

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

На правах рукописи

Садчикова Анастасия Сергеевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СИСТЕМЕ
ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА КЛАССИЧЕСКОЙ
ЧУМЫ СВИНЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных»

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
кандидат ветеринарных наук
Иголкин Алексей Сергеевич

Владимир 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Историческая справка.....	11
1.2 Разнообразие пестивирусов животных.....	18
1.3 Характеристика вируса классической чумы свиней.....	20
1.4 Эпизоотологические особенности.....	26
1.5 Патогенез.....	28
1.6 Клинико-патологоанатомическая картина.....	28
1.7 Лабораторная диагностика.....	32
1.8 Специфическая профилактика.....	40
1.9 Заключение по обзору литературы.....	45
2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	48
2.1 Материалы и методы исследований.....	48
3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	64
3.1 Анализ лабораторных исследований на КЧС, проведенных в период с 2020 по 2024 гг. в России.....	64
3.2 Разработка, валидация и апробация тест-системы по выявлению генома вируса КЧС методом ОТ-ПЦР-РВ.....	71
3.3 Сравнительный анализ отечественных ПЦР-тест-систем по выявлению генома вируса КЧС с внутренним контролем.....	92
3.4 Разработка и валидация метода количественной ОТ-ПЦР-РВ по определению числа копий генома вируса КЧС.....	97
3.5 Актуализация и апробация метода субгенотипирования вируса КЧС на основе филогенетического анализа полноразмерного гена белка Е2.....	103
3.6 Усовершенствование схемы лабораторной диагностики КЧС.....	118
4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	124
4.1 Итоги исследований.....	124
4.2 Практические предложения.....	125
4.3 Перспективы дальнейшей разработки.....	127
5 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	128
6 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	130

ПРИЛОЖЕНИЯ.....	155
Приложение 1	156
Приложение 2	157
Приложение 3	159
Приложение 4	160

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Всемирная организация здравоохранения животных (ВОЗЖ) относит классическую чуму свиней (КЧС) к нотифицируемым особо опасным болезням [117, 280]. По результатам 93 Генеральной сессии ВОЗЖ (май 2026 г.) свободными от КЧС признаны 39 стран, включая государства Северной Америки, Океании, большей части Европы, а также некоторые зоны в Бразилии, Колумбии, Эквадоре и Боливии. В 2025-2026 гг. вспышки КЧС регистрировали в Индонезии, Японии, Кубе, Мадагаскаре, Восточном Тиморе, Колумбии, Эквадоре, Бразилии и на Филиппинах [54, 280]. В России последнюю вспышку КЧС регистрировали в 2020 г. в популяции диких кабанов на территории Приморского края, однако угроза заноса вируса сохраняется [21]. Отсутствие официальной программы эпизоотологического надзора (наблюдения) за данной болезнью и порядка использования лабораторных методов в системе её мониторинга затрудняет объективную оценку эпизоотической ситуации по КЧС в России.

Диагностические мероприятия, проводимые на национальном уровне, должны основываться на рекомендациях ВОЗЖ и действующих ветеринарных правилах по КЧС (№ 580 от 29.09.2020 г.) с учетом научного обоснования применения методов исследований. Согласно главе 3.9.2 Руководства ВОЗЖ, для лабораторной диагностики КЧС рекомендуется использовать вирусовыделение в чувствительной культуре клеток, реакцию прямой иммунофлуоресценции, иммуноферментный анализ, реакцию нейтрализации и полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [180]. С целью раннего выявления инфекции для идентификации генома вируса КЧС в биологическом материале применяют ОТ-ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

На российском рынке представлены ПЦР-тест-системы для диагностики КЧС, однако результаты их валидации не опубликованы в открытой печати. Непрозрачность разработки и отсутствие подтвержденных данных о чувствительности и специфичности используемых в России тест-систем несет

угрозу возникновения ложноотрицательных и ложноположительных результатов, что не согласуется с принципами референтной диагностики и стратегией искоренения КЧС. Таким образом, крайне важно создавать научно обоснованные тест-системы на основе ОТ-ПЦР-РВ, в том числе модернизированные варианты данного метода, с последующей их валидацией и апробацией.

Согласно требованиям ВОЗЖ страна может претендовать на получение статуса благополучия по КЧС при отсутствии вспышек и отказе от применения немаркированных вакцин [180]. На сегодняшний день в Российской Федерации, несмотря на наличие зарегистрированной маркированной вакцины, в качестве средств специфической профилактики КЧС продолжают массово применять живые вакцины на основе штаммов подгрупп 1.2 (Rovac) и 1.1 (С). При данном подходе к иммунизации осуществление DIVA-стратегии (дифференциации инфицированных от вакцинированных животных) серологическими методами становится невозможным. В связи с этим, согласно главе 1.1.5 «Молекулярная эпизоотология и генотипирование» Руководства ВОЗЖ, ведущим методом дифференциации вакцинных штаммов от полевых изолятов является филогенетический анализ по результатам секвенирования трех небольших областей генома вируса КЧС [164, 180]. Однако, по данным Postel A. с соавт., 2012, исследование полноразмерного гена белка Е2 может обладать более высокой точностью, что обуславливает необходимость актуализации подхода к контролю вакцинных штаммов с целью проверки их идентичности (соответствия заявленной производителем нормативно-технической документации), и к реализации DIVA-стратегии [177].

Таким образом, ввиду отсутствия вспышек КЧС в России с 2020 г. эпизоотологический мониторинг играет ключевую роль в надзоре за болезнью, однако необходима коррекция подходов к лабораторной диагностике КЧС и усовершенствование молекулярно-генетических методов.

Степень разработанности темы. Изучение генетического разнообразия вируса и разработка молекулярных методов диагностики КЧС осуществляются отечественными и зарубежными учеными с 1990-х гг. Ведущими экспертами в данной области являются Greiser-Wilke I., Rios L., Edwards S., Blome S., Paton D.J., Postel A., Lowings P., BjoÈrklund H. и многие другие. Результаты их работ легли в основу многочисленных научных публикаций и руководства ВОЗЖ, благодаря чему стало возможным внедрение эффективных методов изучения и диагностики КЧС в практику ветеринарных лабораторий.

В Российской Федерации ключевое значение для понимания распространения генетических вариантов вируса КЧС имеют работы Забережного А.Д., Гребенниковой Т.В., Власовой А.Н. и Южакова А.Г. Неоценимую роль в изоляции и характеристике биологических свойств эпизоотических штаммов вируса КЧС, выделенных в СССР и России, сыграли Куриннов В.В. и Лыска В.М. Получением вакцинных штаммов и изучением их генома активно занимались Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Груздев К.Н., Мищенко Н.К., Алипер Т.И. и Шевцов А.А. Разработке молекулярно-генетических методов диагностики и дифференциации вакцинных штаммов от полевых изолятов вируса КЧС посвящены работы Безбородовой С.В., Андреева В.Г., Семенихина В.И., Селянинова Ю.О., Титова И.А., Цыбанова С.Ж. и Хаммадова Н.И.

В связи с сокращением числа вспышек болезни проблема молекулярной диагностики КЧС с 2015 г. освещается недостаточно.

Цель и задачи. Целью работы являлось усовершенствование молекулярно-генетических методов диагностики КЧС в системе эпизоотологического мониторинга, осуществляемого на территории Российской Федерации.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести анализ результатов лабораторных исследований на КЧС в России, опубликованных в Федеральной государственной информационной системе «ВЕТИС» (компонент «Веста») в период с 2020 по 2024 гг.;
2. Разработать, валидировать и апробировать тест-систему по выявлению генома вируса КЧС методом ОТ-ПЦР-РВ с внутренним контролем;
3. Провести сравнительный анализ показателей влияния ингибиции на амплификацию фрагмента ВКО, чувствительности и специфичности у отечественных ПЦР-тест-систем по выявлению генома вируса КЧС;
4. Разработать и валидировать метод количественной ОТ-ПЦР-РВ по определению числа копий генома вируса КЧС;
5. Актуализировать и апробировать метод субгенотипирования вируса КЧС с использованием филогенетического анализа на основе полноразмерного гена белка E2 для дифференциации вакцинных штаммов и полевых изолятов;
6. Усовершенствовать схему лабораторной диагностики КЧС в Российской Федерации.

Научная новизна. Усовершенствована система праймеров и TaqMan-зонда путем модификации LNA (Locked Nucleic Acid, замкнутых нуклеиновых кислот) для увеличения специфичности отжига олигонуклеотидов на консервативном участке 5'-UTR вируса КЧС.

Впервые установлено отсутствие ингибиции при параллельных этапах обратной транскрипции и амплификации фрагмента 5'-UTR вируса КЧС и фрагмента генома бактериофага MS2, в результате чего предложено использование последнего в качестве внутреннего контрольного образца (ВКО) в составе ПЦР-тест-системы.

Предложены новые пары праймеров, перекрывающие полноразмерный ген белка E2, с целью увеличения точности субгенотипирования при проведении филогенетического анализа вируса КЧС для осуществления

DIVA-стратегии в странах, массово применяющих живые (немаркированные) вакцины.

Предложена усовершенствованная схема лабораторной диагностики КЧС в Российской Федерации, корректирующая порядок применения различных методов в условиях текущей эпизоотической ситуации, при отказе от вакцинации или использовании маркированных вакцин.

Теоретическая и практическая значимость работы. На примере выявления вируса КЧС подгруппы 1.1 (Glentorf), характерной для низковирулентных штаммов, в составе живой вакцины «Эрипестен» (Bioveta, Чехия) методом филогенетического анализа полноразмерного гена белка E2, доказана необходимость усиления контроля вакцинных штаммов, включающего проверку их идентичности.

Показано, что структура филогенетического дерева, построенного на основании полноразмерного гена белка E2 (1118 н.), полностью соответствует древу по полногеномным последовательностям, в то время как анализ по трем фрагментам, рекомендованным ВОЗЖ (5'-UTR – 150 н., E2 – 190 н. и NS5B – 409 н.), обладает меньшей точностью, так как нарушает топологию филогенетического дерева вируса КЧС, отображающего эволюцию генотипа 1.

Разработана, валидирована и апробирована тест-система «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ» (СТО 00495527-0532-2025) для выявления генома вируса КЧС методом ОТ-ПЦР-РВ (Приложение 2).

Разработаны и утверждены ФГБУ «ВНИИЗЖ» три методические рекомендации: «по обнаружению генома вируса классической чумы свиней методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ с использованием внутреннего контрольного образца» (30.11.2023 г.), «по определению числа копий генома вируса КЧС в вируссодержащем материале методом количественной ОТ-ПЦР-РВ» (27.06.2025 г.), «по субгенотипированию вируса КЧС методом филогенетического анализа с использованием ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования» (28.11.2025 г.) (Приложения 1, 3-4).

Представленные методы, тест-система и усовершенствованная схема лабораторной диагностики позволяют проводить своевременные молекулярно-генетические исследования, что вносит существенный вклад в систему эпизоотологического мониторинга и способствует обоснованию дальнейшего получения Россией статуса благополучия ВОЗЖ по КЧС.

Методология и методы исследования. При выполнении экспериментов и анализе результатов использованы вирусологические (культивирование вируса), молекулярно-генетические (ОТ-ПЦР в различных модификациях, клонирование, секвенирование) и биоинформатические (выравнивание, филогенетический анализ) методы. Исследования выполнены на базе референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ» в период с 2022 по 2025 гг.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты анализа лабораторных исследований на КЧС в России, опубликованных в информационной системе ФГИС «ВЕТИС» (компонент «Веста») в период с 2020 по 2024 гг.;
2. Тест-система «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ» для выявления генома вируса КЧС методом ОТ-ПЦР-РВ с внутренним контролем;
3. Результаты сравнительного анализа отечественных ПЦР-тест-систем по выявлению генома вируса КЧС с внутренним контролем;
4. Метод количественной ОТ-ПЦР-РВ по определению числа копий генома вируса КЧС;
5. Метод субгенотипирования вируса КЧС на основе филогенетического анализа полноразмерного гена белка Е2;
6. Усовершенствованная схема лабораторной диагностики КЧС в Российской Федерации.

Личный вклад соискателя. Основной объем представленных в диссертации исследований выполнен автором самостоятельно. Автор выражает благодарность кандидатам биологических наук Чернышеву Р.С., Мазлум А., Андрейчуку Д.Б. и Козлову А.А., кандидатам ветеринарных наук

Шевцову А.А. и Щербинину С.В., младшему научному сотруднику Лаврентьеву И.А., ветеринарным врачам Моисеенко Д.С. и Маркову Н.В. за помощь в проведении экспериментальной и аналитической работы.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность проведенных исследований подтверждена результатами комиссионных испытаний. В процессе экспериментальной работы суммарно проведено более 5000 ПЦР-исследований. Материалы диссертационной работы доложены на заседаниях Ученого совета и методической комиссии ФГБУ «ВНИИЗЖ»; Международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (6-8.09.2023 г., НИИПББ, Республика Казахстан); Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2023» (14.11.2023 г., Россия, Москва), Научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Ветеринария, зоотехния, биотехнология и продовольственная безопасность-науке и практике АПК», приуроченной ко Дню российской науки в рамках Десятилетия науки и технологий и 300-летия Российской академии наук МВА имени К.И. Скрябина (8.02.2024 г., Россия, Москва); Научно-практической конференции «Дятловы холмы/Нижний Новгород 2025. Актуальные проблемы патогенов животных: от молекулярных механизмов к контролю инфекций» (19.11.2025 г., Россия, Нижний Новгород); Главной Международной научно-практической конференции по молекулярной диагностике в России «Молекулярная диагностика 2025» (11.11.2025 г., Россия, Москва).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано пять научных работ, две из которых в журнале перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, и три тезиса в сборниках научных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 160 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: обзор

литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, список сокращений, список литературы, приложения 1-4; работа иллюстрирована 18 таблицами и 29 рисунками. Список литературы состоит из 282 источников, из них 225 иностранных.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Историческая справка

Классическая чума свиней (КЧС, англ. *Classical Swine Fever*, лат. *Pestis suum*, нем. *Schweinepest*, ранее холера свиней) – вирусная болезнь домашних свиней и диких кабанов, отнесенная ВОЗЖ к одной из шести инфекционных болезней, по которым требуется официальное признание свободы страны/зоны [102, 280]. КЧС характеризуется высокой летальностью (до 100 %), контагиозностью (индекс репродукции $R_0=4$) и приводит к значительному экономическому ущербу [32].

Происхождение вируса КЧС, по результатам филодинамического анализа с использованием байесовского метода молекулярных часов, датируется 1790 г. Его связывают с межвидовым переходом вируса туниских овец (Tunisian sheep virus (TSV)) от мелкого рогатого скота к домашним свиньям [117]. По данным Hanson (1957 г.), переход США на интенсивное свиноводство стал ключевым фактором для постоянной циркуляции вируса среди свиней [171].

Соединенные Штаты Америки. Первое описание КЧС отмечено в 1833 г. в Северной Америке, в штате Огайо (США), после чего болезнь стремительно распространилась по всей территории страны к 1860 г., что связывают с масштабным строительством железных дорог и перемещением животных, а к 1887 г. зарегистрирована в 35 штатах, при этом суммарное число вспышек за эти годы составило более 185 [101, 102]. В это время ошибочно возбудитель болезни относили к бактериям рода *Salmonella* [2, 6]. В результате необоснованного подхода к искоренению болезнь прогрессивно распространялась на территории Северной Америки [102, 117]. Только после 1903 г., когда удалось открыть и изучить природу возбудителя, стали разрабатываться эффективные противоэпизоотические мероприятия по борьбе с КЧС [2]. После 1970 г. в США эпизоотия приняла затухающий характер благодаря введенной программе по искоренению КЧС, включающей массовую иммунизацию всего восприимчивого поголовья, а в последующем

- отказ от вакцинации и тотальное уничтожение больных и восприимчивых животных в очаге («стемпинг-аут») [21]. Так, в 1978 г. в США зарегистрирована последняя вспышка. Впоследствии страна получила официальный статус свободы от КЧС, который действует по настоящее время [81, 212, 280].

Бразилия. На территории Южной Америки первые случаи КЧС описаны в Бразилии (1888 г.), однако официально болезнь зарегистрирована в 1934 г. согласно «Декрету № 24548 от 03.07.1934 г., утверждающему положение о службе охраны здоровья животных» [65]. Изначально в Бразилии циркулировал вирус субгенотипов 1.1, 1.2 и 1.3 [164]. С 1946 по 1951 гг. вспышки отмечены во всех штатах Бразилии. За указанный период уничтожено более двух млн свиней, что привело к значительным экономическим потерям [65, 91]. Тотальная иммунизация свиней против КЧС живыми вакцинами позволила сократить число вспышек, а к 1998 г. принята «Программа по борьбе с чумой свиней», приписывающая отказ от вакцинации [276]. С 2001 г. официальный статус благополучия получили отдельные зоны Бразилии, в которых, по данным на 2015 г., содержалось 95 % от общего числа поголовья свиней на территории страны [65]. И всё же, в неблагополучных по КЧС штатах вирус продолжал циркулировать. Так, в 2001 г. впервые охарактеризован вирус, принадлежащий к уникальному субгенотипу 1.5 (штаммы «Caucaia-2001-BR» и «LDDV-2019-587»), а в 2009 г. описан субгенотип 1.6 (единственный известный штамм «Mасара-2009-BR») [91, 129, 216]. С 2018 г. в Бразилии началась новая эпизоотическая волна, и к 2024 г. уже было нотифицировано 79 вспышек, преимущественно в личных подсобных хозяйствах (ЛПХ) [280]. В ответ на это разработан и реализован «стратегический план Бразилии по борьбе с КЧС», базирующийся на усилении клинического наблюдения за животными, увеличении числа лабораторных исследований, уничтожении всех больных свиней, строгом соблюдении мер биологической защиты, а также применении вакцин (из лапинизированного штамма типа «С») в зонах с наибольшим риском возникновения болезни.

Принятая стратегия привела к снижению числа вспышек, однако страна остается энзоотичной по КЧС [65, 91].

Колумбия и Эквадор. Эпизоотия КЧС долгое время продолжается в соседних с Бразилией странах. Так, в 1942 г. болезнь зарегистрирована в Колумбии, с тех пор страна остается энзоотичной по КЧС [222]. В 2002 г. правительство Колумбии на примере национальных программ Бразилии приняло меры по борьбе с болезнью, что позволило к 2007 г. провести регионализацию – установить зоны, свободные от КЧС, и отдельные территории с вакцинацией [119]. В период с 1998 по 2006 гг. в стране циркулировал вирус КЧС субгенотипов 1.1 и 2.2, с 2013 по 2017 гг. – только 2.2 [119, 222]. В 2025 г. на территории Колумбии отмечали единичные вспышки [280]. Эквадор энзоотичен по КЧС с 1940 г. В 2012 г. принята программа по искоренению болезни, включающая главным образом массовую вакцинацию. В результате реализации программы наблюдали снижение числа вспышек, но полностью искоренить болезнь не удалось, за исключением Галапагосских островов [101, 194, 246]. В 2025 г. в Эквадоре нотифицировано 11 вспышек у домашних свиней [280].

Европа. Первые клинические случаи КЧС в Европе описаны в 1862 г. (Великобритания), в 1870-е гг. (Франция и Швеция) и 1890-е гг. (Дания, Германия) [101, 102]. До 1960-х гг. все штаммы циркулирующего в Европе высоковирулентного вируса КЧС относились к генотипу 1 (субгенотипам 1.1 и 1.2), но уже в 1964 г. (Великобритания) охарактеризован штамм «Congenital Tremor», ассоциированный с врожденным тремором у поросят и впоследствии отнесенный к новому субгенотипу 3.1 [145, 195]. Начиная с 1977 г., во многих странах Европы (Германии, Бельгии, Нидерландах и других) выделены изоляты вируса КЧС с умеренно-вирулентными свойствами. Позже установлено, что они принадлежат новому генотипу 2 (субгенотипам 2.1, 2.2 и 2.3) [164]. Для предотвращения распространения болезни в европейских странах использовали политику массовой иммунизации домашних свиней, усиления мер биологической защиты, проведения пероральной вакцинации в

популяциях диких кабанов [195]. После прекращения регистрации вспышек КЧС в государствах-членах Европейского Союза вводилась программа по отказу от вакцинации. Так, к 1980 г. официально заявили об отмене вакцинации Великобритания, Австрия, Дания, Ирландия, Люксембург, Финляндия и Швеция; в период с 1980 по 1990 гг. – Франция, Нидерланды, Бельгия, Испания, Греция, Германия и Италия [228, 275]. Такая программа не способствовала полному искоренению болезни, так как спорадические случаи в Нидерландах, Германии, Испании, Бельгии, Италии продолжали регистрировать в 1990-2010-е годы, что приводило к серьезным экономическим потерям вследствие реализации стратегии «стемпинг-аут» [8]. К примеру, в Германии в период с 1990 по 1998 гг. нотифицировано более 400 новых вспышек КЧС среди домашних свиней, из-за чего уничтожено около двух млн голов, а в Нидерландах всего за один календарный год (1997-1998) – более 400 случаев, в результате чего ликвидировано десять млн животных [149, 198, 257, 260]. В XXI в. (до 2016 г.) вспышки КЧС в Европе (Испании, Хорватии, Болгарии, Германии) были вызваны вирусом субгенотипов 2.3 и 2.1b [98, 120, 166, 236]. Масштабные исследования по выявлению инфицированных животных, пероральная вакцинация диких кабанов и усиление биозащиты хозяйств позволили большинству стран Европы официального статуса свободы от КЧС, который поддерживается и на данный момент [57].

Япония. В Японии первое упоминание КЧС датируется 1880 г. Болезнь была широко распространена до 1960-х гг., пока не была разработана живая вакцина из штамма «GRE-» (субгенотип 1.1, 1969 г.) [150]. Специфическая профилактика в свиноводческих хозяйствах и в популяции дикого кабана позволила существенно сократить число вспышек, и с 1992 г. о новых случаях болезни не сообщалось [69, 243]. Начиная с 2000-х гг. охват вакцинацией уменьшали, что привело к её отмене в 2006 г. и получению официального статуса благополучия ВОЗЖ по КЧС в 2015 г. [150, 244]. Однако статус сохранялся в течение трех лет, и в 2018 г. был зарегистрирован новый очаг

КЧС на территории предприятия, где зафиксирован стремительный темп падежа свиней, а через две недели в угрожаемой зоне вирус КЧС обнаружен в образцах крови кабанов, не проявляющих клинических признаков болезни [243]. В период с 2018 по 2024 гг. в Японии зарегистрировано 4118 случаев КЧС среди диких кабанов и 486 – среди домашних свиней. В стране усилили меры по эпизоотологическому наблюдению в дикой фауне, регулировали численность животных и проводили дезинфекцию территории, где обнаруживали трупы павших от КЧС кабанов (основного резервуара вируса) [146]. Наряду с этим, проводили пероральную вакцинацию кабанов препаратом «Pestiporc Oral» (IDT Biologika GmbH, Германия) в форме «приманок» с отслеживанием у них сероконверсии [131]. В свиноводческих хозяйствах борьба с КЧС заключалась в тотальной иммунизации и усилении биозащиты. В 2025 г. нотифицировано всего 36 случаев КЧС только у домашних свиней, что может говорить о снижении интенсивности эпизоотического процесса и эффективности применяемых подходов к искоренению болезни [226, 280].

Китайская Народная Республика. Первое официальное упоминание болезни в Китае приходится на 1920-е гг. [225]. Благодаря созданию живых вакцин (из лапинизированного штамма «С») в 1955 г. удалось сократить число вспышек [92, 169, 282]. Однако новая эпизоотическая волна КЧС в Китае произошла в 1979 г. в связи с возникновением вируса генотипа 2 [163]. В 2014 г. охарактеризован вирус субгенотипа 2.1d, циркуляция которого стала серьезной проблемой для Китая, поскольку существующие вакцины не обеспечивали полной защиты свиней при заражении [61, 140, 163, 184]. Пик эпизоотии в стране пришелся на 2014-2015 гг. и был связан с циркуляцией вируса КЧС субгенотипа 2.1: из всех исследованных изолятов 52 принадлежали к 2.1d, а девять других – 2.1b [84, 162]. Соблюдение строгих мер биозащиты и систематическая вакцинация позволили уменьшить число вспышек, однако не способствовали освобождению страны от КЧС. В 2016-2018 гг. в Китае наблюдали межэпизоотический период и болезнь не

регистрировали. Однако с 2019 по 2024 гг. зафиксирован восходящий тренд по заболеваемости свиней классической чумой. К примеру, в 2019, 2023 и 2024 гг. нотифицировано суммарно 49 очагов у домашних свиней [54, 280]. Стоит отметить, что в 2024 г. в стране циркулировал умеренно-вирулентный вирус субгенотипа 2.1с, вызывающий 60 % летальность [185].

Индия. Первая вспышка КЧС в Индии зарегистрирована в 1962 г. на свиноводческом предприятии в пригородной части Мумбаи (ранее Бомбей) [208, 233]. Болезнь прогрессивно распространилась в большинстве штатов страны (особенно северо-восточных в связи с большой плотностью поголовья диких и домашних свиней). До 2008 г. ежегодно регистрировали более 100 вспышек КЧС [142, 165, 208]. В эти годы масштабно циркулировал вирус субгенотипа 1.1, предположительно занесенный в Индию из Европы с племенными свиньями [165, 221]. В исследовании Patil S.S. с соавт. отмечено, что в период 2006-2008 гг. преобладающее количество изолятов вируса КЧС, выделенных в Индии, относились к субгенотипу 1.1, но при этом были отличны друг от друга по биологическим свойствам. Помимо этого, в 2008 г. в Индии выявлен вирус субгенотипа 2.2 [165]. В 2011 г. Rajkhowa T.K. с соавт. впервые сообщили о выявлении в Индии субгенотипа 2.1, предположительно занесенного с популяцией дикого кабана [142]. В исследованиях 2014 г. также охарактеризованы вирулентные изоляты субгенотипа 1.2 [201]. В 2015 г. Ahuja A. с соавт. опубликовали полногеномные последовательности изолятов, подтвердив масштабную циркуляцию вируса субгенотипа 2.1 на территории Индии и постепенное «вытеснение» субгенотипа 1.1 [93, 110]. Несмотря на это, циркуляция вируса КЧС субгенотипа 1.1 продолжается и в настоящее время (данные на 2024 г.), преимущественно в южных штатах Индии наравне с генотипом 2 [144]. В последние годы появились публикации о возникновении атипичных генетических вариантов вируса КЧС субгенотипов 2.4 и 1.1d [143, 144]. Тем самым, Индия по настоящее время остается энзоотичной по КЧС (официальная нотификация в ВОЗЖ страной не проводится), несмотря на осуществление специфической профилактики

болезни с 1964 г. В стране применяют лапинизированную вакцину, полученную на основе штамма «HCLV India» (субгенотип 1.1). Однако имеются данные о циркуляции вируса КЧС среди вакцинированных свиней. Более того, вакцина является недоступной для большинства владельцев ЛПХ и свиноводческих предприятий в связи с дороговизной [93, 94, 97, 196, 209, 218]. В 2014-2015 гг. введена «Программа контроля КЧС», где рассмотрены вопросы о разработке и реализации живых вакцин, полученных путем репродукции вируса в культурах клеток, а также о контроле популяции дикого кабана. В 2020 г. зарегистрирована живая вакцина против КЧС «Raksha Class», разработанная Индийским ветеринарным научно-исследовательским институтом (IVRI) и полученная путем аттенуации циркулирующего в Индии вируса неизвестного субгенотипа в культуре клеток. По данным Malik Y. с соавт., 2020, данная вакцина эффективна, безопасна, является наиболее дешевой и технологичной в отличие от лапинизированной [97].

Союз Советских Социалистических Республик и Российская Федерация. В СССР занос вируса КЧС произошел в 1930-е гг., после чего к 1940-м гг. болезнь регистрировали на территории большинства Союзных Республик, в основном в центральных регионах РСФСР [24]. С 1940-х гг. число вспышек удалось незначительно сократить благодаря применению инактивированной вакцины. В качестве вакцинного сырья использовали кровь инфицированных свиней, а инактиванта – кристаллвиолет [45]. В 1960-х гг. разрабатывали живые вакцины, содержащие в составе лапинизированные штаммы «Hudson» (субгенотип 1.2) и «С» (субгенотип 1.1), применение которых сократило случаи болезни уже в сотни раз [50]. С начала 1970-х гг. по 1980 г. ежегодно регистрировали 10-30 очагов КЧС из-за повсеместного применения безопасной и эффективной живой вакцины из штамма «ЛК» [24]. Однако с 1980 г. отмечался подъем заболеваемости КЧС до конца 1990-х гг. До 2005 г. преимущественно регистрировали вирус субгенотипа 1.1, что может указывать на его первичный занос из европейских стран [56, 199]. Однако с 1988 г. наблюдали спорадические случаи болезни, вызванные вирусом

генотипа 2 (2.1, 2.2 и 2.3). С 2007 по 2012 гг. на территории европейской части России (в Смоленской, Псковской, Саратовской областях и других регионах) циркулировал вирус субгенотипа 2.3 [48, 56]. С 2010 по 2020 гг. динамика эпизоотии имела нисходящий тренд. Последние случаи КЧС в России регистрировали в приграничных с Китайской Народной Республикой субъектах: Амурской области и Приморском крае [21, 22, 23, 42]. При этом вирус КЧС, изолированный на Дальнем Востоке, относился к субгенотипу 2.1 [21]. С марта 2020 г. по настоящее время в России вспышки КЧС не регистрировали. Улучшение ситуации в стране связывают с массовой вакцинацией поголовья, а также с усилением мер биологической защиты свиноводческих хозяйств и предприятий. Однако иммунизация свиней живыми (немаркированными) вакцинами препятствует получению Российской Федерацией статуса благополучия ВОЗЖ по КЧС [21, 23].

1.2 Разнообразие пестивирусов животных

По данным Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV), КЧС вызывает *Pestivirus suis* (ранее – *Pestivirus C*), относящийся к роду *Pestivirus* и семейству *Flaviviridae* [29].

Изучение пестивирусов тесно связано с описанием КЧС и совпадает по времени с первой вспышкой болезни в 1833 г. К данному роду вирусов также относятся возбудители диареи крупного рогатого скота (ВД КРС) и пограничной болезни овец, обнаруженные в 1940-1960-х гг. и вызывающие перекрестную реакцию у свиней с вирусом КЧС в серологических тестах [255]. Позже к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* отнесено несколько вирусов, представленных на Рисунке 1 [11, 29, 89, 122, 161, 186, 204, 229, 277].

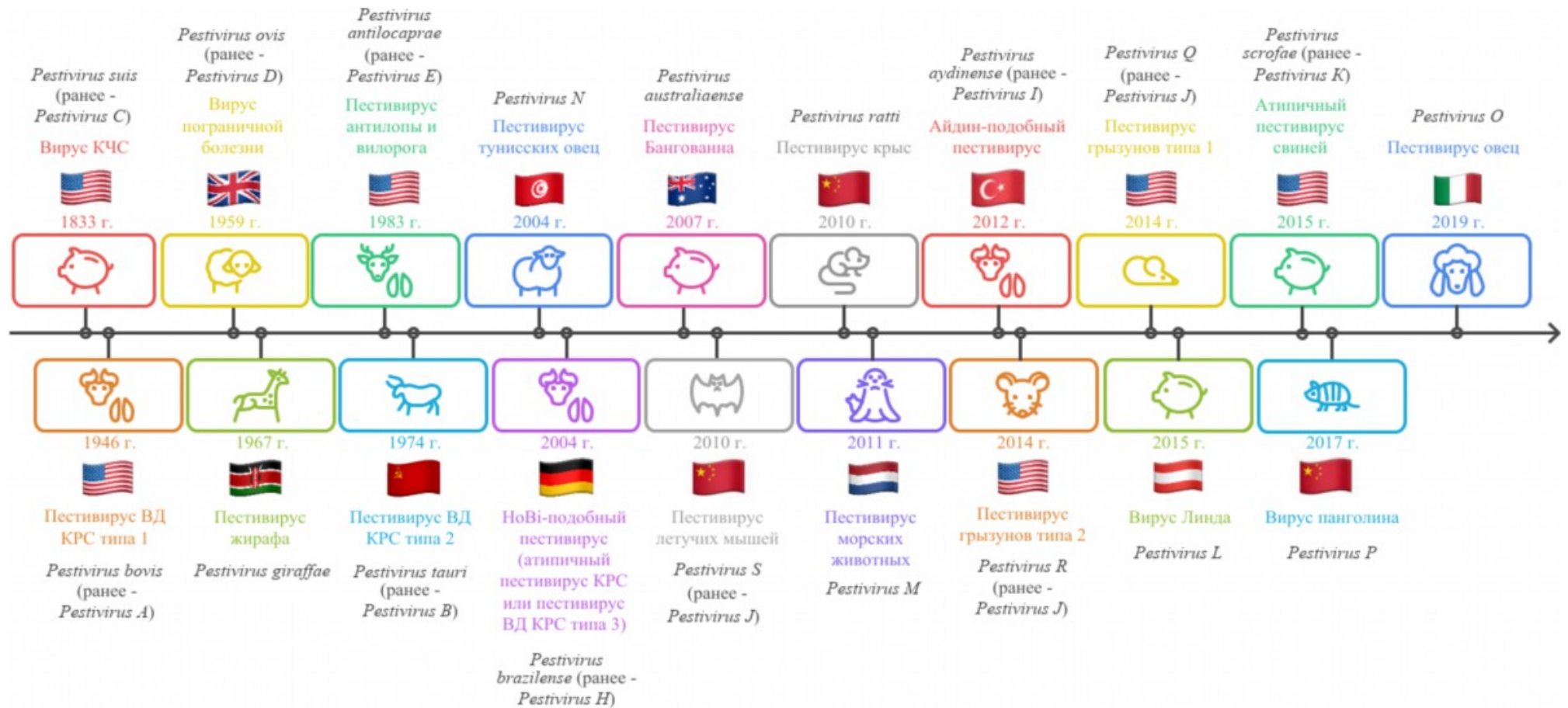


Рисунок 1 – Представители рода *Pestivirus*, согласно актуализированному номенклатурному перечню ICTV на 10.12.2025.
Примечание: г. – год обнаружения болезни (вируса). Иллюстрирование выполняли в графическом редакторе Microsoft Paint 3D.

1.3 Характеристика вируса классической чумы свиней

Вирусную этиологию КЧС установили в 1903 г. De Schweinitz G.E. и Dorset M. во время масштабной эпизоотии в США, осуществляя эксперименты по заражению здоровых свиней кровью больных животных, очищенной через бактериальный фильтр [2, 6].

Структура вируса. Вирион размером 40-60 нм содержит суперкапсид и капсид с икосаэдрическим типом симметрии [2, 104]. Геном – одноцепочечная несегментированная РНК положительной полярности размером 12,3 тысячи нуклеотидов (т.н.), имеет одну открытую рамку считывания (ОРС), окруженную двумя нетранслируемыми областями (5'-UTR и 3'-UTR). ОРС кодирует четыре структурных (капсидный С, суперкапсидные гликопротеины E1, E2 и E0 (E^{ms}) и восемь неструктурных (Npro, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B) белков (Рисунок 2) [104, 117, 172, 175, 192, 215].

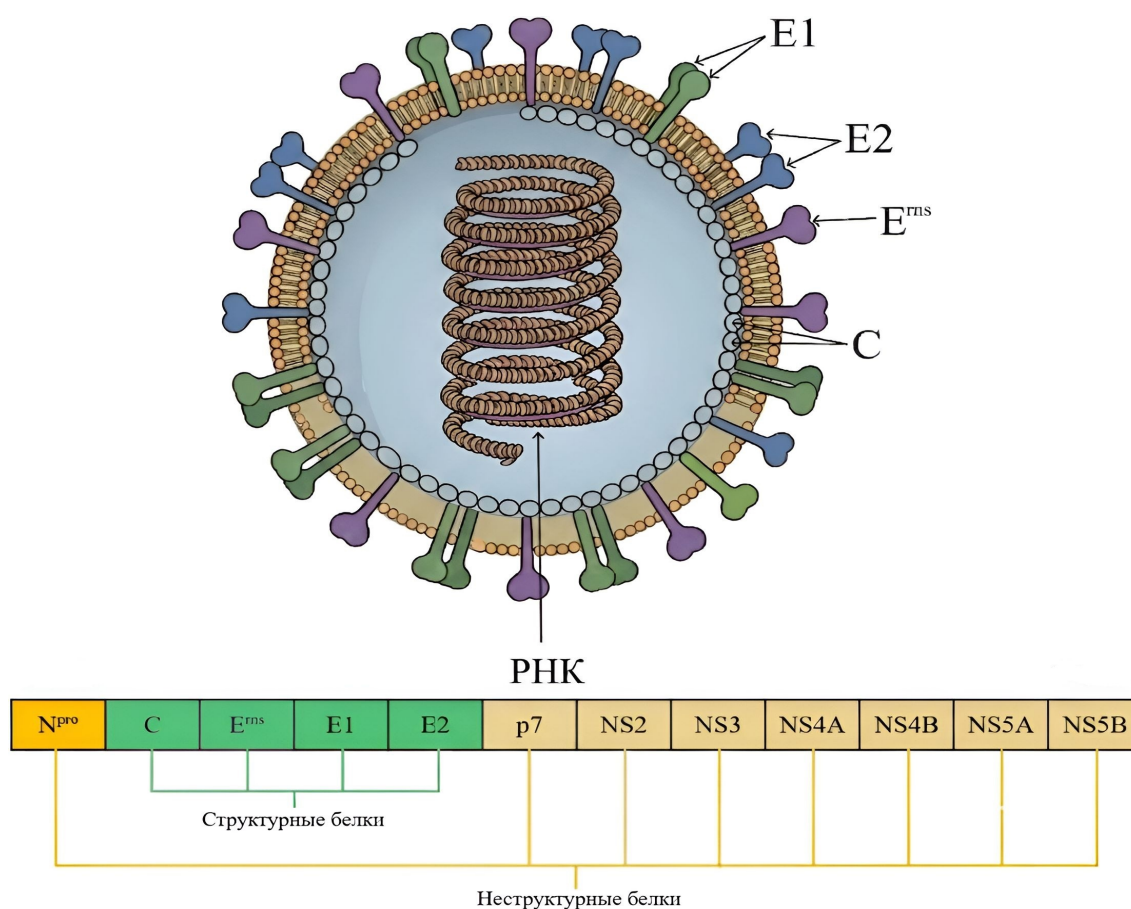


Рисунок 2 – Структура вируса КЧС. *Примечание: внизу рисунка представлена структура открытой рамки считывания, кодирующей полипротеин-предшественник. Иллюстрирование выполняли в графическом редакторе Microsoft Paint 3D.*

Капсидный (корový) белок С играет роль гистона, упаковывающего геномную РНК и нейтрализующего её заряд. Вирусные частицы, полученные методами обратной генетики и лишённые белка С, обладали инфекционной активностью [88, 261].

Гликопротеин Егns, состоящий из 227 аминокислот с молекулярной массой около 26 кДа, представлен гомодимером и содержит трансмембранный домен, образуя спираль на С-конце, что обеспечивает прикрепление вируса к клеткам-хозяина при взаимодействии его с гликозаминогликанами [64, 74, 181, 183, 259]. Также гликопротеин Егns обладает рибонуклеазной активностью, что является крайне важным фактором для репликации генома вируса и регуляции синтеза РНК в инфицированных клетках с возможностью индукции апоптоза [74, 174]. Кроме того, доказана функция подавления белком Егns синтеза интерферонов I типа (α и β), что может снижать распознавание инфицированных клеток иммунной системой хозяина [247, 266].

Следующим белком является гликопротеин Е1, который состоит из 195 аминокислот, включая N-концевой поверхностный и С-концевой гидрофобный трансмембранный домены с полицистеиновым фрагментом [74, 139]. Е1 образует с белком Е2 дисульфидные гетеродимеры, за счёт которых происходит проникновение вируса в клетки-мишени [87, 254].

Основным структурным белком вируса КЧС является гликопротеин Е2 массой около 55 кДа, состоящий из 373 аминокислотных остатков и образующий как гомодимеры, так и гетеродимеры с Е1 [74, 87]. В своей структуре имеет N-концевой сигнальный пептид и гидрофобный трансмембранный домен в С-концевой области, благодаря которому все гетеродимеры вириона закрепляются в суперкапсиде [74]. Е2 отвечает за адсорбцию вируса на поверхности клеток-мишеней, соответственно именно к его эпитопам образуются вируснейтрализующие антитела. По последовательности гена данного белка также проводят генотипирование, определяют вирулентность и тропизм вируса КЧС [19, 34, 70].

Неструктурный белок N^{pro} состоит из 168 аминокислотных остатков и выполняет функцию ингибции апоптоза инфицированных клеток хозяина, что в последующем приводит к торможению клеточного иммунного ответа и как следствие продолжению репродукции вируса КЧС в организме животного [74, 191, 265].

Трансмембранный гидрофобный полипептид p7 имеет в своем строении С-концевую спираль, которая обеспечивает рН-зависимое образование пор в мембране. Данный белок наравне с Е2 является фактором вирулентности вируса КЧС [74, 104].

Неструктурный белок NS2 размером около 450 аминокислот обладает протеазной активностью [74, 205]. После расщепления полипротеина представлен комплексом-предшественником NS2-3, который под влиянием аутопротеолиза ферментируется с образованием белков NS2 и NS3 [104, 205].

Неструктурный белок NS3 содержит в своей структуре N-концевой (сериновая протеаза) и С-концевой домены. Последний выполняет функцию хеликазы и фосфорилазы, играет важнейшую роль в репликации вирусного генома [74, 253]. Кроме того, установлено, что белок NS3 ответственен за сборку капсида [261].

Гидрофобный белок NS4A имеет в своем строении также N-концевой домен, соединенный с N-концом белка NS3, и С-концевой участок, ответственный за катализ NS3, что, в свою очередь, необходимо для фолдинга («сворачивания») вирусной репликазы [63, 104, 205]. Гидрофобный белок NS4B состоит из 550 аминокислотных остатков и локализуется на внутриклеточных мембранах органелл, содержит два консервативных домена [74, 80]. NS4B обладает фосфорилазной активностью и главным образом определяет отсутствие цитопатического эффекта у вируса КЧС [80, 104].

Функция неструктурного белка NS5A сводится к связыванию NS5B с 3'-UTR, что регулирует репликацию вирусной РНК [99, 100, 173]. NS5B является ключевым ферментом репликации генома вируса КЧС, т.е. РНК-зависимой РНК-полимеразой [104, 173, 188, 253].

Стоит обратить внимание, что антитела в организме свиней могут вырабатываться только на три белка вируса КЧС – E2, E^{ms} и NS3 [38, 155].

Репродукционный (инфекционный) цикл. За счет ассоциации белка E^{ms} с мукополисахаридами (как правило, гепарансульфатом) происходит первичное взаимодействие вируса КЧС с клеткой-мишенью, после чего гомодимер E2 связывается с поверхностными гликопротеинами клетки. В результате этого образуется гетеродимер E2-E1, который прикрепляется к специфическим рецепторам, что обеспечивает адсорбцию вируса на цитоплазматической мембране клетки. Вследствие клатрин-зависимого эндоцитоза вирусная частица транспортируется в клетку внутри эндосомы. Впоследствии суперкапсид вириона сливается с мембраной эндосомы, а капсид диффундирует в цитоплазму [79, 87, 136]. После разрушения кора высвобождается вирусная РНК, которая транслируется на рибосомах [104].

В связи с тем, что в 5'-UTR вируса КЧС имеется внутренний сайт связывания с рибосомами (IRES, так называемый «псевдоузел»), происходит инициация трансляции. В результате образуется полипротеин-предшественник [1, 215]. За счет протеаз как вирусного, так и клеточного происхождения, происходит расщепление белка-предшественника на структурные и неструктурные протеины [1, 235]. Протеазы клетки хозяина расщепляют N^{pro}, затем – белки C, E^{ms}, E1, E2, E2, p7 и NS2-3 [104, 234]. После чего NS2-3 распадается на NS2 и NS3 за счет аутопротеолиза [188, 256]. Благодаря сериновым протеазам белка NS3 происходит гидролиз пептидных связей и расщепление NS4A, NS4B, NS5A и NS5B [253]. Репликация происходит с 3'-UTR. В начале образуется РНК отрицательной полярности, на матрице которой с помощью полимеразы NS5B синтезируется экпированная РНК, составляющая геном вируса КЧС (Рисунок 3) [1, 104].

