

РАЗРАБОТКА И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Д. В. Шарыпова¹, О. В. Капустина², И. Ю. Жуков³, Н. Н. Власова⁴, А. С. Иголкин⁵

¹ Сотрудник референтной лаборатории по АЧС, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: sharipova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-0999-5767

² Ведущий научный сотрудник, доктор ветеринарных наук, ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Москва, Россия, e-mail: olgakapustina2010@yandex.ru; ORCID ID 0000-0002-7382-8656

³ Младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: zhukov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3817-2129

⁴ Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-8707-7710

⁵ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: igolkin_as@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5438-8026

РЕЗЮМЕ

Ввиду отсутствия эффективных средств специфической профилактики африканской чумы свиней очевидно, что ранняя диагностика – один из важнейших и результативных способов борьбы с данной болезнью. Однако своевременная диагностика представляет собой наиболее сложную составляющую любой эффективно действующей системы надзора. Научные достижения последних десятилетий обусловили разработку не только высокоспецифичных и чувствительных методов лабораторной диагностики, но и быстрых в исполнении. Тем не менее дальнейшая разработка, усовершенствование и расширение арсенала методов лабораторной диагностики африканской чумы свиней, в том числе экспресс-тестов, является актуальной задачей, требующей особого внимания. Данное исследование посвящено разработке экспресс-методов, предназначенных для быстрого обнаружения антител к вирусу африканской чумы свиней в сыворотках крови инфицированных животных, а также анализу эффективности их применения. Предложены методы иммунопероксидазного монослойного анализа на основе фиксированных тест-препаратов (пермиссивной к вирусу африканской чумы свиней линии клеток CV-1, инфицированной штаммом вируса «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1») и реакции агглютинации латекса на основе рекомбинантного белка р30 вируса африканской чумы свиней. В результате проведенной работы установлена эффективность применения указанных методов для серологической диагностики африканской чумы свиней. Реакция агглютинации латекса и иммунопероксидазный монослойный анализ дают возможность быстро и качественно получать результаты исследований (в течение 1–2 ч). Преимущество указанных методов по сравнению с иммуноферментным анализом состоит также в простоте их постановки и в возможности использования в условиях ограниченного технического обеспечения.

Ключевые слова: африканская чума свиней, реакция агглютинации латекса, иммунопероксидазный тест, перевиваемая культура клеток CV-1, рекомбинантный белок р30, вирусный антиген.

DEVELOPMENT AND IMPROVEMENT OF ASF SEROLOGICAL DIAGNOSTIC TECHNIQUES

D. V. Sharypova¹, O. V. Kapustina², I. Yu. Zhukov³, N. N. Vlasova⁴, A. S. Igolkin⁵

¹ Specialist, ASF Reference Laboratory, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: sharipova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-0999-5767

² Leading Researcher, Doctor of Science (Veterinary Medicine), FGBSI FSC, FGBSI FNC VIEV RAN, Moscow, Russia, e-mail: olgakapustina2010@yandex.ru; ORCID ID 0000-0002-7382-8656

³ Junior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: zhukov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3817-2129

⁴ Leading Researcher, Doctor of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-8707-7710

⁵ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: igolkin_as@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5438-8026

SUMMARY

Due to the lack of effective tools of ASF specific prevention it is evident that early diagnosis is one of the most important and resultative ways of the disease control. However, contemporary diagnosis is a complex component of any effective surveillance system. Latest scientific achievements facilitated not only highly specific and sensitive but also rapid methods of laboratory diagnosis. Nevertheless, further development, improvement and expansion of ASF diagnosis techniques including rapid tests is a topical task of a great concern. The research is devoted to development of rapid test methods for rapid detection of antibodies to ASFV in blood sera of infected animals as well as to analysis of their use effectiveness. The following methods were suggested: immunoperoxidase monolayer assay using fixed cell line (ASFV permissive CV-1 cell-line infected with the virus strain ASF/ARRIAH/CV-1) and latex agglutination test using ASFV p30 recombinant protein. The performed research demonstrated the effectiveness of the applied techniques for ASF serological diagnosis. Latex agglutination test and immunoperoxidase monolayer assay give rapid and high quality test results (within 1–2 hours). The advantage of the specified methods as compared to ELISA is their simplicity and the possibility of use in conditions of limited technical support.

Key words: African swine fever, latex agglutination test, immunoperoxidase monolayer assay, CV-1 continuous cell line, p30 recombinant protein, virus antigen.

