M. Rodríguez [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 3. – P. 950–956.
- Escarbano J.M., Pastor M.J., Sánchez-Vizcaíno J.M. Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false-positive reactions in the serodiagnosis of African swine fever // Am. J. Vet. Res. – 1989. – Vol. 50, № 7. – P. 1118–1122.

7. High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents / J.M. Oviedo, F. Rodríguez, P. Gómez-Puertas [et al.] // J. Virol. Methods. – 1997. – Vol. 64, № 1. – P. 27–35.

8. Highly specific confirmatory western blot test of African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54 / C.I. Alcaraz, F. Rodríguez, J.M. Oviedo [et al.] // J. Virol. Methods. – 1995. – Vol. 52. – P. 111–119.

9. Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in Trichoplusia ni larvae / D.M. Pérez-Filgueira, F. González-Camacho, C. Gallardo [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 9. – P. 3114–3121.

10. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever / C. Gallardo, A.L. Reis, G. Kalema-Zikusoka [et al.] // Clin. and Vaccine Immunol. – 2009. – Vol. 16. – P. 1012–1020.

11. Sancey-Vizcaino J.M. African swine fever // Dis. of Swine / ed. B.E. Straw [et al.]. – 9th ed. – Ames, Iowa, 2006. – P. 291–298.

12. Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae / M.G. Barderas, A. Wigdorovitz, F. Merelo [et al.] // J. Virol. Methods. – 2000. – Vol. 89, № 1–2. – P. 129–136.

13. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus / A.L. Reis, R.M.E. Parkhouse, A.R. Penedos [et al.] // J. Gen. Virol. – 2007. – Vol. 88. – P. 2426–2434.