Таким образом, структурные белки участвуют в прикреплении и проникновении вируса в клетку-мишень, однако вируснейтрализующие антитела вырабатываются только к гликопротеину E2, в результате чего его рекомбинантные формы применяются при разработке субъединичных вакцин

и ИФА-тест-систем. Способностью к иммунологическим реакциям также обладают NS3 и E^{ms}, что указывает на перспективы использования их рекомбинантных форм для создания дифференцирующих ИФА-тест-систем при применении маркированных вакцин [1, 104, 253].

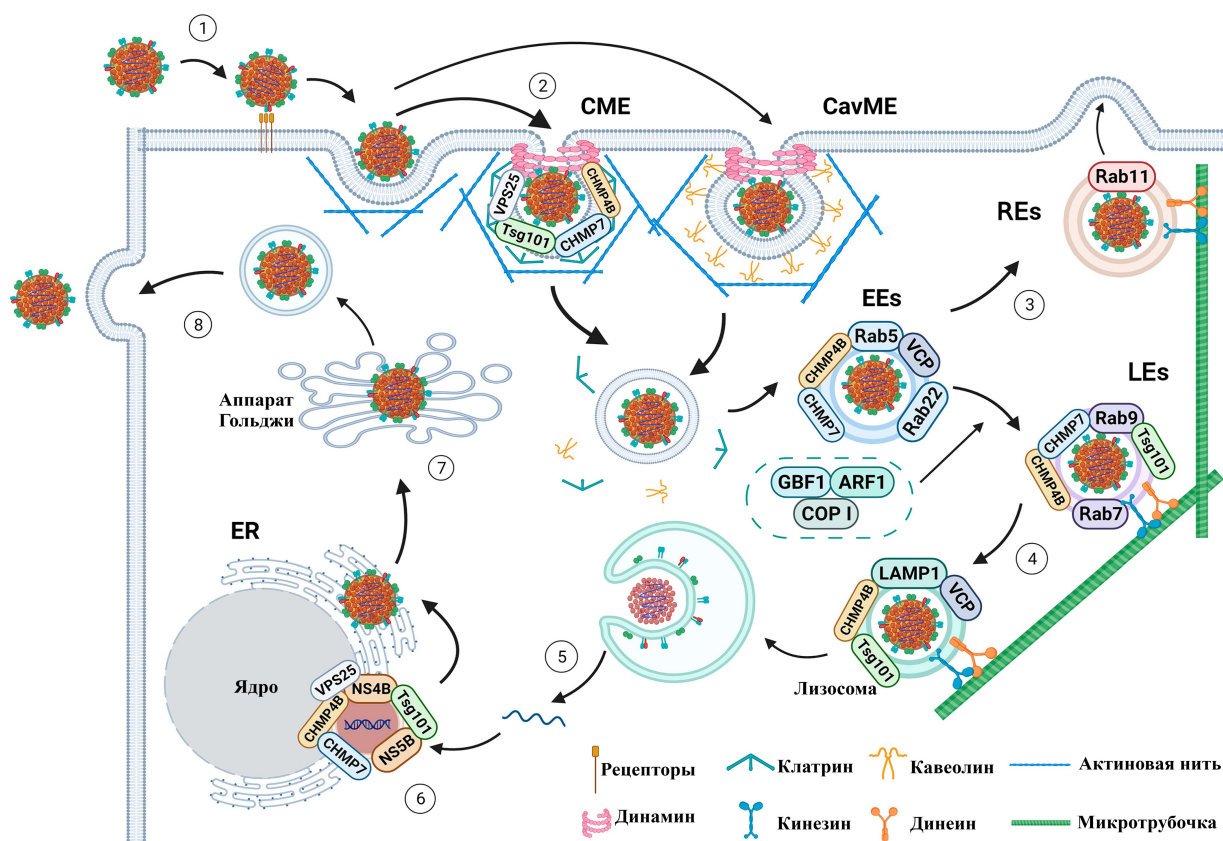


Рисунок 3 – Репродукционный цикл вируса КЧС [74].

Генетическое разнообразие. Для вируса КЧС характерен высокий темп мутаций со скоростью $1,03 \times 10^{-4}$ замен/сайт/год [267]. В зависимости от филогенетической принадлежности (по Lowings Р. с соавт., 1996 г., с дополнениями) классифицируют три генотипа и 14 субгенотипов вируса КЧС (1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 3.2, 3.3 и 3.4) [90, 104, 216]. Вирулентность штаммов генотипов 3 и 2 в целом оценивается как «умеренная». Среди штаммов генотипа 1 выделяют высоко- и низковирулентные, а также вакцинные штаммы [95]. Более того, субгенотип 2.1 подразделяется на четыре основные клады: 2.1a, 2.1b, 2.1c и 2.1d. Стоит сказать, что 2.1d топологически является кластером, включающим несколько субклад внутри обширной клады 2.1b [111]. Некоторые исследователи

выделяли дополнительные клады внутри субгенотипа 2.1 (i, h, g, e, f), однако впоследствии они не подтвердились в качестве самостоятельных единиц [111, 117]. Кроме того, многочисленные реклассификации генотипов вируса КЧС в настоящий момент используются локально, но не применяются в мировой практике [113, 245]. Более подробная характеристика субгенотипов вируса КЧС представлена в *разделе 3.5* диссертации.

Устойчивость вируса. Возбудитель КЧС относительно устойчив к факторам окружающей среды. Ультрафиолетовые лучи полностью инактивируют вирус за 2 ч, солнечный свет – за 5 дней. В разлагающихся трупах, фекалиях свиней вирус теряет инфекционную активность через 3-5 суток, в почве – через 7-14 суток, в солонине сохраняется до 10 месяцев, а в замороженном мясе – до 4,5 лет. До 90 суток инфекционно-активный вирус способен сохраняться в продукции свиноводства, не прошедшей должную термическую обработку [2, 6, 55, 159].

При отсутствии дезинфекции вирус КЧС не теряет своей инфекционной активности на поверхностях свиноводческих помещений в течение года. В сыворотке крови больных свиней при 37 °С активность вируса сохраняется в течение 11 суток. К действию высоких температур вирус неустойчив, инаktivация его происходит при: 60 °С в течение 30 мин, 65 °С – 10 мин, 70 °С – 5 мин, 80 °С – 2 мин, 90 °С – 1 мин, 100 °С – мгновенно [10, 138]. К химическим факторам (дезинфицирующим средствам) вирус также неустойчив: 5-10 % раствор хлорной извести инактивирует его за 2 ч; 1,0 – 2,5 % раствор едкого натра – за 1 ч; зольный щелок – за 2 ч; 5% раствор фенола, 2 % формальдегид, 15-20 % гашеная известь и 3-6 % креоловое молоко – за 1 ч. В настоящее время имеется большое количество комплексных дезинфицирующих препаратов, позволяющих эффективно устранять контаминацию вирусом КЧС и проводить все виды/формы дезинфекции на свиноводческих предприятиях и в ЛПХ [2, 6, 55].

Устойчив вирус КЧС к действию низких температур: при 4 °С сохраняет свою инфекционную активность в биологическом материале до 6 месяцев, при

минус 70 °С и в лиофилизированном состоянии – до 10 лет с минимальным уменьшением титра [2, 6, 55, 138].

1.4 Эпизоотологические особенности

К заражению вирусом КЧС восприимчивы представители семейства *Suidae*, преимущественно домашние свиньи (*Sus scrofa domesticus*) и дикие кабаны (*Sus scrofa scrofa*) независимо от возраста, пола и породы [104, 151, 180]. Наибольшей устойчивостью обладают новорожденные поросята, полученные от вакцинированных/переболевших свиноматок, что связано с наличием у них колостральных антител, которые сохраняются в сыворотке крови от одного до трех месяцев после рождения [26, 68]. Известно, что африканские бородавочники (*Phacochoerus africanus*) и речные свиньи (*Potamochoerus larvatus*) также могут поддерживать репродукцию вируса КЧС. Однако у них наблюдается бессимптомное течение и продолжительное вирусоносительство [158]. Вирус КЧС непатогенен для животных других видов и человека. Исключением являются лабораторные животные, к которым вирус был адаптирован путем серии пассажей с целью создания вакцин. Так, в 1936 г. Н.Ф. Гамалея и М.В. Нестеров адаптировали вирус КЧС к репродукции в организме кроликов, установив снижение его вирулентности для свиней. Позже Chuyton, Mistral и Dubreuil провели подобные опыты на морских свинках. Проводились эксперименты на овцах и козах (1953 г. Арапетян), ежах (Н.В. Лихачев и Е.И. Квасников), однако адаптации вируса КЧС не наблюдали. Экспериментальные опыты по подкожному введению вируса КЧС человеку (1932 г., Nicolle и Balozet) показали отсутствие у него клинических признаков, однако по истечению пяти дней выявилась виремия, подтвержденная биопробой на подсвинках, у которых зарегистрированы болезнь на 4-5 день и падеж - на 19-24 день после заражения [2, 6].

Сезонность для данной болезни не характерна [55]. КЧС чаще всего распространяется в форме эпизоотий, но описаны и спорадические случаи [77, 104].

Инкубационный период болезни составляет от четырех до семи суток при остром течении, при подостром и хроническом может достигать 15 суток, что зависит от множества факторов (вирулентности штамма, иммунного статуса и резистентности животного, зоогигиенических условий, способа и дозы заражения) [10, 38].

Источником возбудителя КЧС являются больные свиньи и вирусоносители, выделяющие патоген с экскретами и секретами. Вирусоносительство продолжается до десяти месяцев, а по некоторым наблюдениям – до нескольких лет, что может обеспечивать стационарность болезни [32].

Для КЧС характерны как вертикальные, так и горизонтальные пути передачи. Чаще наблюдается алиментарное и контактное заражение, реже – трансплацентарное и ятрогенное [10, 81]. Последний из перечисленных путей наиболее наглядно стал фактором эпизоотии КЧС в конце 1990-х гг. в Нидерландах при искусственном осеменении большого количества свиноматок, т.к. вирус способен длительно персистировать в тестикулах хряков (до 120 дней) и выделяться со спермой (до 63 дней) [1].

Факторами передачи могут служить любые предметы, контаминированные вирусом (фомиты: предметы ухода за животными, кормушки, поилки, шприцы, специализированная одежда и обувь персонала, а также подстилка, корма, продукты убоя, трупы, необезвреженные мясные боенские отходы) [10]. Также было доказано, что в распространении КЧС участвуют и некоторые механические переносчики из отряда *Diptera*: комары (в основном представители родов *Aedes*, *Anopheles*, *Psorophora*, *Culex*), слепни (род *Tabanus* виды *Tabanus lineola Fabricius* и *Tabanus quinquevittatus Wiedemann*), мухи (род *Muscidae* виды *Musca domestica* и *Stomoxys calcitrans*), а также – домашние и дикие животные [2, 269, 270].

1.5 Патогенез

Вирус КЧС обладает тропизмом к лимфоидной ткани, эндотелиальным, лимфоретикулярным клеткам, а также к макрофагам и некоторым типам эпителиоцитов [1, 55, 103]. При заражении свиней первичная репродукция вируса КЧС начинается в миндалинах вне зависимости от путей проникновения. Затем вирус через лимфатические сосуды мигрирует в регионарные лимфоузлы [103, 104]. Накопление вируса в иммунных клетках животного по истечению 10-20 ч с момента заражения приводит к виремии, которая длится от одного до двух месяцев [55, 104]. Распространение вируса КЧС с кровотоком приводит к его вторичной локализации: в паренхиматозных органах, костном мозге, висцеральных лимфатических узлах, лимфоидных образованиях слизистой оболочки органов пищеварительной и дыхательной систем [55, 103]. Репродукция вируса КЧС в лимфоцитах приводит к их апоптозу еще до начала виремии, что влечет за собой атрофию лимфоидной ткани и иммунодефицит [6, 55, 101, 103]. Кроме того, происходит истощение костного мозга и как следствие нарушение миелопоэза и мегакариопоэза, наблюдаются апоптоз тимоцитов и атрофия тимуса, гранулоцитопения. При остром течении болезни также ярко выражены лимфопения и тромбоцитопения [101, 103].

Длительная перманентная виремия приводит к систематическому инфицированию эндотелиоцитов и их некрозу, что повышает проницаемость стенок кровеносных сосудов, из-за чего образуются множественные кровоизлияния в слизистых и серозных оболочках, коже и паренхиматозных органах. Тромбоз сосудов селезенки приводит к формированию субкапсулярных «краевых» геморрагических инфарктов [55, 103].

1.6 Клинико-патологоанатомическая картина

Клинические признаки КЧС зависят от ряда факторов, основной из которых – течение болезни. Для КЧС характерны острое, подострое, хроническое и атипичное течения [2, 10, 195].

Острое течение болезни, которое сопровождается септической формой, могут вызывать как высоковирулентные, так и умеренно-вирулентные штаммы вируса КЧС [101]. В данном случае у животных регистрируется лихорадка постоянного типа (повышение температуры тела выше 41 °С, которая длится на протяжении всей болезни), угнетение общего состояния, истощение, диарея, приводящая к обезвоживанию, катарально-гнойный конъюнктивит и ринит [26, 55, 104, 106, 195]. У супоросных свиноматок наблюдаются аборт [10, 55]. Часто возникают (обычно к 10-14 суткам после заражения) пустулы и петехии в коже, особенно в области ушей, хвоста, живота и на внутренней поверхности бедер [2, 10, 26, 195]. Также развивается гиперемия кожи, переходящая в цианоз [2, 6]. Возможны и признаки поражения центральной нервной системы, что сопровождается судорогами отдельных групп мышц, атаксией, круговыми (манежными) движениями, парезом и параличом тазовых конечностей [10, 104, 106]. Острое течение обычно заканчивается смертельно через 7-10 (реже 14) дней после заражения. Летальность может достигать до 100 % [10, 101, 195].

Подострое течение болезни возникает при заражении свиней умеренно-вирулентными штаммами вируса КЧС [10, 106]. Начальные признаки схожи с таковыми при остром течении, однако может регистрироваться лихорадка перемежающегося (интермиттирующего) типа [104, 195]. При подостром и хроническом течениях КЧС свойственно развитие вторичных бактериальных болезней: пастереллеза, сальмонеллеза, гемофильного полисерозита и других [2, 26, 195]. Чаще всего КЧС осложняется пастереллезом. При этом отмечают клинические признаки фибринозной пневмонии: кашель, одышку, болезненность грудной клетки, истечения из носа. При нарушениях дыхания свиньи могут принимать позу «сидячей собаки» [6, 55, 195]. Более того, регистрируют случаи осложнения КЧС сальмонеллезом, что сопровождается болезненной дефекацией, изнурительной диареей, снижением аппетита и истощением [2, 6, 55]. Подострое течение болезни обычно длится до трех недель, летальность

составляет от 30 до 60 %, у переболевших животных формируется пожизненный иммунитет [6, 10, 101].

Хроническое течение болезни продолжается до нескольких месяцев, чаще заканчивается смертью, переболевшие животные долгое время остаются вирусоносителями [10, 26, 151, 195]. Хроническое течение свойственно пороссятам и подсвинкам, у которых наблюдается мацерация кожи, гангрена хвоста и ушных раковин [2, 55, 151]. У супоросных свиноматок регистрируется нарушение репродуктивной функции (аборты и мертворождение) [10, 55].

При атипичном течении регистрируют персистирующую («ползучую») форму при циркуляции низковирулентного варианта вируса КЧС внутри популяции/хозяйства. Данная форма чаще регистрируется среди поросят-сосунов, зараженных внутриутробно или в первые часы жизни. У таких поросят отсутствуют клинические признаки КЧС, но они выделяют вирус в течение нескольких месяцев [2, 6, 101, 104, 230]. Симптомы при персистирующей форме могут начать проявляться в период отъема, отмечают угнетение и дерматит [2, 55, 101]. Вследствие иммуносупрессии у инфицированных поросят часто регистрируют признаки вторичных бактериальных и вирусных болезней [101, 195].

Патологоанатомические изменения при КЧС обычно характеризуются гиперемией и цианозом кожи, генерализованным геморрагическим лимфаденитом, треугольными (клиновидными) геморрагическими инфарктами под капсулой селезенки, обращенных основаниями к её краям, крупноточечными кровоизлияниями в слизистых оболочках различных органов (Рисунок 4) [27]. Следует отметить, что селезенка при КЧС обычно не увеличена и анемична, что принципиально отличается от проявления АЧС.

При остром течении КЧС обнаруживаются типичные признаки геморрагического диатеза: петехии в селезенке, слизистой оболочке мочевого

и желчного пузыря, тонкой кишки и толстой кишки, в коре и лоханке почек, надгортаннике, трахее, подкожной клетчатке, под эпикардом [2, 6, 55, 202].



Рисунок 4 – Патологоанатомическая картина у свиней при экспериментальном заражении эпизоотическим штаммом вируса КЧС. *Примечание: А – гиперемия и цианоз кожи; Б - геморрагические периферические инфаркты под капсулой селезенки; В – геморрагическое воспаление лимфоузлов головы и шеи; Г – кровоизлияния в слизистую оболочку желчного пузыря. Фотографии предоставлены младшим научным сотрудником референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» Колбиным Иваном Сергеевичем.*

При подостром течении КЧС регистрируют патологоанатомические признаки вторичных бактериальных болезней. Так, при осложнении сальмонеллезом наблюдают гиперплазию лимфоидных образований кишки (солитарных фолликулов и пейеровых бляшек), катаральный или крупозный энтерит, а также все формы фибринозного колита (очаговый, диффузный, крупозный, дифтеритический). В относительно редких случаях очаги воспаления в толстой кишке подвергаются казеозному некрозу и образуют так называемые «чумные бутоны» [2, 27, 202]. При осложнении пастереллезом отмечают отёк подкожной клетчатки в области шеи и фибринозную плевропневмонию [27].

1.7 Лабораторная диагностика

Диагноз на КЧС ставится комплексно с учетом эпизоотологических данных и клинико-патологоанатомических признаков, подтверждая результатами лабораторных исследований [10].

Согласно Руководству ВОЗЖ, главе 3.9.2 «Классическая чума свиней (инфекция, вызванная вирусом классической чумы свиней)» (далее – Руководство ВОЗЖ), методы лабораторной диагностики КЧС делятся на две группы [180]:

а) прямые – используются для обнаружения возбудителя болезни (вирусовыделение в чувствительной культуре клеток), его антигена (реакция прямой иммунофлуоресценции, иммуноферментный анализ) и генома (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией);

б) непрямые – применяются для детекции специфических антител к вирусу КЧС (иммуноферментный анализ и реакция нейтрализации).

Аспекты применения прямых и непрямых методов диагностики КЧС приведены в Руководстве ВОЗЖ (Таблица 1).

Вирусовыделение (В/В) в культурах клеток является одним из референтных методов диагностики, рекомендованных ВОЗЖ [32, 180]. Сущность метода заключается в выявлении репродукции вируса в перmissive культурах клеток, таких как перевиваемая линия клеток почки поросенка (РК-15), первично-трипсинизированная культура клеток тестикул свиньи (ТС). По причине отсутствия видимого цитопатического действия у вируса КЧС необходимо использовать дополнительные методы идентификации репродукции. В качестве таких методов применяют иммунопероксидазный тест, реакцию прямой иммунофлуоресценции и полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией [32, 35].

Реакция прямой иммунофлуоресценции (РПИФ) является быстрым методом, используемым для выявления антигена вируса КЧС в клетках некоторых органов инфицированных животных (срезах миндалин, селезенки, почек, лимфатических узлов или подвздошной кишки) [180]. Сущность метода

закljučается в образовании комплекса «антиген-антитело» за счет добавления меченных флуорохромом антител на подготовленные мазки-отпечатки органичного материала. Большинство тестов нацелены на обнаружение гликопротеинов E2 и E^{ms} вируса КЧС [170]. При этом результаты оцениваются визуально с помощью светового инвертированного микроскопа и интерпретируются в крестах (от одного до четырёх), что зависит от интенсивности и четкости свечения, количества образованных комплексов [10, 73, 101].

Таблица 1 - Диагностические процедуры на КЧС, рекомендованные Руководством ВОЗЖ [180]

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением	Вклад в политику искоренения	Подтверждение клинических случаев	Надзор за распространением	Контроль вакцинации
Выявление возбудителя						
Вирусовыделение	-	+	-	+++	-	-
Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией	+	+++	++	+++	++	-
Иммуноферментный анализ на антиген	++	+	+	+	-	-
Реакция иммунофлуоресценции	-	-	+	+	-	-
Выявление специфических антител к вирусу *						
Иммуноферментный анализ на антитела	+++	+++	+++	-	+++	+++
Реакция нейтрализации	+	+++	++	++	+++	+++

Примечание: * - необходимо иметь в наличии диагностические методы, позволяющие дифференцировать антитела специфичные к вирусу КЧС и к другим пестивирусам.

Иммуноферментный анализ (ИФА). В диагностике КЧС ИФА применяется с 1980-х гг. и является одним из быстрых и массовых [32, 126, 189]. Сущность его заключается также в образовании комплекса «антиген-антитело». ИФА можно использовать как для выявления антител, так и для обнаружения антигена. В первом случае взаимодействие происходит с иммобилизованным на пластике рекомбинантным белком E2 или E^{ms} со специфическими антителами, содержащимися в сыворотке крови. Во втором

случае моноклональные антитела к Е2 или Е^{ms} связываются с вирусным антигеном исследуемого образца биологического материала [126, 127, 189]. Попытки использовать комплексный (цельновирионный, культуральный) антиген в постановке ИФА на КЧС оказались безуспешными. Это связано с неудовлетворительной специфичностью по причине перекрестной реакции между антителами против других пестивирусов (возбудителей ВД КРС, пограничной болезни овец и др.) в сыворотке крови свиней и антигеном вируса КЧС [180]. В связи с тем, что антитела к вирусу КЧС при заражении начинают формироваться к 10-14, а у некоторых животных к 21 дню после заражения, после чего сохраняются в сыворотке крови пожизненно, метод ИФА предпочтителен в странах, отказавшихся от применения живых вакцин или использующих маркированные вакцины (с возможностью дифференциации инфицированных от вакцинированных животных; Differentiating Infected from Vaccinated Animals (DIVA) [23, 101, 170, 180]. В настоящее время разработано множество различных вариантов ИФА-тест-систем на основе рекомбинантных белков Е2 и Е^{ms}: непрямой, прямой, конкурентный, которые применяются для диагностики болезни и контроля поствакцинального иммунного ответа [126, 128, 133, 154, 255, 285]. В СССР ИФА активно разрабатывали с конца 1980-х гг., первые опубликованные данные по использованию прямого ИФА принадлежат Ильясовой Г. Х. и Юсупову Р. Х. [17, 32]. С тех пор метод ИФА подвергался различным модификациям. Усовершенствование методологии изложено в работах Бьядовской О.П., Васильева А.П., Костиной Л.В., Решетникова Г.Г., Живодерова С.П. и Ахуновой А.Р. [3, 7, 9, 16, 25, 40].

Реакция нейтрализации (РН). С 1976 г. данный метод применяют для диагностики КЧС и контроля поствакцинального иммунного ответа. Реакция основана на нейтрализации вируса КЧС специфическими антителами, содержащимися в исследуемой сыворотке, с последующей детекцией наличия/отсутствия репродукции в чувствительной культуре клеток. В зависимости от способа идентификации репродукции различают реакцию

нейтрализации флуоресцирующих микробляшек (РНФБ, FAVN) или с детекцией иммунопероксидазным методом (NPLA) [279]. Данный способ рекомендован ВОЗЖ при дифференциации ложнопозитивных сывороток в ИФА [170, 258]. Оптимизация РН для выявления вируса КЧС и антител к нему подробно описана в работе Лыска В.М. [28].

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Молекулярно-генетический метод ПЦР, разработанный в 1983 г. Kary Banks Mullis, оказал значительное влияние на развитие лабораторной диагностики вирусных болезней, в том числе КЧС. Сущность метода заключается в амплификации и детекции специфического фрагмента генома вируса, содержащегося в исследуемых образцах [36]. До появления данного метода диагностика КЧС основывалась на серологических реакциях, которые уступали по показателям чувствительности (геном вируса можно обнаружить у зараженных свиней на двое суток раньше, чем антиген в ИФА) и специфичности (большое количество ложноположительных результатов). С началом повсеместного применения живых (немаркированных) вакцин против КЧС серодиагностика и вовсе перестала соответствовать задаче быстрого выявления инфекции у животных [118, 214]. В 1991 г. разработана первая ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией в агарозном геле для обнаружения фрагмента генома вируса КЧС. Чувствительность первых методов (10^4 ККИД₅₀/реакцию) значительно уступала современным [170, 237]. ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией при большом количестве исследуемых образцов малоэффективна в связи с трудоемкостью постановки, возможностью перекрестной контаминации [180, 237]. По этой причине для быстрого обнаружения генома используется ОТ-ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Как правило, она представлена в моноплексном или мультиплексном вариантах для обнаружения одной или нескольких мишеней соответственно [101, 129]. Предел детекции современных методов достигает 8 копий/реакцию [272].

Позднее уже стали появляться модификации ПЦР с анализом кривых плавления (DNA melting analysis, DMA) или кривых плавления высокого разрешения (High resolution melting, HRM), позволяющие различать некоторые субгенотипы вируса КЧС и группы вакцинных штаммов [58, 101, 121, 268].

В настоящее время с помощью различных модификаций ОТ-ПЦР можно различать вакцинные штаммы подгруппы 1.1 (С) от полевых изолятов. С этой целью применяется гнездовой, дуплексный и триплексный варианты реакции, включая аллельную ОТ-ПЦР-РВ с использованием различных TaqMan MGB-зондов [59, 130, 154, 238]. В Российской Федерации проблеме дифференциации вакцинных штаммов и полевых изолятов вируса КЧС посвящены работы Безбородовой С.В. и Забережного А.Д. с соавт. Для решения данной проблемы предложен метод рестрикционного анализа ПЦР-продукта, полученного в результате амплификации специфического фрагмента генома вируса КЧС [5, 133].

Изотермические методы диагностики. С начала 2000-х гг. стали широко применяться по всему миру изотермические методы диагностики КЧС в связи с меньшими затратами [124, 240].

Метод петлевой изотермической амплификации (LAMP, loop-mediated isothermal amplification) предложен в 2000-м г. Notomi с соавт. и позволяет амплифицировать целевой фрагмент генома в одной пробирке за короткий срок (75 мин) и с поддержанием установленной температурой (65°C) при использовании четырех пар праймеров и полимеразы [190]. Позже, в 2009 г. опубликовано исследование о разработке LAMP с обратной транскрипцией (RT-LAMP, reverse transcription-coupled LAMP) для диагностики КЧС. Реакция протекает в течение 60 мин при 65°C с использованием подобранных на 5'-UTR вируса КЧС праймеров и добавления красителя SYBR Green I (для последующей визуальной оценки). Данный метод обладает высокими показателями чувствительности (5 копий/реакцию) и специфичности, позволяет проводить «полевую» диагностику болезни без использования

специального лабораторного оборудования [240]. С 2010-х гг. и по настоящее время методология RT-LAMP совершенствовалась, что изложено во множестве публикаций [62, 124, 128, 271]. Несмотря на преимущества данного метода, имеется ряд недостатков: получение ложноположительных результатов в связи с повышенным риском перекрестной контаминации, сложный подбор и дизайн олигонуклеотидов (необходимо минимум четыре пары праймеров для повышения специфичности реакции), дороговизна и недоступность множества реагентов на отечественном рынке, субъективная оценка результатов (по окрашиванию или формированию осадка в пробирках) [47].

Метод количественного биолуминесцентного LAMP в режиме реального времени (LAMP-BART, Bioluminescent Assay in Real-Time) позволяет детектировать фрагмент генома вируса КЧС в реакции изотермической амплификации (непрерывно/в режиме реального времени) за счет обнаружения неорганического пирофосфата и биолуминесцентного излучения. Стоит отметить, что высвобожденные пирофосфаты пропорциональны количеству РНК в образце, что позволяет проводить как качественный, так и количественный анализ. Метод LAMP-BART сравнивали с ОТ-ПЦР-РВ и установили, что он не уступает по специфичности, является быстрым (60 мин) и простым в исполнении, однако показатели чувствительности оказались ниже на 4,4 %. Также, в отличие от «классической» LAMP, для детекции светового излучения необходимо использование специализированного лабораторного оборудования (термоциклера) [206].

Система кластерных регулярно расположенных коротких палиндромных повторов (CRISPR, Clustered regularly interspaced short palindromic repeats). В 1987 г. открыта система бактерий CRISPR, с соответствующими белками Cas, обладающая уникальной способностью к «адаптации», то есть распознаванию генома бактериофагов, с последующим кодированием коротких участков последнего в палиндромные повторы локуса CRISPR для

формирования памяти [115]. Система CRISPR-Cas подразделяется на шесть основных типов и 33 подтипа [156]. Наиболее изученной является система шестого типа (CRISPR VI), включающая Cas13a, который является в данном случае РНК-направляемой РНКазой, тем самым обуславливает расщепление вирусной РНК в присутствии направляющей бактериальной РНК, что актуализирует применение метода в молекулярной биологии, генной инженерии и терапии, позволяя проводить редактирование генома вирусов [115, 156]. В сфере диагностики КЧС опубликовано несколько сконструированных систем CRISPR-Cas9/13a, направленных как на обнаружение геномной РНК, так и на дифференциацию полевых и вакцинных штаммов [66, 114, 135]. Система CRISPR-Cas9 в работе Zhang с соавт. (2024) использовалась в целях подавления гена STAT1 при заражении вирусом КЧС клеток PK-15 и 3D4/21. В полученных клеточных линиях происходило значительное усиление аутофагии, наблюдаемое при трансмиссионной электронной микроскопии, после заражения их вирусом КЧС [114]. В другой же работе Zhang с соавт. (2022) предложена схема изотермической амплификации (при 37°C) с участием рекомбиназы (RAA), последующим расщеплением и встройкой участка РНК с помощью нуклеазы Cas13a. Детекция результатов происходила по методу SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing), обработка результатов - HUDSON (Heating Unextracted Diagnostic Samples to Obliterate Nucleases). Методология позволила различать вакцинный «С» как от вирулентного референс-штамма «Ши-Мынь», так и от вируса КЧС других субгенотипов. При этом, показаны удовлетворительные показатели специфичности и чувствительности ($3,5 \times 10^2$ копий /мкл для референс-штамма и $1,8 \times 10^2$ копий/мкл для вакцинного) [135].

Изотермические методы диагностики – перспективные кандидаты для быстрой, высокоточной и чувствительной диагностики болезней. Являясь экспресс-методами, они увеличивают потенциал реагирования на подозрительные случаи, а также подходят для рутинного мониторинга [66]. Недостатками таких методов является повышенный риск контаминации, и,

как следствие, получение ложноположительных результатов, а также более низкая чувствительность по сравнению с ОТ-ПЦР [66, 135]. Основным же формальным ограничением в использовании изотермических методов диагностики является то, что они не входят в перечень рекомендуемых диагностических процедур на КЧС, рекомендованных ВОЗЖ, и на практике при выявлении генома вируса для подтверждения диагноза образцы будут направляться в референтные центры.

Нуклеотидное секвенирование и филогенетический анализ.

Нуклеотидное секвенирование, в том числе NGS (Next Generation Sequencing, секвенирование нового поколения), с проведением филогенетического анализа позволяет точно определять нуклеотидную последовательность как определенного участка генома, так и всю его последовательность, благодаря чему возможно субгенотипирование вируса, определение экспрессии генов и темпа мутаций, функциональных особенностей белков, путей заноса и распространения вируса [105, 199, 203]. Благодаря секвенированию по методу Ф. Сэнгера в 1989 г. удалось установить принадлежность всех пестивирусов к семейству *Flaviviridae*, а не *Togaviridae*, обнаружив у представителей данного семейства одну большую рамку считывания в отличие от тоговировусов, в строении которых имеются две рамки считывания. Впоследствии открытие структурных и неструктурных белков вируса КЧС подтвердило принадлежность данного патогена именно к флавивирусам [168]. Стоит сказать, что согласно главе 1.1.5. «Молекулярная эпизоотология и генотипирование» Руководства ВОЗЖ субгенотипирование изолятов вируса КЧС является референтным методом по дифференциации вакцинных штаммов от полевых изолятов, в первую очередь для стран, использующих живые вакцины. Филогенетический анализ требует временных и финансовых затрат, он не относится к методам рутинной диагностики, но является обязательным для стран, в которых осуществляется вакцинация немаркированными препаратами [10, 180].

1.8 Специфическая профилактика

Разработка вакцин против КЧС продолжается с 1903 г. Пионерами в данной области являются De Schweinitz G.E. и Dorset M. Первые препараты не обладали безопасностью, так как содержали в своем составе вирулентный вирус, вызывающий манифестацию КЧС и продолжительное вирусоносительство у переболевших животных [2, 6].

В начале 1930-х гг. по всему миру разрабатывали вакцины, изготовленные из вируссодержащего материала (как правило, крови инфицированных свиней), инаktivированного кристаллвиолетом (реже формалином) [45, 50]. Применение инаktivированных вакцин сыграло особую роль в десятикратном сокращении вспышек КЧС на территории СССР в период с 1950-х по 1960-е гг. [50]. Хотя такие препараты защищали большую часть вакцинированных свиней от гибели, но не индуцировали полную протекцию стада от заражения вирусом и манифестации КЧС. Острое течение болезни регистрировали у 10-20 % иммунизированных животных, остающихся вирусоносителями в течение всей жизни. Стоит отметить, что высокие финансовые затраты на вакцинацию (свиньям внутримышечно и двукратно инокулировали по 5,0 см³ препарата с ревакцинацией каждые 5-11 месяцев в зависимости от возраста животного), низкая иммуногенность, сложности инаktivации и её контроля, а также неспособность вакцин вызывать длительный иммунитет и защиту от персистенции вируса сделали их неликвидными для массовой иммунизации животных. В связи с этими недостатками в 1973 г. производство инаktivированных вакцин против КЧС в СССР было прекращено [45].

С 1940-х гг. в США разрабатывали живые вакцины против КЧС путем многократного пассирования (аттенуации) вирулентного вируса субгенотипа 1.2 в организме кроликов [103]. Тем самым к середине 1950-х гг. получены лапинизированные штаммы «Rovac» и «Hudson» [249, 262].

Штамм «Hudson» не использовался для специфической профилактики КЧС в США, но был передан СССР. К 1960 г. советские ученые провели

дополнительную аттенуацию штамма на кроликах. Однако при проведении клинических испытаний живые вакцины на основе штамма «Hudson» не обладали безопасностью: в 80 % случаях у «иммунизированных» животных наблюдали клиническую картину болезни. При этом отмечали как вертикальный, так и горизонтальный пути передачи вируса, у супоросных свиноматок наблюдали аборт, у новорожденных поросят – морфологические и функциональные отклонения от нормы, тератогенное действие [33, 45]. Использование вакцин на основе данного штамма запретили, однако продолжали научные исследования по его дальнейшей аттенуации и адаптации к культуре клеток почки свиньи ППС. Так, в 1998 г. Н.К. Мищенко и К.Н. Груздевым запатентован штамм «ГМ-94» ВГНКИ с низкой реактогенностью и высокой иммуногенностью, полученный путем перемежающихся пассажей штамма «Hudson» на кроликах и ППС [33]. На сегодняшний день вакцины, содержащие в своем составе штамм «Hudson» или его производные, в России не зарегистрированы [14].

Штамм «Rovas» аттенуирован в результате проведения более 900 пассажей на кроликах. Живые вакцины на основе данного штамма повсеместно применяли в США вплоть до искоренения КЧС, так как они продемонстрировали высокую иммуногенность и безопасность [274].

В СССР в 1967-1971 гг. учеными из ВНИИВВиМ (Сергеевым В. А., Поповым В. И., Рудобельским Э. В. и Жестеревым В. И.) получен штамм «ЛК» путем пассирования низковирулентного вируса КЧС субгенотипа 1.2 в первичной и суб-культуре клеток тестикул ягнят (ТЯ) [46, 249]. С тех пор получен ряд производных вакцинных штаммов (субвариантов) вируса КЧС от «ЛК». Исходный вариант «ЛК» сейчас именуется как «ЛК-ВНИИВВиМ», который входит в состав зарегистрированного препарата «Вирусвакцина против классической чумы свиней из штамма ЛК-ВНИИВВиМ культуральная сухая» производства ФГБНУ ФИЦВиМ (Россия) [8, 14]. В 1994 г. путем клонирования штамма «ЛК» получен субвариант «ЛК-К», способный накапливаться в высоких титрах ($5,5-7,0 \lg \text{ККИД}_{50}/\text{см}^3$) в перевиваемой

культуре клеток РК-15, при этом сохраняя репродукционную стабильность более 50 пассажей [4, 53]. В период с 2005 по 2006 гг. проводили сравнительные испытания вакцин для перорального применения среди диких кабанов и доказали, что препараты на основе штамма «ЛК-К» являются более иммуногенными, чем из штамма «ЛК-ВНИИВВиМ» (титры антител составляли 1:128 и 1:4 соответственно) [41]. Также из «ЛК» получен штамм «КС» (1998 г., В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов с соавт.) [15]. К вакцинным штаммам субгенотипа 1.2, полученным в России, также относятся «Синлак» (2001 г., А.А. Гусев, А.С. Толокнов с соавт.) и производный от него «СК» (2023 г., Д.А. Бирюченков, Е. П. Баборенко с соавт.) [51, 52]. Данные варианты вируса КЧС обладают высокой иммуногенностью и протективностью (до 100 %), ареактогены для свиней, отвечают всем требованиям ВОЗЖ к вакцинным препаратам и применяются на территории России для специфической профилактики болезни в настоящее время [14, 280].

Самым известным вакцинным штаммом вируса КЧС является «С» (Chinese lapinized strain), полученный в 1963 г. учеными из Харбинского ветеринарного научно-исследовательского института (HVRI) [92, 232]. Аттenuацию выполняли путем 800 пассажей в организме кроликов изначально высоковирулентного вируса КЧС субгенотипа 1.1 [232]. Ранее считалось, что исходным вирусом для штамма «С» является вариант «Ши-Мынь», преимущественно циркулирующий в 1940-1960-е гг. в Китае, однако в дальнейшем по результатам полногеномного анализа доказано, что «С» не имеет общего предка с «Ши-Мынь» и образует отдельную группу вакцинных штаммов внутри субгенотипа 1.1 [232, 249]. Вакцины на основе штамма «С» обладают высокими показателями иммуногенности (вызывают продолжительный иммунитет на протяжении 12 месяцев), ареактогенны, являются безопасными для свиней любого возраста, а также генетически стабильны (реверсия к вирулентным свойствам за все время использования препаратов не зарегистрирована) [83, 108, 232]. В связи с тем, что получение вакцинного сырья на кроликах – трудозатратный и дорогостоящий процесс,

штамм «С» адаптировали к репродукции в различных культурах клеток свиного происхождения, наибольшую распространенность из которых приобрели SK-6 и PK-15 [140]. Впоследствии штамм «С» и его производные вошли в состав ряда живых вакцин не только в Китае, где на конец 2025 г. насчитывается 13 зарегистрированных препаратов, но и во всем мире: «Pestiffa» (Ceva-Phylaxia, Венгрия), «Suiferin C» (Hoechst Roussel Vet GmbH, Германия), «VADIMUN» (США), «Cellpest» (Польша), «Пестистоп» (ФКП «Щелковский биокомбинат», Россия) и др. [57, 83, 262].

Среди известных вакцинных штаммов также можно выделить «GRE-», полученный путем многократного пассирования в культуре клеток морской свинки низковирулентного вируса «ALD» субгенотипа 1.1 в 1969 г. учеными из Японского национального института здоровья животных (NIAH). Живые вакцины на основе штамма «GRE-» активно применяли в Японии во время первой эпизоотии КЧС (XX век), что позволило значительно сократить количество новых вспышек [57, 86, 243]. В период современной эпизоотии КЧС на территории Японии (2018-н.в.) данные вакцины также используются и обладают высокой протективностью в отношении циркулирующего умеренно-вирулентного варианта вируса субгенотипа 2.1b [231].

Во Франции в 1971 г. получен вакцинный штамм «Thiverval» субгенотипа 1.1 путем аттенуации высококовирулентного штамма «Alfort» в перевиваемой культуре клеток PK-15 [57, 137].

Также известен ряд вакцинных штаммов вируса КЧС субгенотипа 1.1, полученных во многих странах мира, основными из которых являются «LOM» (получен в 1969 г. учеными из Южной Кореи из низковирулентного штамма «Miyagi»; в 2018 г. отмечена горизонтальная передача и реверсия штамма «JJ04LOM») и «PAV-250» (разработан в Мексике в 1979 г. путем аттенуации умеренно-вирулентного штамма «CSF A»; безопасен, обладает высокой иммуногенностью, реверсия не обнаружена) [57, 160].

Стоит отметить, что в настоящий момент живые вакцины на основе вируса КЧС генотипа 2 не разработаны в мире. Хотя известно, что вакцины,

содержащие в своем составе штамм «С» не обеспечивают полную защиту свиней при контрольном заражении вирусом КЧС клады 2.1d [140].

Исходя из вышесказанного, живые аттенированные вакцины уже более 80 лет являются важным инструментом в профилактике и борьбе с КЧС. Главный недостаток таких немаркированных вакцин – отсутствие «отрицательных серологических маркеров», то есть невозможность реализации стратегии DIVA, что влечет за собой ряд торговых ограничений [23, 43, 57].

Разработка маркированных вакцин является актуальной задачей, поскольку в соответствии с главой 3.9.2 Руководства ВОЗЖ для получения официального статуса свободы от КЧС необходим отказ от иммунизации живыми вакцинами или использование препаратов, отвечающих требованиям DIVA-стратегии [23, 180, 280]. С начала 2000-х гг. активно разрабатывали маркированные вакцины, однако в настоящее время зарегистрировано лишь несколько препаратов [23, 38, 43, 96, 141, 227, 262]:

- Субъединичная «Porcilis[®] Pesti» (MSD Animal Health, Нидерланды, содержит рекомбинантный белок E2 вируса КЧС штамма «Brescia», не производится с 2009 г.);
- Субъединичная «Bayovac[®] CSF Marker» (Bayer AG, Германия, рекомбинантный E2 штамма «Alfort/187»);
- Векторная «Flc-LOM-BE^{ms}» (Южная Корея, химерный штамм «LOM» вируса КЧС, несущий участки E^{ms} и 3'-UTR возбудителя ВД КРС, оценка эффективности вакцины продолжается в настоящее время);
- Субъединичная «TWJ-E2» (TECON, Китай, рекомбинантный белок E2 штамма «С», экспрессированный в бакуловирусной системе);
- Векторная «Suvaxyn CSF» (Zoetis, Бельгия, химерный штамм «CP7» ВД КРС, несущий ген белка E2 вируса КЧС штамма «Alfort/187»);
- Субъединичная «ВЕРРЕС-КЧС-E2» (ООО «Ветбиохим», Российская Федерация, рекомбинантный белок E2, экспрессированный в бакуловирусной системе «AcNPV-8Z»);

- Субъединичная «Porvac®» (Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Camagüey, Куба, химерный белок E2-CD154, полученный путем слияния гликопротеина E2 штамма «Margarita» и внеклеточного домена белка CD154 свиньи).

Несмотря на имеющиеся зарегистрированные маркированные вакцины, данные о их масштабном применении отсутствуют в связи с некоторыми ограничениями в использовании. Доказано, что разработанные до 2018 г. препараты уступали живым вакцинам по иммуногенности и протективности. После контрольного заражения вирулентный вирус продолжал циркулировать в группе вакцинированных свиней [96, 141]. В свою очередь, субъединичные маркированные вакцины, разработанные в последние годы, по безопасности и эффективности не уступают живым вакцинам, однако экономические затраты на производство сырья (рекомбинантных белков, полученных в бакуловирусной системе экспрессии), его очистку, эмульгирование, ревакцинацию с увеличенной кратностью (через каждые 6 месяцев), снижают рентабельность таких препаратов для масштабного использования в свиноводстве [57, 227, 262]. Производство же векторных вакцин по экономическим затратам сопоставимо с живыми, поэтому их разработка и внедрение являются перспективными задачами для российской биологической промышленности.