ВВЕДЕНИЕ

До настоящего времени эффективных средств специфической профилактики такого опасного заболевания, как африканская чума свиней (АЧС), не разработано, поэтому наличие специфических антител к вирусу АЧС является показателем ранее перенесенной или текущей инфекции [6]. В связи с этим особую важность в системе мер борьбы с АЧС имеет своевременная диагностика. При ее проведении происходит выявление возбудителя инфекционных болезней, его локализации, а также искоренения очага инфекции. Диагностика также является весьма эффективным средством для изучения особенностей патогенеза болезни [2, 9]. В связи с учащающимися случаями обнаружения изолятов вируса с ослабленными вирулентными свойствами и сниженной летальностью для свиней возникает все большая необходимость разработки новых и усовершенствования имеющихся методов серологической диагностики АЧС. Быстрое и надежное выявление возбудителя АЧС и специфических антител к нему является ключевым моментом для своевременного осуществления мероприятий по недопущению распространения болезни. Обобщая все вышеизложенное, можно сделать вывод о необходимости совершенствования серологических диагностических средств, в том числе методов экспресс-диагностики.

Для иммунологических методов исследования используют диагностикумы на основе реакции пассивной агглютинации. Это экспрессные иммунохимические тесты, сочетающие высокую специфичность и чувствительность с простотой постановки, быстрым получением ответа, не требующие применения сложной аппаратуры для регистрации полученных результатов. Такие методы широко используют в медицинской и ветеринарной практике [4, 5]. Тест-системы на основе реакции латексной агглютинации (РЛА) представляют собой суспензию полимерных микрочастиц латекса, которые содержат на своей поверхности специфические биолиганды, способные аффинно связываться с детектируемым компонентом (антигеном/антителом), образуя при этом агрегаты, которые легко визуализируются [1, 8].

Методы иммуноцитохимического анализа для выявления антител основаны на специфичности иммунологической реакции антиген-антитело и чувствительности светового микроскопа. Образующийся иммунный комплекс выявляется с помощью антивидовых антител, конъюгированных с ферментом-меткой. Иммунопероксидазный монослойный анализ (ИПМА) – это метод иммуноцитохимии с использованием фиксированных клеток пермиссивной линии, инфицированной соответствующим вирусом для выявления специфических антител. Преимуществами метода являются: простота подготовки тест-препаратов и возможность их длительного хранения; учет результатов реакции с помощью инвертированного светового микроскопа, который подходит для полевых условий; стабильность результатов окрашивания и длительное сохранение окраски препаратов [7].

На настоящий момент в нашей стране нет коммерческих наборов и тест-систем для выявления антител к вирусу АЧС на основе методов агглютинации латекса и иммунопероксидазного монослойного анализа. Использование РЛА и ИПМА может стать воспроизводимой и безопасной альтернативой традиционно используемым методам серологической лабораторной диагностики АЧС.

Разработка и применение быстрых, простых и доступных методов обнаружения специфических антител к вирусу АЧС может помочь в ускорении диагностики инфекции в условиях ограниченных ресурсов. Они позволят идентифицировать районы высокого риска, разработать соответствующие рекомендации по предупреждению появления и распространения болезни, а также могут способствовать быстрой идентификации и ликвидации источников АЧС в неблагополучных районах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реакция агглютинации латекса. Для создания специфического латексного диагностикума в качестве носителя использовали латекс – монодисперсные полистирольные частицы, имеющие средний диаметр 0,9–1,1 мкм (ДиаМ, Россия).

Прокариотически экспрессируемый рекомбинантный белок р30 вируса АЧС использовали в качестве специфического антигена для сенсбилизации полистирольных частиц латекса.

Реакцию проводили согласно общепринятой методике в иммунологических планшетах с U-образным дном (полуколичественный анализ) или на предметном стекле (качественный анализ). Сенсбилизированные частицы латекса смешивали с фосфатно-буферным раствором (PBS), положительной и отрицательной к вирусу АЧС сыворотками и наблюдали на предмет спонтанной и специфической агглютинации.