1.9 Заключение по обзору литературы

Классическую чуму свиней более 190 лет регистрируют в большинстве стран мира. Болезнь и по сей день продолжает наносить значительный экономический ущерб свиноводству. Основные затраты приходятся на лабораторные исследования при торговле живыми животными, мясным сырьем и продукцией свиноводства, массовую вакцинацию, проведение комплекса ликвидационных мероприятий «стемпинг-аут» [21, 57, 102].

В последние же годы (с 2020 по н.в.) наблюдается нисходящий тренд развития эпизоотий КЧС во всем мире, включая Россию, однако высокая

сохранность вируса в органах и тканях инфицированных животных (особенно в замороженном состоянии) повышает риск возникновения эмерджентных случаев болезни. Главными факторами в развитии новых эпизоотий КЧС являются длительная циркуляция вируса среди неиммунизированных диких кабанов и антропогенное влияние. В случае эмерджентного заноса вируса КЧС в зону высокого риска входят хозяйства I-II компартмента (с низким уровнем биозащиты, как правило, ЛПХ) [10, 159, 180].

Ряд стран, свободных от КЧС (например, Австралия, Канада, США, страны Евросоюза и другие), добились эпизоотического благополучия, внедряя радикальные меры, включающие отказ от вакцинации, масштабные исследования по выявлению инфицированных животных, тотального убоя всех восприимчивых свиней в выявляемых очагах, усиление биозащиты хозяйств. Все это требовало больших экономических затрат [57]. Для снижения расходов используется менее радикальный подход – с усилением эпизоотологического наблюдения (надзора) и зонированием территории страны. При этом в зонах высокого риска продолжается вакцинация, а в зонах с меньшим риском от нее отказываются, постепенно увеличивая их территорию. Этот подход характерен для стран Латинской Америки (Бразилии, Колумбии и Эквадора). С другой стороны, страны Азии, Карибского бассейна и Российская Федерация применяют политику массовой иммунизации свиней живыми вакцинами преимущественно из аттенуированных лапинизированных штаммов подгрупп 1.1. (С) и 1.2 (Rovac) [10, 57, 180]. Однако использование немаркированных вакцин не соответствует требованиям ВОЗЖ по получению официального статуса благополучия по КЧС, что снижает экспортный потенциал стран [280].

Генетическое разнообразие вируса КЧС, связанное с высокой изменчивостью гена гликопротеина Е2, во многом влияет на эффективность иммунопрофилактики. Так, вакцины на основе штамма «С» не обладали протективностью при заражении свиней циркулирующим в Китае вирусом клады 2.1d [140, 163, 184].

В настоящее время иммунологические свойства маркированных вакцин против КЧС (главным образом, на основе рекомбинантного белка Е2, экспрессированного в бакуловирусной системе) сопоставимы с традиционными живыми вакцинами. Однако из-за высокой стоимости данных препаратов и необходимости разработки и использования дифференцирующих ИФА-тест-систем перспективы их применения неоднозначны [57, 227, 262].

Исходя из опыта искоренения КЧС во многих странах мира, можно сделать вывод, что зонирование территории Российской Федерации с постепенным отказом от вакцинации в зонах с наименьшим риском заноса вируса КЧС является актуальным и целесообразным подходом к получению статуса благополучия ВОЗЖ по данной болезни. Соблюдение же строгих мер биологической защиты хозяйств и использование научно-обоснованных современных методов диагностики в системе эпизоотологического мониторинга – ключевые элементы успешного надзора за КЧС в благополучных странах [23, 180, 280].

Разнообразие форм и течений болезни, недостаточность дифференцирующих клинико-патологоанатомических признаков от африканской чумы свиней представляют сложность для диагностики КЧС [10, 32, 180]. Вследствие этого окончательный диагноз ставится на основании результатов лабораторных исследований, осуществляемых прямыми и непрямыми методами, направленными на выявление вируса, его антигена, генома и специфических антител к нему [10, 180]. Непрямые методы (ИФА, РН) являются наиболее актуальными для масштабного мониторинга, однако они подходят для стран, отказавшихся от иммунизации свиней живыми вакцинами или использующих маркированные препараты. Для государств, не имеющих официального статуса благополучия ВОЗЖ по КЧС, предпочтительно использовать прямые (молекулярно-генетические: ОТ-ПЦР в различных модификациях) методы диагностики.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Данные. Использовали информационные ресурсы федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзора), ВОЗЖ, а также данные проведенных за 2020-2024 гг. лабораторных исследований, опубликованные в электронной государственной информационной системе ФГИС «ВЕТИС» (компонент «Веста»).

Вирусы и бактерии. Для работы использовали штаммы вируса КЧС, полученные в форме лиофилизированного материала из государственной и рабочей коллекций ФГБУ «ВНИИЗЖ» (ГКШМ и РКШМ, Таблица 2).

Таблица 2 – Перечень вирулентных штаммов вируса КЧС, использованных в работе

№ п/п	Название штамма вируса КЧС	Страна (регион), в которой штамм был выделен/получен	Год выделения штамма	Субгенотип
1	2	3	4	5
1	«9»	Армянская ССР	1982	1.2
2	«223»	СССР (Челябинская обл.)	1988	неизвестен
3	«238»	СССР (Владимирская обл.)	1988	1.1
4	«259»	СССР (Кемеровская обл.)	1989	2.2
5	«324»	СССР (Томская обл.)	1989	2.2
6	«275»	СССР (Томская обл.)	1989	2.2
7	«305»	СССР (Амурская обл.)	1989	неизвестен
8	«326»	СССР (Курская обл.)	1990	2.3
9	«449»	СССР (Респ. Туркмения)	1991	неизвестен
10	«582»	Россия Тульская обл.	1994	неизвестен
11	«626»	Россия Липецкая обл.	1994	неизвестен
12	«627»	Россия Тюменская обл.	1994	неизвестен
13	«579»	Россия Ставропольский край	1994	неизвестен
14	«684»	Россия (Московская обл.)	1995	1.1
15	«661»	Россия (Московская обл.)	1995	1.1
16	«664»	Россия (Белгородская обл.)	1995	1.1
17	«665»	Россия, (респ. Башкортостан)	1995	1.1
18	«716»	Россия (Новосибирская обл.)	1996	1.1
19	«702»	Россия (Калининградская обл.)	1996	1.1
20	«713»	Россия (Липецкая обл.)	1996	1.1
21	«719»	Россия (Самарская обл.)	1996	1.1
22	«742»	Россия (респ. Башкортостан)	1997	1.1

1	2	3	4	5
23	«741»	Россия (респ. Башкортостан)	1997	1.1
24	«933»	Россия (Амурская обл.)	1997	неизвестен
25	«752»	Россия (Самарская обл.)	1998	1.1
26	«760»	Россия (Волгоградская обл.)	1999	2.3
27	«805»	Россия (Владимирская обл.)	2002	1.1
28	«820»	Россия (Челябинская обл.)	2003	неизвестен
29	«840»	Россия (Тверская обл.)	2004	2.3
30	«841»	Россия (Владимирская обл.)	2005	2.3
31	«855»	Россия (Тверская обл.)	2005	2.3
32	«842»	Россия (Тверская обл.)	2005	2.3
33	«843»	Россия (Владимирская обл.)	2005	2.3
34	«867»	Россия (Московская обл.)	2006	2.3
35	«879»	Россия (Ставропольский край)	2007	неизвестен
36	«894»	Россия (Московская обл.)	2008	2.3
37	«915»	Россия (Ивановская обл.)	2010	2.3
38	«917»	Россия (Ярославская обл.)	2010	2.3
39	«908»	Россия (Волгоградская обл.)	2010	2.3
40	«918»	Россия (Смоленская обл.)	2010	2.3
41	«920»	Россия (Владимирская обл.)	2011	2.3
42	«921»	Россия (Владимирская обл.)	2011	2.3
43	«922»	Россия (Владимирская обл.)	2011	2.3
44	«924»	Россия (Владимирская обл.)	2011	2.3
45	«925»	Россия (Владимирская обл.)	2011	2.3
46	«923»	Россия (Владимирская обл.)	2011	2.3
47	«926»	Россия (Смоленская обл.)	2011	2.3
48	«927»	Россия (Волгоградская обл.)	2012	2.3
49	«929»	Россия (Саратовская обл.)	2012	2.3
50	«930»	Россия (Смоленская обл.)	2012	2.3
51	«930a	Россия (Волгоградская обл.)	2012	неизвестен
52	«CSF Tigrovoe 16/WB-634»	Россия (Приморский край)	2016	2.1
53	«CSF Amur 19-10/WB- 12555»	Россия (Амурская обл.)	2019	2.1

Примечание: респ. – республика, обл. – область.

Для валидации и апробации разработанных методов также использовали вакцинный штамм «Синлак» (субгенотип 1.2), импортированный в форме лиофилизата из ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ», и десять образцов производственных серий живых вакцин против КЧС (Таблица 3), приобретенные посредством закупки в рамках коммерческого предложения.

Таблица 3 – Перечень живых вакцин против КЧС, использованных в работе

№ п/п	Коммерческое название вакцины	Штамм в составе вакцины	Производитель (страна)	Год создания штамма	Субгено-тип
1	Swivac C	«GPE-»	Kyoritsu Seiyaku Corporation (Япония)	1969	1.1
2	COGLAPEST	«Thiverval»	Ceva-Phylaxia (Венгрия)	1973	1.1
3	Вакцина «КС» против классической чумы свиней живая культуральная сухая	«КС»	Ветбиохим (Россия)	1996	1.2
4	ВНИИЗЖ-КЧС, вакцина против классической чумы свиней живая культуральная сухая	«СК»	ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Россия)	2023	1.2
5	Вирусвакцина против классической чумы свиней из штамма ЛК-ВНИИВВиМ культуральная сухая	«ЛК-ВНИИВВиМ»	ФГБНУ ФИЦВиМ (Россия)	1971	1.2
6	PRO-VAC CSF	«LOM-850»	Komipharm (Южная Корея)	1969	1.1
7	Classical Swine Fever Vaccine, Live (Tissue Culture Origin)	«С»	SINDER HILE (Китай)	1963	1.1
8	Пестистоп	«K/SHBK»	ФКП «Щелковский биокомбинат» (Россия)	2024	1.1
9	Pestiffa	«CL»	Ceva-Phylaxia (Венгрия)	неизвестно	1.1
10	Эрипестен	«Непатогенный» штамм «С» (согласно инструкции)	Bioveta (Чехия)	неизвестно	1.1

Для валидации разработанных методов использовали гетерологичные возбудители болезней свиней, полученных в форме лиофилизированного материала из ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ»: вакцинный штамм «ВК» вируса болезни Ауески; штамм «Иркутский 2007» вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC) американского типа; референс-

штамм «Arm 07» II генотипа вируса африканской чумы свиней (АЧС). Также в работе использовали полевой изолят возбудителя рожи свиней *Erysipelothrix rhusiopathiae*, изолят «Челябинск 2021» вируса диареи крупного рогатого скота второго типа и полевой изолят атипичного пестивируса свиней, любезно предоставленные сотрудниками ФГБУ «ВНИИЗЖ» Евграфовой В.А., Кротовой А.О. и Тимановым М.В.

Исследуемые образцы. В качестве истинно положительных образцов использовали образцы селезенки, почек, печени, мышечной ткани, лимфатических узлов, крови, ороназальных и ректальных мазков, отобранные от зараженных свиней вирулентными штаммами вируса КЧС субгенотипов 1.1 и 2.1 при проведении биопробы в условиях экспериментально-биологической лаборатории по работе с животными (ЭБЛРЖ) ФГБУ «ВНИИЗЖ». Кроме того, исследовали навески контаминированного вирусом КЧС корма, полученного в помещениях ЭБЛРЖ ФГБУ «ВНИИЗЖ», где содержались инфицированные свиньи. В качестве истинно отрицательных образцов использовали биологический материал, поступивший в референтную лабораторию по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир, Россия) в рамках проведения государственного эпизоотологического мониторинга и коммерческих исследований (клинический и патологический материал от домашних свиней и диких кабанов, мясное сырье и изделия свиного происхождения, корма).

С целью апробации метода субгенотипирования при дифференциации вакцинных штаммов и полевых изолятов использовали также пять образцов крови от домашних свиней с позитивным статусом на геном вируса КЧС, поступивших в референтную лабораторию по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» при выполнении мониторинга в период с 2022 по 2025 гг.

Статус образцов (истинно положительные или истинно отрицательные) определяли в тест-системе «ID Gene Classical Swine Fever Virus Duplex» (IDvet, Франция), валидированной референтной лабораторией Европейского Союза по классической чуме свиней (г. Ганновер, Германия).

Получение и титрование вируса. Для получения первичной культуры клеток ТС использовали поросят-сосунов массой 7-9 кг в возрасте 1-1,5 месяца из благополучных по КЧС хозяйств Владимирской области. Эвтаназию свиней и отбор тестикул производили в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Вирус КЧС накапливали в культуре клеток ТС, культивируемой на среде Игла-МЕМ, приготовленной по прописи ФГБУ «ВНИИЗЖ», с добавлением 10 % фетальной сыворотки крови КРС и 50 мкг/см³ гентамицина сульфата [35]. Идентификацию репродукции вируса проводили в ОТ-ПЦР-РВ согласно методическим рекомендациям [30]. Титр вируса определяли в культурально-клеточных инфекционных дозах (ККИД₅₀/см³) при дополнительной идентификации с помощью метода РПИФ согласно методическим рекомендациям [31].

Олигонуклеотиды. Дизайн праймеров и TaqMan-зонда выполняли, исходя из литературных данных, выравнивания и анализа нуклеотидных последовательностей генома штаммов и изолятов различных пестивирусов, импортированных из базы данных GenBank, используя программы Bioedit v7.2.5. Выбор позиций с модификацией LNA осуществляли в программе OligoEvaluator, исходя из оптимального увеличения температуры отжига праймеров и гибридизации TaqMan-зонда. Праймеры и зонды, используемые в работе, синтезированы в НПО «Синтол» (Россия).

Контрольные образцы. В качестве ВКО использовали лиофилизированный материал бактериофага MS2 (производства НИЦ «Курчатовский институт», Россия), разбавленный в изотоническом (физиологическом) растворе до необходимого титра, измеряемого в бляшкообразующих единицах (БОЕ/см³).

При выборе положительных и отрицательных контрольных образцов использовали сыворотку крови крупного рогатого скота для культур клеток (БИОХИМСЕРВИС, Россия), воду свободную от нуклеаз (Евроген, Россия),

биопрепарат «ВНИИЗЖ-КЧС, вакцина против классической чумы свиней живая культуральная сухая» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия).

Пробоподготовка образцов к экстракции РНК. Каждый образец патологического материала (органов и тканей) делили стерильными ножницами на три равные части, взвешивая на весах. Масса одного образца составляла 100 мг. После чего каждую полученную пробу измельчали с использованием автоматического гомогенизатора Tissue Lyszer LT (QIAGEN, Германия). Затем к гомогенатам добавляли равное количество стерильного физиологического раствора (300 мкл на 100 мг) и получали 10 % однородную суспензию, которую впоследствии центрифугировали при 400 g в течение 2 мин. Надосадочную жидкость использовали для экстракции нуклеиновых кислот в трех повторностях.

Образцы стабилизированной крови и сыворотки животных, а также вируссодержащую суспензию культуры клеток использовали в равных количествах (по 100 мкл) для экстракции нуклеиновых кислот без предварительной пробоподготовки в трех повторностях.

К ороназальным и ректальным мазкам добавляли равное количество стерильного физиологического раствора (по 300 мкл) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем использовали смыв для экстракции РНК в трех повторностях.

Экстракцию нуклеиновых кислот проводили методом аффинной сорбции с использованием набора реагентов для выделения ДНК/РНК «РИБО-сорб» и методом преципитации с использованием набора реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкциями производителя.

С целью проведения количественной ОТ-ПЦР-РВ экстракцию РНК проводили методом «тризольного выделения». Для этого к полученной суспензии биологического материала добавляли тризол (Invitrogen, США) в соотношении 1:5 (0,2 см³ суспензии к 1,0 см³ тризола). Инкубацию проводили в течение 10 мин при комнатной температуре, затем к полученной смеси

добавляли хлороформ (Applichem, Германия) в соотношении с тризолом 1:5. Смесь перемешивали в течение 2-3 мин, центрифугировали при 12000 g 10 мин и температуре 2-8 °С. Верхнюю водную фазу отбирали в стерильные пробирки и к полученной смеси добавляли изопропанол (ЭКОС-1, Россия) в соотношении с тризолом 1:2, центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин и температуре 2-8 °С. После удаления супернатанта к осадку добавляли 1,0 см³ 70 % этилового спирта и центрифугировали 13000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли и высушивали осадок при 55 °С в течение 12 мин. Затем элюировали осадок в 50,0 мкл воды свободной от нуклеаз.

Постановка ПЦР. ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ проводили, используя компоненты реакции от НПО «Синтол» (Россия), а именно: Taq ДНК-полимеразу, обратную транскриптазу MMLV, воду деионизованную (бидистиллированную), 10X ПЦР-Буфер-Б, растворы MgCl₂ (25 мМ) и дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP, 25 Мм каждого). Кроме того, использовали реагенты от ЗАО «Евроген» (Россия): набор «OneTube RT-PCR TaqMan», воду свободную от нуклеаз, 10X Taq Turbo буфер, раствор MgCl₂ (50 Мм), смесь dNTP (10 мМ каждого), HS Taq ДНК-полимеразу, обратную транскриптазу MMLV. ОТ-ПЦР проводили на программируемом термоциклере «Mastercycler Gradient» (Eppendorf, Германия), а ОТ-ПЦР-РВ - на амплификаторе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени «Rotor-Gene Q» (QIAGEN, Германия).

Электрофорез. Детекцию продуктов амплификации ОТ-ПЦР проводили методом горизонтального электрофореза в 1,0 % агарозном геле с содержанием бромистого этидия 0,001 %. Электрофорез проводили в 1X TAE-буфере при напряжении 8 В/см длины геля и силе тока 50 мА с использованием маркера молекулярного веса Gene Ruler 1Kbp DNA Ladder Plus (ThermoFisher, США). Результаты электрофореза учитывали в гель-документирующей системе «Doc Print VX5» (Vilber Lourmat, Франция) при ультрафиолетовом излучении с длиной волны 254 нм.

Очистку ПЦР-продукта проводили с использованием набора реагентов для выделения ДНК из геля «QIAquick Gel Extraction Kit» (QIAGEN, Германия) и «Cleanup St Gel» (Евроген, Россия).

Концентрацию очищенной ДНК определяли спектрофотометрическим методом на приборе NanoDrop OneC (ThermoFisher Scientific, США).

Оценку стабильности контрольных образцов тест-системы проводили согласно ГОСТ Р 70150-2022 [12]. Для этого ВКО в течение года (каждые три месяца) при рекомендуемых условиях хранения (4°C) проверяли в ОТ-ПЦР-РВ, учет результата проводили по среднему значению C_t ($C_{t_{mean}}$) и коэффициенту вариации (CV, в %). Для определения устойчивости положительных контрольных образцов к многократному «замораживанию-оттаиванию» рассчитывали необходимое количество циклов (N), согласно комплектации тест-системы по формуле: $N = P / k + 1$, где P – число исследований, на которое рассчитана комплектация тест-системы, k – количество контрольных образцов (за исключением ВКО), которое входит в один набор тест-системы. При этом каждый цикл включал 30 мин оттаивания при 20 °C и 60 мин заморозки при температуре от минус 24 °C до минус 16 °C. Тест-систему считали стабильной, если CV не превышал 10 %.

Валидация метода качественной ОТ-ПЦР-РВ. Поскольку не существует единой методологии валидации лабораторных методов, то при определении параметров руководствовались рекомендациями, изложенными в различных источниках. В частности, при определении валидационных характеристик ОТ-ПЦР-РВ учитывали рекомендации руководства ВОЗЖ «Глава 1.1.6. Принципы и методы валидации диагностических анализов для инфекционных болезней», а также нормативную документацию ФГБУ «ВНИИЗЖ» [180]. Для определения *сходимости* (промежуточной прецизионности, повторяемости) и *воспроизводимости* (внутрилабораторной прецизионности) анализировали 20 истинно положительных на КЧС образцов в трех параллельных испытаниях в течение дня одним исследователем и в трех параллельных испытаниях в течение трех дней двумя исследователями.

Рассчитывали размах (R) и размер (δ) вариации порогового цикла амплификации (Ct). Размах вариации определяли согласно формуле: $R = Ct_{\max} - Ct_{\min}$, где $Ct_{\max}$ – максимальное полученное значение, а $Ct_{\min}$ – минимальное полученное значение. Размер вариации (среднеквадратическое отклонение) рассчитывали по формуле: $\delta = \sqrt{(\sum d_i^2)/n}$, где n – общее число повторяемых исследований, а d_i (индивидуальное линейное отклонение) = $|Ct_i - Ct_{\text{mean}}|$, Ct_i – значение Ct для одного повторяемого исследования, а Ct_{mean} – среднее значение Ct.

Проверку *аналитической специфичности* (ASp) выполняли с истинно отрицательными образцами на КЧС, содержащими экстрагированный геном гетерологичных вирусов и бактерий, а также с образцами штаммов вируса КЧС различных субгенотипов.

Для определения *диагностической чувствительности* (DSe) исследовали истинно положительные образцы, результат выражали в % (отношение образцов с «положительным» результатом, определенных валидируемым методом, к общему числу истинно положительных образцов). Показатель *диагностической специфичности* (DSp) определяли путем исследования истинно отрицательных образцов, результат выражали в % (отношение образцов с «отрицательным» результатом, определенных валидируемым методом, к общему числу истинно отрицательных образцов).

Тест-системы. Для сравнительной оценки используемых в России тест-систем на основе ОТ-ПЦР-РВ с ВКО проводили комиссионные испытания как разработанного диагностикума «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ», так и отечественных тест-систем других производителей, зашифрованных как № x1 и № x2. Главным критерием выбора тест-систем для сравнительных испытаний являлось наличие экзогенного ВКО.

Получение рекомбинантной плазмиды pJET1.2.CSFV.5'-UTR. Для получения рекомбинантной плазмиды встраивали участок генома референтного штамма «Ши-Мынь» (5'-UTR) вируса КЧС в коммерческий вектор pJET1.2.blunt (Рисунок 5) согласно руководству CloneJET PCR Cloning

Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Инсерция 5'UTR фрагмента генома вируса КЧС в плазмидный вектор pJET 1.2.blunt осуществляли по «тупым концам». Для этого на льду проводили удаление полиадениловых концов, синтезируемых Taq-полимеразой, у целевых фрагментов с использованием буфера для реакции (2X Reaction Buffer – 10,0 мкл) и корректирующего фермента ДНК (DNA Blunting Enzyme – 1,0 мкл). К смеси добавляли 500 нг ПЦР-продукта и воду, свободную от нуклеаз, до конечного объема 20,0 мкл. После встряхивания и центрифугирования (5 с, 15000 g) смесь инкубировали 5 мин при 70°C, а затем охлаждали на льду. Дополнительно в пробирки вносили 1,0 мкл вектора (pJET1.2/blunt Cloning Vector (50,0 нг/мкл) и 1 мкл T4 ДНК-лигазы. Впоследствии лигазную смесь выдерживали 14 ч при 4°C.

Полученную лигазную смесь использовали для трансформации клеток *E.coli* (штамм XL1-BLUE, Евроген, Россия) методом теплового шока. Для этого осуществляли разморозку клеток *E.coli* на льду. Добавляли к 100,0 мкл клеток 30,0 мкл лигазной смеси и инкубировали на льду в течение 20-30 мин. Тепловой шок компетентных клеток проводили при температуре 42°C в течение 35 с. Затем добавляли 400,0 мкл питательной среды LB к полученной смеси, инкубировали при температуре 37°C в течение часа и центрифугировали при 2000 g в течение 1 мин. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в 100,0 мкл питательной среды LB, вносили полученную суспензию на агар LB с 0,02 %-ным ампициллином и инкубировали при 37 °C в течение 14-16 ч. На следующий день на агаре LB появлялись клоны *E.coli*, которые отбирали бактериальной петлей в 10,0 мкл воды, свободной от нуклеаз.

Скрининг целевых клонов бактериальных клеток *E.coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды, проводили методом «ПЦР с колоний». Для этого использовали протокол, рекомендованный наставлением по применению набора «CloneJET PCR Cloning Kit» и «DreamTaq Hot Start DNA Polymerase»: 1X Taq буфер; смесь dNTP, 0,2 mM каждого; 1,5 mM MgCl₂; прямой праймер (pJET1.2 Forward Sequencing Primer) 0,4 mM; обратный праймер (pJET1.2

Reverse Sequencing Primer) 0,4 мМ; 1 ед. HS DreamTaq ДНК-полимеразы; элюат колонии – 1,0 мкл; вода свободная от нуклеаз – до 20,0 мкл. Затем осуществляли аналитический электрофорез в 1,0 % агарозном геле, содержащем 0,001 % бромистого этидия, при напряжении 8 В/см в течение 25 мин. Полученный клон, содержащий участок 5'-UTR генома вируса КЧС, показывал положительный результат в ПЦР и соответствовал размеру ампликона (212 п.н.). Затем, бактериальные клетки, содержащие рекомбинантную плазмиду, культивировали в 5,0 мл питательной среды LB с 0,02 %-ным ампициллином в течение 12 ч при температуре 37 °С. Суточную бактериальную культуру использовали для выделения плазмиды pJET1.2.CSFV.5'-UTR с использованием набора «Plasmid Miniprep 2.0» (Евроген, Россия).

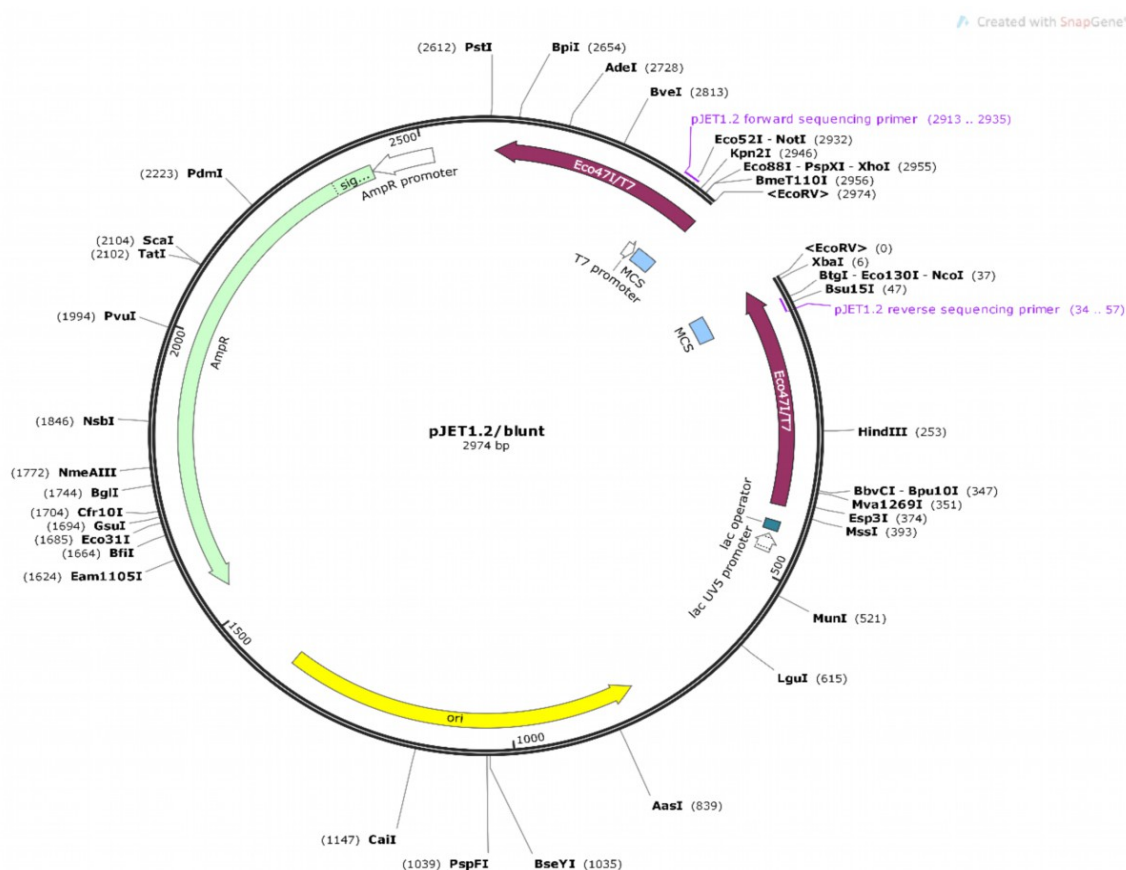


Рисунок 5. Генетическая карта вектора pJET 1.2.blunt – реципиента инсерций
Примечание: Визуализация последовательности выполнена в программе SnapGene v.5.2.1

Нуклеотидная последовательность полученной рекомбинантной плазмиды pJET1.2.CSFV.5'-UTR подтверждалась методом анализа данных секвенирования по Сэнгеру, проводимого с использованием набора «BigDye™

Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» на капиллярном ДНК-секвенаторе ABIPrism 3100 (Applied Biosystems, США). Плазмида pJET1.2.CSFV.5'-UTR соответствовала генетической карте (Рисунок 6).

Изготовление стандартов (калибраторов) для количественной ОТ-ПЦР-РВ. Плазмиду pJET1.2.CSFV.5'-UTR линеаризовали с использованием рестриктазы Pst I (FastDigest, Thermofisher, США). После рестрикции продукты разделяли методом электрофореза в 1,0 % агарозном геле, содержащем 0,001 % бромистого этидия. Электрофорез проводили при напряжении 8 В/см в течение 45 мин. Двухцепочечную линейную ДНК pJET1.2.CSFV.5'-UTR очищали из агарозного геля с использованием набора «QIAquick Gel Extraction Kit» и вычисляли концентрацию (в нг/мкл) спектрофотометрическим методом.

Синтез РНК на матрице линеаризованной плазмиды проводили методом Т-7 транскрипции с помощью набора «для проведения Т7-транскрипции *in vitro*» (Biolabmix, Россия). Очистку и переосаждение синтезированной РНК от ДНК осуществляли с помощью набора «ДНК-аза Е» (Евроген, Россия) согласно инструкции по применению.

Валидация количественной ОТ-ПЦР-РВ. При определении валидационных характеристик количественной ОТ-ПЦР-РВ учитывали руководство MIQE: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments и национальный стандарт Российской Федерации (ГОСТ Р ИСО 17822-2021) [13, 268].

Для определения *правильности* анализировали стандарты РНК с различным содержанием аналита в трех повторяемых испытаниях. Выражали правильность в виде уравнения линейной функции $y = k \times x + b$, где y – экспериментально полученное значение числа копий генома вируса КЧС (копий/мкл), x – заданное значение копий/мкл, k – угловой коэффициент, b – свободный член. При этом метод интерпретировался как «правильный», если k составлял $1 \pm 0,05$, b – 0 ± 50 [44].

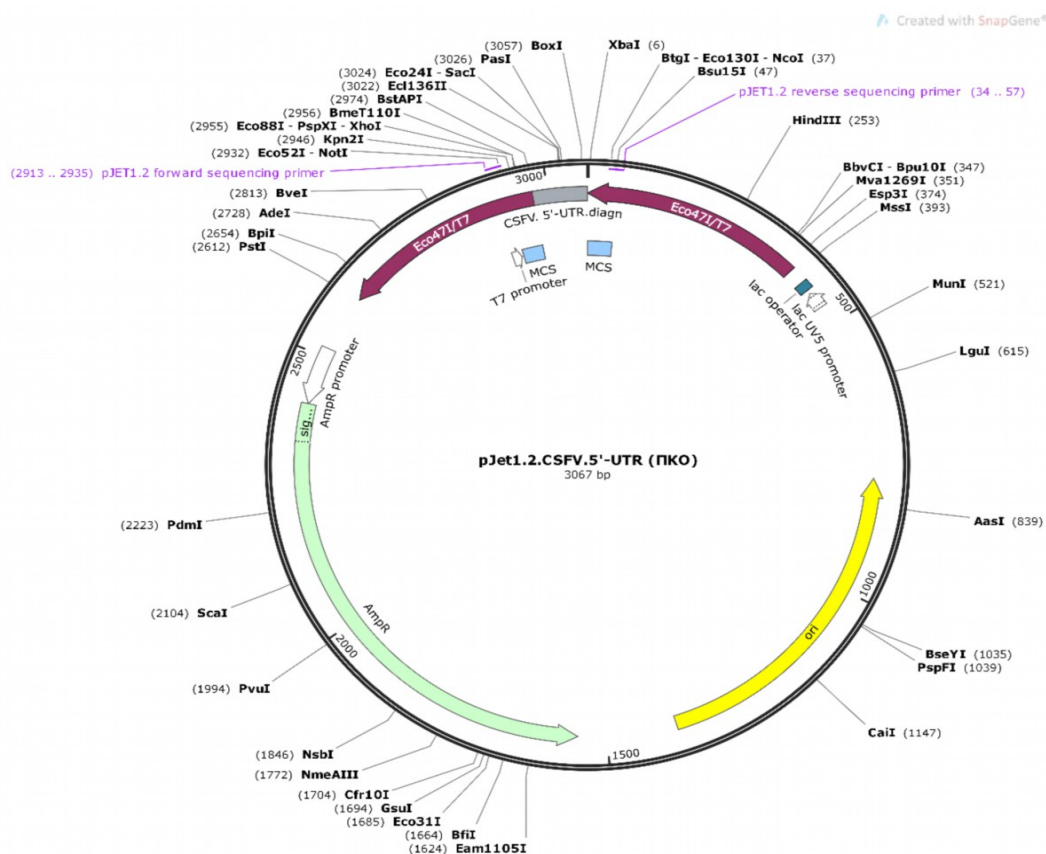


Рисунок 6. Генетическая карта рекомбинантной плазмиды pJET1.2.CSFV.5'-UTR, содержащей участок генома вируса КЧС. *Примечание: Визуализация последовательности выполнена в программе SnapGene v.5.2.1*

Для определения *прецизионности* в условии повторяемости и воспроизводимости анализировали истинно положительные на КЧС образцы в трех параллельных испытаниях в течение дня одним исследователем и в трех параллельных испытаниях в течение трех дней двумя исследователями. Для каждого образца рассчитывали среднее значение копий/мкл (C_{mean}), стандартное (среднеквадратическое) отклонение (δ), коэффициент вариации (CV) по формуле: $CV = \delta / C_{\text{mean}} \times 100 (\%)$. Результат считали «прецизионным в условии повторяемости», если $CV \leq 5 \%$, и «прецизионным в условии воспроизводимости», если $CV \leq 10 \%$ [275].

Линейность определяли в одной реакции ОТ-ПЦР-РВ при анализе истинно положительных на КЧС образцов в трех повторениях. Автоматически вычисляли коэффициент детерминации (R^2), который должен составлять $\geq 99 \%$ [8]. *Эффективность* амплификации вычисляли согласно формуле: $E = (10^{1/\text{slope}} - 1) \times 100 \%$, где slope – это значение наклона линейной области

зависимости Ct от числа копий генома вируса КЧС. Эффективность реакции должна находиться в диапазоне 78-97 % [149].

Аналитическую чувствительность вычисляли в исследованиях десятикратных разведений стандартов с различным содержанием аналита. Показатель предела детекции выражали как медианное значение копий/мкл, обнаруженное валидируемым методом, и 95 % доверительный интервал к нему (95 % ДИ).

Секвенирование по Сэнгеру. Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием наборов Big Dye Terminator Kit версия 1.1 или 3.1 (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130/3130xl (Applied Biosystems, США) согласно инструкциям производителя.

После секвенирования нуклеотидные последовательности выравнивали на референс-геном штамма «Ши-Мынь» (номер доступа в GenBank – AF092448) с помощью программы SnapGene v.5.2.1. Затем конкатенировали перекрывающиеся фрагменты в последовательность полноразмерного гена белка E2 вируса КЧС.

Множественное выравнивание. С целью выравнивания использовали последовательности изолятов и штаммов вируса КЧС, импортированные из базы данных GenBank, перечисленные в перечне (Таблица 4). После импорта референсные и исследуемые последовательности выравнивали в программе Bioedit v7.2.5 с помощью алгоритма CLUSTAL W (1000 итераций).

Филогенетический анализ. Построение дендрограммы выполняли в программе MEGA 12. Модель замен оценивали по BIC (байесовскому информационному критерию). Комбинацию с наименьшим значением BIC считали наиболее оптимальной для анализа. Использовали следующие параметры филогении: статистический метод – максимальное правдоподобие (ML, Maximum Likelihood); филогенетический тест – бутстреп-метод (Bootstrap method); репликации бутстреп (итерации) – 500. Укоренение древа выполняли «в средней точке». Субгенотип и подгруппу у исследуемого вируса

идентифицировали по его принадлежности к определенному филогенетическому кластеру, исходя из топологии древа.

Таблица 4 - Перечень штаммов и изолятов вируса КЧС, импортированных из базы данных GenBank, использованных при проведении филогенетического анализа

№ п/п	Название штамма (изолята) вируса КЧС	Страна, в которой штамм был получен	Год получения штамма	Номер доступа в GenBank
1	2	3	4	5
1	«Alfort/187»	Франция	1966	NC_038912
2	«Thiverval» (вакцинный)	Франция	1973	EU490425
3	«JJ04LOM»	Южная Корея	2004	MN558869
4	«GPE-» (вакцинный)	Япония	1969	D49533
5	«KNU-1827-1»	Южная Корея	2018	MK093250
6	«Glentorf»	Германия	1968	U45478
7	«LX/2018»	Китай	2018	OR459954
8	«Koslov»	Чехословакия	1970-е	HM237795
9	«Eustrup»	Германия	1964	AF326963
10	«C/HVRI» (вакцинный)	Китай	1963	AY805221
11	«Riems» (вакцинный)	Германия	1970-е	AY259122
12	«Shimen»	Китай	1945	AF092448
13	«CSFV/IVRI/VB-131»	Индия	2009	KM262189
14	«BRESCIAX»	США	-	AY578687
15	«Brescia»	Италия	1945	M31768
16	«Rovac» (вакцинный)	США	1940-е	KJ873238
17	«ЛК-ВНИИВВиМ» (вакцинный)	СССР	1971	KM522833
18	«KC» (вакцинный)	Россия	1996	AF099102
19	«Guatemala»	Гватемала	1982	MG655308
20	«CSFV/Margarita/1958»	Куба	1958	OR997840
21	«CSFV/CSF1058/2010/Pinar del Rio»	Куба	2010	KX576461
22	«Caucaia-2001-BR»	Бразилия	2001	KX431228*
23	«Macapa-2009-BR»	Бразилия	2009	KX431233*
24	«Peru-An-5»	Перу	2008	OM817562
25	«CSF0410 Congenital Tremor»	Великобритания	1964	JQ411575*
26	«CBR/93»	Таиланд	1993	KF771867*
27	«P97»	Китай	1996	L49347
28	«YI9908/Korea 1999»	Южная Корея	1999	KT716271
29	«JJ9811»	Южная Корея	1998	KF669877
30	«CSFV IND/UK/LAL-290»	Индия	2012	KC851953
31	«Polonuevo»	Колумбия	2017	OL963699
32	«CSFV/2.3/wb/CSFV1045/2009/Roesrath»	Германия	2009	GU233734
1	2	3	4	5
33	«Wingene»	Бельгия	1993-1994	JQ595295
34	«Paderborn»	Германия	1996	AY072924

35	«SXCDK»	Китай	2009	GQ923951
36	«UK2000 SF01»	Великобритания	2000	LC702327
37	«HNLY-2011»	Китай	2011	JX262391
38	«GXF29/2013»	Китай	2013	KP233070
39	«HLJ1»	Китай	2015	MF150641
40	«HB150309»	Китай	2015	MF150640
41	«SDWF-2016»	Китай	2016	MK211486
42	«GD317/2011»	Китай	2011	KY132096
43	«Zj0801»	Китай	2008	FJ529205
44	«HuN23/2013»	Китай	2013	KP233071
45	«HL16-205»	Китай	2016	MT799513
46	«CSFV/JPN/1/2018»	Япония	2018	LC425854
47	«CSFV/wb/Jpn-Mie/P96/2019»	Япония	2019	LC713055

Примечание: - точный год выделения штамма неизвестен. * - по причине отсутствия полногеномной последовательности вируса КЧС представлен номер доступа полноразмерной последовательности гена белка E2.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов (метод корреляционного анализа с вычислением коэффициента линейной корреляции (Пирсона, R) и детерминации (R^2)) проводили в программе Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Edition, 2003). $R \geq 0,5$ указывал на высокую положительную корреляцию двух переменных, а $R^2 \geq 0,5$ показывал удовлетворительный уровень дисперсии между двумя переменными. Уровень статистической значимости отличий (p) вычисляли по непараметрическому методу Манна-Уитни с учетом U-критерия. При этом абсолютные значения переводили в ранги автоматически. Если значения находились в «зеленой» ($p \leq 0,01$) и «серой» ($p \leq 0,05$) зоне U-критерия, то различия между выборками интерпретировали как статистически значимые (отличные друг от друга). Если значения находились в «красной» ($p > 0,05$) зоне U-критерия, то различия между выборками считали статистически незначимыми. Доверительные интервалы для биномиальной пропорции (при определении DSe и DSp) рассчитывали по методу Клоппера-Пирсона. Построение графиков выполнялось в программе GraphPad Prism.

В работе выполняли **картографирование** с помощью онлайн-платформы MapChart.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анализ результатов лабораторных исследований на КЧС, проведенных в период с 2020 по 2024 гг. в России

В России последние случаи КЧС регистрировали на территории Приморского края в популяциях домашних свиней в 2019 г. и дикого кабана в 2020 г. Несмотря на это, число исследований на КЧС, проводимых на территории Российской Федерации, не снижается от года к году. Целью исследования являлся анализ результатов лабораторных исследований на КЧС в России, опубликованных в информационной системе ФГИС «ВЕТИС» (компонент «Веста») в период с 2020 по 2024 гг., включающий определение количественных (числа, распределения по методам и регионам) и качественных (методов, целесообразности) характеристик.

Согласно данным компонента «Веста», в период с 2020 по 2024 гг. в России проведено 504 140 исследований на КЧС, большая часть от которых проведена методом ИФА (389 429 – 77,2 %), ОТ-ПЦР (114 167 – 22,6 %), в меньшей степени – РПИФ (486 – 0,1 %) и В/В (58 – 0,01 %) в 85 регионах страны (Рисунок 7). Более подробная информация о количестве проведенных исследований образцов от диких и домашних свиней на КЧС за период 2020-2024 гг. представлена в Таблице 5.

В соответствии с данными, отраженными на Рисунке 7, количество проведенных исследований на КЧС методом ИФА, направленного на выявление специфических антител, значительно выше (на 54,6 %), чем методом ОТ-ПЦР. Стоит отметить, что большинство образцов, исследованных методом ИФА, направлялись в ветеринарные лаборатории с запросом обеспечить «контроль эффективности вакцинации».

При этом за период 2020-2024 гг. получен 31 положительный результат на КЧС в ОТ-ПЦР: семь образцов, отобранных от диких кабанов на территории Приморского края в ходе последней официально

нотифицированной вспышки в 2020 г., а при исследовании 24 образцов выявлена РНК генома вируса КЧС, принадлежащие к вакцинным штаммам.