Качественный анализ проводили с применением проб сывороток крови свиней без предварительного разведения. Результат учитывали как отрицательный или положительный. При полуколичественном анализе сыворотки тестировали в серии повторных двукратных разведений в диапазоне от 1:20 до 1:5120. Результаты реакции учитывали в крестах: «++++» – крупнозернистая агглютинация на фоне прозрачной жидкости; «+++» – мелкозернистая агглютинация на полупрозрачном фоне; «++» – мелкозернистая агглютинация на мутном фоне; «+» – слабозаметная агглютинация на мутном фоне; «–» – отсутствие агглютинации, фон равномерно мутный. Положительным результатом считали агглютинацию на 2–4 креста; сомнительным – результат, при котором агглютинация оценивалась на один крест; отрицательным был результат, который характеризовался отсутствием агглютинации.

Иммунопероксидазный монослойный анализ. В качестве тест-препаратов использовали культуральные 96-луночные планшеты со сформированным монослоем клеток CV-1, инфицированных адаптированным к репродукции в культуре клеток CV-1 штаммом «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1» вируса АЧС.

В качестве вторичных (антивидовых) антител использовали пероксидазный конъюгат IgG козы против иммуноглобулинов свиньи, рабочее разведение конъюгата готовили в блокирующем буферном растворе (рН 7,2–7,4).

Субстратный буфер готовили из 20 мг 3-амино-9-этилкарбазола, растворенного в 2,5 см³ диметилформамида (хранение при 4 ± 3 °С в темноте 1 мес.) на 0,05%-м ацетатном буфере с добавлением H₂O₂.

Оценку степени окрашивания проводили под контролем инвертируемого светового микроскопа. Результаты реакции оценивали по наличию и интенсивности красно-коричневого окрашивания мест специфиче-

ского взаимодействия антигена вируса АЧС и антител к нему, присутствующих в исследуемой сыворотке, при подсчете окрашенных инфицированных клеток в 10 произвольно выбранных полях зрения. Положительной считали сыворотку при наличии 20 и более процентов специфически окрашенных инфицированных клеток, при условии отсутствия подобного окрашивания в контрольных лунках. В качестве контрольных использовали лунки с сывороткой крови свиней и лунки с интактной культурой клеток CV-1.

Сыворотки крови свиней. В качестве положительно-го контроля использовали сыворотку крови от свиньи, переболевшей АЧС, полученную в ходе постановки биологической пробы на животных согласно методическим рекомендациям [3]. В качестве отрицательного контроля – полевую сыворотку крови свиньи, не содержащую антител к вирусу АЧС. Все контрольные сыворотки прошли предварительное тестирование в ИФА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для конструирования антительного латексного диагностикума на основе рекомбинантного белка р30 вируса АЧС использовали 5–10%-ю суспензию мономерного полистирольного латекса с диаметром микросфер 0,9–1,1 мкм без функциональных групп.

Для сохранения нативной конформации и иммунной активности биолиганда его связывание с поверхностью микросфер проводили через «спейсер». В данном исследовании глутаровый альдегид выполнял ключевую роль мостика для ковалентного соединения частиц латекса и целевого белка.

Оптимальные параметры РЛА определяли шахматным титрованием различных концентраций рекомбинантного белка р30 в диапазоне от 500 до 10 мкг/мл для сенсibilизации 2,5% частиц латекса и двукратных разведений проб стандартной положительной к вирусу АЧС сыворотки крови и отрицательного контроля.

Наибольшую чувствительность РЛА (1:2560–1:5120) удалось получить при спонтанной адсорбции рекомбинантного белка р30 на поверхности полистирольных

микросфер при концентрации антигена 150 мкг/мл в 0,01 М PSB pH 7,2–7,4 (разведение 1:4) и 30 мкг/мл после обработки частиц латекса 0,05%-м раствором глутарового альдегида на 0,01 М PSB pH 7,2–7,4 (разведение 1:16). Эти разведения рекомбинантного белка р30 обеспечивали концентрацию антигена, достаточную для сенсibilизации частиц латекса, которая не препятствовала реакции.

Для постановки реакции агглютинации латекса в лунки планшета для иммунологических реакций с U-образным дном вносили 0,025 см³ испытуемой сыворотки и 0,025 см³ нагруженных частиц латекса. Время появления результатов реакции 5–15 мин, для получения окончательного результата требуется 30–60 мин. Наблюдаемая агглютинация частиц латекса хорошо видна невооруженным глазом на темном фоне или под малым увеличением микроскопа (рис. 1).

Проведенные исследования показали, что связывание с поверхностью микросфер через «спейсер» (глутаровый альдегид) оказалось сильнее и стабильнее, чем традиционная спонтанная адсорбция латексных частиц биолигандом, а использование глутарового альдегида обеспечило лучшую адсорбцию антигена на частицах латекса без увеличения неспецифического связывания антител и сорбированного на латексе рекомбинантного антигена.