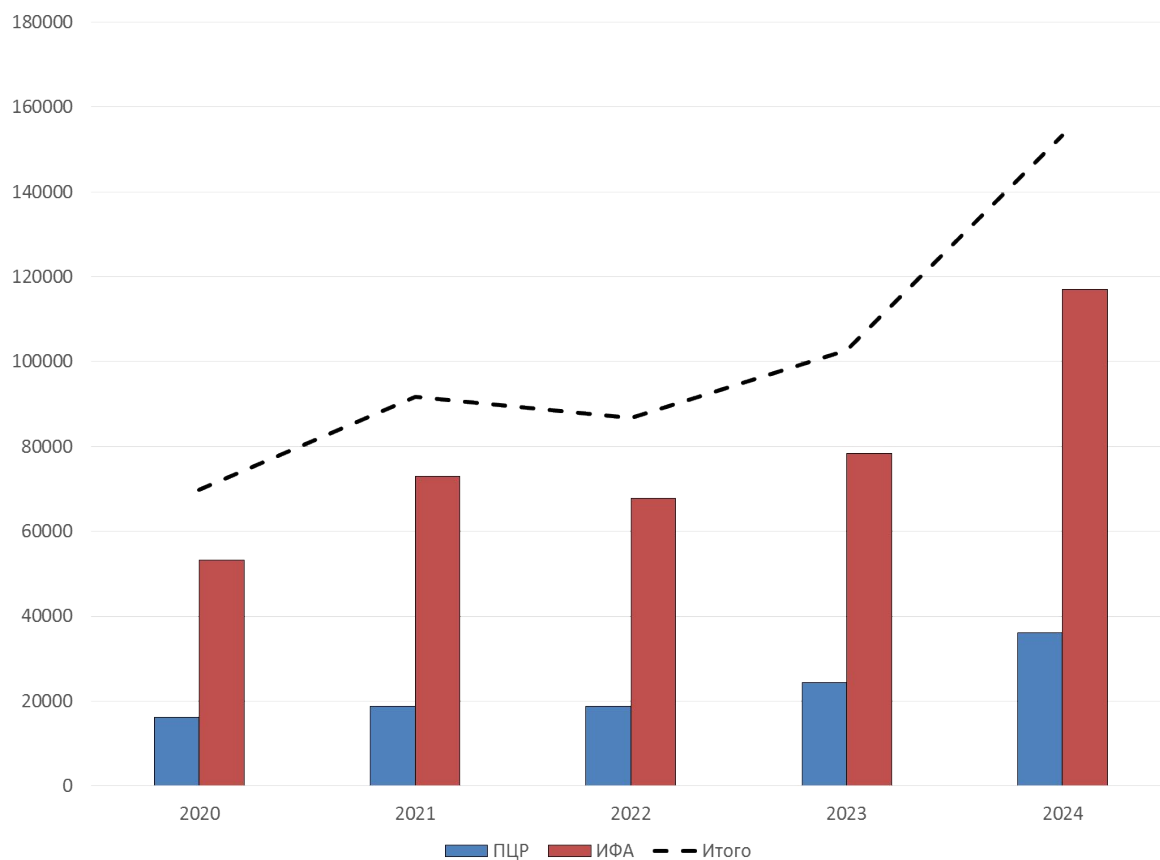


Рисунок 7 - Лабораторные исследования на КЧС методами ПЦР и ИФА проведенные в России за 2020-2024 гг. по данным ФГИС «ВЕТИС» компонент «Веста». *Примечание: Синим отображено количество исследований методом ПЦР, красным – ИФА. Данные по РПИФ и В/В не показаны.*

Таблица 5 – Результаты лабораторных исследований на КЧС, проведенных в Российской Федерации в период с 2020 по 2024 гг.

№	Год	ПЦР		РПИФ		ИФА	
		пол./кол-во проб от кабанов	пол./кол-во проб от свиней	пол./кол-во проб от кабанов	пол./кол-во проб от свиней	пол./кол-во проб от кабанов	пол. у невакцинир./кол-во проб от свиней
1	2020	7/2 893	13/13 286	0/17	0/279	0/142	0/53 187
2	2021	0/3 107	2/15 705	0/6	0/24	0/48	0/72 867
3	2022	0/2 251	3/16 518	0/0	0/0	0/12	0/67 860
4	2023	0/2 121	3/22 156	0/0	0/0	0/4	0/78 307
5	2024	0/3 040	3/33 090	0/0	0/160	0/25	0/116 977
Итого		13 412	100 755	23	463	231	389 198

Примечание: количество исследований согласно данным ФГИС «ВЕТИС» компонент «Веста». Пол. – положительный результат; невакцинир. – невакцинированные домашние свиньи.

Согласно данным ФГИС «ВЕТИС» компонент «Веста», количество проведенных исследований образцов от диких кабанов составляет всего 2,7 % от их общего числа, что обусловлено невысокими нормативными требованиями. Так, согласно п. 18 Правил отбор образцов от диких кабанов регламентирован только в регионах с неблагополучным статусом (установленных согласно требованиям регионализации) [10].

При этом лабораторные исследования образцов из дикой фауны преимущественно проводились прямыми методами (98,3 %), а доля исследований методом ИФА составила 1,7 %. Это свидетельствует о преобладании пассивного мониторинга (исследование трупов) над активным, осуществляемого в популяции диких кабанов, так как требует отстрела животных для отбора сыворотки крови.

В популяции домашних свиней наблюдается пятилетняя тенденция роста числа лабораторных исследований на КЧС. Так, в 2024 г. по сравнению с 2020 г. в 2,5 раза увеличилось число исследований молекулярно-генетическими и в 2,2 раза – серологическими методами. В ходе анализа пространственного распределения числа лабораторных исследований на КЧС, проведенных в России, выявлена прямая зависимость количества проведенных исследований (%) от численности поголовья домашних свиней в отдельных регионах страны, так, к примеру, большая часть исследований (31,130 %) на КЧС пришлась на Белгородскую (15,265 %), Воронежскую (9,079 %) и Курскую области (6,786 %), тогда как на регионы, где регистрировали последние вспышки КЧС (2016-2020 гг.), а именно Амурскую область и Приморский край, пришлось суммарно всего 1,897 % от общего числа проведенных исследований (Рисунок 8).

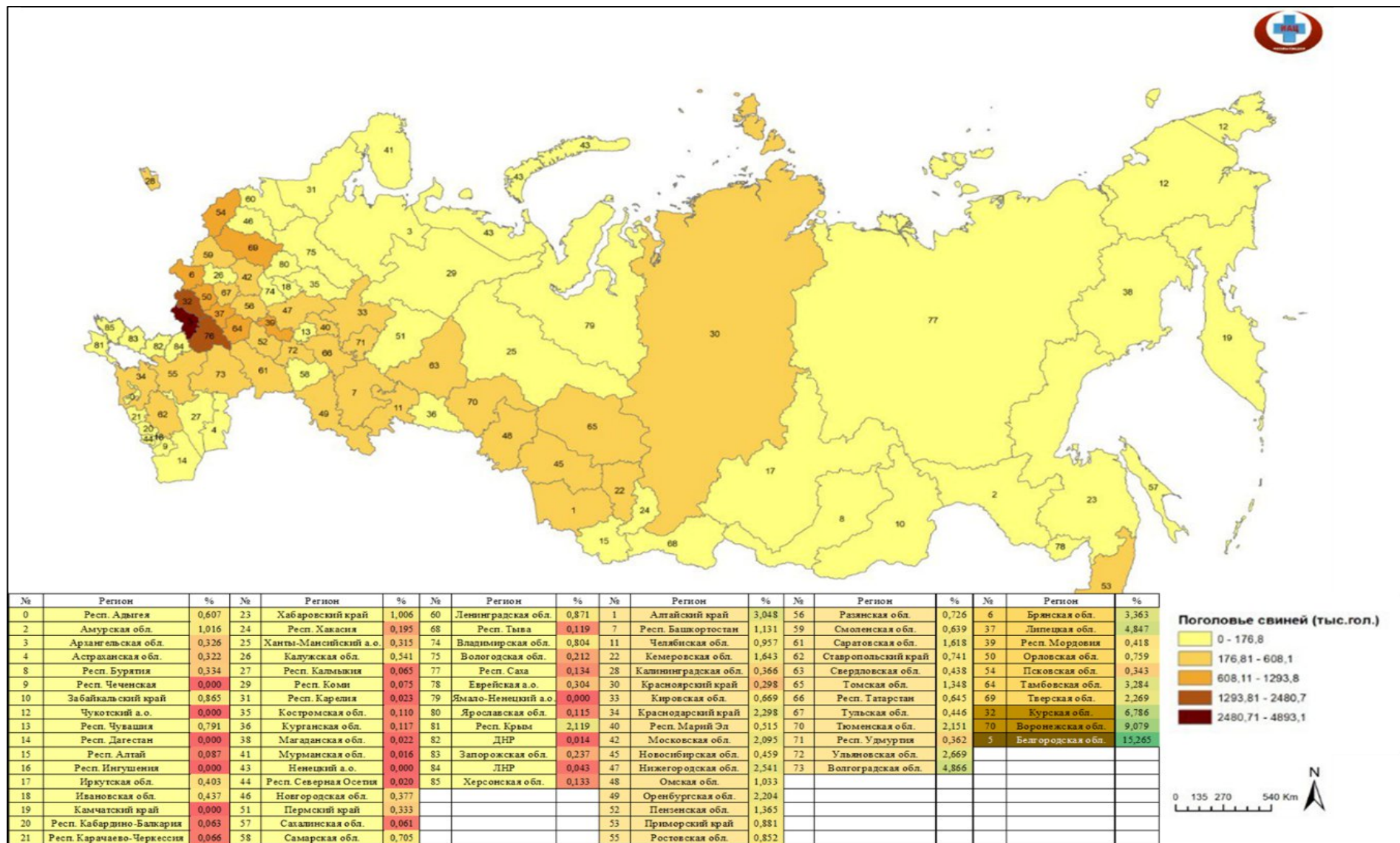


Рисунок 8 – Пространственное распределение численности поголовья домашних свиней и количества проведенных лабораторных исследований на КЧС (по данным ФГИС «ВЕТИС» компонент «Веста») в России за 2020-2024 гг.

Корреляционный анализ среднего поголовья свиней в регионах (тыс.гол./год) и среднего количества лабораторных исследований на КЧС, проведенных в данном регионе (исследований/год), за период 2020-2024 гг. показал высокую положительную корреляцию ($R = 0,88$) и удовлетворительную дисперсию между двумя переменными ($R^2 = 0,77$), уровень статистической значимости (p) составил менее 0,05 (Рисунок 9).

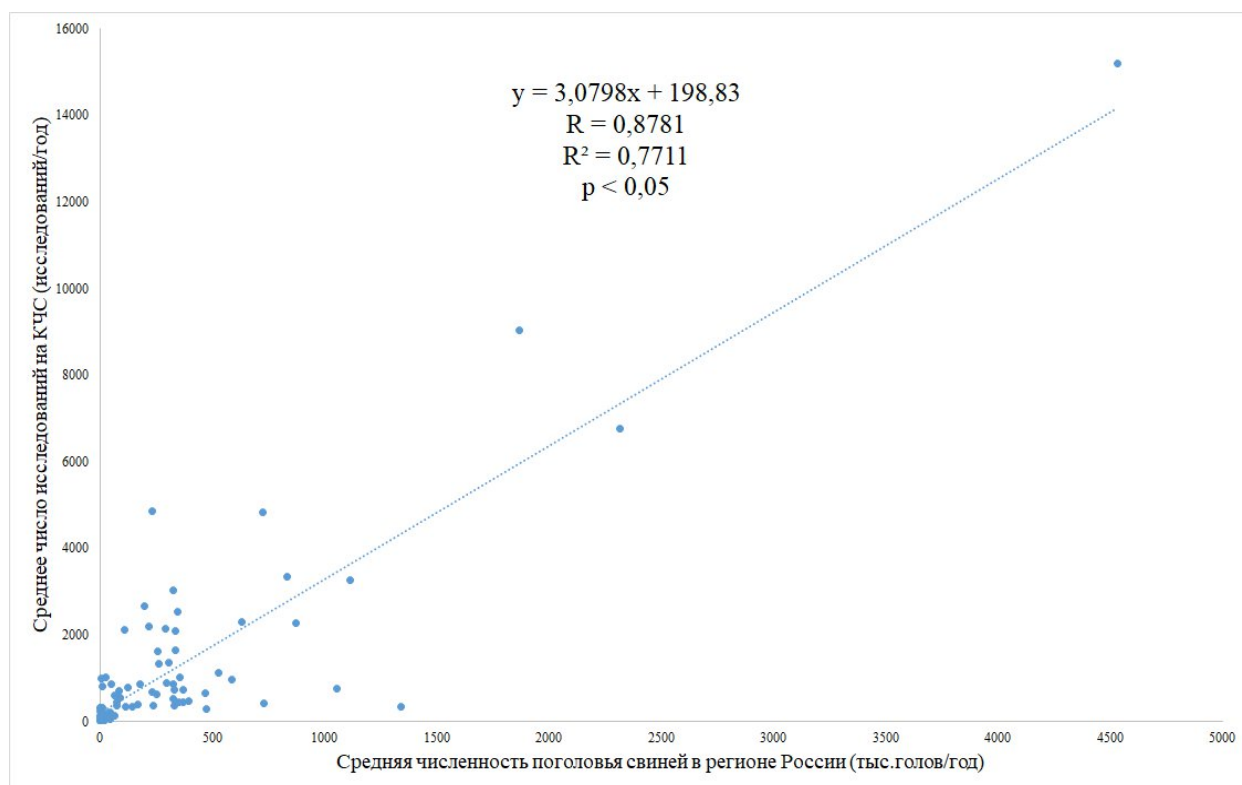


Рисунок 9 – График линейной регрессии, отображающий корреляцию между средней численностью поголовья в регионе России и средним числом лабораторных исследований на КЧС в данном регионе за период 2020-2024 гг.

Представленные цифры свидетельствуют о том, что в текущей ситуации ведущим критерием отбора проб является численность поголовья в отдельном регионе России. Однако, даже в отсутствии вспышек КЧС, усиление эпизоотологического мониторинга целесообразно проводить в субъектах с высоким риском заноса вируса (например, в дальневосточных регионах России) [21]. Перераспределение числа лабораторных исследований в пользу таких субъектов возможно в рамках государственного финансирования (федеральный и региональный эпизоотологический мониторинг), что в свою

очередь выполнимо за счет корректировки схемы лабораторной диагностики со смещением исследований в направлении прямых методов (ОТ-ПЦР).

Согласно методическим рекомендациям «по планированию лабораторных исследований и отбору проб для совершенствования эпизоотологического наблюдения за классической чумой свиней на территории Российской Федерации», рекомендованным Научно-техническим советом Минсельхоза России (протокол № 31 от 4 октября 2024 г.), приоритетными задачами эпизоотологического мониторинга (как основной составляющей системы надзора) являются:

1. раннее выявление КЧС у восприимчивых животных (для быстрого купирования и ликвидации эпизоотического очага);
2. доказательство отсутствия инфекции в хозяйстве/предприятии/районе/регионе в целях регионализации.

В свою очередь, согласно положениям Руководства ВОЗЖ, оценка эффективности вакцинопрофилактики (напряженности поствакцинального иммунного ответа) относится к контрольным, а не к надзорным мероприятиям и, как следствие, не должна реализовываться за счет целей эпизоотологического надзора. Также стоит отметить, что проведение исследований непрямыми методами диагностики КЧС не рекомендуется в странах, использующих немаркированные вакцины, к которым относится в том числе и Российская Федерация [32]. Государства, на территории которых применяются немаркированные вакцины в равной степени неблагоприятны по КЧС со странами, где регистрируют вспышки болезни. Международные рекомендации по обеспечению благополучия территорий по КЧС, задекларированные в Кодексе здоровья наземных животных, делают акцент на том, что свиньи, иммунизированные немаркированными вакцинами, эквивалентны инфицированному животному, так как подобная вакцинация может «маскировать» циркуляцию вирулентного вируса в популяции. Контроль вакцинации рекомендуется проводить только при наличии методов,

позволяющих отличить постинфекционные антитела от поствакцинальных [180].

Таким образом, в текущей эпизоотической ситуации в России мониторинг КЧС среди домашних свиней с использованием серологических методов (ИФА и РН) неинформативен и нецелесообразен, поскольку в условиях массовой вакцинации это не отвечает основной цели эпизоотологического надзора – раннему выявлению инфекции у животных.

В связи с этим разработка и валидация ПЦР-тест-систем является приоритетной задачей для проведения эпизоотологического мониторинга КЧС на территории Российской Федерации.

3.2 Разработка, валидация и апробация тест-системы по выявлению генома вируса КЧС методом ОТ-ПЦР-РВ

В настоящее время ПЦР широко используется как один из самых быстрых, специфичных и чувствительных методов в молекулярной биологии, нацеленный на обнаружение генома возбудителей инфекционных болезней животных [213]. Однако метод ПЦР с электрофоретической детекцией – долгий и трудоёмкий, несущий высокий риск перекрестной контаминации. Для диагностики КЧС в системе эпизоотологического мониторинга наиболее подходит ОТ-ПЦР-РВ с ВКО, снижающая вероятность недостоверных результатов [134]. В связи с этим цель данного исследования заключалась в разработке, валидации и апробации высокочувствительной, специфичной и воспроизводимой тест-системы на основе ОТ-ПЦР-РВ с ВКО, актуальной для выявления генома вируса КЧС различных субгенотипов.

Дизайн олигонуклеотидов. Результаты анализа литературных данных указывают на более высокую чувствительность (8 копий/на реакцию) и специфичность системы праймеров CSF 100-F; CSF 192-R и TaqMan-зонда CSF-Probe 1, предложенной Hoffmann В. с соавт., 2005 [272]. Данная система рекомендована руководством ВОЗЖ для проведения ОТ-ПЦР-РВ [180]. При оценке специфичности данных праймеров и TaqMan-зонда учитывали

консерватизм 5'-UTR у различных вариантов вируса КЧС и её вариабельность у других пестивирусов *in silico*.

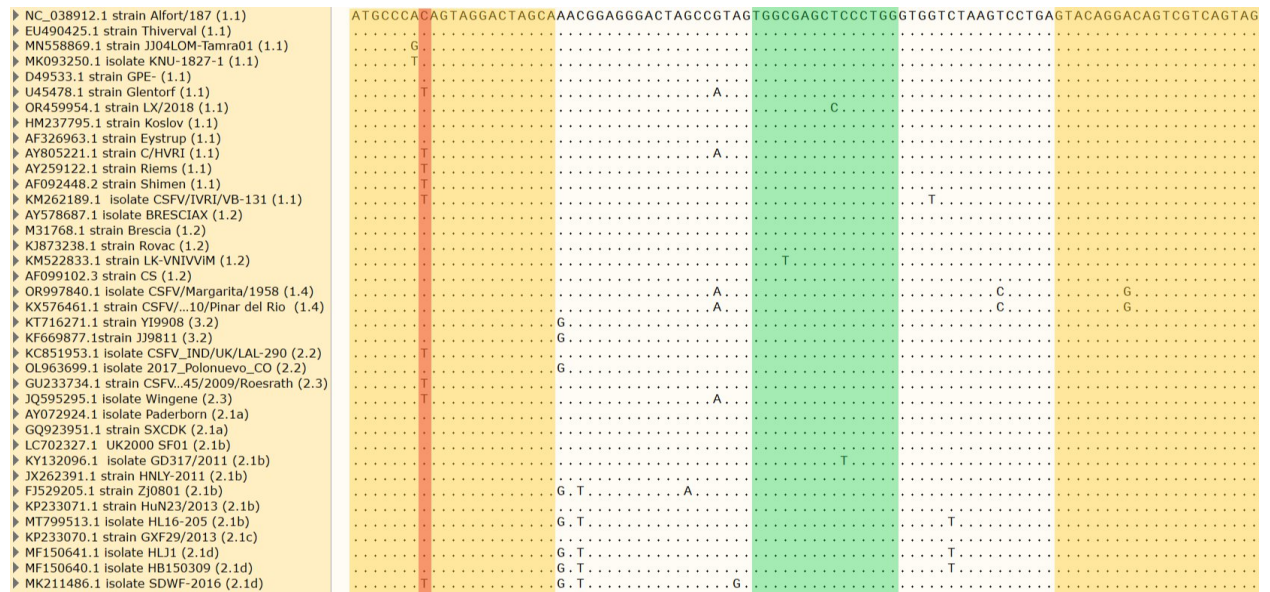


Рисунок 10 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей участка 5'-нетранслируемой области (5'-UTR), перекрываемой выбранными олигонуклеотидами, у различных штаммов вируса КЧС, импортированных из GenBank. *Примечание: Визуализация последовательности выполнена в программе SnapGene v.5.2.1. Оранжевым цветом обозначены области отжига прямого и обратного праймеров, зеленым цветом – область гибридизации TaqMap-зонда, красным цветом – позицию с вырожденностью по пиримидиновому основанию у прямого праймера.*

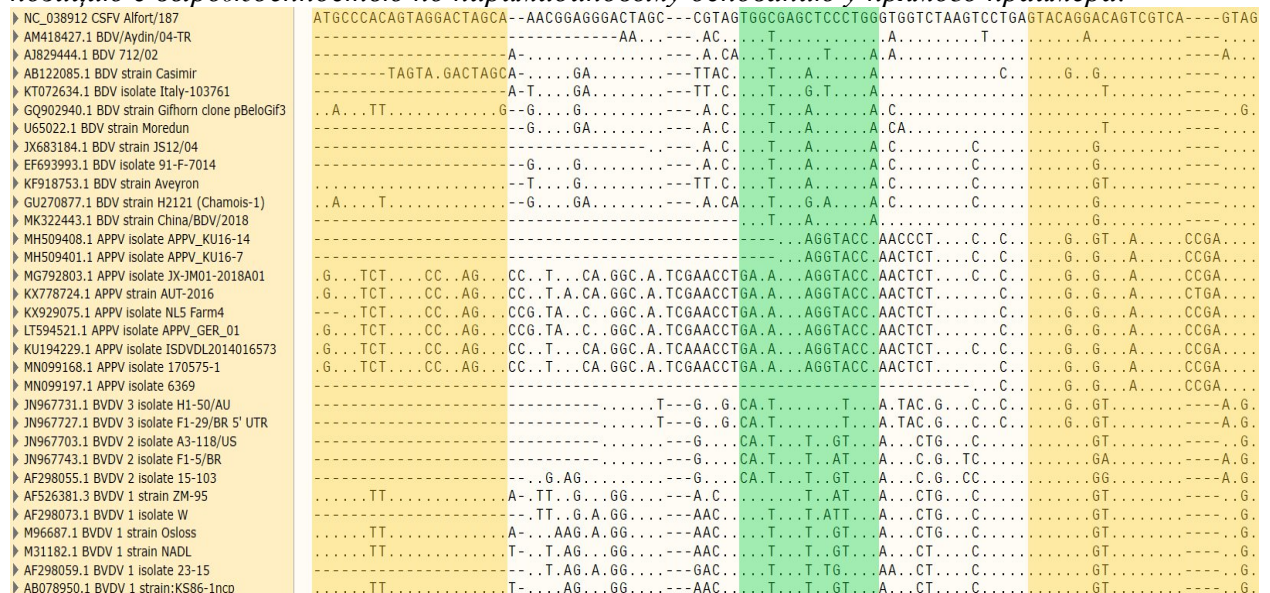


Рисунок 11 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей участка 5'-нетранслируемой области (5'-UTR), перекрываемой выбранными олигонуклеотидами, у различных пестивирусов животных, импортированных из GenBank. *Примечание: Визуализация последовательности выполнена в программе SnapGene v.5.2.1. Оранжевым цветом обозначены области отжига прямого и обратного праймеров, зеленым цветом – область гибридизации TaqMap-зонда. CSFV – вирус классической чумы свиней, BDV – вирус пограничной болезни, APPV – атипичный пестивирус свиней, BVDV – возбудитель вирусной диареи крупного рогатого скота.*

При разработке метода проводили выравнивание и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей штаммов различных субгенотипов вируса КЧС (Рисунок 10). По результатам анализа выбранный участок 5'-UTR, находящийся в позиции 100-193 последовательности генома референс-штамма «Ши-Мынь», обладает консерватизмом.

Кроме того, проводили выравнивание и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей штаммов вирусов пограничной болезни, ВД КРС 1,2,3 типов, атипичного пестивируса свиней (Рисунок 11). Выбранный участок 5'-UTR демонстрирует межвидовую вариабельность у других пестивирусов, что подчеркивает целесообразность его использования для специфичного выявления генома вируса КЧС.

В последовательность олигонуклеотидов Hoffmann В. с соавт., 2005, внесены модификации LNA [272]. Размер амплифицируемого фрагмента составил 93 п.н. TaqMan-зонд к целевому фрагменту мечен флуорофором FAM (6-карбоксифлуоресцеин) и гасителем BHQ1 (black hole quencher 1, Таблица 6). Модификация LNA обеспечивает более высокий уровень аффинности праймеров к ДНК-мишени, их физико-химической стабильности и уравнивает температуру отжига праймеров (T_a).

Таблица 6 -Нуклеотидные последовательности праймеров и зонда для амплификации фрагмента генома вируса КЧС

Ген	Название олигонуклеотидов	Последовательность 5' - 3'	Размер фрагмента (п.н.)
5'-UTR (5'-нетранслируемая область генома вируса КЧС)	CSF 100-F_21 (прямой праймер)	ATGCC C AYAG T AGGACTAGCA	93
	CSF-Probe21 (TaqMan-зонд)	FAM TGGCGAGC T CCC T GG BHQ1	
	CSF 192-R_21 (обратный праймер)	C TACTGACGACTGTCCTGTAC	

Примечание: нуклеотиды, выделенные крупным и жирным шрифтом, несут модификацию LNA. Y – вырожденность по пиримидиновому основанию.

Выбор ВКО. Использование ВКО дает возможность избежать ложноотрицательных результатов, возникающих вследствие ошибок как на

стадии пробоподготовки (выделение нуклеиновой кислоты), так и амплификации целевого фрагмента [72].

Существуют эндогенные и экзогенные ВКО. Эндогенный контроль – система праймеров и зондов, позволяющая достоверно определить валидность выделения и амплификации фрагмента генома хозяина (в случае вируса КЧС – *Sus scrofa*), однако имеет ряд ограничений в связи с возможностью исследования только образцов от животных и мясной продукции [18]. Экзогенный контроль – это система амплификации фрагмента неродственного организма (вируса, бактерии). С помощью экзогенного ВКО возможно исследовать не только образцы от живых/павших животных и изделия свиного происхождения, но и корма, смывы с поверхностей животноводческих помещений [182]. Поскольку вирус КЧС может долгое время сохранять инфекционную активность в окружающей среде наиболее рациональным является выбор экзогенного ВКО [159].

Исходя из всего вышеперечисленного, выбрали экзогенный ВКО, который представляет собой небольшой специфический бактериофаг MS2 *Escherichia coli*, экосаэдрического типа симметрии, геном которого состоит из одноцепочечной РНК около 3,5 т.н., максимально создавая имитацию небольших РНК-содержащих вирусов. А также он является безвредным для людей, животных, растений и других высших организмов, что делает его предпочтительным при диагностике КЧС методом ОТ-ПЦР-РВ [241].

Для подбора праймеров и зонда на фрагмент ВКО использовали литературные данные [241]. Последовательность олигонуклеотидов приведена в Таблице 7. TaqMan-зонд к участку ВКО мечен флуорофором Cy5.5 (цианин-5.5) и гасителем BHQ3 (black hole quencher 3).

Оптимизация условий реакции. С целью уменьшения времени и трудоемкости метода стадия обратной транскрипции и амплификации должны быть включены в одну реакцию. Температурно-временной профиль ОТ-ПЦР-РВ выбран, исходя из размера фрагментов вируса КЧС и бактериофага MS2, и изначально состоял из обратной транскрипции при 42 °С в течение 25 мин,

общей денатурации при 95 °С 10 мин и амплификации (45 циклов). Каждый цикл включал три стадии: денатурацию при 95 °С 10 с, отжиг праймеров при 55 °С 40 с с детекцией флуоресцентного сигнала на каналах green и crimson, элонгация при 72 °С 10 секунд.

Таблица 7 - Нуклеотидные последовательности праймеров и зонда для амплификации фрагмента генома бактериофага MS2 [238]

Название праймера/зонда	Последовательность 5' - 3'	Размер фрагмента (п.н.)
ОСо-632F (прямой праймер)	GTCGCGGTAATTGGCGC	77
ОСо-708R (обратный праймер)	GGCCACGTGTTTTGATCGA	
ОСо-650Zond (TaqMan-зонд)	Cy5.5 AGGCGCTCCGCTACCTTGGCCT BHQ3	

С целью выбора оптимального состава ПЦР-смеси для ОТ-ПЦР-РВ использовали различные компоненты производства «Синтол» (Россия) и «Евроген» (Россия), а в качестве матрицы – РНК референтного штамма «Ши-Мынь» вируса КЧС с титром $6,93 \lg \text{ ККИД}_{50}/\text{см}^3$ в трех повторяемых испытаниях. В процессе оптимизации компоненты ПЦР-смеси разделяли на константные и вариативные. Концентрация константных компонентов не изменялась в различных вариантах ПЦР и составляла (на одну реакцию): 1X Буфер для соответствующей ДНК-полимеразы, 0,4 мкМ праймера CSF 100-F_21, 0,4 мкМ праймера CSF 192-R_21, 0,2 мкМ зонда CSF-Probe21, 0,2 мкМ праймера ОСо-632F, 0,2 мкМ праймера ОСо-708R, 0,2 мкМ зонда ОСо-650Zond, матрица – 10,0 мкл, вода свободная от нуклеаз – до 25,0 мкл (общий объем ПЦР-смеси). Содержание вариативных компонентов изменяли в зависимости от варианта ПЦР (на одну реакцию): MgCl_2 (от 1М до 4М), dNTP (0,2-0,4 мМ каждого), Taq ДНК-полимераза (от 1 до 5 ед.), MMLV-ревертаза (от 12 до 50 ед.). Состав ПЦР-смеси при использовании компонентов набора «OneTube RT-PCR TaqMan» (Евроген) не изменялся и составлял согласно инструкции производителя: 1X «OneTube RT-PCRmix», 0,4 мкМ праймера CSF 100-F_21, 0,4 мкМ праймера CSF 192-R_21, 0,2 мкМ зонда CSF-Probe21,

0,2 мкМ праймера OCo-632F, 0,2 мкМ праймера OCo-708R, 0,2 мкМ зонда OCo-650Zond, 1X TM-MMLV ревертазы, 10,0 мкл матрицы. До конечного объема реакционной смеси 25,0 мкл добавлялась вода свободная от нуклеаз. Результаты оптимизации состава ПЦР-смеси статистически обработаны и сведены в единый график (Рисунок 12).

Исходя из результатов, отображенных на графике (Рисунок 12), оптимальным вариантом является использование набора «OneTube RT-PCR TaqMan», так как во всех вариациях состава ПЦР-смеси с компонентами «Синтол» и «Евроген» среднее значение порогового цикла амплификации (C_t) было ниже ($p < 0,001$).

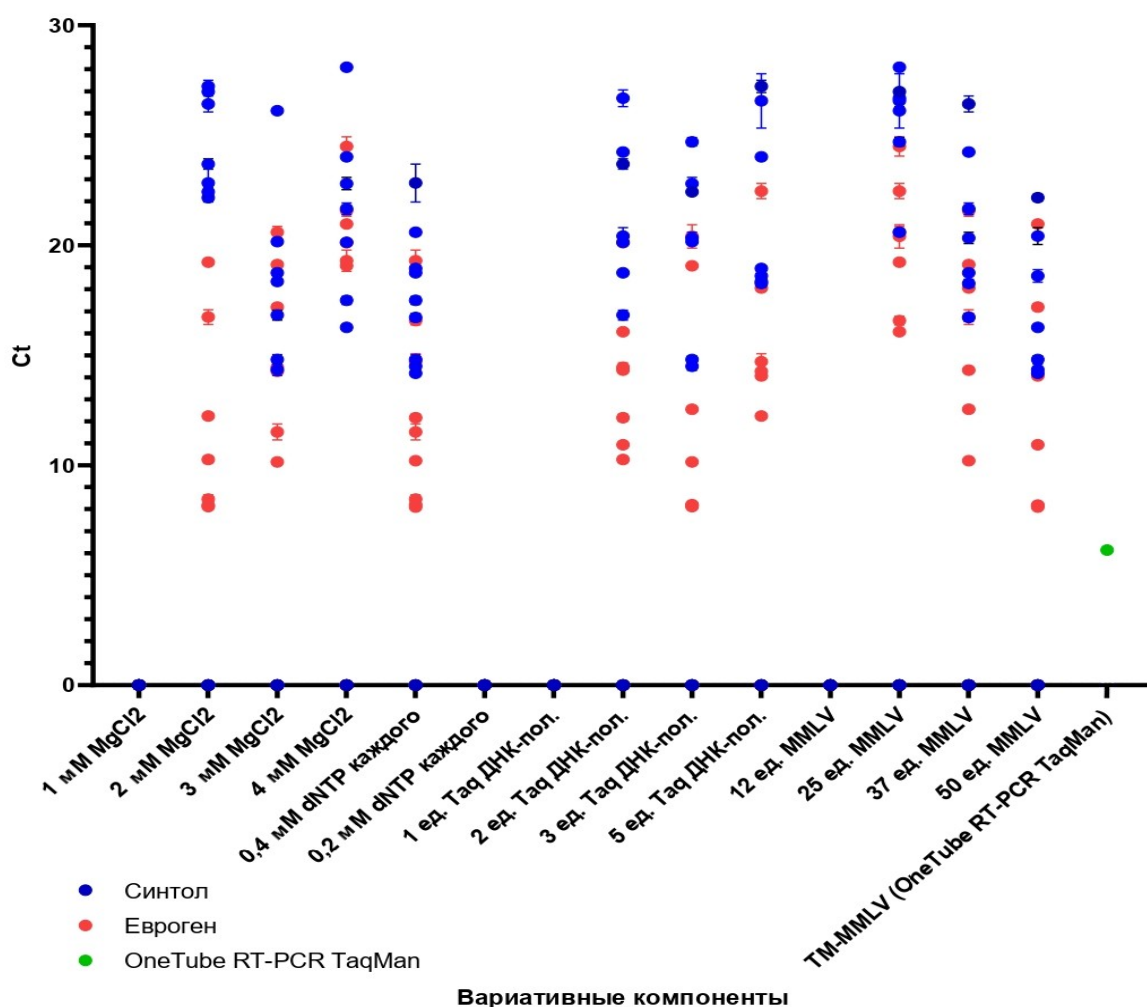


Рисунок 12 – Оптимизация состава ПЦР-смеси с использованием вариативных компонентов НПО «Синтол», ЗАО «Евроген» и набора «OneTube RT-PCR TaqMan» (ЗАО «Евроген»). *Примечание: на графике показаны средние значения C_t ($C_{t_{mean}}$) и стандартные отклонения (δ). ДНК-пол. – ДНК-полимераза.*

В качестве дополнительного этапа оптимизации состава ПЦР-смеси проведено определение сравнительной чувствительности наилучших вариаций с использованием компонентов производства «Синтол», «Евроген» и набора «OneTube RT-PCR TaqMan». В качестве объекта исследования выбраны десятикратные разведения референтного штамма «Ши-мынь» вируса КЧС с титром $6,93 \lg \text{ККИД}_{50}/\text{см}^3$ (Таблица 8).

Таблица 8 – Сравнительная чувствительность различного состава ПЦР-смеси (n=3, p<0,001)

Титр вируса КЧС (штамм «Ши-Мынь»)/ на одну реакцию ПЦР	Компоненты НПО «Синтол», Ct на канале green (mean± δ)	Компоненты ЗАО «Евроген», Ct на канале green (mean± δ)	ЗАО «Евроген», «OneTube TaqMan», Ct на канале green (mean± δ)
5,93 lg ККИД ₅₀	20,06 ± 0,21	14,99 ± 0,37	12,36 ± 0,15
4,93 lg ККИД ₅₀	22,84 ± 0,09	16,22 ± 0,25	14,09 ± 0,07
3,93 lg ККИД ₅₀	26,59 ± 0,16	18,04 ± 0,17	16,04 ± 0,01
2,93 lg ККИД ₅₀	-	20,14 ± 0,11	17,99 ± 0,1
1,93 lg ККИД ₅₀	-	22,38 ± 0,27	20,07 ± 0,07
0,93 lg ККИД ₅₀	-	27,64 ± 0,11	23,18 ± 0,11
<0,01 lg ККИД ₅₀	-	-	26,24 ± 0,09
не содержит	-	-	-

Примечание: «-» - отрицательный результат; Ct на канале green – значение для фрагмента вируса КЧС; mean – среднее значение, δ – среднеквадратическое отклонение. Зеленым цветом обозначен оптимальный вариант.

Полученные результаты также продемонстрировали более высокую чувствительность ($<0,01 \lg \text{ККИД}_{50}/\text{см}^3$, p<0,001) для набора «OneTube RT-PCR TaqMan». Таким образом, состав ПЦР-смеси был определен, и дальнейшие стадии оптимизации проводили с использованием «OneTube RT-PCR TaqMan».

Следующим этапом скорректирован температурно-временной профиль ОТ-ПЦР-РВ. Так как температурный оптимум ТМ-MMLV-ревертазы выше (50-55°C), чем у стандартной MMLV-ревертазы (37-42°C), с целью более специфичного отжига праймеров температура на стадии обратной транскрипции увеличена до 50°C. Затем выполнена оптимизация T_a (от 55 до 65 °C, Рисунок 13). По ее результатам установили, что T_a в диапазоне 55-60 °C обеспечивает более раннее выявление генома вируса КЧС в образце (p>0,05), тогда как повышение T_a с 61 °C до 63 °C значительно увеличивает значение

Ct ($p < 0,001$), а при $T_a = 64-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ амплификация отсутствует. Ct на канале, детектирующим ВКО, в диапазоне $T_a\ 55-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ не изменяется, а при $T_a > 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ отсутствует. Также высокая специфичность детекции флуоресцентного сигнала достигнута двойным циклированием. Окончательный профиль ОТ-ПЦР-РВ включал обратную транскрипцию при $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 25 мин, общую денатурацию при $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 мин и амплификацию с двойным циклированием: первые 10 циклов без детекции флуоресценции (денатурация $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 секунд, отжиг праймеров $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 секунд, элонгация $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 секунд), затем 35 циклов с детекцией флуоресценции на каналах green и crimson (денатурация $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 секунд, отжиг праймеров $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 секунд, элонгация $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 секунд).

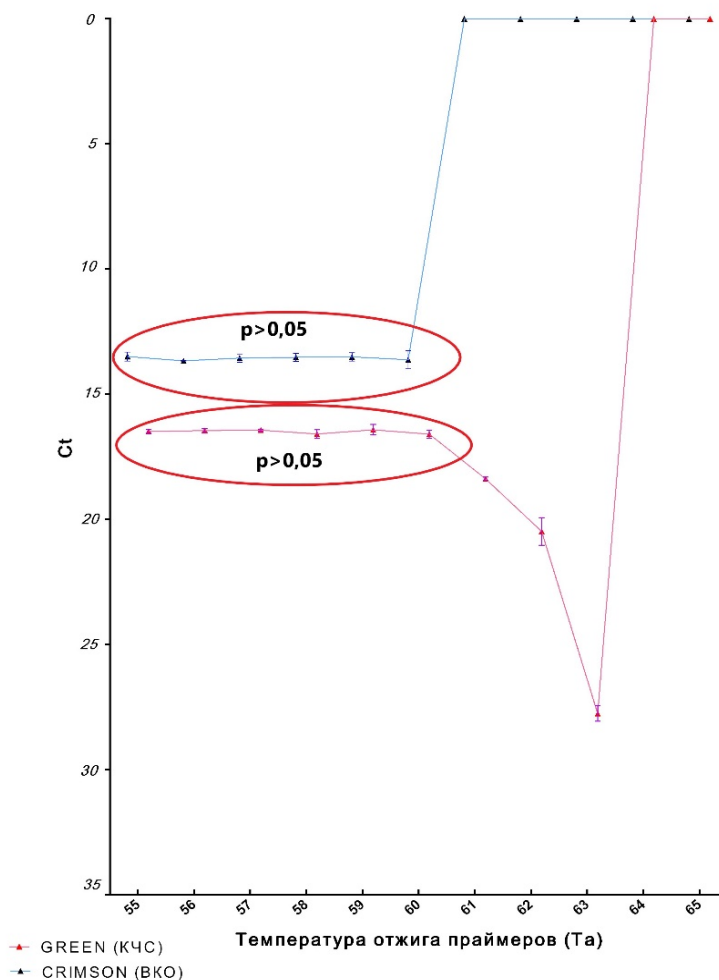


Рисунок 13 – Оптимизация температуры отжига праймеров (T_a) в ОТ-ПЦР-РВ.

Оптимизация ВКО. С целью определения достаточной концентрации ВКО для добавления в систему экстракции РНК проведено тестирование образцов интактной культуры клеток ТС, 10 % суспензии селезёнки

инфицированных и свободных от вируса КЧС свиней, вируссодержащей суспензии культуры клеток штамма «719» вируса КЧС и физиологического раствора с содержанием бактериофага MS2 от 10^2 до 10^4 БОЕ/на реакцию (Таблица 9).

В результате оптимальное содержание ВКО составило $3,2 \cdot 10^3$ БОЕ бактериофага MS2 на реакцию. Увеличение значения Ct на канале crimson (фрагмент ВКО) при высоком содержании генома вируса КЧС (канал green) не снижает достоверность результатов ОТ-ПЦР-РВ.

В ходе проведенных исследований установили отсутствие взаимной ингибиции при параллельных атаках обратной транскрипции и амплификации фрагмента генома ВКО и фрагмента генома вируса КЧС вне зависимости от концентрации целевого фрагмента и вида биологического материала, что подтверждает целесообразность и эффективность использования комплекса бактериофага MS2 с соответствующими праймерами и зондом в качестве ВКО в единой системе ОТ-ПЦР-РВ для выявления генома вируса КЧС.

Контрольные образцы. С целью достоверной оценки этапов экстракции, обратной транскрипции и амплификации при ОТ-ПЦР-РВ разработали четыре контрольных образца: отрицательный и положительный контрольные образцы выделения (ОКОВ и ПКОВ), а также отрицательный и положительный контрольные образцы реакции (ОКОР и ПКОР).

Для проверки степени ингибиции реакции вследствие наличия балластных веществ (белков, липидов, сахаридов, спиртов, детергентов и других низкомолекулярных соединений) в качестве ОКОВ выбрана сыворотка крови КРС. Комплексный состав сыворотки, включающий белки (альбумины, глобулины, фибриноген и др.), моносахариды, липиды, пигменты, органические кислоты, гормоны, витамины, требует тщательной очистки РНК в процессе экстракции. Проведен ряд исследований, которые доказали отсутствие ингибирующего действия сыворотки крови КРС на амплификацию фрагмента ВКО при условии требуемой (согласно инструкции к набору выделения) очистки (Таблица 10).

Таблица 9 - Титрование ВКО в ОТ-ПЦР-РВ при использовании образцов различных материалов

(n=3)

Канал	Образец	Ct (10 ² БОЕ/на реакцию)	Ct (3,2×10 ² БОЕ/на реакцию)	Ct (10 ³ БОЕ/на реакцию)	Ct (3,2×10 ³ БОЕ/на реакцию)	Ct (10 ⁴ БОЕ/на реакцию)
		mean ± δ				
Green	ОКО	-	-	-	-	-
Crimson	ОКО	-	24,85 ± 0,04	20,11 ± 0,18	18,70 ± 0,35	18,34 ± 0,26
Green	Интактная культура клеток ТС	-	-	-	-	-
Crimson	Интактная культура клеток ТС	-	24,67 ± 0,24	20,93 ± 0,16	18,21 ± 0,20	18,82 ± 0,44
Green	10 %-ная суспензия селезенки свободной от КЧС свиньи	-	-	-	-	-
Crimson	10 %-ная суспензия селезенки свободной от КЧС свиньи	-	24,80 ± 0,14	20,90 ± 0,22	18,21 ± 0,31	18,33 ± 0,08
Green	10 %-ная суспензия селезенки инфицированной вирусом КЧС свиньи	14,28 ± 0,04	14,62 ± 0,12	14,12 ± 0,29	14,10 ± 0,04	14,43 ± 0,24
Crimson	10 %-ная суспензия селезенки инфицированной вирусом КЧС свиньи	-	24,22 ± 0,20	20,73 ± 0,54	18,48 ± 0,28	18,62 ± 0,20
Green	Вирусодержащая суспензия штамма «719»	6,15 ± 0,21	5,96 ± 0,10	5,95 ± 0,17	5,86 ± 0,12	5,97 ± 0,02
Crimson	Вирусодержащая суспензия штамма «719»	-	24,98 ± 0,36	20,07 ± 0,18	18,25 ± 0,30	18,21 ± 0,32

Примечание: «-» - отрицательный результат, Green – канал, детектирующий наличие генома вируса КЧС; Crimson – канал, детектирующий наличие ВКО; mean – среднее значение, δ – среднеквадратическое отклонение. Зеленым цветом обозначен оптимальный вариант ВКО.

В качестве ПКОВ предложено использовать растворенный в 4,0 см³ физиологического раствора биопрепарат «ВНИИЗЖ-КЧС, вакцина против классической чумы свиней живая культуральная сухая», содержащий лиофилизированный материал вакцинного штамма «СК» вируса КЧС с титром не менее 5,5 lg ККИД₅₀/см³ [52]. Биопрепарат безопасен для окружающей среды, содержит высокий титр вакцинного вируса КЧС и наиболее подходит для имитации «полевых» образцов. Наличие балластных веществ (как компонентов стабилизатора – гидролизата лактальбумина (4 %), сахарозы (3 %) и желатина (0,4 %) также требует тщательной очистки РНК как вируса

КЧС, так и ВКО в процессе экстракции. В результате ряда исследований доказано отсутствие ингибирующего действия компонентов ПКОВ на амплификацию фрагментов генома вируса КЧС и ВКО при условии требуемой (согласно инструкции к набору выделения) очистки (Таблица 10).

Главная задача ОКОР – проверка контаминации ампликонами и анализатами на стадии постановки ОТ-ПЦР. В связи с этим в качестве ОКОР выбрана вода свободная от нуклеаз производства ЗАО «Евроген» (Россия) из-за отсутствия в ней целевой мишени и ВКО для отжига праймеров и гибридизации зондов.

Таблица 10 – Оценка ингибиции реакции ОТ-ПЦР-РВ компонентами ОКОВ и ПКОВ при различной степени очистки РНК

(n=3, p<0,001)

Условия экстракции РНК	Ct на канале green (mean±δ)	Ct на канале crimson (mean±δ)	Результат
ОКОВ (полный цикл очистки)	-	14,03 ± 0,39	Валидный результат
ОКОВ (отсутствие стадии очистки спиртовым раствором)	-	-	Невалидный результат, отсутствие сигнала на канале crimson
ПКОВ (полный цикл очистки)	19,25 ± 0,27	13,58 ± 0,15	Валидный результат
ПКОВ (отсутствие стадии очистки спиртовым раствором)	-	-	Невалидный результат, отсутствие сигнала на канале crimson и green

Примечание: «-» - отрицательный результат; Ct на канале green – значение для фрагмента вируса КЧС; Ct на канале crimson – значение для фрагмента ВКО; mean – среднее значение, δ – среднеквадратическое отклонение. Зеленым цветом обозначен валидный результат, оранжевым цветом – невалидный результат.

Основным требованием к ПКОВ являлось содержание анализата (фрагмента РНК вируса КЧС) в концентрации, способной приводить к достоверным «положительным» результатам в реакции как на стадии обратной транскрипции, так и на стадии амплификации. Поскольку экстрагированная геномная РНК вируса КЧС не обладает физико-химической стабильностью при длительном хранении и многократных циклах «замораживания-оттаивания», принято решение о получении РНК методом

Т7-транскрипции *in vitro* [67]. Для разработки ПКОР изначально сконструирована рекомбинантная плазмида pJET1.2.CSFV.5'-UTR, содержащая участок генома референтного штамма «Ши-Мынь» (раздел 2.1). Данная плазмида послужила матрицей для получения РНК-стандартов методом Т7-транскрипции *in vitro* (раздел 2.1) с целью использования их в качестве ПКОР. Для определения количественного состава ПКОР в ОТ-ПЦР-РВ провели 10 последовательных десятикратных разведений РНК-стандартов. Исходя из результатов анализа графика (Рисунок 14), оптимальной концентрацией РНК для ПКОР является от $5,4 \times 10^{-1}$ до 5×10^{-4} нг/реакцию, так как достигнута незначительная вариация ($\delta \leq 0,5$) между повторяемыми испытаниями.

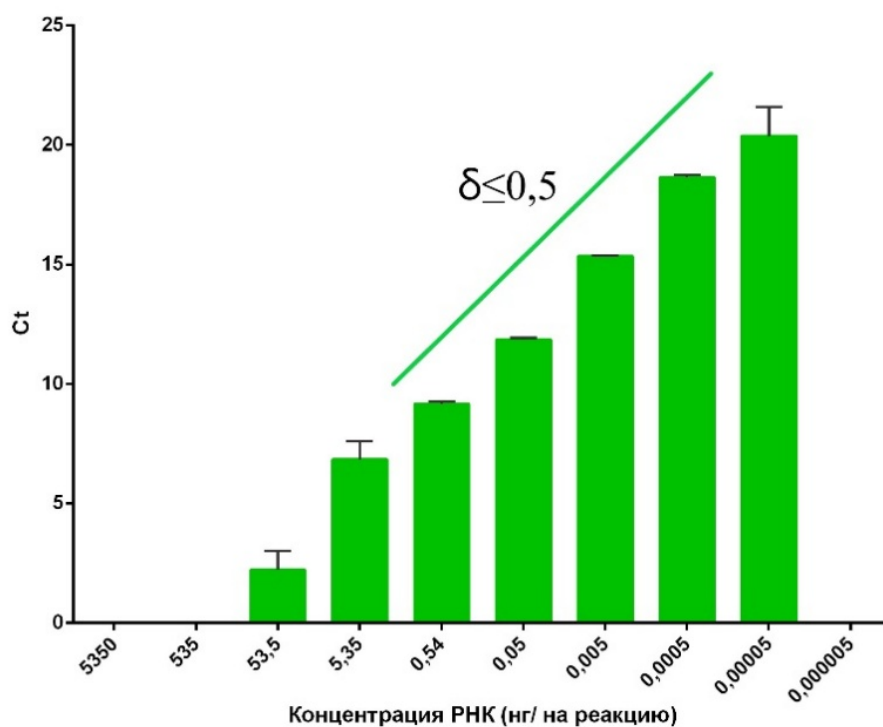


Рисунок 14 – Определение количественного состава ПКОР в ПЦР-тест-системе. Примечание: δ – среднеквадратическое отклонение.

Определение параметров анализа ОТ-ПЦР-РВ. Рекомендуемые параметры ПЦР-анализа для каналов green и crimson тождественны: установка динамического фона, корректировки уклона, устранения выбросов на 10 %, линейная шкала и пороговое значение, которое составляет 0,05. Результаты интерпретируются на основании наличия или отсутствия пересечения

стандартной кривой с установленной пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию значения C_t в соответствующей графе таблицы результатов (Рисунок 15).

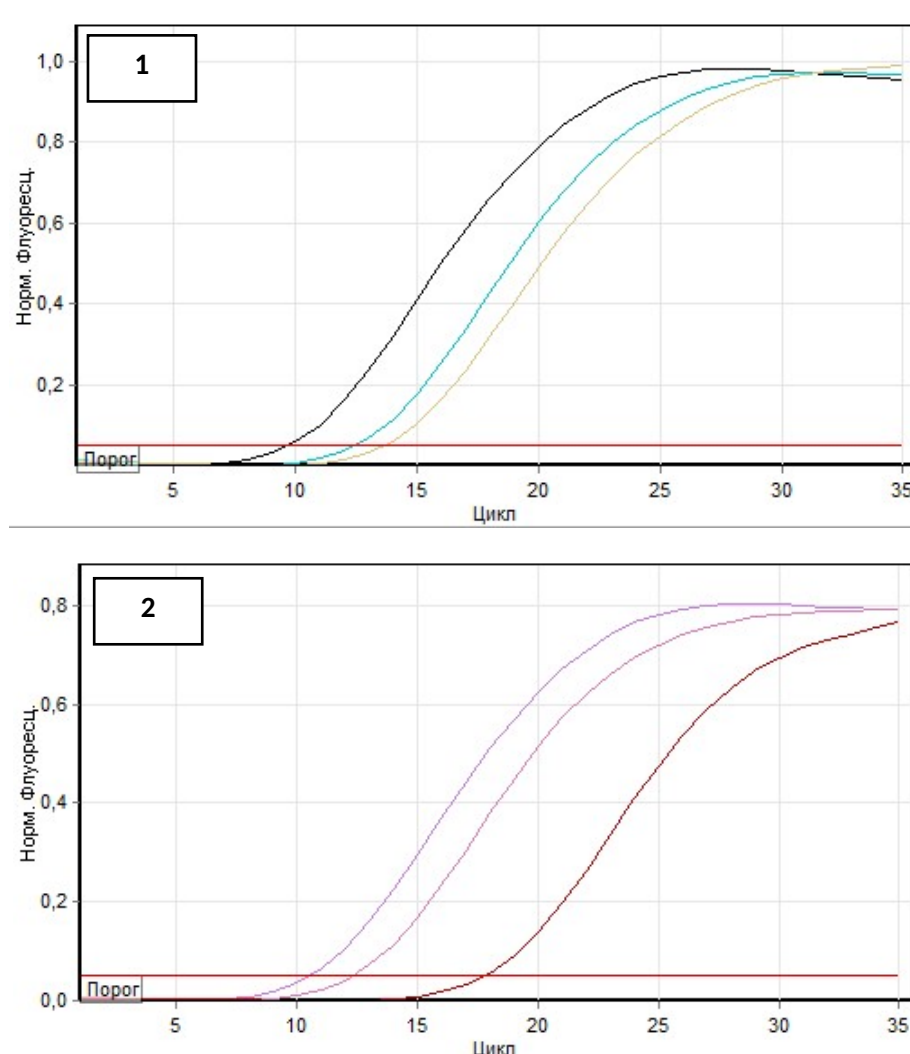


Рисунок 15 – Кривые флуоресценции: 1 – на канал green (фрагмент вируса КЧС), 2 – на канал crimson (фрагмент ВКО).

Полученные данные показали, что максимальное значение C_t составило $27,83 \pm 0,04$, что соответствует титру штамма «719» $0,3 \lg \text{ККИД}_{50}/\text{на реакцию}$. Таким образом, результат ОТ-ПЦР-РВ рационально интерпретировать как «положительный» при C_t на канале green $\leq 28,0$.

С целью определения максимального C_t , при котором образец может интерпретироваться как «положительный», провели исследование двукратных разведений вирусосодержащей суспензии культуры клеток штамма «719» с исходным титром $7,5 \lg \text{ККИД}_{50}/\text{на реакцию}$ (Рисунок 16).

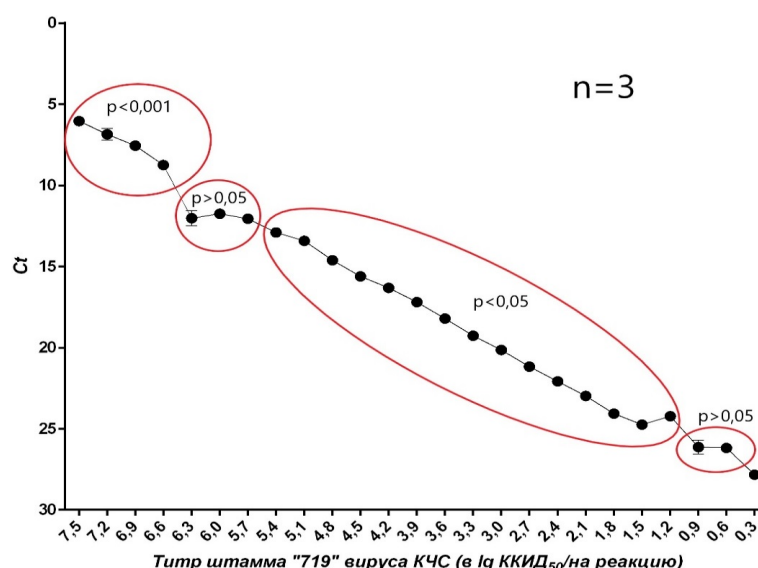


Рисунок 16 – Определение порогового значения Ct на примере двукратных разведений вирусосодержащей суспензии штамма «719» (с исходным титром $7,5 \lg \text{ККИД}_{50}/\text{на реакцию}$).

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для всех контролей реакции (Таблица 11).

Таблица 11 - Интерпретация результатов ОТ-ПЦР-РВ

Значение Ct по каналу FAM/Green	Значение Ct по каналу Cy5.5/Crimson	Результат
отсутствует	определено	Геном вируса КЧС не обнаружен
≤ 28	определено или отсутствует	Обнаружен геном вируса КЧС
отсутствует или > 28	отсутствует	Невалидный результат*
> 28	определено	Сомнительный результат*
ПКОВ		
≤ 28	определено	Правильный результат**
ОКОВ		
отсутствует	определено	Правильный результат
ПКОР		
≤ 28	отсутствует	Правильный результат
ОКОР		
отсутствует	отсутствует	Правильный результат

Примечание: * В случае получения невалидного или сомнительного результатов, необходимо провести повторное исследование соответствующих образцов, начиная с этапа экстракции РНК. ** При отклонении результатов контролей выделения (ПКОВ и ОКОВ) реакция считается невалидной, необходимо провести повторное исследование соответствующих образцов, начиная с этапа экстракции РНК. При отклонении результатов контролей реакции (ПКОР и ОКОР) реакция считается невалидной, необходимо провести повторное исследование соответствующих образцов в ОТ-ПЦР-РВ без этапа выделения.

Оценка стабильности тест-системы. ВКО хранили при рекомендуемых условиях (4 °С, с исходным титром бактериофага MS2 - $3,2 \times 10^5$ БОЕ/см³) в течение года, каждые три месяца тестируя в ОТ-ПЦР-РВ. ПКОВ и ПКОР хранили при рекомендуемых условиях (от минус 16 °С до минус 24 °С) в течение года, каждые три месяца тестируя в ОТ-ПЦР-РВ. Результаты определения стабильности ВКО, ПКОВ и ПКОР представлены в Таблице 12.

Таблица 12 – Определение стабильности ВКО, ПКОВ, ПКОР при хранении на 4 °С в течение года

(n = 6)

Дата тестирования	ВКО Ct/Crimson (mean ± δ), CV от исходного значения (%)	ПКОВ Ct/Green (mean ± δ) CV от исходного значения (%)	ПКОР Ct/Green (mean ± δ) CV от исходного значения (%)
26.10.2023	18,71 ± 0,04	18,66 ± 0,10	19,26 ± 0,07
26.01.2024 (три месяца хранения)	18,02 ± 0,05 1,5 %	18,62 ± 0,02 0,40 %	19,41 ± 0,17 0,72 %
26.04.2024 (шесть месяцев хранения)	18,90 ± 0,08 0,99 %	18,76 ± 0,05 0,48 %	20,12 ± 0,10 2,18 %
26.07.2024 (девять месяцев хранения)	18,70 ± 0,16 0,87 %	19,05 ± 0,06 0,31 %	20,08 ± 0,12 2,44 %
26.10.2024 (год хранения)	18,71 ± 0,32 1,76 %	19,05 ± 0,07 1,22 %	19,94 ± 0,06 1,94 %

Примечание: Ct на канале green – значение для фрагмента вируса КЧС; Ct на канале crimson – значение для ВКО; mean – среднее значение, δ – среднеквадратическое отклонение, CV – коэффициент вариации. Зеленым цветом обозначен валидный результат.

Исходя из данных таблицы 12 установлено, что ВКО, ПКОВ и ПКОР стабильны в течение года, так как CV не превышал 10% [12].

Комплектация разрабатываемой ПЦР-тест-системы рассчитана на проведение 50 и 100 исследований. Исходя из этого, провели расчет количества циклов замораживания и оттаивания (согласно ГОСТ Р 70150-2022), необходимое для оценки устойчивости положительных контрольных образцов тест-системы, которое составило 14 (для комплектации на 50 реакций) и 26 (для комплектации на 100 реакций, Рисунок 17).

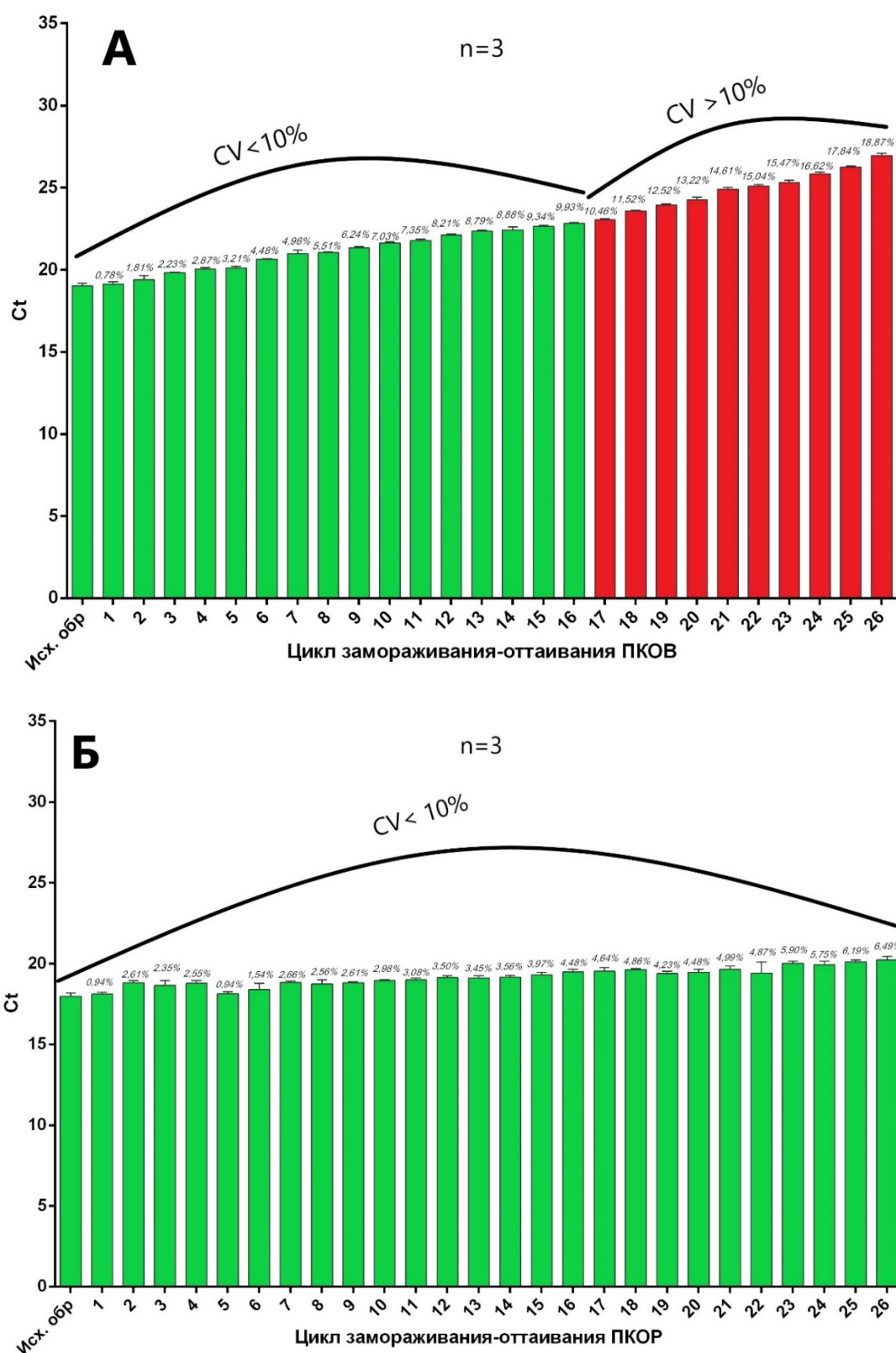


Рисунок 17 – Определение устойчивости положительных контрольных образцов при многократных циклах замораживания и оттаивания: А – ПКОВ; Б – ПКОР. Примечание: столбцами обозначено значение $C_{t\text{mean}}$ (по каналу green), отрезками – среднее квадратическое отклонение (δ), подписями к столбцам – коэффициент вариации (CV). Зеленым цветом показаны валидные результаты, красным – невалидные.

Как показано на рисунке 17, ПКОР показал стабильный результат при 26 циклах замораживания и оттаивания, при этом CV не превышал 10 %. ПКОВ стабилен при проведении 16 циклов замораживания и оттаивания, в связи с чем принято решение включить два эквивалентных образца (ПКОВ) в комплектацию тест-системы, предусмотренной на 100 исследований, чтобы количество циклов замораживания и оттаивания не превышало 16.

Валидация. Для определения *промежуточной прецизионности в условиях повторяемости (сходимости)* результатов, получаемых при использовании разработанного метода, проводили исследование 20 истинно положительных образцов одним исследователем в трех параллельных исследованиях в течение одного дня (Рисунок 18). Результат выражали как среднее значение Ct (Ct_{mean}), размер вариации (среднеквадратическое отклонение (δ) и размах вариации (R).

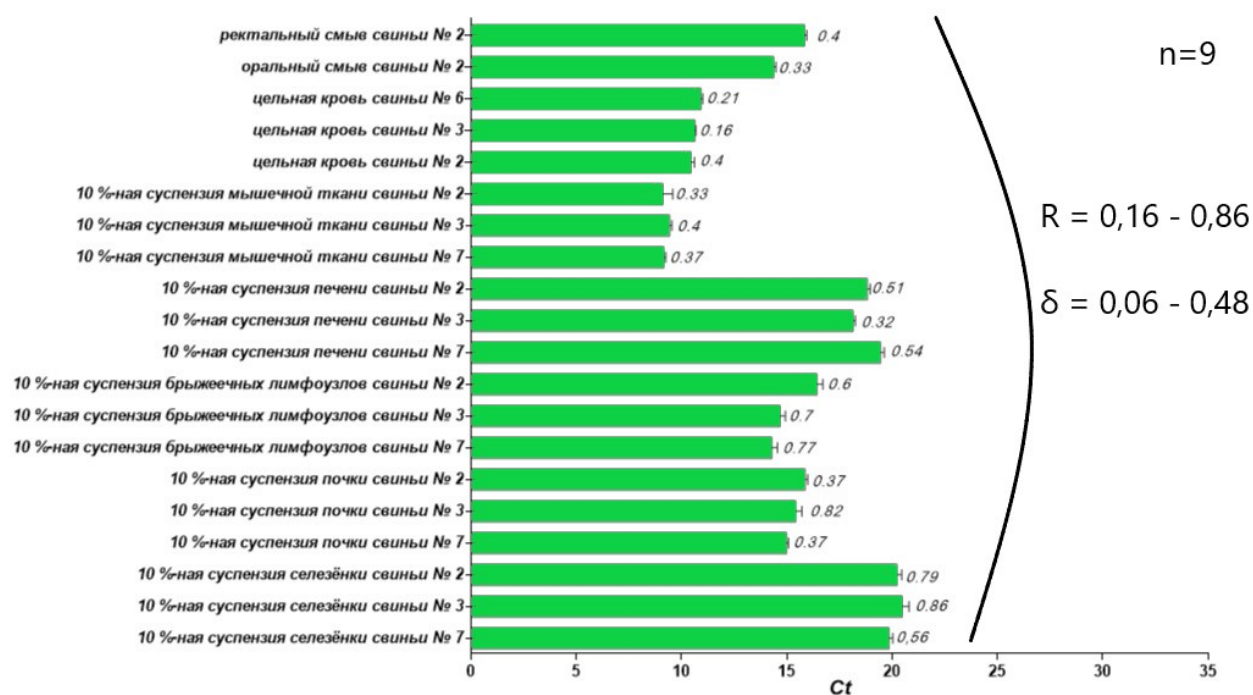


Рисунок 18 – Прецизионность в условиях повторяемости (сходимость) разработанного метода. *Примечание:* зелеными столбцами обозначено значение Ct_{mean} (по каналу green), отрезками – среднеквадратическое отклонение или размер вариации (δ), подписями к зеленым столбцам – размах вариации (R).

Из рисунка 18 следует, что во всех 20 истинно положительных образцах в трех параллельных исследованиях в течение одного дня обнаружен фрагмент

генома вируса КЧС. Также получен «правильный» результат для значений Ct/Crimson (ВКО) и всех контролей реакции (не представлено на графике). Размах вариации находился в диапазоне ($R=0,16-0,86$); размер вариации – в диапазоне ($\delta=0,06-0,48$), что указывает на «сходимость» валидируемого метода.

Для определения *внутрилабораторной прецизионности в условиях воспроизводимости* результатов, получаемых при использовании разработанного метода, проводили исследование 20 истинно положительных образца в трех параллельных испытаниях в течение трех дней двумя исследователями (Рисунок 19). Результат выражали как Ct_{mean} , размер вариации (δ) и размах вариации (R).

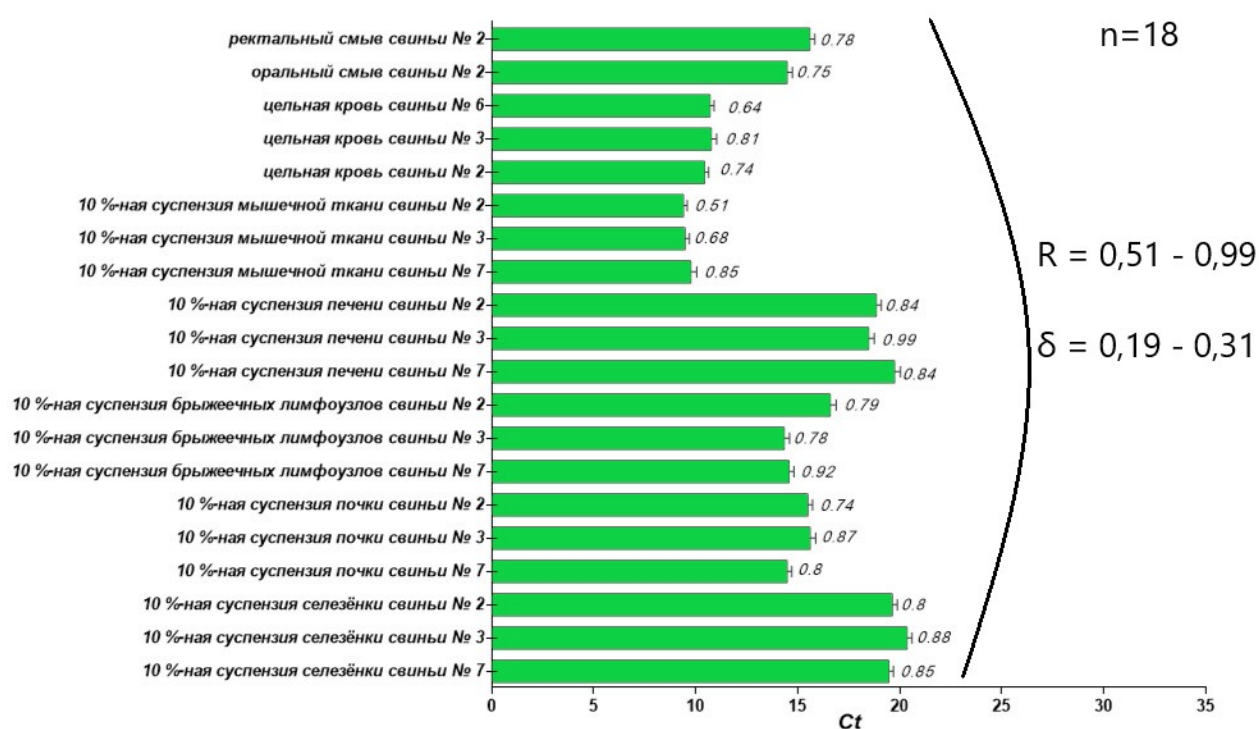


Рисунок 19 – Прецизионность в условиях воспроизводимости разработанного метода. *Примечание: зелеными столбцами обозначено значение Ct_{mean} (по каналу green), отрезками – среднее квадратическое отклонение или размер вариации (δ), подписями к зеленым столбцам – размах вариации (R).*

Из рисунка 19 следует, что во всех 20 истинно положительных образцах в трех параллельных испытаниях в течение трех дней двумя исследователями обнаружен фрагмент генома вируса КЧС. Также получен «правильный»

результат для значений Ct/Crimson (ВКО) и всех контролей реакции (не представлено на графике). Размах вариации находился в диапазоне ($R=0,51-0,99$); размер вариации – в диапазоне ($\delta=0,19-0,31$), что указывает на воспроизводимость валидируемого метода.

С целью определения *аналитической специфичности* тестировали образцы гетерологичных вирусов и бактерий, вирулентных и вакцинных штаммов вируса КЧС различных субгенотипов, живых вакцин против КЧС (Таблица 13).

Таблица 13 – Аналитическая специфичность валидируемого метода ОТ-ПЦР-РВ

(n = 3)

№ п/п	Образец	Ct/Green ($Ct_{mean} \pm \delta$)	Ct/Crimson ($Ct_{mean} \pm \delta$)
1	2	3	4
1	Полевой изолят <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	-	18,23 $\pm$ 0,25
2	Штамм «Иркутский 2007» вируса РРСС	-	18,30 $\pm$ 0,32
3	Штамм «ВК»-ДЕП вируса болезни Ауески	-	18,51 $\pm$ 0,30
4	Штамм «Мозамбик-78» вируса АЧС	-	18,60 $\pm$ 0,33
5	Изолят «Челябинск 2021» возбудителя ВД КРС	-	18,30 $\pm$ 0,25
6	Полевой изолят атипичного пестивируса свиней	-	18,45 $\pm$ 0,36
7	Вирус КЧС, штамм «9»	15,27 $\pm$ 0,11	18,02 $\pm$ 0,14
8	Вирус КЧС, штамм «223»	21,13 $\pm$ 0,04	18,46 $\pm$ 0,06
9	Вирус КЧС, штамм «238»	20,30 $\pm$ 0,13	18,23 $\pm$ 0,15
10	Вирус КЧС, штамм «259»	12,84 $\pm$ 0,20	18,44 $\pm$ 0,26
11	Вирус КЧС, штамм «324»	17,22 $\pm$ 0,08	18,14 $\pm$ 0,04
12	Вирус КЧС, штамм «275»	20,01 $\pm$ 0,13	19,08 $\pm$ 0,20
13	Вирус КЧС, штамм «305»	15,80 $\pm$ 0,17	19,02 $\pm$ 0,12
14	Вирус КЧС, штамм «326»	16,61 $\pm$ 0,12	18,69 $\pm$ 0,22
15	Вирус КЧС, штамм «449»	14,48 $\pm$ 0,04	18,74 $\pm$ 0,41
16	Вирус КЧС, штамм «582»	16,51 $\pm$ 0,30	18,56 $\pm$ 0,08
17	Вирус КЧС, штамм «626»	25,89 $\pm$ 0,13	18,24 $\pm$ 0,16
18	Вирус КЧС, штамм «627»	24,13 $\pm$ 0,04	18,74 $\pm$ 0,23
19	Вирус КЧС, штамм «579»	10,43 $\pm$ 0,42	19,04 $\pm$ 0,09
20	Вирус КЧС, штамм «684»	15,50 $\pm$ 0,35	19,22 $\pm$ 0,16
21	Вирус КЧС, штамм «661»	10,43 $\pm$ 0,42	18,76 $\pm$ 0,36
22	Вирус КЧС, штамм «664»	13,50 $\pm$ 0,34	18,25 $\pm$ 0,17
23	Вирус КЧС, штамм «665»	20,26 $\pm$ 0,26	19,14 $\pm$ 0,06

1	2	3	4
24	Вирус КЧС, штамм «716»	$16,99 \pm 0,22$	$18,65 \pm 0,57$
25	Вирус КЧС, штамм «702»	$24,74 \pm 0,37$	$18,17 \pm 0,13$
26	Вирус КЧС, штамм «713»	$15,53 \pm 0,14$	$18,52 \pm 0,08$
27	Вирус КЧС, штамм «719»	$6,75 \pm 0,27$	$18,48 \pm 0,32$
28	Вирус КЧС, штамм «742»	$9,94 \pm 0,13$	$18,44 \pm 0,27$
29	Вирус КЧС, штамм «741»	$16,85 \pm 0,13$	$18,56 \pm 0,28$
30	Вирус КЧС, штамм «933»	$16,39 \pm 0,20$	$18,47 \pm 0,32$
31	Вирус КЧС, штамм «752»	$9,51 \pm 0,06$	$19,07 \pm 0,13$
32	Вирус КЧС, штамм «760»	$16,53 \pm 0,24$	$19,22 \pm 0,47$
33	Вирус КЧС, штамм «805»	$18,19 \pm 0,16$	$18,78 \pm 0,22$
34	Вирус КЧС, штамм «820»	$19,18 \pm 0,06$	$18,62 \pm 0,02$
35	Вирус КЧС, штамм «840»	$16,14 \pm 0,09$	$18,46 \pm 0,12$
36	Вирус КЧС, штамм «841»	$26,13 \pm 0,15$	$19,02 \pm 0,08$
37	Вирус КЧС, штамм «855»	$16,49 \pm 0,12$	$19,24 \pm 0,22$
38	Вирус КЧС, штамм «842»	$21,02 \pm 0,13$	$19,04 \pm 0,04$
39	Вирус КЧС, штамм «843»	$9,98 \pm 0,10$	$18,56 \pm 0,06$
40	Вирус КЧС, штамм «867»	$16,27 \pm 0,21$	$18,80 \pm 0,08$
41	Вирус КЧС, штамм «879»	$18,49 \pm 0,08$	$19,06 \pm 0,18$
42	Вирус КЧС, штамм «894»	$10,18 \pm 0,05$	$19,15 \pm 0,15$
43	Вирус КЧС, штамм «915»	$16,64 \pm 0,31$	$18,38 \pm 0,32$
44	Вирус КЧС, штамм «917»	$9,35 \pm 0,14$	$18,36 \pm 0,23$
45	Вирус КЧС, штамм «908»	$16,09 \pm 0,18$	$18,99 \pm 0,37$
46	Вирус КЧС, штамм «918»	$16,23 \pm 0,14$	$19,08 \pm 0,06$
47	Вирус КЧС, штамм «920»	$10,68 \pm 0,28$	$18,87 \pm 0,18$
48	Вирус КЧС, штамм «921»	$19,11 \pm 0,07$	$18,98 \pm 0,23$
49	Вирус КЧС, штамм «922»	$23,64 \pm 0,31$	$18,58 \pm 0,09$
50	Вирус КЧС, штамм «924»	$15,29 \pm 0,03$	$19,08 \pm 0,13$
51	Вирус КЧС, штамм «925»	$13,93 \pm 0,05$	$19,25 \pm 0,14$
52	Вирус КЧС, штамм «923»	$14,90 \pm 0,13$	$19,36 \pm 0,22$
53	Вирус КЧС, штамм «926»	$11,82 \pm 0,18$	$18,78 \pm 0,02$
54	Вирус КЧС, штамм «927»	$9,45 \pm 0,24$	$18,98 \pm 0,28$
55	Вирус КЧС, штамм «929»	$12,36 \pm 0,17$	$18,80 \pm 0,33$
56	Вирус КЧС, штамм «930»	$15,45 \pm 0,09$	$18,97 \pm 0,25$
57	Вирус КЧС, штамм «930а»	$11,24 \pm 0,11$	$18,02 \pm 0,36$
58	Вирус КЧС, штамм «Ши-Мынь»	$15,31 \pm 0,15$	$19,19 \pm 0,33$
59	Вирус КЧС, штамм CSF Tigrovoe 16/WB-634»	$18,11 \pm 0,09$	$19,20 \pm 0,16$
60	Вирус КЧС, штамм CSF Amur 19-10/WB-12555	$16,75 \pm 0,13$	$19,48 \pm 0,09$
61	Вакцина «Swivac C», штамм «GPE-»	$24,04 \pm 0,11$	$18,98 \pm 0,27$
62	Вакцина «COGLAPEST», штамм «Thiverval»	$25,98 \pm 0,08$	$18,66 \pm 0,23$
63	Вакцина «КС» против классической чумы свиней живая культуральная сухая, штамм «КС»	$19,40 \pm 0,08$	$18,98 \pm 0,19$

1	2	3	4
64	«ВНИИЗЖ-КЧС», вакцина против классической чумы свиней живая культуральная сухая, штамм «СК»	19,69 ± 0,17	18,36 ± 0,25
65	Вирусвакцина против классической чумы свиней из штамма ЛК-ВНИИВВиМ культуральная сухая, штамм «ЛК-ВНИИВВиМ»	18,37 ± 0,09	18,24 ± 0,16
66	Вакцина «Pestiffa», штамм «CL»	19,88 ± 0,13	18,12 ± 0,08
67	Вакцина «PRO-VAC CSF», штамм «LOM-850»	12,46 ± 0,06	19,01 ± 0,17
68	Вакцина «Classical Swine Fever Vaccine, Live (Tissue Culture Origin)», штамм «С»	18,02 ± 0,16	18,33 ± 0,09
69	Вакцина «Пестистоп», штамм «K/SHBK»	12,46 ± 0,11	19,14 ± 0,33
70	Вакцина «Эрипестен», «непатогенный» штамм «С» (согласно инструкции)	11,12 ± 0,09	18,36 ± 0,14

Примечание: «-» - отрицательный результат; Ct на канале green – значение для фрагмента вируса КЧС; Ct на канале crimson – значение для ВКО; mean – среднее значение, δ – среднеквадратическое отклонение. Зеленым цветом обозначен специфичный результат.

Исходя из результатов Таблицы 13, разработанный метод специфичен в отношении 64 вирулентных и вакцинных штаммов вируса КЧС пяти субгенотипов (1.1, 1.2, 2.1, 2.2 и 2.3). Перекрестной реакции в отношении вирусов АЧС, болезни Ауески, РРСС, ВД КРС, атипичного пестивируса свиней и возбудителя рожи свиней *Erysipelothrix rhusiopathiae* не регистрировали.

Для определения *диагностической специфичности* метода провели исследования 256 истинно отрицательных образцов, а для определения *диагностической чувствительности* – 161 истинно положительный образец. Показатель DS_{sp} составил 100 % (95 % ДИ 86,64-100 %), а DS_{se} – 98,14 % (95 % ДИ 90,60-99,42 %). Более подробная характеристика специфичности и чувствительности представлена в сравнительном испытании тест-систем (раздел 3.3). Таким образом, по результатам валидации разработанного метода ОТ-ПЦР-РВ подготовлен комплект документов и утверждены методические

рекомендации (Приложение 1), а впоследствии тест-система «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ» (СТО 00495527-0532-2025, Приложение 2).

Апробация. В период с 01.01.2025 г. по 01.12.2025 г. количество проведенных исследований разработанным методом в референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» (согласно приказу №550 от 16.05.2025 г. о внесении изменений в приложения №1 и №2 к приказу Россельхознадзора от 16.12.2024 г. №1636 «О лабораторных исследованиях в рамках реализации мероприятий Россельхознадзора по государственной работе в 2025 году «Испытания и (или) экспертиза подконтрольных государственному ветеринарному контролю (надзору) товаров») составило 1047. Образцы поступили из 32 регионов Российской Федерации. Один образец от домашней свиньи демонстрировал «положительный» результат в ОТ-ПЦР-РВ, 1046 образца от диких и домашних свиней - «отрицательный» результат. Дальнейшее субгенотипирование подтвердило принадлежность вируса КЧС в «положительном» образце к вакцинным штаммам.

3.3 Сравнительный анализ отечественных ПЦР-тест-систем по выявлению генома вируса КЧС с внутренним контролем

На отечественном рынке представлены ПЦР-тест-системы с ВКО для диагностики КЧС, однако данные об их разработке, валидации и апробации не опубликованы в открытой печати. Как правило, ВКО имеет засекреченный состав и не проходит независимую оценку на предмет способности имитировать все этапы ОТ-ПЦР (в особенности экстракцию РНК и обратную транскрипцию). Кроме того, использование при проведении эпизоотологического мониторинга тест-систем с неизвестными показателями чувствительности и специфичности не исключает появление ложноотрицательных и ложноположительных результатов, что не согласуется с принципами референтной диагностики и стратегией искоренения КЧС.

Первым этапом сравнительного анализа являлась *оценка влияния целенаправленной ингибиции на амплификацию фрагмента ВКО*. Для

минимизации искажения эксперимента присутствующими в биологическом материале балластными веществами исследовали два образца (истинно положительный и истинно отрицательный) суспензии культуры клеток ТС, очищенной от клеточного дебриса, в ОТ-ПЦР-РВ тест-системами № x1, x2, а также разработанной «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ», исключая этапы очистки РНК спиртовым раствором и обратной транскрипции из протокола реакции. Результаты представлены в Таблице 14.

Таблица 14 – Влияние ингибиции на амплификацию фрагмента ВКО для различных ПЦР-тест-систем

(n=3)

Условия реакции	Образец	Тест-система № x1		Тест-система № x2		Тест-система «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ»	
		Ct (целевой фрагмент) mean± δ	Ct (фрагмент ВКО) mean± δ	Ct (целевой фрагмент) mean± δ	Ct (фрагмент ВКО) mean± δ	Ct (целевой фрагмент) mean± δ	Ct (фрагмент ВКО) mean± δ
Очистка РНК спиртовым раствором с обратной транскрипцией	Истинно пол.	16,83±0,32	25,49±0,53	18,91±0,17	16,56±0,29	12,74±0,09	17,80±0,32
	Истинно отр.	-	26,34±0,37	-	15,47±0,17	-	16,17±0,42
Без очистки РНК спиртовым раствором с обратной транскрипцией	Истинно пол.	-	29,10±1,40	-	20,10±1,12	-	-
	Истинно отр.	-	25,02±1,17	-	21,88±0,49	-	-
Очистка РНК спиртовым раствором без обратной транскрипции	Истинно пол.	-	21,91±1,12	-	28,86±0,40	-	-
	Истинно отр.	-	20,42±0,49	-	28,58±0,37	-	-
Без очистки РНК спиртовым раствором без обратной транскрипции	Истинно пол.	-	-	-	-	-	-
	Истинно отр.	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» - отрицательный результат; Ct (целевой фрагмент) – значение для фрагмента вируса КЧС; mean – среднее значение, δ – среднеквадратическое отклонение; Истинно отр. – истинно отрицательный образец; Истинно пол. – истинно положительный образец. Зеленым цветом обозначен валидный результат; оранжевым – невалидный результат.

Исходя из данных, представленных в Таблице 14, отсутствие этапа очистки нуклеиновой кислоты спиртовым раствором не повлияло на экстракцию ВКО и ингибировало выделение РНК вируса КЧС при использовании тест-систем № x1 и x2, что невалидно, так как не создается «эффект имитации» очистки РНК вируса от его белков системой внутреннего

контроля. Более того, исключение этапа обратной транскрипции из протокола реакции при применении тест-систем № x1 и x2 также не повлияло на амплификацию фрагмента ВКО в отсутствии детекции фрагмента вируса КЧС. В свою очередь, при использовании тест-системы «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ» и различных вариантах целенаправленной ингибиции наблюдали «эффект имитации», что является валидным результатом. Полученные данные продемонстрировали, что отсутствие сведений относительно состава ВКО в ПЦР-тест-системах не исключает использования с этой целью ДНК (плазмид, природных или синтетических молекул), что некорректно и может приводить к недостоверным результатам при постановке диагноза на КЧС, так как не создается «эффект имитации».

Сравнительный анализ диагностической чувствительности выполняли в два этапа. При выполнении *первого этапа* параллельно тестировали тест-системами № x1, x2 и «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ» в трех повторениях образцы вируссодержащей суспензии культуры клеток, содержащей штаммы «719», «684» и «Ши-Мынь» с известными, но отличными друг от друга титрами (Рисунок 20).