При подборе условий иммобилизации рекомбинантного белка р30 вируса АЧС на латексных частицах были использованы различные температурные режимы и время инкубации. Установлено, что для сорбции полистирольного латекса рекомбинантным белком р30 в концентрации 30 нг/мкл в 0,05%-м растворе глутарового альдегида на 0,01 М PSB pH 7,2–7,4 оптимальной является температура +37 °С, время – 6 ч. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Из данных, представленных в таблице 1, можно сделать вывод, что экспозицию 6 ч при температуре +37 °С можно считать оптимальной, так как дальнейшее увеличение времени иммобилизации не привело к значительному увеличению чувствительности РЛА.

Таким образом, в результате работы подобраны оптимальные условия сенсibilизации латексных частиц рекомбинантным белком р30.

Методом латекс-агглютинации протестировано 30 положительных и 20 отрицательных (по данным ИФА) сывороток крови свиней. Результаты постановки РАЛ при этом на 100% совпадали с результатами, полученными при исследовании указанных сывороток крови методом твердофазного ИФА. Таким образом, разработанный метод РАЛ позволяет эффективно и быстро определять наличие антител к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней.

В рамках дальнейшей разработки и усовершенствования диагностических тестов были изготовлены фиксированные тест-препараты для постановки реакции ИПМА. Перед добавлением исследуемых сывороток крови свиней тест-препараты промывали однократно PBS (pH 7,2). Серийные 2-кратные разведения сывороток (от 1:10 до 1:640) вносили в планшет (2 лунки/разведение), которые инкубировали в течение 60 мин при 37 °С на шейкере. После трехкратного промывания PBS во все лунки добавляли по 100 мкл козьих IgG к иммуноглобулину свиньи или протеин А, конъюгированные с пероксидазой. Планшеты инкубировали при 37 °С в течение 45 мин. После 3-кратного промывания

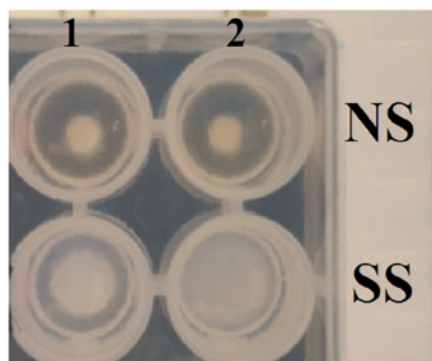


Рис. 1. Выявление специфических антител к вирусу АЧС в РЛА

Столбцы: № 1 – латексный диагностикум, приготовленный методом пассивной адсорбции; № 2 – латексный диагностикум, приготовленный методом ковалентной связи (глутаровый альдегид); NS (верхний ряд) – нормальная сыворотка свиней; SS (нижний ряд) – специфическая контрольная сыворотка, положительная к вирусу АЧС.

Таблица 1
Зависимость результатов реакции латекс-агглютинации от времени экспозиции

Разведение сыворотки	Время экспозиции (час)						
	2	3	4	5	6	7	8
1:10	+	++	+++	++++	++++	+++++	+++++
1:20	+	+	++	+++	++++	+++++	+++++
1:40	-	+	++	+++	+++	++++	+++
1:80	-	+	++	++	+++	+++	+++
1:160	-	-	+	++	+++	++	+++
1:320	-	-	-	+	++	++	++
1:640	-	-	-	-	-	+	-
1:1280	-	-	-	-	-	-	-

Температура экспозиции +37 °С, концентрация рекомбинантного белка р30 для РЛА 30 мкг/мл.

в лунки планшета добавляли по 100 мкл субстратного буфера. Цветной реакции давали развиваться в течение 20 мин, затем планшеты один раз промывали PBS и исследовали под световым инвертируемым микроскопом.

Специфические антитела к вирусу АЧС методом ИПМА удалось выявить в сыворотках в разведении от 1:20 до 1:160 без обнаружения неспецифической фоновой реакции.

Выявление специфического взаимодействия антигенов к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней с антигенами вируса АЧС в культуре клеток CV-1 представлено на рисунке 2.

На рисунке видно, что специфическое пероксидазное окрашивание выявлено только в результате взаимодействия инфицированной культуры клеток CV-1 с сыворотками крови свиней, положительными к вирусу АЧС, и не выявлено с сыворотками, не содержащими антител к вирусу.