Как представлено на графике (Рисунок 20), с использованием разработанной тест-системы продемонстрирован «положительный результат» при исследовании образца штамма «684» с титром на $1,0 \lg \text{ККИД}_{50}$ выше, чем с помощью тест-системы № x2, и на $2,0 \lg \text{ККИД}_{50}$ выше, чем тест-системой x1. Образец с минимальным титром референтного штамма «Ши-Мынь» ($0,01 \text{ ККИД}_{50}$) интерпретирован как «положительный» при использовании тест-систем «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ» и № x1. Однако минимальный титр штамма «Ши-Мынь» в образце, детектируемым тест-системой № x2, был на $2,0 \lg \text{ККИД}_{50}$ выше. Исследование образца штамма «719» с титром $0,5 \lg \text{ККИД}_{50}$ разработанной тест-системой показывает «положительный» результат, в то время, как его параллельное испытание тест-системами № x1 и x2 приводит к «отрицательному» результату. Таким образом, тест-система «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ» позволяет интерпретировать образцы вируссодержащего

материала культуры клеток как «положительные» с титрами в диапазоне 0,01-0,50 lg ККИД₅₀; тест-система № x1 – 0,01-2,20 lg ККИД₅₀; тест-система № x2 – 1,2-2,0 lg ККИД₅₀.

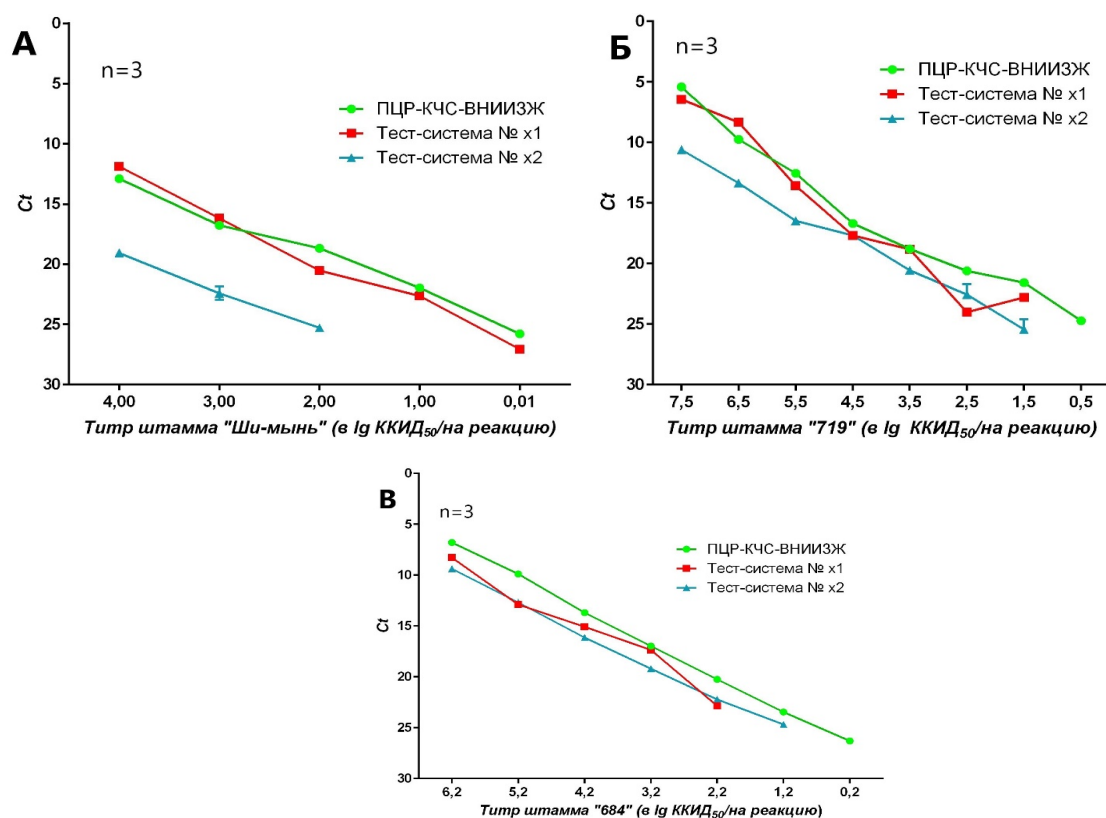


Рисунок 20 - Результаты ОТ-ПЦР-РВ при тестировании штаммов вируса КЧС с различными титрами тест-системами «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ», № x1 и x2 (n=3)
Примечание: На графиках показаны значения *Ct* на каналах: green – значение для фрагмента вируса КЧС (тест-система «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ»); yellow - значение для фрагмента вируса КЧС, полученное с использованием тест-системы № x1 и x2 согласно инструкции производителя.

В рамках проведения **второго этапа сравнительного анализа диагностической чувствительности** исследовали 161 истинно положительный образец тремя тест-системами. Результаты представлены на Рисунке 21.

Как показано на Рисунке 21, при использовании тест-системы «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ» количество ложноотрицательных образцов составило 3 из 161, тест-системы № x1 – 10 из 161, тест-системы № x2 – 35 из 161. Таким образом, диагностическая чувствительность тест-системы «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ» составляет 98,14 % (95 % ДИ 90,60-99,42 %), тест-системы № x1 –

93,79 % (95 % ДИ 86,46-98,07 %), тест-системы № x2 – 78,26 % (95 % ДИ 70,70-84,27 %).

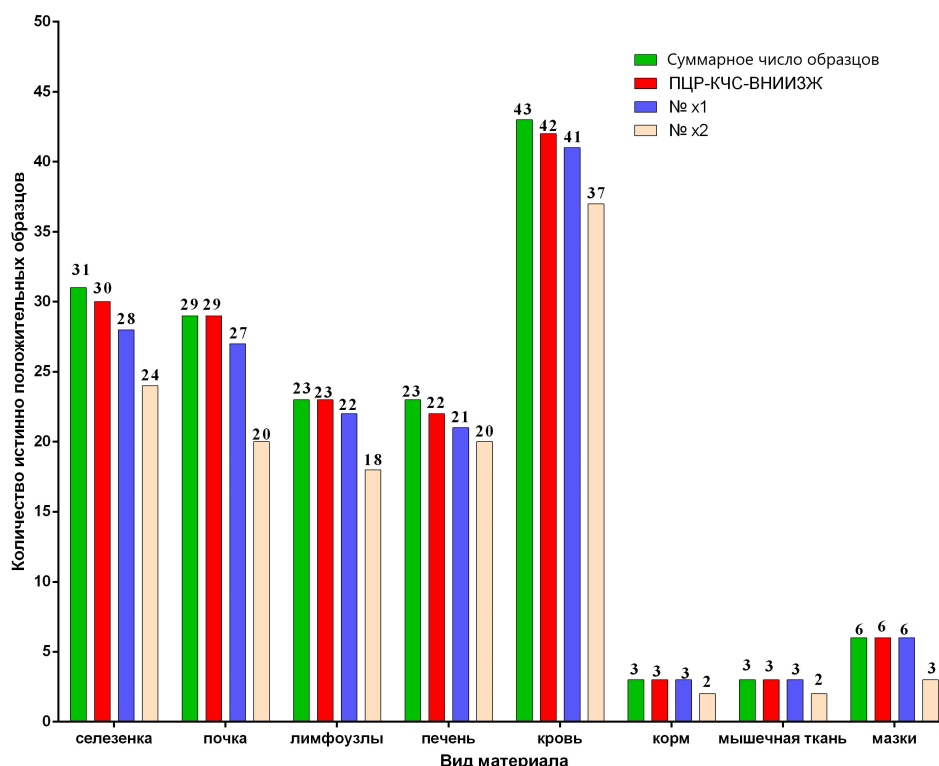


Рисунок 21 – Сравнительный анализ диагностической чувствительности тест-систем с использованием истинно положительных образцов.

Для *сравнительного анализа диагностической специфичности* исследовали 256 истинно отрицательных образцов (в т.ч. содержащих возбудитель ВД КРС и атипичный пестивирус свиней) тест-системами «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ», № x1, № x2. Ложноположительные результаты не регистрировали, что указывает на 100 % диагностическую специфичность (95 % ДИ 86,64-100 %).

3.4 Разработка и валидация метода количественной ОТ-ПЦР-РВ по определению числа копий генома вируса КЧС

Разработанная тест-система «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ» не адаптирована для количественной оценки вирусосодержащего материала, что не позволяет изучать динамику репродукции вируса КЧС как в культурах клеток, так и в организме инфицированных животных. С этими целями проводят титрование путем тестирования серии десятикратных разведений исходного

вируссодержащего материала в чувствительных культурах клеток с детекцией в РПИФ (из-за отсутствия цитопатического действия у вируса КЧС) и вычислением титра по формуле Кербера/Рида-Менча. Однако такой принцип имеет ряд недостатков:

- длительность и трудоемкость получения первичных культур клеток, чувствительных к вирусу КЧС;
- длительный срок культивирования вируса (один пассаж проводится в течение 3-4 суток);
- трудоемкость в оценке репродукции вируса на каждом пассаже с применением дополнительных детектирующих методов (РПИФ);
- дороговизна и недоступность большинства конъюгатов на отечественном рынке, а также возможные неспецифичные результаты при постановке РПИФ;
- ошибки при интерпретации результатов РПИФ в связи с субъективностью при визуальной оценке, следовательно, наименьшая точность количественного анализа;
- высокий риск контаминации культуры клеток, в частности при титровании микрометодом с использованием культуральных планшетов.

В отличие от РПИФ количественная ОТ-ПЦР-РВ обладает точностью, большей объективностью при интерпретации результатов, быстротой, доступностью компонентов реакции, а также требует меньших трудозатрат [264]. В связи с этим целью исследования являлась разработка и валидация метода количественной ОТ-ПЦР-РВ для определения числа копий генома (геномных эквивалентов) вируса КЧС в культуре клеток или в организме инфицированных свиней.

Изготовление стандартов. Получение стандартов (калибраторов), содержащих фрагмент РНК вируса КЧС, проводили комплексными методами молекулярного клонирования и Т7-транскрипции *in vitro* согласно разделу 2.1.

Подготовку стандартов выполняли после каждого оттаивания образцов с последующим определением числа копий РНК/мкл спектрофотометрическим методом согласно формуле:

$$\text{Число копий} = \frac{X \text{ нг} \cdot (6.022 \times 10^{23} \text{ молекул/моль})}{N \times 345 \text{ г/моль} \times 1 \times 10^9 \text{ нг/г}},$$

где:

X: концентрация РНК (нг/мкл);

N: размер одноцепочечной РНК (pJET1.2.CSFV.5'-UTR; 2750 п.н.);

345 г/моль: средняя масса одного нуклеотида РНК;

$6,022 \times 10^{23}$ молекул/моль: Константа Авогадро.

Изначально готовили десять последовательных десятикратных разведений РНК pJET1.2.CSFV.5'-UTR, используя их в качестве матрицы при постановке ОТ-ПЦР-РВ. Результаты представлены в Таблице 15.

Таблица 15 – Оптимизация количественного состава стандартов РНК (n=3)

Разведение стандартов (априорное число копий РНК/мкл)	$Ct_{\text{mean}} \pm \delta$	$C_{\text{mean}} \pm \delta,$ CV
10^{-1} (482400000)	-	-
10^{-2} (48240000)	-	-
10^{-3} (4824000)	$1,87 \pm 0,57$	4305568 ± 313715 7,29 %
10^{-4} (482400)	$4,51 \pm 0,13$	$487698 \pm 6454,01$ 1,3 %
10^{-5} (48240)	$9,56 \pm 0,16$	$48480 \pm 183,45$ 3,78 %
10^{-6} (4824)	$13,41 \pm 0,09$	$4714 \pm 155,60$ 3,3 %
10^{-7} (482)	$16,97 \pm 0,26$	$486 \pm 11,53$ 2,37 %
10^{-8} (48)	$19,63 \pm 0,14$	$79 \pm 3,06$ 3,87 %
10^{-9} (5)	$24,37 \pm 0,31$	5 ± 1 20 %
10^{-10} (0-1)	$27,52 \pm 0,29$	$1 \pm 0,58$ 58,0 %

Примечание: «-» - отрицательный результат; Ct_{mean} – среднее значение Ct , C_{mean} – среднее значение экспериментально полученного числа копий генома вируса КЧС в образце, δ – среднее квадратическое отклонение, CV – коэффициент вариации. Зеленым цветом выделен валидный результат ($CV \leq 5\%$), красным цветом – невалидный результат ($CV \geq 5\%$).

Как показано в Таблице 15, оптимальным заданным (априорным) значением числа копий РНК для изготовления стандартов является от 482400 до 48 копий/мкл.

Экстракцию РНК из образцов после пробоподготовки осуществляли методом «тризольного выделения» (*раздел 2.1*) для снижения фрагментации нуклеиновой кислоты и как следствие сохранения её целостности. Контроль качества выделения РНК проводили спектрофотометрическим методом по определению соотношений A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} . Очистку РНК от белковых соединений считали валидной, если значение A_{260}/A_{280} находилось в диапазоне 1,8-2,0. Показатель A_{260}/A_{230} в диапазоне 2,0-2,2 означал удовлетворительную степень очистки РНК от низкомолекулярных соединений.

Постановку ОТ-ПЦР-РВ осуществляли тест-системой «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ», разработанной ранее (*раздел 3.2*).

Интерпретация результатов. Калибровочную кривую и уравнение линейной регрессии выводили в автоматическом режиме с помощью программы амплификатора, исходя из данных C_t , полученных при исследовании образцов с исходным (заданным, априорным) числом копий РНК (стандартов). На основе полученных данных с помощью программного обеспечения амплификатора строили график зависимости (корреляции) C_t от числа копий РНК, использованной в реакции.

Результат расчета считали достоверным, если коэффициент детерминации (R^2) составлял не менее 0,99, а коэффициент вариации (CV) для каждого исследуемого образца не превышал 5 %. Числом копий генома вируса КЧС в исследуемом образце считали среднее значение (C_{mean}) по триплету повторностей, полученное в количественной ОТ-ПЦР-РВ, с обязательным указанием среднеквадратического отклонения (δ).

Валидация. Для определения *правильности* проведено исследование 24 разведений стандартов РНК с различным содержанием аналита в трех повторяемых испытаниях (Рисунок 22).

Исходя из графика линейной зависимости между заданным (априорным, x) и экспериментально полученным (y) числом копий генома вируса КЧС (Рисунок 22), функция выражается как $y = 1,0005x - 22,62$. Угловой коэффициент (k) составляет 1,0005 и соответствует референс-интервалу ($1 \pm 0,05$), а свободный член (b) равен 22,62, что также соответствует установленному референсу (0 ± 50). Таким образом, установили, что метод обладает правильностью.

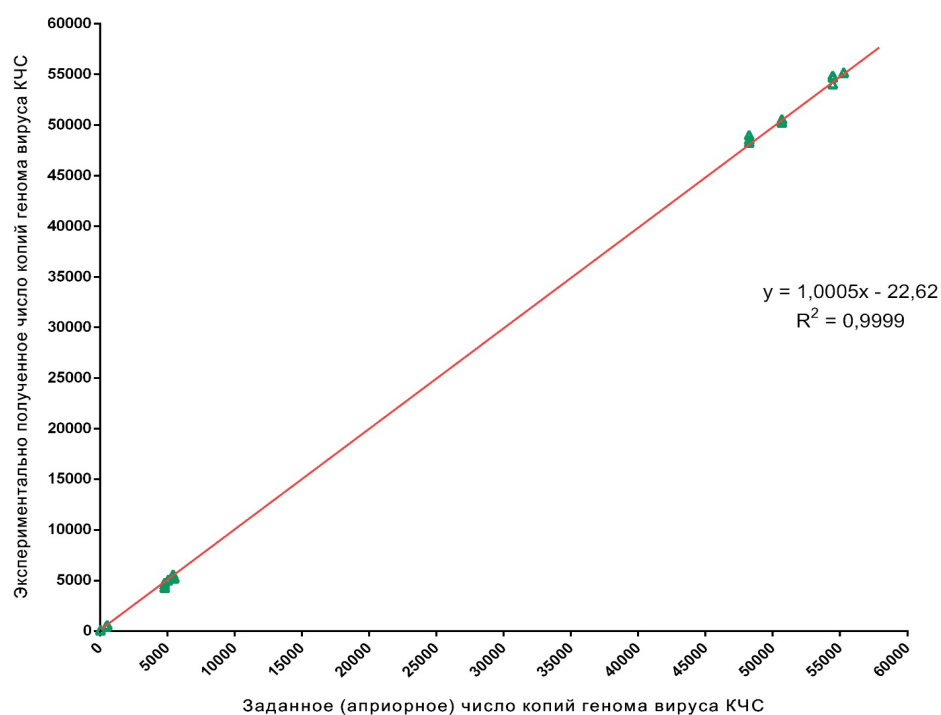


Рисунок 22 – Определение правильности количественной ОТ-ПЦР-РВ: линейная зависимость заданного (априорного) и экспериментально полученного числа копий генома вируса КЧС.

Для определения прецизионности в условии *повторяемости* и *воспроизводимости* анализировали 20 истинно положительных на КЧС образцов в трех параллельных испытаниях в течение дня одним исследователем и в трех параллельных испытаниях в течение трех дней двумя исследователями (Таблица 16).

Согласно таблице 16, результаты являются «прецизионными в условии повторяемости», поскольку в каждом из трех параллельных испытаний в течение дня одним исследователем CV находился в диапазоне 0,22 - 4,86 % (≤ 5 %), и «прецизионными в условии воспроизводимости», поскольку в

каждом из трех параллельных испытаний в течение трех дней двумя исследователями CV находился в диапазоне 0,29 – 9,75 % (≤ 10 %).

Таблица 16 – Определение прецизионности метода количественной ОТ-ПЦР-РВ в условии повторяемости и воспроизводимости

№ п/п	Образец	Прецизионность в условии повторяемости (n=9) $C_{mean} \pm \delta$, CV	Прецизионность в условии воспроизводимости (n=18) $C_{mean} \pm \delta$, CV
1	2	3	4
1	10 % суспензия селезёнки свиньи № 7	48704 $\pm$ 108,89 0,22 %	48641 $\pm$ 212,35 0,44 %
2	10 % суспензия селезёнки свиньи № 3	33509 $\pm$ 74,04 0,22 %	33566 $\pm$ 96,23 0,29 %
3	10 % суспензия селезёнки свиньи № 2	35547 $\pm$ 46,82 1,32 %	35515 $\pm$ 233,41 0,66 %
4	10 % суспензия почки свиньи № 7	882 $\pm$ 14,57 1,75 %	873 $\pm$ 18,74 2,15 %
5	10 % суспензия почки свиньи № 3	763 $\pm$ 14,22 1,86 %	763 $\pm$ 18,50 2,42 %
6	10 % суспензия почки свиньи № 2	877 $\pm$ 18,01 2,05 %	881 $\pm$ 14,51 1,65 %
7	10 % суспензия брыжеечных лимфоузлов свиньи № 7	2241 $\pm$ 53,69 2,40 %	2223 $\pm$ 39,37 1,77 %
8	10 % суспензия брыжеечных лимфоузлов свиньи № 3	2504 $\pm$ 7,21 0,29%	2371 $\pm$ 14,96 0,63%
9	10 % суспензия брыжеечных лимфоузлов свиньи № 2	2217 $\pm$ 6,11 0,28 %	2498 $\pm$ 9,27 0,37 %
10	10 % суспензия печени свиньи № 7	734 $\pm$ 7,68 1,05 %	741 $\pm$ 14,72 1,99 %
11	10 % суспензия печени свиньи № 3	737 $\pm$ 4,58 0,62 %	739 $\pm$ 15,23 2,06 %
12	10 % суспензия печени свиньи № 2	962 $\pm$ 13,08 1,36 %	963 $\pm$ 16,16 1,68 %
13	10 % суспензия мышечной ткани свиньи № 7	1223 $\pm$ 10,21 0,83 %	1239 $\pm$ 23,08 1,86 %
14	10 % суспензия мышечной ткани свиньи № 3	1124 $\pm$ 4,58 0,41 %	1131 $\pm$ 13,59 1,20 %
15	10 % суспензия мышечной ткани свиньи № 2	923 $\pm$ 14,05 1,52 %	929 $\pm$ 14,06 1,51 %
16	кровь свиньи № 2	164 $\pm$ 4,04 2,46 %	165 $\pm$ 3,97 2,41 %
17	кровь свиньи № 3	158 $\pm$ 7,68 4,86 %	160 $\pm$ 6,32 3,95 %
18	кровь свиньи № 6	122 $\pm$ 3,61 2,96 %	133 $\pm$ 12,97 9,75 %

1	2	3	4
19	Вирусосодержащая суспензия штамма «CSF Tigrovoe 16/WB-634»	103 ± 4,04 3,92 %	106 ± 5,15 4,86 %
20	Вирусосодержащая суспензия штамма «719»	1237185 ± 5992,22 0,48 %	1245407 ± 10360,14 0,83 %

Примечание: C_{mean} – среднее значение экспериментально полученного числа копий генома вируса КЧС в образце, δ – среднеквадратическое отклонение, CV – коэффициент вариации. Зеленым цветом обозначены «повторяемые» и «воспроизводимые» результаты.

Линейность и эффективность определяли в одной реакции ОТ-ПЦР-РВ при анализе 20 истинно положительных на КЧС образцов в трех повторениях (Рисунок 23).

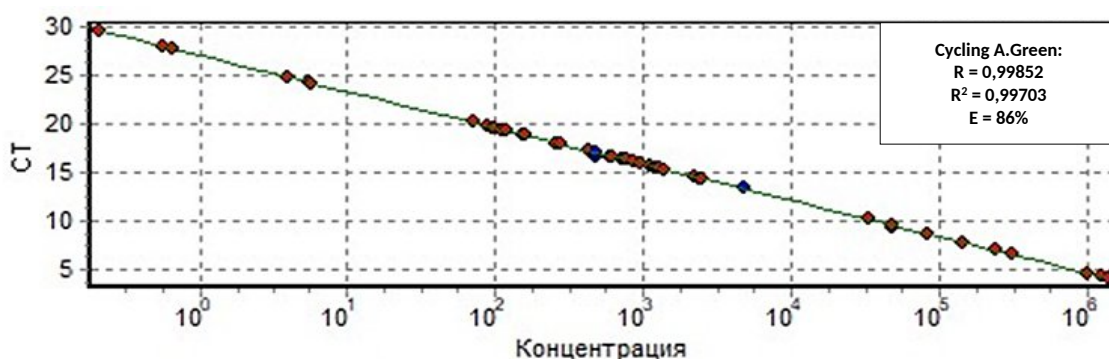


Рисунок 23 – График корреляции числа копий фрагмента РНК (5'-UTR) вируса КЧС и значения порогового цикла амплификации (C_t), определенного в ОТ-ПЦР-РВ, с учетом коэффициента детерминации (R^2) и эффективности (E).

Коэффициент детерминации R^2 равен 0,99703 ($\geq 99\%$), что подчеркивает линейность разработанного метода. Эффективность реакции составила 86 %, что соответствует референс-интервалу (78-97 %).

Аналитическую чувствительность (предел детекции, limit of detection, LOD) вычисляли в 20 испытаниях десятикратных разведений стандартов РНК с различным содержанием аналита (Рисунок 24).

Как показано на рисунке 24, предел детекции составил 1 копия/мкл или 10 копий/на реакцию. 95 % ДИ составил 1,056-1,644, однако значения копий генома корректнее выражать целым числом, то есть 95 % ДИ равен 1-2 копий/мкл.

Важно отметить, что значение C_t для предела детекции в 1 копию/мкл всегда находилось в диапазоне 27,29-27,83, что подчеркивает корректность интерпретации порога «положительного» результата в ОТ-ПЦР-РВ, выполненного ранее (Рисунок 16).

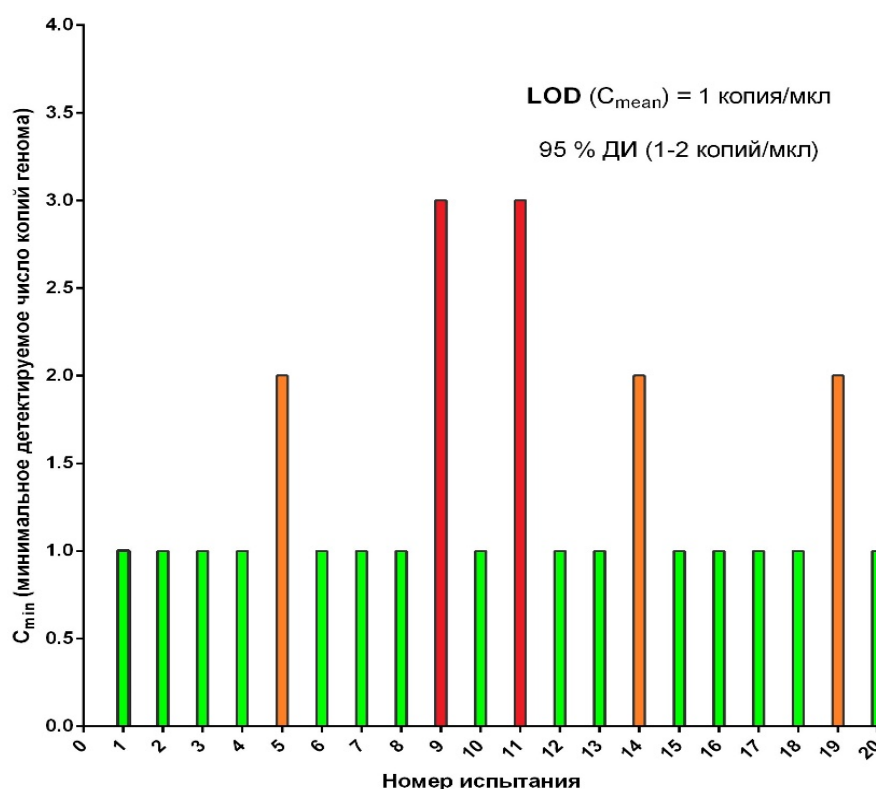


Рисунок 24 – Распределение минимально детектируемых значений числа копий генома вируса КЧС (C_{min}) в 20 испытаниях. *Примечание: LOD (C_{mean}) – предел детекции, выраженный в виде среднего значения минимально детектируемого числа копий генома. 95 % ДИ – 95 % достоверный интервал.*

3.5 Актуализация и апробация метода субгенотипирования вируса КЧС на основе филогенетического анализа полноразмерного гена белка E2

С начала XXI века (с 2010 г. по н.в.) в мире отмечается нисходящий тренд по числу вспышек КЧС. Улучшение ситуации связывают с массовой иммунизацией свиней живыми вакцинами, а также с усилением мер биологической защиты предприятий [21]. По данным ВОЗЖ, в 2024-2025 гг. официальная компания вакцинации против КЧС продолжалась в Сербии, Черногории, Украине, Беларуси, России, Азербайджане, Китае (включая Гонконг), Индии, Непале, Южной Корее, Японии, Таиланде, Камбодже, Индонезии, Филиппинах, Мадагаскаре, Кубе, Гаити, Доминиканской Республике, Перу, а также в некоторых зонах Бразилии, Колумбии и Эквадора (Рисунок 25) [280].

Главной проблемой масштабного применения живых (аттенуированных, немаркированных) вакцин является невозможность использования серологических реакций в осуществлении стратегии дифференциации вакцинированных и инфицированных животных (DIVA), что влечет за собой ряд торговых ограничений, а также требует актуализации молекулярно-генетических методов в этом вопросе [57].

Несмотря на отсутствие регистрации вспышек КЧС в Европе с 2016 г., во многих странах мира вирус различных субгенотипов продолжает распространяться: 2.1 – в Японии (2018-2025 гг.), 1.5 и 1.6 – в Бразилии (2001-2024 гг.), 1.7 – в Эквадоре (2006-2024 гг.) [167, 211, 216, 217]. Таким образом, молекулярно-эпизоотологические исследования КЧС актуальны в осуществлении надзора за болезнью: при дифференциации вакцинных штаммов и полевых изолятов, определении вирулентности и вероятных путей заноса/распространения вируса. В связи с этим необходимы современные и научно-обоснованные методы субгенотипирования, включая филогенетический анализ.

Согласно главе 1.1.5. «Молекулярная эпизоотология и генотипирование» руководства по наземным животным ВОЗЖ субгенотипирование изолятов вируса КЧС рекомендуется осуществлять на основании трех фрагментов генома. Один из них находится в пределах 5'-нетранслируемой области (5'-UTR, 150 н.), второй - в гене гликопротеида E2 (190 н.), третий - в гене белка NS5B (409 н.) [180]. При этом рекомендуется использовать стандартные праймеры, разработанные Р. Lowings с соавт., 1996, I. Greiser-Wilke с соавт., 1998, и Н. BjoÈrklund с соавт., 1999 [71, 90, 224].

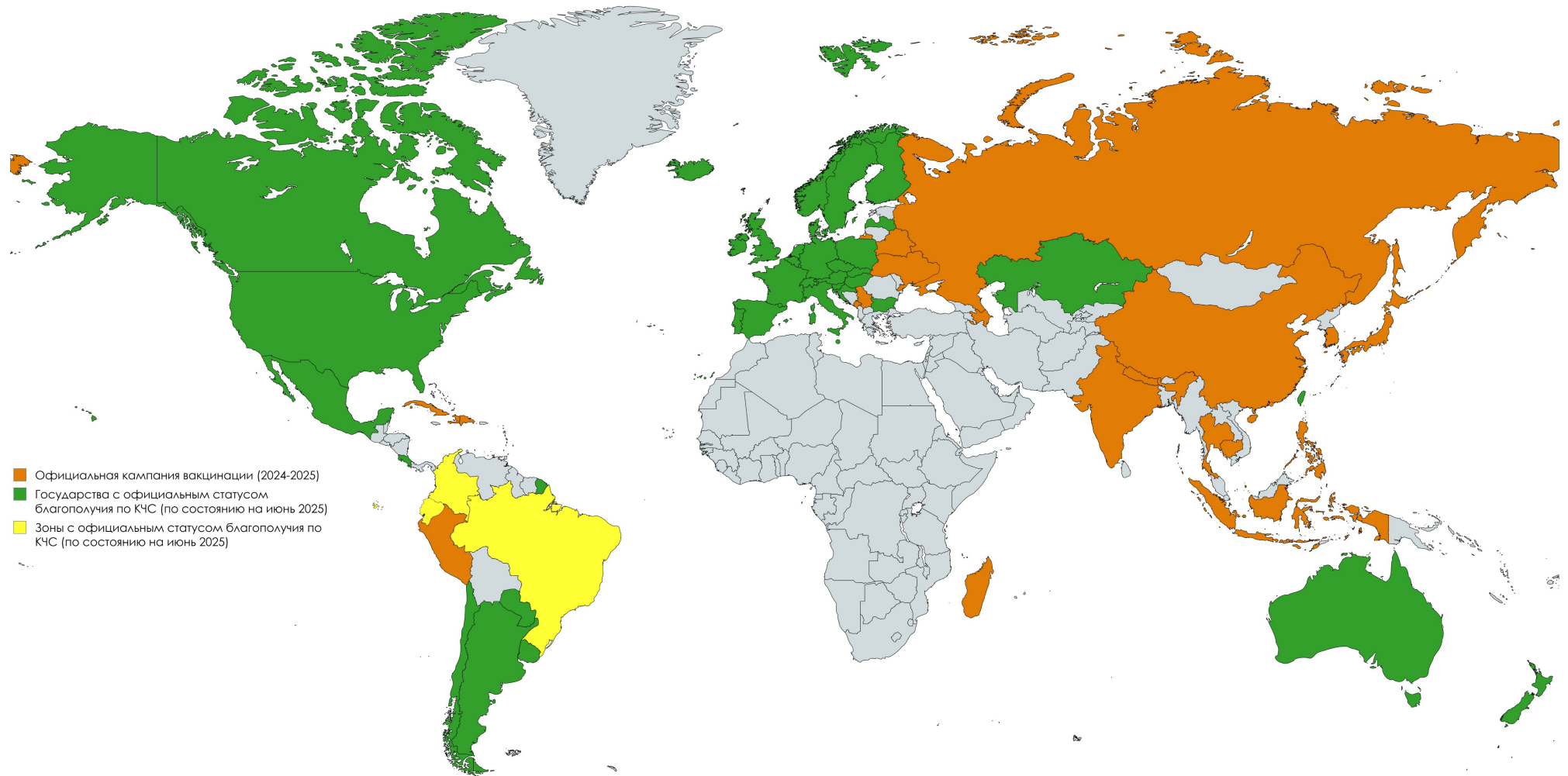


Рисунок 25 – Карта профилактических мероприятий в отношении КЧС, проводимых на территории различных странах мира в период с 2024 по 2025 гг. (по данным ВОЗЖ) [280].

Однако некоторые исследования указывают на высокую точность субгенотипирования и разрешающую способность при использовании в качестве маркера полноразмерного гена белка E2 (~1118 н.) [117, 177, 263]. Поскольку белок E2 является ключевым антигеном в формировании иммунитета против КЧС, так как он отвечает за адсорбцию вируса на поверхности клетки-мишени, соответственно именно к его эпитопам образуются вируснейтрализующие антитела, то использование одноименного гена в молекулярных исследованиях считается более предпочтительным. Кроме того, требуется систематизация филогенетических единиц вируса КЧС и пошаговое руководство по распределению изолятов из-за множества подгрупп внутри субгенотипов 1.1 и 2.1, варианты которых значительно отличаются друг от друга по биологическим свойствам.

Целями данной работы являлись актуализация и апробация метода субгенотипирования вируса КЧС с использованием филогенетического анализа на основе полноразмерного гена белка E2 для дифференциации вакцинных штаммов и полевых изолятов.

Сравнение алгоритмов субгенотипирования. Выполняли анализ двух методов субгенотипирования вируса КЧС: на основании трех фрагментов, рекомендуемых ВОЗЖ- 5'-UTR (150 н.), E2 (190 н.) и NS5B (409 н.), и гена белка E2 (1118 н.). Для этого проводили филогенетический анализ 43 штаммов и изолятов вируса КЧС по: полногеномным последовательностям; конкатенированным участкам 5'-UTR, E2 и NS5B; полноразмерным последовательностям гена белка E2 (Таблица 4). Учитывали наиболее охарактеризованные вакцинные и вирулентные штаммы/изоляты вируса КЧС, составляющие самостоятельные филогенетические единицы (генетические варианты), отличающиеся по своим молекулярно-биологическим свойствам. Внутри каждой группы выбирали небольшое число штаммов/изолятов (1-3) с целью сохранения универсальности анализа и исключения дублирования одинаковых генетических вариантов. Однако полногеномные последовательности вируса КЧС субгенотипов 1.5, 1.6, 3.1 и 3.3 на

сегодняшний день не представлены в базе данных GenBank, в результате чего четыре изолята (Caucaia-2001-BR (1.5), Масара-2009-BR (1.6), CSF0410 Congenital Tremor (3.1), CBR/93 (3.3) дополнительно были включены в филогенетический анализ только по полноразмерному гену белка E2. Результаты представлены на Рисунке 26.

При сравнительном анализе топологии дендрограмм установили, что структура дерева, построенного на основании полноразмерного гена белка E2 (Рисунок 26В), полностью соответствует дереву по полногеномным последовательностям (Рисунок 26А). В свою очередь, анализ по трем фрагментам, рекомендованных ВОЗЖ, обладает меньшей точностью, т.к. нарушает топологию филогенетического дерева вируса КЧС, отображающего эволюцию генотипа 1 (субгенотип 1.7 включается в состав субгенотипа 1.1, а субгенотип 1.3 имеет общего предка с субгенотипом 1.1, а не со всеми другими внутри генотипа 1, Рисунок 26Б). Преимуществом анализа на основе гена белка E2 также является наличие последовательностей штаммов/изолятов вируса КЧС субгенотипов 1.5, 1.6, 3.1 и 3.3, что обеспечивает более высокую разрешающую способность метода.

Разработка ОТ-ПЦР. В процессе разработки метода сконструировано четыре пары праймеров: одна пара «внешних» и три пары перекрывающих «внутренних». Наименование и последовательность праймеров, размера амплифицируемого фрагмента, расположение исследуемых участков в геноме вируса КЧС представлены на Рисунке 27.

Предложено две стратегии ОТ-ПЦР и секвенирования.

Первый способ заключается в использовании «внешних» праймеров (E2aF и E2aR), перекрывающих полноразмерный ген белка E2 вируса КЧС (фрагмент 1450 п.н.), в ОТ-ПЦР. После очистки ПЦР-продукта для его последующего секвенирования по Сэнгеру используют уже три пары «внутренних» праймеров (E2-5F/E2-5R, FE-6F/FE-6R, FE-7F/FE-7R), отжигающихся внутри амплифицированного фрагмента. Данная схема предложена для исследования большого количества образцов, требует

меньших трудозатрат, а также снижает риск перекрестной контаминации, хотя и повышает риск ошибок обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы.

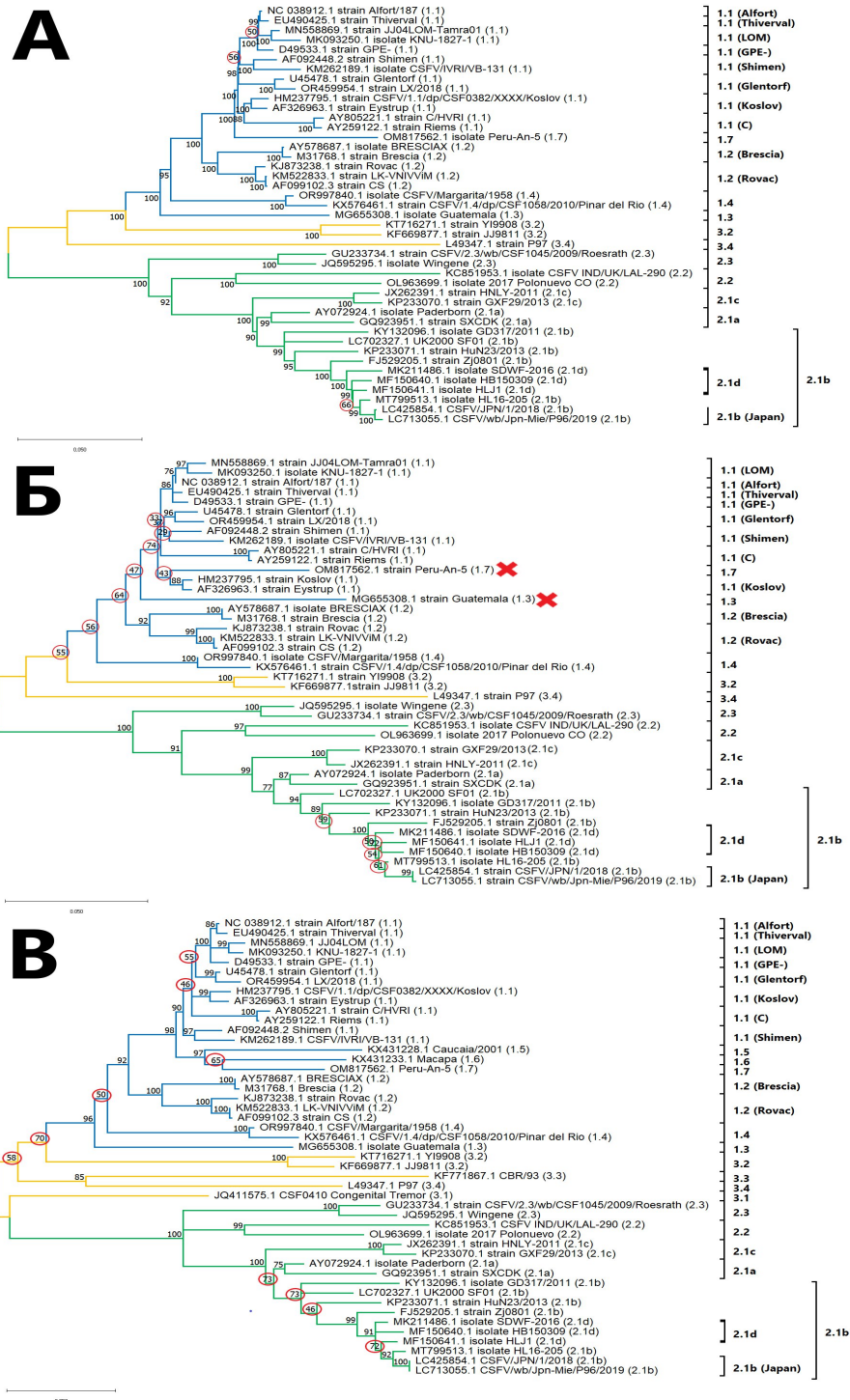


Рисунок 26 – Филогенетический анализ штаммов/изолятов различных субгенотипов вируса КЧС, выполненный на основании: А - полногеномных последовательностей; Б –конкатенированных участков 5'-UTR, E2 и NS5B; В – полноразмерных последовательностей гена белка E2. *Примечание: синий цвет ветви – 1 генотип; зеленый цвет ветви – 2 генотип; оранжевый цвет ветви – 3 генотип; индекс достоверности клады (бутстреп-поддержка) ≤ 75 обозначен красным кругом; несоответствие топологии древу, построенному по полногеномным последовательностям, обозначено красным крестом.*

Второй способ включает в себя использование только «внутренних» праймеров как в ОТ-ПЦР, так и при секвенировании, что снижает вероятность ошибок амплификации. Однако данный метод более трудоемкий, несет риск контаминации и рекомендован при исследовании небольшого количества образцов.

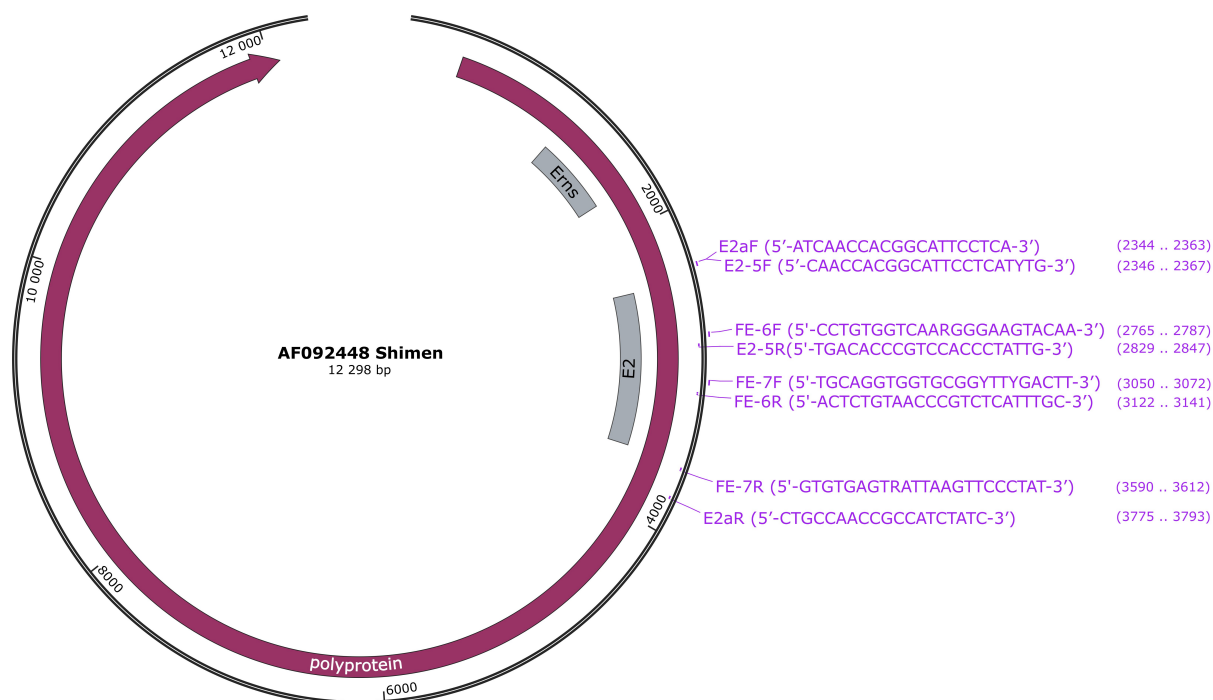


Рисунок 27 – Последовательность и расположение сайтов отжига «внешних» и «внутренних» праймеров для амплификации фрагментов гена белка E2 на примере генома референтного штамма «Ши-Мынь» (субгенотип 1.1). *Примечание: Визуализация последовательности выполнена в программе SnapGene v.5.2.1. Y – вырожденность по пиримидиновым основаниям; R – вырожденность по пуриновым основаниям.*

Для постановки ОТ-ПЦР использовали реагенты от ЗАО «Евроген» (Россия), набор «OneTube RT-PCR TaqMan», в связи с высокими показателями чувствительности и специфичности, как было определено ранее в разделе 3.2. Смесь на одну реакцию содержала: 1X «OneTube RT-PCRmix», 0,4 мкМ прямого (forward, F) и 0,4 мкМ обратного (reverse, R) праймеров, 1X ТМ-ММЛV ревертазу, 10,0 мкл РНК-матрицы. До конечного объема реакционной смеси 25,0 мкл добавляли воду свободную от нуклеаз. Если праймер содержал вырожденность в одной позиции, то его концентрацию в ПЦР-смеси увеличивали до 0,8 мкМ; если имелась вырожденность в двух позициях, то концентрация праймера составляла 1,6 мкМ.