Помимо отрицательных к вирусу АЧС сывороток крови свиней, на изготовленных тест-препаратах были испытаны сыворотки крови свиней, положительные к гетерологичным вирусным инфекциям (КЧС, грипп свиней) в различных разведениях. В результате постановки иммунопероксидазной реакции с указанными

сыворотками специфического взаимодействия с антителами выявлено не было. Результаты постановки реакции ИПМА с различными сыворотками представлены в таблице 2.

Из результатов, представленных в таблице, видно, что специфическое окрашивание клеток в результате постановки реакции наблюдалось в лунках с зараженной культурой клеток при добавлении специфической сыворотки крови свиньи к вирусу АЧС до разведения 1:160. В лунках с незараженной культурой клеток, нормальными сыворотками свиньи и кабана, а также с сыворотками к гетерологичным вирусным инфекциям (КЧС, грипп свиней) окрашивания выявлено не было.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная и представленная в данной работе методика постановки РЛА с использованием рекомбинантного белка р30 является специфичным и чувствительным, быстрым и простым в исполнении методом, не требующим специального оборудования и высокой квалификации персонала, экономически выгодным и тем самым наиболее приемлемым в ветеринарной практике для полевого серологического мониторинга АЧС. Таким образом, РЛА на основе рекомбинантного белка р30 эффективна при диагностических исследова-

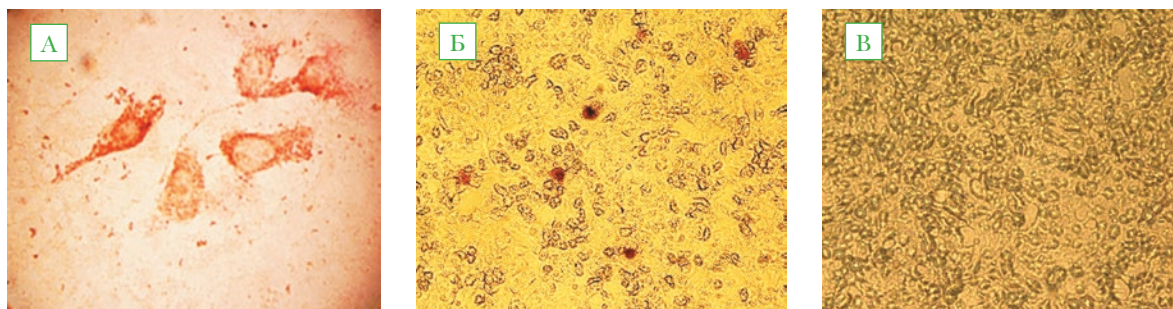


Рис. 2. Выявление специфических антител к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней в ИПМА

А – положительное иммунопероксидазное окрашивание инфицированных клеток, увеличение $\times 400$;

Б – положительная реакция со специфической сывороткой в разведении 1:40, увеличение $\times 200$;

В – отрицательная реакция с нормальной сывороткой крови свиньи в разведении 1:40, увеличение $\times 200$.

Таблица 2
Выявление антител к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней в ИПМА

Разведение сыворотки № столбца	NS свиной		SS к вирусу АЧС №1		NS кабана		SS к вирусу КЧС		SS к вирусу гриппа свиней		SS к вирусу АЧС №2	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:20	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
1:40	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
1:80	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
1:160	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
1:320	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:640	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Нечетные столбцы – незараженная культура клеток (контроль);

четные столбцы – зараженная культура клеток;

«+» и окрашенные ячейки – специфическое окрашивание клеток в лунках;

«–» – окрашивание отсутствует.

ниях и исключает необходимость работы с инфекционным вирусным материалом.

Метод ИПМА также имеет ряд преимуществ. В их числе простота подготовки планшетов с инфицированными вирусом клетками и сохранность их в течение длительного времени. Кроме того, тест дает возможность простой и объективной интерпретации результатов с использованием в качестве оборудования только инвертированного светового микроскопа. Результат окрашивания является стабильным, и окрашенные образцы могут храниться в течение нескольких месяцев.

Таким образом, РЛА и ИПМА являются простыми, быстрыми и воспроизводимыми методами, сопоставимыми с эталонными методами диагностики АЧС, и подходят для использования в регионах с ограниченными лабораторными возможностями. Тесты имеют потенциал как недорогие альтернативные методы для обнаружения и оценки низких и высоких уровней специфических антител к АЧС при единичных и скрининговых (мониторинговых) исследованиях, в том числе в полевых условиях.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бровкина А. Н. Разработка метода и тест-системы выявления бактерий рода *Salmonella* на основе латекс-агглютинации // Научный журнал КубГАУ. – 2011. – № 72 (08). – URL: <http://ej.kubagro.ru/2011/08/pdf/31.pdf>.
- Макаров В. В. Африканская чума свиней. – М.: РУДН, 2011. – 268 с.
- Методические указания по получению типоспецифической сыворотки крови свиней к вирусу африканской чумы свиней для постановки реакции задержки гемадсорбции: утв. Россельхознадзором в 2017 г. / МУ 07-15; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2017. – 15 с.
- Станишевский Я. М. Полимерные дисперсные системы медико-биологического назначения: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2001. – 23 с.
- Чайка Н. А. Реакция агглютинации латекса // Иммунологическая диагностика вирусных инфекций / Ф. С. Носков, А. А. Смородинцев, Ю. М. Бродянский [и др.]; под ред. Т. В. Перадзе, П. Халонена. – М.: Медицина. – 1985. – С. 121–143.
- African swine fever // *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)* / OIE. – 7th ed. – Paris, 2012. – Vol. 2, Chap. 2.8.1. – P. 1067–1079.

- Development of an immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies against peste des petits ruminants virus based on BHK-21 cell line stably expressing the goat signaling lymphocyte activation molecule / J. Zhang, W. Liu, W. Chen [et al.] // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11 (10):e0165088; DOI: 10.1371/journal.pone.0165088.

- Hechemy K., Michaelson E. Latex particle assays in laboratory medicine. Part I–II // *Laboratory Management*. – 1984. – Vol. 27 (40). – P. 26–34.

- Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011 / A. Malogolovkin, A. Yelsukova, C. Gallardo [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2012. – Vol. 158 (3–4). – P. 415–419; DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.03.002.

REFERENCES

- Brovkina A.N. Development of *Salmonella* detection method and test-system using latex agglutination [Razrabotka metoda i test-sistemy vyavleniya bakterij roda *Salmonella* na osnove lateks-agglutinacii]. *Scientific Journal KubSAU*. 2011; 72 (08). URL: <http://ej.kubagro.ru/2011/08/pdf/31.pdf> (in Russian).
- Makarov V. V. African swine fever [Afrikanская чума свиней]. М.: РУДН, 2011 (in Russian).
- Methodical instructions for preparation of type-specific pig blood serum to ASFV for hemadsorption inhibition test performance: approved by the Rosselkhoz nadzor in 2017 [Metodicheskie ukazaniya po polucheniyu tipospecificheskoj syvorotki krovi svinej k virusu afrikanской chumy svinej dlya postanovki reakcii zaderzhki gemadsorbicii: utv. Rossel'hoznadzorom v 2017 g.]. МУ 07-15; ФГБУ «ВНИИЗЖ». Владимир, 2017 (in Russian).
- Stanishevsky Ya. M. Biomedical polymer disperse systems [Polimernye dispersnye sistemy mediko-biologicheskogo naznacheniya]: authors extract. dis. ... candidate of science (Biology). М., 2001 (in Russian).
- Chaika N. A. Latex agglutination test [Reakciya agglutinacii lateksa]. *Immunodiagnosis of viral infections [Immunologicheskaya diagnostika virusnyh infekcij]*. F. S. Noskov, A. A. Smoroditsev, Yu. M. Brodyansky [et al.]; ed. by T. V. Peradze, P. Halonen. М.: Medicine. 1985; 121–143 (in Russian).
- African swine fever. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. OIE. 7th ed. Paris, 2012; 2 (2.8.1): 1067–1079.
- Development of an immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies against peste des petits ruminants virus based on BHK-21 cell line stably expressing the goat signaling lymphocyte activation molecule. J. Zhang, W. Liu, W. Chen [et al.]. *PLoS ONE*. 2016; 11 (10):e0165088; DOI: 10.1371/journal.pone.0165088.
- Hechemy K., Michaelson E. Latex particle assays in laboratory medicine. Part I–II. *Laboratory Management*. 1984; 27 (40): 26–34.
- Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011. A. Malogolovkin, A. Yelsukova, C. Gallardo [et al.]. *Vet. Microbiol.* 2012; 158 (3–4): 415–419; DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.03.002.

Поступила 06.05.19

Принята в печать 24.05.19