Оптимизировали температуру отжига праймеров с использованием программируемого термоциклера «Mastercycler Gradient» с установленной программой градиента температур для всех пар праймеров в диапазоне 48,0 °С – 58,0 °С (Таблица 17). В качестве матрицы использовали РНК референтного штамма «Ши-Мынь» вируса КЧС с титром 6,93 lg ККИД₅₀/см³.

Таблица 17 – Оптимизация температуры отжига праймеров, перекрывающих полноразмерный ген белка Е2 вируса КЧС

Праймеры	Температура отжига праймеров, °С											
	48,0	48,9	49,7	50,4	51,6	52,5	53,4	54,4	55,3	56,2	57,1	58,0
E2aF/E2aR	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E2-5F/E2-5R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FE-6F/FE-6R	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
FE-7F/FE-7R	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» - отсутствие ПЦР-продукта; «+» - наличие целевого ПЦР-продукта. Оранжевым цветом выделены результаты ОТ-ПЦР, при которых наблюдали наличие шимеров (неспецифичных продуктов реакции), зеленым цветом – оптимальная и универсальная температура для всех пар праймеров.

Исходя из полученных результатов (Таблица 17), универсальная температура отжига для всех пар праймеров не превышает 50,4 °С. Тем самым, для повышения специфичности ОТ-ПЦР выбрали оптимальное (максимальное и универсальное) значение температуры отжига для «внешних» и «внутренних» пар праймеров, которое составило 50 °С.

Учитывая полученные результаты оптимизации температуры отжига праймеров, размер целевого фрагмента и термостабильность ТМ-MMLV ревертазы определен температурно-временной профиль реакции. Программа ОТ-ПЦР включала обратную транскрипцию при 50 °С в течение 40 мин, предварительную денатурацию ДНК в течение 5 мин при 95 °С, амплификацию в 40 циклов (денатурация 95 °С 45 с, отжиг праймеров 50 °С 20 с, элонгация 72 °С 40 с для «внутренних» праймеров и 90 с для «внешних»), а также дополнительную элонгацию при 72 °С в течение 5 мин.

Апробация метода и рекомендации по субгенотипированию. С целью апробации разработанного метода проведены комплексные исследования с использованием ОТ-ПЦР, секвенирования и филогенетического анализа 20 образцов: лиофилизированного материала одного вакцинного («Синлак») и четырех вирулентных («719», «926», «275», «Amur 19-10/WB-12555») штаммов вируса КЧС различных субгенотипов; десять живых вакцин (Таблица 3), пять проб крови («полевых» образцов) от вакцинированных домашних свиней. Результаты представлены на дендрограмме (Рисунок 28).

Для интерпретации результатов выполнен литературный анализ и предложены рекомендации по субгенотипированию, изложенные в Таблице 18, согласно которым проводят дифференциацию вакцинных штаммов и вирулентных изолятов [48, 60, 75, 76, 78, 85, 97, 98, 107, 109, 112, 116, 120, 123, 133, 142, 145, 147, 153, 157, 160, 163, 166, 176, 178, 179, 187, 196, 197, 199, 200, 207, 208, 210, 216, 219, 220, 223, 233, 236, 239, 250, 252, 273, 278].

Как показано на Рисунке 28, большинство образцов соответствует заявленным данным паспорта на штамм или инструкции по применению вакцины. Так, штамм «GPE-» относится к подгруппе 1.1 (GPE-); «Thiverval» – к 1.1 (Thiverval); «LOM-850» – к 1.1 (LOM); «С», «K/SHBC», «CL» – к 1.1 (C); «719» – к 1.1 (Shimen); «СК», «КС», «ЛК-ВНИИВВиМ» и «Синлак» – к 1.2 (Rovac); «926» – к 2.3; 275 – к 2.2; «Amur 19-10/WB-12555» – к 2.1d. Также установлено, что все «полевые» образцы крови от домашних свиней, поступившие в период с 2022 по 2025 гг., содержат вакцинные штаммы подгруппы 1.2 (Rovac). Однако вирус в составе вакцины «Эрипестен» (Bioveta, Чехия, производственная серия 745232AAA) относился к подгруппе 1.1 (Glentorf), характерной для низковирулентных штаммов, хотя в инструкции заявлен «непатогенный» штамм «С». Данная вакцина на сегодняшний день зарегистрирована на территории Республики Беларусь (государстве-члена Евразийского экономического союза (ЕАЭС, номер регистрации 8633-10-23 ЗВВЖЖ) [39].

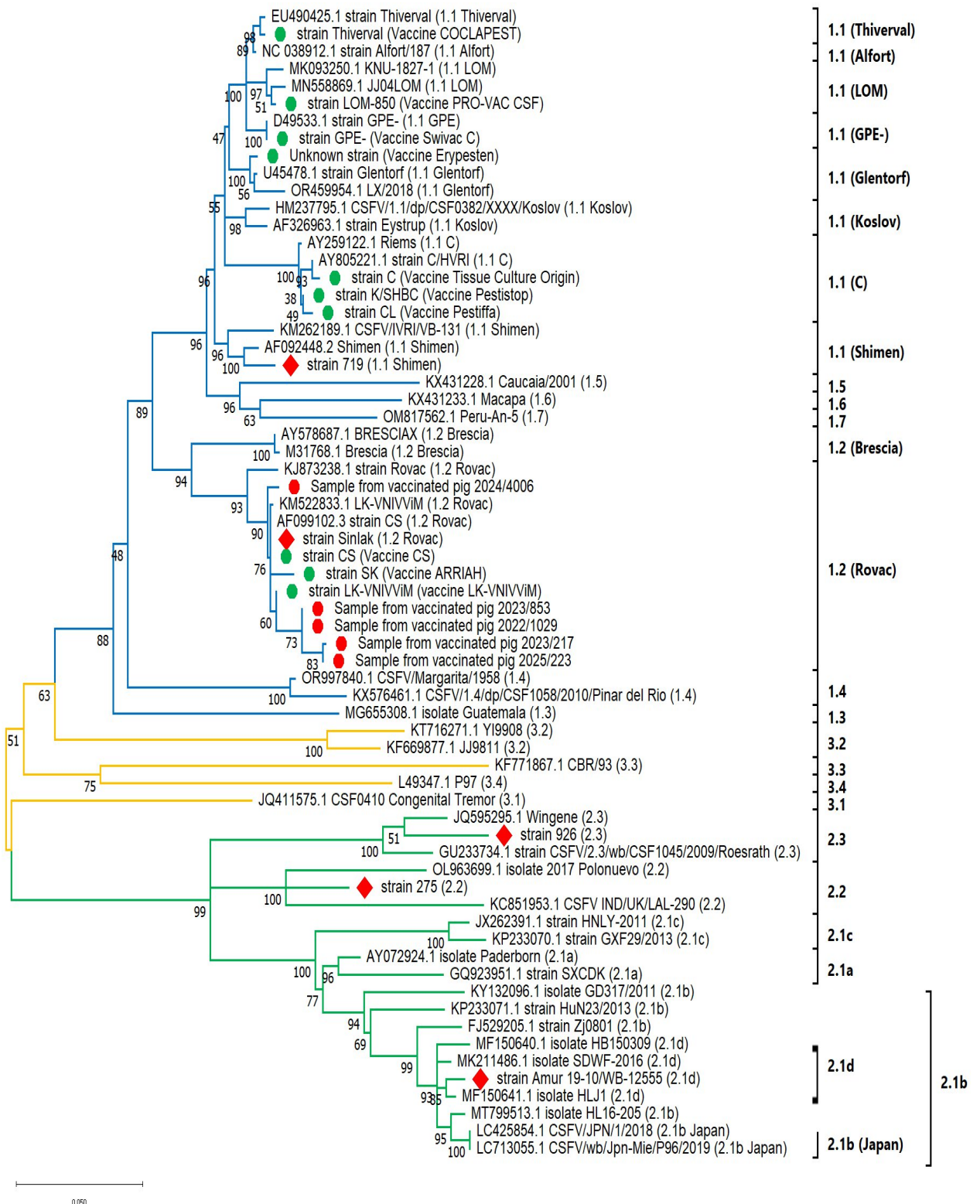


Рисунок 28 — Филограмма, построенная методом максимального правдоподобия на основе последовательностей полноразмерного гена белка Е2 известных штаммов и исследуемых образцов в рамках апробации метода субгенотипирования вируса КЧС. *Примечание: синий цвет ветви — 1 генотип; зеленый цвет ветви — 2 генотип; оранжевый цвет ветви — 3 генотип; образцы лиофилизированного материала штаммов («strain»), импортированных из ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ», отмечены красным ромбом; «полевые» образцы («samples from vaccinated pigs»), поступившие в рамках выполнения государственного эпизоотологического мониторинга - красным кругом, вирус в составе живых вакцин (Vaccine) – зеленым кругом.*

Таблица 18 - Рекомендации по субгенотипированию вируса КЧС

№ п/п	Субгенотип (подгруппа)	Представители: штаммы (изоляты) вируса КЧС	Молекулярно-эпизоотологическая характеристика
1	2	3	4
1	1.1 (Alfort)	«Alfort/187»	Вирулентный вариант, циркулировавший в первой половине XX века в странах Европы и СССР (референс-штамм «Alfort/187», выделенный во Франции) [75, 199].
2	1.1 (Thiverval)	«Thiverval» (вакцинный)	В процессе низкотемпературного культивирования (29-30°C) «Alfort/187» в культуре клеток РК-15 спустя 170 пассажей во Франции получен аттенуированный штамм «Thiverval», использующийся в составе живых вакцин против КЧС [85].
3	1.1 (LOM)	«JJ04LOM; KNU-1827-1»	Изначально вакцинный штамм LOM, применяющийся для специфической профилактики КЧС в Южной Корее с 1974 года. Штамм не являлся безопасным, вызывал аборт у супоросных свиноматок [250]. С начала XXI века в Южной Корее у свиней со сниженной резистентностью была замечена горизонтальная передача и реверсия (возврат к вирулентности) штамма «JJ04LOM» [160]. В 2014-2018 гг. на территории корейского полуострова наблюдали эпизоотию КЧС, вызванную вирулентным вариантом «JJ04LOM» [176].
4	1.1 (GPE)	«GPE-» (вакцинный)	Вакцинный вариант. Получен в Японии в 1969 году путём пассирования низковирулентного штамма «ALD» в культуре клеток морской свинки при 30 °C [60]. Штамм обладает безопасностью и используется для профилактики КЧС в Японии.
5	1.1 (Glentorf)	«Glentorf»; «LX/2018»	Низковирулентный вариант, вызывает длительную виремию и персистенцию в организме свиней, аборт и мертворождение [116]. Изначально был выделен в Германии («Glentorf», 1968 г.), хотя впоследствии регистрировался и в Китае («LX/2018»).
6	1.1 (Koslov)	«Koslov»; «Eustrup»	Один из наиболее вирулентных вариантов вируса КЧС. Регистрировался на территории Европы (в частности, Чехословакии и Германии) во второй половине XX века [76, 153].

1	2	3	4
7	1.1 (C)	«C/HVRI» (вакцинный); «Riems» (вакцинный)	Наиболее известный вакцинный лапинизированный штамм «C» («Chinese strain») или «hog cholera lapinized virus» («HCLV»). Получен путем длительного пассирования высоковирулентного штамма на кроликах (более 900 пассажей) в Харбинском ветеринарном исследовательском институте («HVRI») в Китае (1963 год) [78]. Является основой ряда живых вакцин, производимых в азиатских (Китае, Тайланде, Вьетнаме) и европейских (производный штамм «Riems») странах [153]. На сегодняшний день повсеместно применяются живые вакцины на основе штаммов этой группы.
8	1.1 (Shimen)	«Shimen»; «CSFV/IVRI/VB-131»	Высоковирулентный вариант, который был широко распространен на территории Азии и СССР, по крайней мере, с 1945 г. [187, 199]. Штамм Ши-Мынь чаще всего используется в качестве референтного при филогенетическом анализе. Последние случаи КЧС, вызванные этим вариантом, регистрировались в Индии (2010-е) [97].
9	1.2 (Brescia)	«BRESCIAX», «Brescia»	Вирулентный вариант, был распространен повсеместно (как в Европе, так и в Северной Америке) до конца XX века. Референтный штамм «Brescia» выделен в Италии в 1940-е гг. [123]. Кроме того, вероятно данный вариант стал основой для создания лапинизированного штамма Rovac.
10	1.2 (Rovac)	«Rovac» (вакцинный); «LK-VNIVViM» (вакцинный); «CS» strain (вакцинный)	Вакцинный вариант. Штамм «Rovac» получен в США путем длительного пассирования на кроликах [249]. В СССР в 1967-1971 гг. учеными из ВНИИВВиМ получен штамм «ЛК» путем пассирования низковирулентного вируса КЧС субгенотипа 1.2 в первичной и культуре клеток тестикул ягнят [46]. В свою очередь, штамм «КС» является производным от ЛК-ВНИИВВиМ [133]. На сегодняшний день в России применяются живые вакцины на основе штаммов этой группы.
11	1.3	«Guatemala»	Вирулентный вариант, был распространен в Гватемале и Малайзии в 1980-е гг. [177, 219].
12	1.4	«CSFV/Margarita /1958»; «CSFV/1.4/dp/CS F1058/2010/Pinar del Rio»	Вирулентный вариант, который длительно циркулировал на территории Кубы (по крайней мере, с 1958 по 2010 гг.), со временем наблюдалось ослабление вирулентных свойств [207].

1	2	3	4
13	1.5	«Caucaia-2001-BR»	Вирулентный вариант, является причиной «новой» эпизоотии на территории Бразилии (с 2001 г.) [216]. Поскольку Бразилия неблагополучна по КЧС в настоящий момент, данный вариант является актуальным для усиления его мониторинга среди живых свиней и продукции свиноводства, перевозимых из Южной Америки в другие страны.
14	1.6	«Macapa-2009-BR»	Вирулентный вариант, единственный известный штамм «Macapa-2009-BR» был выделен в Бразилии (2009 г.) [216].
15	1.7	«Peru-An-5»	Вирулентный вариант, который с начала XX века периодически регистрируют в странах Южной Америки (Перу и Эквадоре) [217, 220].
16	3.1	«CSF0410 Congenital Tremor»	Вирулентный вариант. Единственный известный штамм «Congenital Tremor» выделен в 1964 г. в Великобритании и был ассоциирован с врожденным тремором у поросят [145].
17	3.2	«YI9908/Korea 1999»; «JJ9811»	Вариант, циркулировавший в Южной Корее до 2002 г. Показано, что штаммы этой группы обладают различной вирулентностью (от низкой до высокой) [109, 157].
18	3.3	«CBR/93»	Низковирулентный вариант, зарегистрированный в Таиланде в 1993 г. [252].
19	3.4	«P97»	Вариант, циркулировавший в азиатских странах (Японии, Китае) во второй половине XX века [112]. Считается умеренно-вирулентным, однако его репродукционная активность в организме свиней уступает штаммам субгенотипа 2.1 [178]. В результате этого вирус субгенотипа 3.4 был полностью вытеснен вирусом субгенотипа 2.1 на территории Тайваня в 1996 г. [179].

1	2	3	4
20	2.2	«CSFV IND/UK/LAL- 290»; «Polonuevo»	Вариант, впервые описанный на территории Нидерландов в 1977 г. и охарактеризованный как низковирулентный, который периодически регистрировали в Европе до 1998 г. (в Чехии, Германии, Австрии и Италии) [76, 77, 166, 273]. С начала XXI века регистрировали в Китае, затем в Индии (2006-2022 гг.) и во Вьетнаме (2013-2014 г.), где вариант уже был охарактеризован как умеренно- и высоковирулентный [196, 210, 278]. С 2013 по 2017 гг. стал причиной вспышек в различных регионах Колумбии [197]. Разнообразие клинических форм и сравнительно недавние вспышки болезни в Индии указывают на необходимость усиления мониторинга данного варианта.
21	2.3	«Wingene»; «CSFV/2.3/wb/C SFV1045/2009/R oesrath»	Умеренно-вирулентный вариант, характерный для всех европейских стран. Впервые идентифицирован в Бельгии в 1993 г. (штамм «Wingene») [147]. В период с 1993 по 2009 гг. его периодически регистрировали в Испании, Германии, Хорватии, Болгарии и других странах [120, 166, 236]. В России циркулировал до 2012 г. [48].
22	2.1a	«Paderborn»; «SXCDK»	Высоковирулентный вариант, впервые охарактеризованный во время вспышек в Германии (1996 г.) и Нидерландах (1997-1998 гг.) [107]. Распространение этого варианта также наблюдали на территории Китая до 2009 г. [163].
23	2.1b	«UK2000 SF01»; «GD317/2011»; «Zj0801»; «HuN23/2013»; «HL16-205»	Умеренно-вирулентный вариант. Впервые охарактеризован в Великобритании (2000 г.) [200]. Впоследствии его регистрировали в странах Европы совместно с субгенотипом 2.3. Последний случай КЧС, вызванный вирусом субгенотипа 2.1b, в Европе отмечен у домашних свиней в Германии (2016 г.) [98, 236]. В 2002 г. впервые выделен в Южной Корее (город Кимпхо). Был широко распространен в азиатских странах, в особенности на территории Китая (2003-2018 гг.), Южной Кореи (2002-2016 гг.), Монголии (2014 г.) [148, 157, 169, 239].

1	2	3	4
24	2.1c	«HNLY-2011»; «GXF29/2013»	Умеренно-вирулентный вариант, который в период с 2013 по 2021 гг. регистрировали в Китае, Индии и Вьетнаме [148, 157, 169, 210].
25	2.1d	«HLJ1»; «HB150309»; «SDWF-2016»	Умеренно-вирулентный вариант, составляет субкладу внутри обширной клады 2.1b. Впервые идентифицирован в Китае в 2014 году [61]. При этом вакцины на основе китайского штамма С (субгенотип 1.1) не обеспечивают полную защиту при контрольном заражении вирусом КЧС субгенотипа 2.1d [140]. Ретроспективный анализ показал, что на территории Южной Кореи данный вариант циркулировал в период с 2011 по 2017 гг., а Китая – с 2014 по 2020 гг. [148, 157].
26	2.1b (Japan)	«CSFV/JPN/1/2018»; «CSFV/wb/Jpn-Mie/P96/2019»	Умеренно-вирулентный вариант, производный от китайских штаммов субгенотипа 2.1b. Впервые зарегистрирован в Японии (2018 г.) [167]. В период с 2018 по н.в. все вспышки КЧС в Японии вызваны данным вариантом [223].

Полученные результаты указывают на необходимость усиления контроля вакцинных штаммов, включающего проверку их идентичности.

Главными недостатками метода филогенетического анализа являются длительность проведения, дороговизна оборудования и реактивов, а также необходимость в высококвалифицированном персонале. С целью решить имеющиеся ограничения разработаны модернизированные методы ПЦР с анализом кривых плавления высокого разрешения (HRM), позволяющие быстро дифференцировать вакцинные штаммы и «полевые» изоляты вируса КЧС [121, 268]. Однако метод, предложенный P. Ning с соавт., 2013, может различать только вирус подгрупп 1.1 (C) от 1.1 (Shimen) [121]. Способ И.А. Титова с соавт., 2015, ориентирован на дифференциацию вакцинных штаммов субгенотипа 1.2 от вируса КЧС субгенотипов 1.1, 1.4, 2.1 и 2.3 [268]. В России же на сегодняшний день применяются вакцины как на основе штаммов подгруппы 1.2 (Rovac), так и 1.1 (C). Кроме того, универсальность HRM в отношении различных штаммов является спорным вопросом, требующим валидации с использованием панелей референтных образцов. К тому же в случае возникновения новых очагов болезни с целью определения

происхождения, распространения и вирулентности вируса КЧС необходимо будет использовать метод секвенирования по Сэнгеру с последующим субгенотипированием изолятов.

Таким образом, при сложившейся системе специфической профилактики КЧС на территории Российской Федерации с использованием живых немаркированных вакцин на основе штаммов подгрупп 1.2 (Rovac) и 1.1 (С) филогенетический анализ по гену белка Е2 является наиболее актуальным подходом к осуществлению DIVA-стратегии.

В результате исследований предложен метод, заключающийся в использовании новых пар праймеров («внешних» и перекрывающихся «внутренних») с целью амплификации полноразмерного гена белка Е2 вируса КЧС, его дальнейшего секвенирования по Сэнгеру и проведения филогенетического анализа с набором последовательностей известных штаммов. Также изложены рекомендации по субгенотипированию изолятов на основе литературных и полученных данных.

Метод апробирован на 20 образцах лиофилизированного материала вакцинных и вирулентных штаммов, живых вакцин и проб крови от вакцинированных домашних свиней, поступивших при выполнении государственного эпизоотологического мониторинга в период с 2022 по 2025 гг. Специфичность метода экспериментально доказана в отношении подгрупп 1.1 (Shimen), 1.1 (С), 1.1 (Glentorf), 1.1 (Thiverval), 1.1 (LOM), 1.1 (GPE-), 1.2 (Rovac), 2.2, 2.3, 2.1d, что указывает на возможность его применения в диагностических и молекулярно-эпизоотологических исследованиях КЧС.

3.6 Усовершенствование схемы лабораторной диагностики КЧС

Исходя из выполненного анализа результатов лабораторных исследований на КЧС в России, опубликованных в ФГИС «ВЕТИС» (компонент «Веста») в период с 2020 по 2024 гг. (раздел 3.1), наибольшее их число приходится на ИФА, направленный на выявление специфических антител к вирусу КЧС. В период с 2020 по 2024 гг. в результате проведенных

исследований методом ИФА у невакцинированных свиней антитела не выявляли. Основным ограничением в получении Российской Федерацией статуса благополучия ВОЗЖ по КЧС является массовая вакцинация с использованием немаркированных вакцин (по данным ФГБУ «Центр ветеринарии», ежегодно проводится более 90 миллионов вакцинаций свиней от КЧС). В исследуемый период серологические исследования (389,2 тыс.) проводили и среди иммунизированных свиней, которые являлись серопозитивными, что не является рациональным подходом к диагностике [49]. Неинформативность исследований, выполненных методом ИФА в России, подтверждается несогласованностью с основными задачами эпизоотологического надзора (раннее выявление инфицированных животных и доказательство отсутствия циркуляции вируса в популяции) и с рекомендациями Руководства ВОЗЖ [32, 180]. Оценка поствакцинального иммунного ответа относится к контрольным мероприятиям и не входит в систему эпизоотологического мониторинга. В то же время согласно Руководству ВОЗЖ использовать в настоящее время в России серологические методы с целью контроля вакцинации невозможно (при иммунизации немаркированными вакцинами никакие серологические методы не позволяют дифференцировать поствакцинальные антитела от постинфекционных). Тем самым, серологические исследования на КЧС в рамках эпизоотологического мониторинга в настоящее время нецелесообразны в популяции домашних свиней. Его использование в России рационально лишь при исследовании популяций диких кабанов, в которых вакцинация не проводится.

Однако несмотря на имеющиеся ограничения, метод ИФА является быстрым и массовым, который способен играть значительную роль в лабораторной диагностике при отмене вакцинации или использовании маркированных вакцин. К тому же, ИФА-тест-системы и методы, которые внедрены в практику лабораторий, должны содержать рекомбинантный белок E2 в качестве антигена, быть обязательно валидированы согласно параметрам сходимости, воспроизводимости, чувствительности (Se) и специфичности (Sp)

[180]. Особое внимание необходимо уделять отсутствию перекрестной реакции между антителами к другим пестивирусам (возбудителю вирусной диареи КРС, пограничной болезни овец, атипичному пестивирусу свиней и т.д.) в сыворотке крови и антигеном в составе ИФА-тест-систем.

Согласно Руководству ВОЗЖ по диагностике КЧС, для выявления клинических случаев болезни по обнаружению антител рекомендуется использовать не ИФА, а реакцию нейтрализации [10, 180]. Данный метод является наиболее чувствительным для выявления антител, однако его проведение требует высоких затрат на ведение банка культур клеток, наличие референтных вирусов и закупку дорогостоящих антивидовых конъюгатов и моноклональных антител, в результате чего он не используется на сегодняшний день в рутинной диагностике [258]. Хотя наличие данного метода в референтных лабораториях необходимо для дифференциации ложнопозитивных сывороток в ИФА. Внедрение реакции нейтрализации в деятельность аккредитованных ветеринарных лабораторий России является актуальной задачей при отказе от вакцинации или применении маркированных вакцин, но не в текущей эпизоотической ситуации в стране, поскольку данный метод, аналогично ИФА, не позволяет осуществлять DIVA-стратегию.

Самым доступным методом диагностики КЧС в текущей эпизоотической ситуации является ОТ-ПЦР-РВ. Разработанная в рамках данной работы тест-система «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ» (*раздел 3.2*) валидирована на 417 «референтных» образцах (истинно положительных и истинно отрицательных) и апробирована на 1047 образцах, поступивших в рамках выполнения государственного эпизоотологического мониторинга, что указывает на возможность ее масштабного применения в диагностике.

Также в действующих Ветеринарных Правилах по КЧС (№ 580 от 29.09.2020 г.) упоминается использование РПИФ с целью обнаружения антигена вируса КЧС в мазках-отпечатках биологического материала. В последние годы же сократились случаи использования упомянутого метода

для подтверждения диагноза в связи с дороговизной и недоступностью большинства конъюгатов на отечественном рынке, возможностью получения неспецифичных результатов, ошибок при визуализации результатов реакции в связи с субъективностью оценки [10].

Вирусовыделение (В/В) является одним из прямых методов диагностики, однако число исследований, проведенных данным методом, на территории страны является крайне малым по сравнению с общим числом исследований. Согласно рекомендациям ВОЗЖ, идентификацию репродукции вируса можно проводить спустя 24-96 ч после инфицирования клеток. При постановке В/В необходимо планировать проведение 3-5 пассажей [180]. Однако данная методология имеет ряд ограничений, к примеру, дорогостоящее ведение банка культур клеток, дороговизна и недоступность большинства специфичных конъюгатов на отечественном рынке и ошибки при визуализации результатов после окрашивания. Применение при идентификации ОТ-ПЦР упрощает и удешевляет детекцию результатов В/В, а также снижает вероятность получения ложных результатов [72]. В/В же способствует получению актуальных изолятов и штаммов вируса КЧС с целью оценки их биологических свойств на естественно-восприимчивых животных (контагиозности, вирулентности, сероконверсии, иммуногенности) с последующим депонированием в государственные коллекции и использовании в разработке диагностикумов или при оценке иммунобиологических свойств вакцин. Такая деятельность составляет важнейшую часть эпизоотологического надзора за КЧС, но не относится прямым образом к диагностике болезни.

Таким образом, В/В предпочтительно используют в научных исследованиях как один из методов эпизоотологического надзора, но при рутинной диагностике массовое применение получил ОТ-ПЦР [30, 242].

При массовой иммунизации свиней живыми вакцинами масштабное использование ОТ-ПЦР-РВ возможно только в случае наличия методов дифференциации вакцинных штаммов и вирулентных изолятов вируса КЧС.

В данной работе (раздел 3.5) показана более высокая точность субгенотипирования вируса КЧС внутри генотипа 1 с использованием полноразмерного гена белка E2 (1118 н.), чем при исследовании трёх фрагментов, рекомендуемых ВОЗЖ - 5'-UTR (150 н.), E2 (190 н.) и NS5B (409 н.). При апробации метода установили, что все тестируемые образцы вирулентных штаммов соответствовали заявленным данным паспорта, а большинство исследованных живых вакцин – нормативно-технической документации. Однако в одной вакцине «Эрипестен» (Bioveta, Чехия), зарегистрированной в Беларуси, обнаружен вирус подгруппы 1.1 (Glentorf), хотя в регистрационных документах заявлен штамм «С». Полученные данные свидетельствует о необходимости усиления контроля вакцинных штаммов, включающего проверку их идентичности в рамках регистрационных процедур.

На основе всего вышесказанного предложена усовершенствованная схема лабораторной диагностики КЧС в популяциях домашних свиней и диких кабанов при текущей ситуации, при условии отказа от вакцинации и применении маркированных вакцин (Рисунок 29).

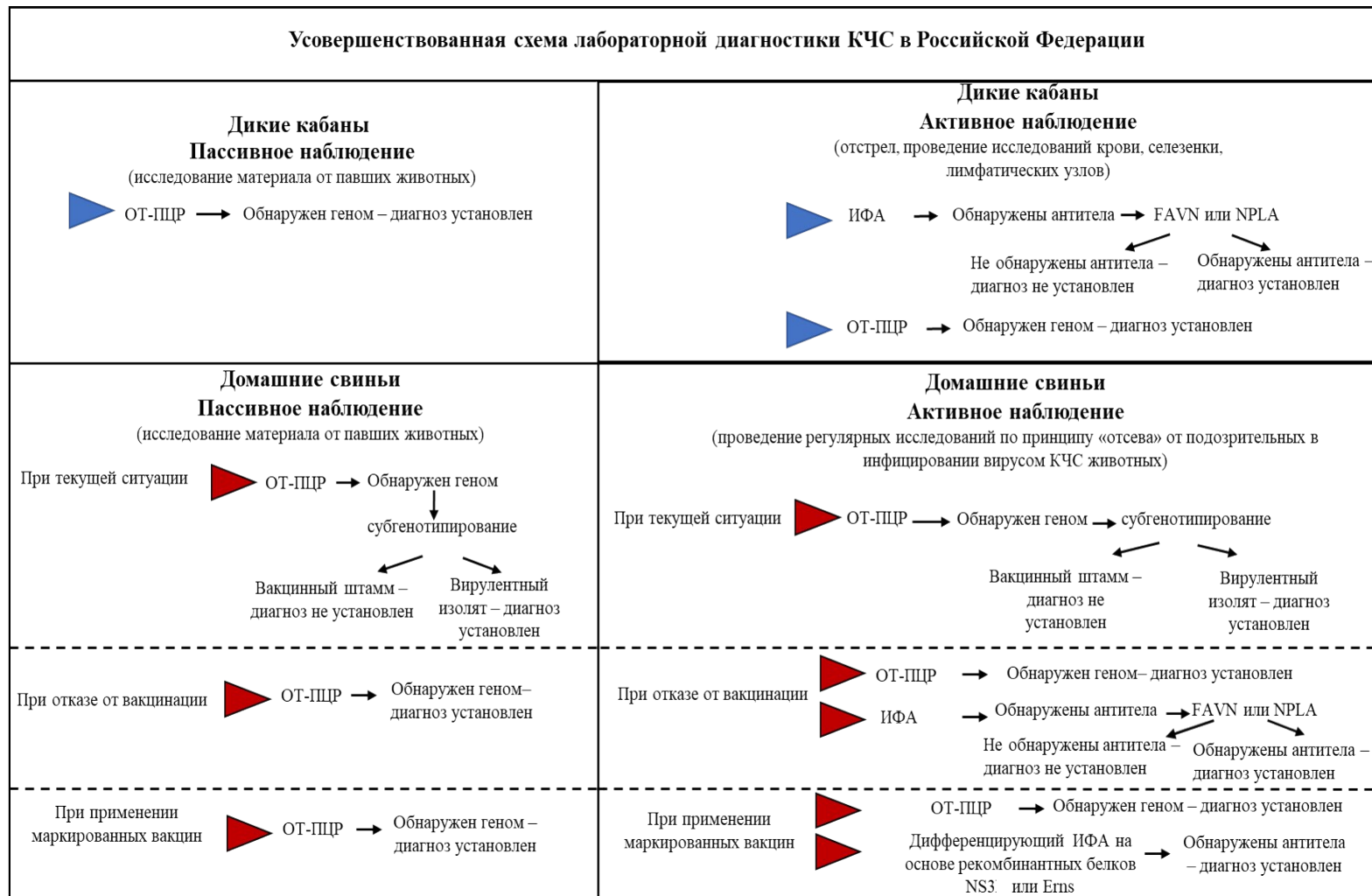


Рисунок 29 – Предложенная стратегия лабораторного исследования образцов от диких и домашних свиней на КЧС в Российской Федерации. *Примечание: В случае выявления генома вируса КЧС, не относящегося к вакцинным штаммам, рекомендуется проводить вирусыведение для дальнейшего использования штамма в научных исследованиях. При текущей ситуации серологическая диагностика в популяциях домашних свиней нецелесообразна в связи с массовой иммунизацией живыми вакцинами.*

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 Итоги исследований

1. Анализ результатов лабораторных исследований на КЧС в России, опубликованных в информационной системе ФГИС «ВЕТИС» (компонент «Веста») в период с 2020 по 2024 гг., показал, что доля прямых методов диагностики КЧС (ОТ-ПЦР, РПИФ и вирусывыделения) составляет 22,8 % от общего числа исследований. При этом в диагностике преобладает метод ИФА (77,2 %), несмотря на его неинформативность и нецелесообразность проведения в популяции домашних свиней при массовом применении живых вакцин, после использования которых невозможно дифференцировать постинфекционные антитела от поствакцинальных.

2. Разработана тест-система для выявления генома вируса КЧС методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием бактериофага MS2 в качестве ВКО, которая специфична в отношении вирулентных и вакцинных штаммов вируса КЧС субгенотипов 1.1, 1.2, 2.1, 2.2 и 2.3 и не приводит к получению ложноположительных результатов в отношении других пестивирусов. Тест-система апробирована на 1047 «полевых» образцах, что указывает на возможность ее применения в эпизоотологическом мониторинге КЧС.

3. При сравнительном анализе отечественных ПЦР-тест-систем на КЧС установлено, что ВКО только в составе разработанной тест-системы создает «эффект имитации», в то время как целенаправленная ингибиция не влияет на амплификацию фрагмента ВКО в тест-системах № x1 и № x2. Диагностическая специфичность для трех тест-систем составила 100 %. Диагностическая чувствительность для разработанной тест-системы составила 98,14 %; для № x1 - 93,79 %; для № x2 - 78,26 %.

4. Разработан и валидирован метод количественной ОТ-ПЦР-РВ по определению числа копий генома вируса КЧС, который позволяет выявить до одной копии/мкл, обладает линейностью ($R^2=0,99703$), 86 % эффективностью и может использоваться при изучении репродукции вируса КЧС в культурах

клеток или организме инфицированных животных на различных этапах эксперимента.

5. Актуализирован метод субгенотипирования вируса КЧС, включающий амплификацию гена белка E2 (1118 н.) в ОТ-ПЦР с использованием разработанных праймеров (одной пары «внешних» и трех пар перекрывающих «внутренних») и филогенетический анализ. При его апробации установлено, что образцы одного вакцинного и четырех вирулентных штаммов субгенотипов 1.2 (Rovac), 1.1 (Shimen), 2.1d, 2.2 и 2.3 соответствовали заявленным данным паспорта, а 9 из 10 исследованных живых вакцин – нормативно-технической документации. В одной вакцине «Эрипестен» (Bioveta, Чехия) обнаружен вирус подгруппы 1.1 (Glentorf), хотя в инструкции к биопрепарату заявлен штамм «С». В пяти «полевых» образцах крови от домашних свиней, отобранных на территории России в период с 2022 по 2025 гг., обнаружен геном вакцинных штаммов вируса КЧС подгруппы 1.2 (Rovac).

6. Усовершенствована схема лабораторной диагностики КЧС, которая направлена на приоритетное применение ОТ-ПЦР в текущей эпизоотической ситуации, а также учитывает особенности серодиагностики в случае отказа от вакцинации или использования маркированных вакцин на территории Российской Федерации.

4.2 Практические предложения

Предложенные в настоящем исследовании для диагностики КЧС молекулярно-генетические методы и тест-система «ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ» могут применяться как в системе эпизоотологического мониторинга в текущей ситуации, так и при переходе Российской Федерации к поэтапному отказу от вакцинации, что позволяет ветеринарным специалистам оперативно реагировать на подозрение КЧС у свиней, определять вирусную нагрузку в биологическом материале, а также выявлять генетические варианты вируса КЧС при осуществлении DIVA-стратегии и расследовании вспышек.

Несмотря на оснащение отечественного рынка необходимыми для своевременной диагностики ПЦР-тест-системами, имеются некоторые ограничения, не позволяющие Российской Федерации на данный момент получить статус благополучия ВОЗЖ по КЧС. Для исполнения данной задачи же необходим задекларированный и утвержденный на государственном уровне комплекс мер (нормативный документ), согласованный с международными стандартами ВОЗЖ, но при этом учитывающий особенности текущей ситуации в России по КЧС. Такие мероприятия должны включать в себя два возможных сценария: по отказу от вакцинации и использованию маркированных вакцин. Основными положениями в таком документе предлагается обозначить следующие:

- 1) анализ риска повторного заноса и распространения вируса КЧС на территории различных регионов Российской Федерации;
- 2) анализ ежегодных планов эпизоотологического мониторинга по КЧС и перераспределение исследований, проводимых непрямыми методами, с учетом предложенной схемы лабораторной диагностики;
- 3) усиление мер биологической защиты свиноводческих предприятий;
- 4) регионализация (зонирование территории) Российской Федерации с поэтапным отказом от вакцинации, начиная с зон с наименьшим риском заноса вируса КЧС;
- 5) при тотальном отказе от вакцинации возможен постепенный переход на не прямые методы диагностики (ИФА и РН) в течение двух лет;
- 6) разработка и внедрение в практику рентабельных маркированных вакцин, зарегистрированных согласно всем требованиям Руководства ВОЗЖ;
- 7) внедрение в лабораторную практику ИФА-тест-систем, отвечающим требованиям DIVA-стратегии.

4.3 Перспективы дальнейшей разработки

Представленные результаты резюмируют порядок использования референтных (рекомендованных ВОЗЖ) методов диагностики КЧС. Однако актуальным стоит вопрос о разработке мультиплексных вариантов ОТ-ПЦР-РВ, позволяющих проводить одновременную дифференциальную диагностику нескольких болезней свиней (КЧС, АЧС, рожи, РРСС и других). Кроме того, необходима адаптация к современным лабораторным условиям в Российской Федерации и валидация изотермических методов диагностики КЧС (RT-LAMP, LAMP-BART, SHERLOCK и других).

Для реализации DIVA-стратегии на территории страны актуален вопрос о разработке маркированных вакцин, отвечающим всем требованиям ВОЗЖ [180]. Помимо этого, такие препараты должны быть рентабельными. В связи с чем требуется принятие решения компетентными органами на основе экономического обоснования выбора одного из двух подходов для Российской Федерации: отказа от вакцинации или использования маркированных вакцин.

5. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АЧС – африканская чума свиней;
- БОЕ – бляшкообразующая единица;
- ВОЗЖ – Всемирная организация здоровья животных;
- ВКО – внутренний контрольный образец;
- В/В – вирусовыделение;
- ВД КРС – вирусная диарея крупного рогатого скота;
- ГКШМ – государственная коллекция штаммов микроорганизмов;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ДИ – доверительный интервал;
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ККИД – культурально-клеточная инфекционная доза;
- КРС – крупный рогатый скот;
- КЧС – классическая чума свиней;
- ЛПХ – личные подсобные хозяйства;
- ОКОВ – отрицательный контрольный образец выделения;
- ОКОР – отрицательный контрольный образец реакции;
- ОРС – открытая рамка считывания;
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;
- ОТ-ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени;
- ПКОВ – положительный контрольный образец выделения;
- ПКОР – положительный контрольный образец реакции;
- п.н. – пары нуклеотидов;
- РН – реакция нейтрализации;
- РНК – рибонуклеиновая кислота;
- РКШМ – рабочая коллекция штаммов микроорганизмов;
- РПИФ – реакция прямой иммунофлуоресценции;
- РРСС – репродуктивно-респираторный синдром свиней;

СТО – стандарт организации;

ТС – культура клеток тестикул свиней;

ТЯ – культура клеток тестикул ягнят;

CV – коэффициент вариации;

St – пороговый цикл амплификации;

CRISPR – система кластерных регулярно расположенных коротких палиндромных повторов;

DIVA – дифференциация инфицированных от вакцинированных животных;

DMA – анализ кривых плавления;

FAVN – реакция нейтрализации с детекцией флуоресцирующих микробляшек;

HRM – анализ кривых плавления высокого разрешения;

ICTV – Международный комитет по таксономии вирусов;

LAMP – метод петлевой изотермической амплификации;

LAMP-BART – метод количественной билюминесцентной петлевой изотермической амплификации в режиме реального времени;

LNA – конформационно заблокированные нуклеозиды (замкнутые нуклеиновые кислоты);

LOD – предел детекции;

NPLA – реакция нейтрализации с детекцией иммунопероксидазным методом;

NGS – секвенирование нового поколения;

RT-LAMP – метод петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией;

Se – чувствительность;

Sp – специфичность;

T_a – температура отжига праймеров;

TSV – тунисские овцы;

5'-UTR – 5'- нетранслируемая область;

3'-UTR – 3'- нетранслируемая область.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алипер, Т. И. Актуальные инфекционные болезни свиней: Руководство для студентов, научных и практических специалистов / Т. И. Алипер. – М. : ЗооВетКнига, 2019. – 400 с.
2. Андреев, П. Н. Инфекционные болезни свиней / П. Н. Андреев. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Огиз-Сельхозгиз, 1948. – 472 с.
3. Ахунова, А. Р. Разработка DIVA-совместимых тест-систем для серологической диагностики классической чумы свиней : специальность 4.2.3 "Инфекционные болезни животных и биотехнология" : диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Ахунова Алина Рамилевна. – Санкт-Петербург, 2026. – 153 с.
4. Балышева, В. И. Создание вирусной вакцины против чумы свиней из штамма ЛК-К и результаты производственных испытаний / В. И. Балышева // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 1998. – № 4. – С. 40-42.
5. Безбородова, С. В. Усовершенствование генетических методов лабораторной диагностики классической чумы свиней : специальность 16.00.03 "Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология" : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Безбородова Светлана Валерьевна. – Владимир, 2002. – 136 с.
6. Болезни свиней / сост. Ф. М. Орлов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Сельхозгиз, 1961. – 509 с. : ил.
7. Бьядовская, О. П. Разработка и совершенствование методов иммуноферментной диагностики классической чумы свиней : специальность 03.00.06 : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Бьядовская Ольга Петровна. – Владимир, 2002. – 136 с.
8. Вакцины и стратегия вакцинации против классической чумы свиней / В. А. Сергеев, Б. Г. Орлянкин, К. П. Алексеев [и др.] // Ветеринария. – 2018. – № 4. – С. 3-11.
9. Васильев, А. П. Разработка твердофазного иммуноферментного анализа для прямого обнаружения антигенов вируса классической чумы свиней : специальность 03.00.06 : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Васильев Александр Павлович. – Покров, 2005. – 122 с.
10. Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов КЧС : утв. Приказом № 580

- Минсельхоза России 29.09.2020 / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. – М., 2020. – 30 с.
11. Глотов, А. Г. Пестивирусы жвачных животных / А. Г. Глотов, Т. И. Глотова, А. Ф. Шуляк // Вопросы вирусологии. – 2016. – Т. 61, № 2. – С. 59-62.
 12. ГОСТ Р 70150-2022. Тест-системы для диагностики болезней животных методом полимеразной цепной реакции. Общие требования и методы испытаний : национальный стандарт Российской Федерации. – М. : Российский институт стандартизации, 2022. – 9 с.
 13. ГОСТ Р ИСО 17822-2021. Наборы реагентов для диагностики *in vitro*. Процедуры исследования, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, для обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов. Руководство по обеспечению качества лаборатории : национальный стандарт Российской Федерации. — М. : Российский институт стандартизации, 2021. — 12 с. — (ОКС 11.100.01) (Дата введения 01.04.2022).
 14. Государственный реестр лекарственных средств для ветеринарного применения [Электронный ресурс] / Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор). – URL: <https://fsvps.gov.ru/reestry-2> (дата обращения: 17.03.2026). – Загл. с экрана.
 15. Живая вакцина «КС» против классической чумы свиней и способ профилактики классической чумы свиней : пат. 2129443 С1 Рос. Федерация : МПК А 61 К 39/187, С 12 N 7/00 / В. А. Сергеев, Е. А. Непоклонов [и др.] ; патентообладатель В. А. Сергеев, Е. А. Непоклонов [и др.]. – № 98114374/13 ; заявл. 15.07.1998 ; опубл. 27.04.1999, Бюл. № 12.
 16. Живодеров, С. П. Разработка средств и методов серологического мониторинга классической чумы свиней на основе твердофазного иммуноферментного анализа : специальность 06.02.00 "Ветеринария и Зоотехния" : диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Живодеров Сергей Петрович. – Покров, 2007. – 122 с.
 17. Ильясова, Г. Х. Прямой метод ИФА для выявления антител к вирусу КЧС / Г. Х. Ильясова, Р. Х. Юсупов // Тез. секц. и станд. сообщ. всесоюз. иммунол. съезда (Сочи, 15-17 ноября 1989 г.). – М., 1989. – Т. 1. – С. 217.
 18. Использование внешних и внутренних контрольных образцов при постановке полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции полимеразной цепной реакции / Т. Е. Сизикова, Е. В. Мельникова, А. В. Маношкин [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 3. – С. 41-44.
 19. Картирование антигенных детерминант белка Е2 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. – Т. 24, № 3. – С. 144-149.
20. Классическая чума свиней: прогноз на 2021 год / Шевцов А.А. [и др.] // Прогнозы по ряду болезней животных в Российской Федерации на 2021 год / ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2020. – 26 с.
 21. 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. – Т. 11, № 3. – С. 229-238.
 22. Классическая чума свиней: ретроспективный анализ эпизоотической ситуации в Российской Федерации (1996-2015 гг.) / А. С. Оганесян, А. А. Шевцов, М. А. Шибает [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 3(18). – С. 52-59.
 23. 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.
 24. Коломыцев, А. А. Особенности эпизоотического процесса классической чумы свиней и совершенствование мер борьбы : специальность 16.00.03 "Ветеринария" : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Коломыцев Алексей Александрович. – Покров, 2003. – 37 с.
 25. Костина, Л. В. Эпитопное картирование поверхностного гликопротеина Е2 вируса классической чумы свиней : специальность 03.00.06 : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Костина Людмила Владимировна. – Москва, 2008. – 25 с.
 26. Кочетова, О. В. Инфекционные болезни свиней, распространенные в Российской Федерации / О. В. Кочетова, С. В. Поносов. – Пермь : Пермский институт Федеральной службы исполнения наказаний, 2021. – 259 с.
 27. Кудряшов, А. А. Атлас патологической анатомии свиней / А. А. Кудряшов, А. Н. Гречухин. – Санкт-Петербург : Типография Любавич, 2014. – 250 с.
 28. Лыска, В. М. Разработка и усовершенствование иммунологических методов диагностики классической чумы свиней : специальность 03.00.06 : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Лыска Валентина Маркеловна. – Покров, 1999. – 147 с.
 29. Международный комитет по таксономии вирусов – ICTV [Электронный ресурс] / International Committee on Taxonomy of Viruses. – URL: <https://ictv.global/taxonomy> (дата обращения: 10.12.2025). – Загл. с экрана.

30. Методические рекомендации по выделению вируса классической чумы свиней на первичных культурах клеток (СС, КМС, СП, ТЯ, ТС) с идентификацией возбудителя методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени : утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 14.09.2021 № 42-21 / И. С. Колбин, Н. Н. Власова, А. С. Иголкин [и др.] ; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир : ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2021. – 56 с.
31. Методические рекомендации по выявлению вируса классической чумы свиней в пробах крови и патологических материалов, отобранных от павших или вынужденно убитых свиней, в реакции прямой иммунофлюоресценции (РПИФ) : утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 13.09.2017 / ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир : ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2017. – 14 с.
32. Методические рекомендации по планированию лабораторных исследований и отбору проб для совершенствования эпизоотологического наблюдения за классической чумой свиней на территории Российской Федерации / А. А. Шевцов, И. С. Колбин, А. К. Караулов [и др.]. – М. : ФГБНУ «Росинформагротех», 2025. – 44 с. – URL: <https://mcx.gov.ru/upload/iblock/6f3/b5s8dt85o05507nuntsg4bhuvc4p2j1s.pdf>. (дата обращения: 31.07.2026).
33. Мищенко, Н. К. Штамм pestivirus, используемый для изготовления лапинизированной вирусвакцины против классической чумы свиней : пат. 2096454 С1 Рос. Федерация : МПК С 12 N 7/00, А 61 К 39/187 / Н. К. Мищенко, К. Н. Груздев ; заявитель Всерос. науч.-исслед. ин-т контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов. – № 96116250/13 ; заявл. 08.08.1996 ; опубл. 20.11.1997, Бюл. № 32.
34. Непоклонов, Е. А. Применение моноклональных антител для изучения вируса КЧС / Е. А. Непоклонов, Т. И. Алипер, И. А. Ленева // Вопросы вирусологии. – 1999. – № 2. – С. 54-60.
35. Определение репродуктивных свойств вируса классической чумы свиней вирулентных и вакцинных штаммов в первичных и перевиваемых культурах клеток / И. С. Колбин, А. С. Иголкин, В. Л. Гаврилова [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2022. – Т. 11, № 2. – С. 149-155.
36. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР) : методическое пособие / ООО «ДНК-Технология». – М. : ДНК-Технология, 2012. – 149 с.
37. Официальный сайт компании ООО «Ветбиохим» [Электронный ресурс] / ООО «Ветбиохим». – URL: <https://vetbio.ru> (дата обращения: 31.07.2026). – Загл. с экрана.
38. 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. – Т. 54, № 6. – С. 1236-1246.

39. Реестр зарегистрированных ветеринарных препаратов Республики Беларусь [Электронный ресурс] / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь. – URL: <http://www.dvnp.gov.by/ru/preparaty-ru/> (дата обращения: 11.05.2026). – Загл. с экрана.
40. Решетников, Г. Г. Создание синтетических антигенов для лабораторной диагностики губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота и классической чумы свиней : специальность 03.00.06 : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Решетников Геннадий Геннадьевич. – Владимир, 2005. – 146 с.
41. Совершенствование вакцинации диких кабанов против классической чумы свиней / В. Н. Сазонкин, В. И. Уласов, Е. М. Хрипунов [и др.] // Современные проблемы природопользования, охотоведения и звероводства : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 85-летию ВНИИОЗ (Киров, 22-25 мая 2007 г.) / Всерос. науч.-исслед. ин-т охотничьего хозяйства и звероводства им. проф. Б. М. Житкова. – Киров, 2007. – С. 370-371.
42. Современная эпизоотическая ситуация по КЧС в России / А. А. Шевцов, В. Л. Гаврилова, О. Ю. Горюшев, К. Н. Груздев // Ветеринария сегодня. – 2012. – № 1(1). – С. 55-58.
43. Современное состояние генно-инженерных вакцин в свиноводстве (обзор) / Р. С. Чернышев, А. Р. Шотин, А. С. Иголкин [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2025. – Т. 60, № 2. – С. 245-270.
44. Современные подходы к разработке тест-систем на основе количественной ПЦР в режиме реального времени / М. И. Доронин, Д. В. Михалишин, А. В. Спрыгин [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2023. – Т. 12, № 3. – С. 197-207.
45. Способ изготовления инактивированной вакцины против классической чумы свиней : пат. 2049477 С1 Рос. Федерация : МПК А61К 39/187, С12N 7/06 / В. И. Жестерев, В. И. Балышева, Г. Н. Чурбанова [и др.] ; заявитель Всерос. науч.-исслед. ин-т ветеринар. вирусологии и микробиологии. – № 93021007/13 ; заявл. 23.04.1993 ; опубл. 10.12.1995, Бюл. № 34.
46. Способ получения аттенуированного штамма вируса чумы свиней : а. с. 305710 СССР : МКИ С12К 5/00 / В. А. Сергеев, В. И. Попов, Э. В. Рудобельский [и др.]. – № 1373510/30-15 ; заявл. 28.10.1969 ; опубл. 04.06.1971, Бюл. № 19.
47. Сравнительный анализ методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот / О. С. Чемисова, О. А. Цырулина, А. Л. Трухачев, А. К. Носков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. – Т. 99, № 1. – С. 126-138.

48. Титов, И. А. Геногрупповая принадлежность вирусов КЧС, циркулирующих в Российской Федерации / И. А. Титов, Д. В. Колбасов // Молекулярная диагностика : Сборник трудов X юбилейной международной научно-практической конференции, Москва, 09–11 ноября 2021 года. Том 2. – Тамбов: Общество с ограниченной ответственностью фирма "Юлис", 2021. – С. 207-208.
49. Центр ветеринарии : официальный сайт. – Москва. – URL: xn----8sbfkscavba6bf4aeduc4d.xn--plai (дата обращения: 29.09.2025). – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей.
50. Шевцов, А.А. Классическая чума свиней: перспективы искоренения / А. Шевцов // Животноводство России. – 2021. – № 10. – С. 27-30.
51. Штамм "Синлак" вируса *pestis suum* для изготовления вакцинных препаратов : пат. 2180237 С1 Рос. Федерация : МПК А 61 К 39/187, С 12 N 7/00 / А. А. Гусев, А. С. Толокнов [и др.] ; заявитель Федер. гос. учреждение Всерос. науч.-исслед. ин-т защиты животных. – № 2001105772/13 ; заявл. 02.03.2001 ; опубл. 10.03.2002, Бюл. № 7.
52. Штамм «СК» вируса классической чумы свиней *Pestivirus* для изготовления биопрепаратов для специфической профилактики классической чумы свиней : пат. 2801949 С1 Рос. Федерация : МПК С12N 7/00, А61К 39/187, А61Р 31/14 / Д. А. Бирюченков, Е. П. Баборенко [и др.] ; заявитель Федер. гос. бюджет. учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). – № 2023106078 ; заявл. 12.03.2023 ; опубл. 21.08.2023, Бюл. № 24.
53. Штамм *swine fever virus* для изготовления вакцины против классической чумы свиней : пат. 2057805 С1 Рос. Федерация : МПК С 12 N 7/00, А61К 39/187 / В. И. Жестерев, В. И. Балышева [и др.] ; заявитель Всерос. науч.-исслед. ин-т ветеринар. вирусологии и микробиологии. – № 94004840/13 ; заявл. 08.02.1994 ; опубл. 10.04.1996, Бюл. № 10.
54. Эпизоотическая ситуация по классической чуме свиней в странах мира 2017-2026 гг. [Электронный ресурс] / Официальный сайт Россельхознадзора. – URL: <https://fsvps.gov.ru/jepizooticheskaja-situacija/zarubezhnye-strany/klassicheskaja-chuma-svinej/> (дата обращения: 29.06.2026). – Загл. с экрана.
55. Эпизоотология и инфекционные болезни. Классическая чума свиней : учебно-методическое пособие для студентов факультета ветеринарной медицины по специальности 1-74 03 02 «Ветеринарная медицина» и слушателей ФПК и ПК по ветеринарным специальностям / П. А. Красочко, В. С. Прудников, Н. В. Сеница [и др.] ; Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", 2022. – 38 с.

56. Южаков, А. Г. Молекулярно-генетический анализ вакцинных и вирулентных штаммов пестивирусов : специальность 03.00.0603.00.03 : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Южаков Антон Геннадиевич. – Москва, 2009. – 105 с.
57. A critical review about different vaccines against classical swine fever virus and their repercussions in endemic regions / L. Coronado, C. L. Perera, M. T. Frías [et al.] // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9, No. 2. – P. 1-35.
58. A Multiplex Crystal Digital PCR for Detection of African Swine Fever Virus, Classical Swine Fever Virus, and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus / K. Shi, Ya. Chen, Ya. Yin [et al.] // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2022. – Vol. 9.
59. A multiplex nested RT-PCR for the detection and differentiation of wild-type viruses from C-strain vaccine of classical swine fever virus / Y. Li, J. J. Zhao, N. Li [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2007. – Vol. 143, № 1. – P. 16-22.
60. A mutant of hog cholera virus inducing interference in swine testicle cell cultures / Y. Shimizu, S. Furuuchi, T. Kumagai, J. Sasahara // *American Journal of Veterinary Research*. – 1970. – Vol. 31, № 10. – P. 1789-1794.
61. A new subgenotype 2.1d isolates of classical swine fever virus in China, 2014 / H. Zhang, C. Leng, L. Feng [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2015. – Vol. 34. – P. 94-105.
62. A novel RT-LAMP assay for rapid and simple detection of classical swine fever virus / L. Chen, X. Z. Fan, Q. Wang [et al.] // *Virol Sin*. – 2010. – Vol. 25, № 1. – P. 59-64.
63. A positive-strand RNA virus uses alternative protein-protein interactions within a viral protease/cofactor complex to switch between RNA replication and virion morphogenesis / D. Dubrau, M. A. Tortorici, F. A. Rey [et al.] // *PLoS Pathogens*. – 2017. – Vol. 13, № 1. – P. 1-32.
64. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus / E. Weiland, R. Ahl, R. Stark [et al.] // *Journal of Virology*. – 1992. – Vol. 66, № 6. – P. 3677-3682.
65. 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, No. 11. – P. 1327.
66. Advances in CRISPR-Cas12a/13a-Based Nucleic Acid Detection for Porcine Viral Diseases: A Comprehensive Review / X. Zhang, X. Zhao, Ya. Song [et al.] // *Veterinary Sciences*. – 2026. – Vol. 13, No. 2. – P. 141.
67. An efficient method for high-fidelity messenger RNA amplification from a small amount of total RNA / M. Chiba, S. Asari, M. Kimura, T. Nakamura // *Biomedical Reports*. – 2013. – Vol. 1, № 1. – P. 105-110.

68. An Experimental Infection With Classical Swine Fever Virus in Pregnant Sows: Transmission of the Virus, Course of the Disease, Antibody Response and Effect on Gestation / J. Dewulf, H. Laevens, F. Koenen [et al.] // *Journal of Veterinary Medicine, Series B.* – 2001. – Vol. 48, No. 8. – P. 583-591.
69. Anti-classical swine fever virus strategies / J. Fan, Y. Liao, M. Zhang [et al.] // *Microorganisms.* – 2021. – Vol. 9, No. 4.
70. 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 Research.* – 2010. – Vol. 149, No. 2. – P. 183-189.
71. Application of a computer program for genetic typing of classical swine fever virus isolates from Germany / I. Greiser-Wilke, K. Depner, J. Fritzemeier [et al.] // *Journal of Virological Methods.* – 1998. – Vol. 75, № 2. – P. 141-150.
72. Application of a Real-Time Polymerase Chain Reaction with Internal Positive Control for Detection and Quantification of Enterovirus in Cerebrospinal Fluid / S. Monpoeho, M. Coste-Burel, M. Costa-Mattioli [et al.] // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* – 2002. – Vol. 21, No. 7. – P. 532-536.
73. Assessment of classical swine fever diagnostics and vaccine performance / S. Blome, A. Meindl-Böhmer, W. Loeffen [et al.] // *Revue Scientifique et Technique.* – 2006. – Vol. 25, № 3. – P. 1025-1038.
74. Attachment, Entry, and Intracellular Trafficking of Classical Swine Fever Virus / X. Guo, M. Zhang, X. Liu [et al.] // *Viruses.* – 2023. – Vol. 15, No. 9. – P. 1870.
75. Aynaud, J. M. Etude de la multiplication en cycle unique d'un clone du virus de la peste porcine classique au moyen de l'immunofluorescence / J. M. Aynaud // *Annales de Recherches Vétérinaires.* – 1968. – Vol. 1. – P. 25-36.
76. Bartak, P. Genetic typing of classical swine fever virus isolates from the territory of the Czech Republic / P. Bartak, I. Greiser-Wilke // *Veterinary Microbiology.* – 2000. – Vol. 77, No. 1-2. – P. 59-70.
77. Biagetti, M. Molecular epidemiology of classical swine fever in Italy / M. Biagetti, I. Greiser-Wilke, D. Rutili // *Veterinary Microbiology.* – 2001. – Vol. 83, No. 3. – P. 205-215.
78. Bognár, K. Experiences with a Chinese strain of lapinized swine fever virus / K. Bognár, J. Mészáros // *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae.* – 1963. – Vol. 13. – P. 69-74.
79. Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis / S. Lecot, S. Belouzard, J. Dubuisson [et al.] // *Journal of Virology.* – 2005. – Vol. 79, № 16. – P. 10826-10829.
80. Bovine viral diarrhea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes / E. Weiskircher,

- Ja. Aligo, G. Ning, K. V. Konan // *Virology Journal*. – 2009. – Vol. 6, No. 1. – P. 1-15.
81. 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 // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2018. – Vol. 5, № 31. – P. 1-19.
 82. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector / O. O. Abudayyeh, D. B. T. Cox, F. Zhang [et al.] // *Science*. – 2016. – Vol. 353, No. 6299. – P. aaf5573.
 83. Challenge of pigs with classical swine fever viruses after C-strain vaccination reveals remarkably rapid protection and insights into early immunity / S. P. Graham, H. E. Everett, F. J. Haines [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. 1-13.
 84. Characterisation of Newly Emerged Isolates of Classical Swine Fever Virus in China, 2014-2015 / C. Leng, H. Zhang, Y. Kan [et al.] // *Journal of Veterinary Research*. – 2017. – Vol. 61, № 1. – P. 1-9.
 85. Characteristics of a new live virus vaccine against hog cholera prepared in tissue culture at low temperature: the "Thiverval" strain / J. M. Aynaud, S. M. Launai, G. Corthier, H. Laude // *Proceedings of the International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress (Ames, Iowa, USA, 1976)*. – Ames, 1976. – P. 34.
 86. Characteristics of Classical Swine Fever Virus Variants Derived from Live Attenuated GPE – Vaccine Seed / T. Kim, L. T. Huynh, Sh. Hirose [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, No. 8. – P. 1672.
 87. 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, № 2. – P. 332-341.
 88. Characterization of essential domains and plasticity of the Classical Swine Fever Virus Core protein / C. Riedel, B. Lamp, M. Heimann [et al.] // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84, № 21. – P. 11523-11531.
 89. Characterization of the First Marine Pestivirus, Phocoena Pestivirus (PhoPeV) / L. Söder, D. Meyer, O. Isken [et al.] // *Viruses*. – 2025. – Vol. 17, No. 1. – P. 107.
 90. Classical swine fever diversity and evolution / P. Lowings, G. Ibata, J. Needham [et al.] // *Journal of General Virology*. – 1996. – Vol. 77, № 6. – P. 1311-1321.
 91. Classical Swine Fever in Brazil: Study for the survey of classical swine fever outbreaks in Brazil from 1978 to 2004 / T. R. P. Freitas, E. G. Esteves, A. M. Oliveira [et al.] // *Semina: Ciencias Agrarias*. – 2007. – Vol. 28, № 2. – P. 277-286.
 92. Classical swine fever in China: a minireview / Y. Luo, S. Li, Y. Sun [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2014. – Vol. 172, № 1-2. – P. 1-6.

93. Classical swine fever in India: current status and future perspective / V. K. Singh, K. K. Rajak, A. Kumar, Sh. K. Yadav // *Tropical Animal Health and Production*. – 2018. – Vol. 50, No. 6. – P. 1181-1191.
94. Classical swine fever in northeast India: prevention and control measures / B. Bett, R. Deka, V. Padmakumar [et al.]. – Nairobi, Kenya : International Livestock Research Institute, 2012. – 4 p. – (ILRI Policy Brief ; № 7).
95. Classical swine fever in pigs: Recent developments and future perspectives / V. Chander, S. Nandi, C. Ravishankar [et al.] // *Animal Health Research Reviews*. – 2014. – Vol. 15, № 1. – P. 87-101.
96. Classical swine fever vaccines—State-of-the-art / S. Blome, C. Moß, I. Reimann [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2017. – Vol. 206. – P. 10-20.
97. Classical Swine Fever Virus Biology, Clinicopathology, Diagnosis, Vaccines and a Meta-Analysis of Prevalence: A Review from the Indian Perspective / Ya. S. Malik, S. Bhat, O. R. V. Kumar [et al.] // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9, No. 6. – P. 500.
98. 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 // *Veterinary Microbiology*. – 2010. – Vol. 146, No. 3-4. – P. 276-284.
99. Classical swine fever virus NS5A protein interacts with 3'-untranslated region and regulates viral RNA synthesis / C. Sheng, Y. Chen, J. Xiao [et al.] // *Virus Research*. – 2012. – Vol. 165, № 1. – P. 63-70.
100. Classical swine fever virus NS5A regulates viral RNA replication through binding to NS5B and 3'UTR / Y. Chen, J. Xiao, J. Xiao [et al.] // *Virology*. – 2012. – Vol. 432, № 2. – P. 376-388.
101. Classical swine fever virus: the past, present and future / L. Ganges, H. R. Crooke, J. A. Bohórquez [et al.] // *Virus Research*. – 2020. – Vol. 289. – P. 198151.
102. Classical swine fever: the global situation / S. Edwards, A. Fukusho, P. C. Lefevre [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2000. – Vol. 73, No. 2-3. – P. 103-119.
103. Classical swine fever: Unveiling the complexity through a multifaceted approach / A. Khairullah, M. Effendi, I. Moses [et al.] // *Open Veterinary Journal*. – 2024. – Vol. 14, No. 10. – P. 2497.
104. Classical swine fever-an updated review / S. Blome, J. Henke, J. Carlson [et al.] // *Viruses*. – 2017. – Vol. 9, No. 4. – P. 1-24.
105. Cloning and Sequencing of Full-length cDNA of Classical Swine Fever Virus LPC Strain / M. L. Wong, B. Y. Peng, Ja. J. Liu, T. J. Chang // *Virus Genes*. – 2001. – Vol. 23, No. 2. – P. 187-192.
106. Comparative analyses of host responses upon infection with moderately virulent Classical swine fever virus in domestic pigs and wild boar / A. Petrov,

- U. Blohm, M. Beer [et al.] // *Virology Journal*. – 2014. – Vol. 11, No. 1. – P. 1-6.
107. Comparative sequence analysis of classical swine fever virus isolates from the epizootic in the Netherlands in 1997-1998 / M. N. Widjojoatmodjo, H. G. P. Van Gennip, A. J. De Smit, R. J. M. Moormann // *Veterinary Microbiology*. – 1999. – Vol. 66, No. 4. – P. 291-299.
 108. Comparison of the Pathogenicity of Classical Swine Fever Virus Subgenotype 2.1c and 2.1d Strains from China / G. Hao, H. Zhang, H. Chen [et al.] // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9, No. 10. – P. 821.
 109. Complete Genome Sequence Analysis of Acute and Mild Strains of Classical Swine Fever Virus Subgenotype 3.2 / S. I. Lim, S. H. Han, H. Hyun [et al.] // *Genome Announcements*. – 2016. – Vol. 4, № 1. – Art. e01329-15.
 110. Complete genome sequence of classical Swine Fever virus subgenogroup 2.1 from assam, India / A. Ahuja, U. Bhattacharjee, A. K. Chakraborty [et al.] // *Genome Announcements*. – 2015. – Vol. 3, № 1. – P. 1-2.
 111. Complete genome sequences of classical swine fever virus: Phylogenetic and evolutionary analyses / Yu. Liu, A. N. Bahoussi, P. H. Wang [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13.
 112. Complete sequence of a subgroup 3.4 strain of classical swine fever virus from Taiwan / Y. J. Lin, M. S. Chien, M. C. Deng, C. C. Huang // *Virus Genes*. – 2007. – Vol. 35, № 3. – P. 737-744.
 113. Comprehensive E2 gene-based phylogeny uncovers emerging lineages and refines global genotype framework of classical swine fever virus / Sh. Sh. Patil, Ja. Harish, G. K. Ramakrishna [et al.] // *Virology*. – 2026. – Vol. 619. – P. 110875.
 114. CRISPR/Cas9-mediated knockout of STAT1 in porcine-derived cell lines to elucidate the role of STAT1 in autophagy following classical swine fever virus infection / L. Zhang, D. Liang, K. Min [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – Vol. 15.
 115. CRISPR-Cas13a system: A novel tool for molecular diagnostics / L. Zhao, M. Qiu, X. Li [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13.
 116. Dahle, J. Comparative study with cloned classical swine fever virus strains Alfort and Glentorf: clinical, pathological, virological and serological findings in weaner pigs / J. Dahle, B. Liess // *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*. – 1995. – Bd. 83. – S. 232-238.
 117. Deciphering the emergence, genetic diversity and evolution of classical swine fever virus / L. Rios, L. Coronado, D. Naranjo-Feliciano [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7, No. 1. – P. 1-18.
 118. Depner, K. Evaluation of real-time RT-PCR assay for the routine intra vitam diagnosis of classical swine fever / K. Depner, B. Hoffmann, M. Beer // *Veterinary Microbiology*. – 2007. – Vol. 121, № 3-4. – P. 338-343.

119. Descriptive epidemiology of classical swine fever outbreaks in the period 2013-2018 in Colombia / P. Pineda, A. Deluque, M. Peña [et al.] // PLoS ONE. – 2020. – Vol. 15, No. 6. – P. e0234490.
120. Descriptive epidemiology of the outbreak of classical swine fever in Catalonia (Spain), 2001/02 / A. Allepuz [et al.] // Veterinary Record. – 2007. – Vol. 160, № 12. – P. 398-403.
121. Detection and differentiation of classical swine fever virus strains C and Shimen by high-resolution melt analysis / P. Ning, H. Li, W. Liang [et al.] // Journal of Virological Methods. – 2013. – Vol. 194, № 1-2. – P. 129-131.
122. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *rattus norvegicus* in New York city / C. Firth, M. Bhat, S. H. Williams [et al.] // MBio. – 2014. – Vol. 5, No. 5. – P. e01933-14.
123. Determinants of virulence of classical swine fever virus strain Brescia / H. G. Van Gennip, A. C. Vlot, M. M. Hulst [et al.] // Journal of Virology. – 2004. – Vol. 78, № 16. – P. 8812-8823.
124. Development and evaluation of rapid detection of classical swine fever virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) / S. Yin, Y. Shang, G. Zhou [et al.] // Journal of Biotechnology. – 2010. – Vol. 146, № 4. – P. 147-150.
125. Development and partial validation of a recombinant E2-based indirect ELISA for detection of specific IgM antibody responses against classical swine fever virus / W. Li, L. Mao, L. Yang [et al.] // Journal of Virological Methods. – 2013. – Vol. 191, № 1. – P. 63-68.
126. Development of a classical swine fever subunit marker vaccine and companion diagnostic test / R. J. M. Moormann, A. Bouma, J. A. Kramps [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2000. – Vol. 73, No. 2-3. – P. 209-219.
127. 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.] // Research in Veterinary Science. – 2001. – Vol. 70, № 1. – P. 1-7.
128. Development of a new loop-mediated isothermal amplification test for the sensitive, rapid, and economic detection of different genotypes of Classical swine fever virus / J. A. Bohórquez, A. Muñoz-Aguilera, S. Lanka [et al.] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2024. – Vol. 14.
129. 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.] // Journal of Virological Methods. – 2009. – Vol. 160, № 1-2. – P. 111-118.
130. Development of a triplex TaqMan real-time RT-PCR assay for differential detection of wild-type and HCLV vaccine strains of classical swine fever virus

- and bovine viral diarrhea virus 1 / X. J. Zhang, Q. Y. Han, Y. Sun [et al.] // *Research in Veterinary Science*. – 2012. – Vol. 92, № 3. – P. 512-518.
131. Development of an Effective Oral Vaccine Dissemination Strategy against Classical Swine Fever for Wild Boar in Gifu Prefecture, Japan / S. Ito, Ja. Bosch, C. Aguilar-Vega [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2023. – Vol. 2023. – P. 9484441.
 132. Development of an indirect ELISA for the detection of antibody against classical swine fever virus / H. Lin, H. Zhou, Z. Tong [et al.] // *Chinese Journal of Veterinary Science*. – 2017. – Vol. 47, № 1. – P. 9-15.
 133. Differentiation between vaccine strain and field isolates of Classical Swine Fever Virus using polymerase chain reaction and restriction test / A. D. Zaberezhny, T. V. Grebennikova, T. I. Aliper [et al.] // *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. – 1999. – Vol. 106, No. 9. – P. 394-397.
 134. Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) / C. W. Canal, I. Hotzel, L. L. de Almeida [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 1996. – Vol. 48, № 3-4. – P. 373-379.
 135. Differentiation of Classical Swine Fever Virus Virulent and Vaccine Strains by CRISPR/Cas13a / Yu. Zhang, Q. Li, R. Wang [et al.] // *Microbiology Spectrum*. – 2022. – Vol. 10, No. 5.
 136. Donis, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host / R. O. Donis // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. – 1995. – Vol. 11, № 3. – P. 393-423.
 137. Early and Solid Protection Afforded by the Thiverval Vaccine Provides Novel Vaccination Alternatives Against Classical Swine Fever Virus / Y. Lamothe-Reyes, J. A. Bohórquez, M. Wang [et al.] // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9, № 5. – P. 1-13.
 138. Edwards, S. Survival and inactivation of classical swine fever virus / S. Edwards // *Veterinary Microbiology*. – 2000. – Vol. 73, No. 2-3. – P. 175-181.
 139. 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.
 140. Efficacy evaluation of the C-strain-based vaccines against the subgenotype 2.1d classical swine fever virus emerging in China / Y. Luo, S. Ji, J. L. Lei [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2017. – Vol. 201. – P. 154-161.
 141. Efficacy of an orally administered classical swine fever live marker vaccine (Flc-LOM-BErns strain) in pigs / S. Choe, G. N. Park, Ki. S. Kim [et al.] // *Vaccine*. – 2023. – Vol. 41, No. 49. – P. 7377-7386.

142. Emergence of 2.1. subgenotype of classical swine fever virus in pig population of India in 2011 / T. K. Rajkhowa, L. Hauhnar, I. Lalrohlua, G. J. Mohanarao // *Veterinary Quarterly*. – 2014. – Vol. 34, № 4. – P. 224-228.
143. Emergence of a Candidate Novel Sub-Genotype 1.1d of Classical Swine Fever Virus in India: Insights from a Comprehensive NS5B Gene Analysis and Multi-Locus Phylogeny / V. Muruganantham, R. Mahadevaswamy, Sh. S. Patil [et al.] // *Current Microbiology*. – 2026. – Vol. 83, No. 2. – P. 120.
144. Emergence of a novel subgenotype 2.4 of classical swine fever virus in India / S. S. Patil, J. Harish, K. R. Ganesh [et al.] // *Research in Veterinary Science*. – 2026. – Vol. 200. – P. 106031.
145. Emerson, J. L. Cerebellar hypoplasia, hypomyelinogenesis, and congenital tremors of pigs, associated with prenatal hog cholera vaccination of sows / J. L. Emerson, A. L. Delez // *Journal of the American Veterinary Medical Association*. – 1965. – Vol. 147, № 1. – P. 47-54.
146. Epidemiological analysis of classical swine fever in wild boars in Japan / Y. Shimizu, Y. Hayama, Y. Murato [et al.] // *BMC Veterinary Research*. – 2021. – Vol. 17, No. 1.
147. Epidemiological characteristic of an outbreak of classical swine fever in an area of high pig density / F. Koenen, G. Van Caenegem, J. P. Vermeersch [et al.] // *Veterinary Record*. – 1996. – Vol. 139, № 15. – P. 367-371.
148. Epidemiological investigation and phylogenetic analysis of Classical Swine Fever virus in Yunnan province from 2015 to 2021 / Ju. Yao, L. Su, Q. Wang [et al.] // *Journal of Veterinary Science*. – 2022. – Vol. 23, No. 4.
149. Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s / J. Fritzemeier, J. Teuffert, I. Greiser-Wilke [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2000. – Vol. 77, No. 1-2. – P. 29-41.
150. Epidemiology of Classical Swine Fever in Japan—A Descriptive Analysis of the Outbreaks in 2018–2019 / Yu. Shimizu, Y. Hayama, Y. Murato [et al.] // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2020. – Vol. 7.
151. Epidemiology, diagnosis and control of classical swine fever: Recent developments and future challenges / A. Postel, S. Austermann-Busch, A. Petrov [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2018. – Vol. 65. – P. 248-261.
152. Establishment and application of a solid-phase blocking ELISA method for detection of antibodies against classical swine fever virus / Yu. Cao, Li. Yuan, Sh. Yang [et al.] // *Journal of Veterinary Science*. – 2022. – Vol. 23, No. 5.
153. Establishment and characterisation of two cDNA-derived strains of classical swine fever virus, one highly virulent and one avirulent / D. Mayer, T. M. Thayer, M. A. Hofmann, J. D. Tratschin // *Virus Research*. – 2003. – Vol. 98, No. 2. – P. 105-116.

154. 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.] // *Veterinary Microbiology*. – 2008. – Vol. 126, No. 1-3. – P. 1-10.
155. 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.] // *Revue Scientifique et Technique*. – 2012. – Vol. 31, № 3. – P. 997-1010.
156. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems / K. S. Makarova, D. H. Haft, R. Barrangou [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. – 2011. – Vol. 9, № 6. – P. 467-477.
157. Evolutionary dynamics of classical swine fever virus in South Korea: 1987-2017 / D. J. An, S. I. Lim, S. Choe [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2018. – Vol. 225. – P. 79-88.
158. Experimental infection of common warthogs (*Phacochoerus africanus*) and bushpigs (*Potamochoerus larvatus*) with classical swine fever virus. I: Susceptibility and transmission / H. Everett, H. Crooke, R. Gurralla [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2011. – Vol. 58, № 2. – P. 128-134.
159. Farez, S. Potential animal health hazards of pork and pork products / S. Farez, R. S. Morley // *Revue Scientifique et Technique*. – 1997. – Vol. 16, № 1. – P. 65-78.
160. Feed contaminated with classical swine fever vaccine virus (LOM strain) can induce antibodies to the virus in pigs / B. Kim, J. Y. Song, D. S. Tark [et al.] // *Veterinary Record*. – 2008. – Vol. 162, № 1. – P. 12-17.
161. Further characterization of Border disease virus isolates: Evidence for the presence of more than three species within the genus Pestivirus / P. Becher, M. König, D. J. Paton [et al.] // *Virology*. – 1995. – Vol. 209, № 1. – P. 200-206.
162. Genetic Diversity and Positive Selection Analysis of Classical Swine Fever Virus Envelope Protein Gene E2 in East China under C-Strain Vaccination / D. Hu, L. Lv, J. Gu [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7, № 85. – P. 1-14.
163. Genetic Diversity of Subgenotype 2.1 Isolates of Classical Swine Fever Virus / W. Gong, J. Wu, Z. Lu [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2016. – Vol. 41. – P. 218-226.
164. Genetic typing of classical swine fever virus / D. J. Paton, A. Mcgoldrick, I. Greiser-Wilke [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2000. – Vol. 73, No. 2-3. – P. 137-157.
165. Genetic typing of recent classical swine fever isolates from India / S. S. Patil, D. Hemadri, B. P. Shankar [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2010. – Vol. 141, № 3-4. – P. 367-373.

166. Genetische Typisierung von deutschen Isolaten des Virus der Klassischen Schweinepest = [Genetic typing of German isolates of classical swine fever virus] / H. Wonnemann, G. Floegel-Niesmann, V. Moennig [et al.] // Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. – 2001. – Vol. 108, № 6. – P. 252-256.
167. Genome Sequence of a Classical Swine Fever Virus of Subgenotype 2.1, Isolated from a Pig in Japan in 2018 / T. Nishi, K. I. Kameyama, T. Kato, K. Fukai // Microbiology Resource Announcements. – 2019. – Vol. 8, № 3. – Art. e01362-18.
168. Genomic localization of hog cholera virus glycoproteins / R. Stark, T. Rümenapf, G. Meyers [et al.] // Virology. – 1990. – Vol. 174, № 1. – P. 286-289.
169. Genotyping and Molecular Characterization of Classical Swine Fever Virus Isolated in China during 2016-2018 / M. Fatima, Yu. Luo, Li. Zhang [et al.] // Viruses. – 2021. – Vol. 13, No. 4. – P. 664.
170. 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. 5524-5530.
171. Hanson, R. P. Origin of hog cholera / R. P. Hanson // Journal of the American Veterinary Medical Association. – 1957. – Vol. 131, № 5. – P. 211-218.
172. Hog cholera virus: Molecular composition of virions from a pestivirus / H. J. Thiel, R. Stark, E. Weiland [et al.] // Journal of Virology. – 1991. – Vol. 65, № 9. – P. 4705-4712.
173. HSP90AA1 interacts with CSFV NS5A protein and regulates CSFV replication via the JAK/STAT and NF- κ B signaling pathway / Ch. Liu, W. Zhao, J. Su [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2022. – Vol. 13.
174. Hulst, M. M. Passage of classical swine fever virus in cultured swine kidney cells selects virus variants that bind to heparan sulfate due to a single amino acid change in envelope protein E(rns) / M. M. Hulst, H. G. van Gennip, R. J. Moormann // Journal of Virology. – 2000. – Vol. 74, № 20. – P. 9553-9561.
175. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae / P. Simmonds, P. Becher, J. Bukh [et al.] // Journal of General Virology. – 2017. – Vol. 98, № 1. – P. 2-3.
176. Impact of a Live Attenuated Classical Swine Fever Virus Introduced to Jeju Island, a CSF-Free Area / S. Choe, J. H. Kim, K. S. Kim [et al.] // Pathogens. – 2019. – Vol. 8, № 4. – P. 251.
177. 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.] // Veterinary Research. – 2012. – Vol. 43, No. 1. – P. 1-15.
178. In vivo characterization of the superior fitness of classical swine fever virus genotype 2.1 to genotype 3.4 / H. M. Liu, M. C. Deng, Y. L. Huang [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2023. – Vol. 285. – Art. 109854.

179. In Vivo Demonstration of the Superior Replication and Infectivity of Genotype 2.1 with Respect to Genotype 3.4 of Classical Swine Fever Virus by Dual Infections / Y. L. Huang, K. J. Tsai, M. C. Deng [et al.] // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9, № 4. – P. 261.
180. Infection with classical swine fever virus [Электронный ресурс] // *Terrestrial Manual* / WOAHP. – URL: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals> (дата обращения: 30.07.2026). – Загл. с экрана.
181. Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: Role for virus replication in vivo and virulence / M. M. Hulst, H. G. van Gennip, A. C. Vlot [et al.] // *Journal of Virology*. – 2001. – Vol. 75, № 20. – P. 9585-9595.
182. Internal control for real-time polymerase chain reaction based on MS2 bacteriophage for RNA viruses diagnostics / M. R. Zambenedetti, D. P. Pavoni, A. C. Dallabona [et al.] // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 2017. – Vol. 112, № 5. – P. 339-347.
183. Iqbal, M. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans / M. Iqbal, H. Flick-Smith, J. W. McCauley // *Journal of General Virology*. – 2000. – Vol. 81, № 2. – P. 451-459.
184. Isolation and Characterization of a Moderately Virulent Classical Swine Fever Virus Emerging in China / Y. Luo, S. Ji, Y. Liu [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2017. – Vol. 64, № 6. – P. 1848-1857.
185. Isolation and Pathogenicity of an Emerging Highly Virulent CSFV 2.1c Strain in South China / X. Gao, Yu. Wu, Yi. Song [et al.] // *Veterinary Sciences*. – 2025. – Vol. 12, No. 7. – P. 606.
186. Kingscote, B. F. Antibodies to bovine bacterial and viral pathogens in pronghorns in Alberta, 1983 / B. F. Kingscote, J. G. Bohac // *Journal of Wildlife Diseases*. – 1986. – Vol. 22, № 4. – P. 511-514.
187. Lack of phylogenetic evidence that the Shimen strain is the parental strain of the lapinized Chinese strain (C-strain) vaccine against classical swine fever / H. Xia, N. Wahlberg, H. J. Qiu [et al.] // *Archives of Virology*. – 2011. – Vol. 156, № 6. – P. 1041-1044.
188. Lackner, T. Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a cellular chaperone in proteolysis / T. Lackner, H. J. Thiel, N. Tautz // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103, № 5. – P. 1510-1515.
189. Lin, M. Enzyme-linked immunosorbent assay based on a chimeric antigen bearing antigenic regions of structural proteins Erns and E2 for serodiagnosis of classical swine fever virus infection / M. Lin, E. Trottier, M. Mallory // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. – 2005. – Vol. 12, № 7. – P. 877-881.

190. Loop-mediated isothermal amplification of DNA / T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol. 28, № 12. – P. e63.
191. Loss of interferon regulatory factor 3 in cells infected with classical swine fever virus involves the N-terminal protease, Npro / S. A. La Rocca, R. J. Herbert, H. Crooke [et al.] // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79, № 11. – P. 7239-7247.
192. Meyers, G. Classical swine fever virus: Recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles / G. Meyers, H. J. Thiel, T. Rümenapf // *Journal of Virology*. – 1996. – Vol. 70, № 3. – P. 1588-1595.
193. Meyers, G. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus / G. Meyers, T. Rümenapf, H. J. Thiel // *Virology*. – 1989. – Vol. 171, № 2. – P. 555-567.
194. Modelling control strategies against classical swine fever: Influence of traders and markets using static and temporal networks in Ecuador / A. Acosta, N. C. Cardenas, C. Imbacuan [et al.] // *Preventive Veterinary Medicine*. – 2022. – Vol. 205. – P. 105683.
195. Moennig, V. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge / V. Moennig, G. Floegel-Niesmann, I. Greiser-Wilke // *The Veterinary Journal*. – 2003. – Vol. 165, № 1. – P. 11-20.
196. Molecular Analysis of Classical Swine Fever Virus Associated Field Infections Evidence Novel CSFV Sub Genotype in Tamil Nadu, Southern India / S. Parthiban, B. Kowsalya, M. Parthiban [et al.] // *Indian Journal of Microbiology*. – 2024.
197. Molecular and Pathological Characterization of Classical Swine Fever Virus Genotype 2 Strains Responsible for the 2013–2018 Outbreak in Colombia / E. Robert, K. Goonewardene, L. Lamboo [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, No. 12. – P. 2308.
198. Molecular epidemiology of a large classical swine fever epidemic in the European Union in 1997-1998 / I. Greiser-Wilke, J. Fritzemeier, F. Koenen [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2000. – Vol. 77, No. 1-2. – P. 17-27.
199. 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.
200. Molecular Epidemiology Questions Transmission Pathways Identified During the Year 2000 Outbreak of Classical Swine Fever in the UK / R. Strong, S. McCleary, S. Grierson [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13.
201. Molecular typing of classical swine fever viruses from field outbreaks in Southern India / S. Rathnapraba, K. Kumanan, K. Vijayarani [et al.] // *Indian Journal of Animal Sciences*. – 2014. – Vol. 84, № 7. – P. 723-727.

202. Neuropathologic study of experimental classical swine fever / J. C. Gomez-Villamandos, I. Garcia de Leaniz, A. Nunez [et al.] // *Veterinary Pathology*. – 2006. – Vol. 43, № 4. – P. 530-540.
203. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements / H. Satam, K. Joshi, U. Mangrolia [et al.] // *Biology*. – 2023. – Vol. 12, № 7. – P. 1-34.
204. No evidence of spread of Linda pestivirus in the wild boar population in Southern Germany / D. Schulz, A. Aebischer, K. Wernike, M. Beer // *Virology Journal*. – 2024. – Vol. 21, No. 1. – P. 205.
205. 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, No. 2. – P. 376-389.
206. Novel bioluminescent quantitative detection of nucleic acid amplification in real-time / O. A. Gandelman, V. L. Church, C. A. Moore [et al.] // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5, No. 11. – P. e14155.
207. Novel poly-uridine insertion in the 3'UTR and E2 amino acid substitutions in a low virulent classical swine fever virus / L. Coronado, M. Liniger, S. Muñoz-González [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2017. – Vol. 201. – P. 103-112.
208. Observations on swine fever in Maharashtra / S. N. Sapre, R. G. Moghe, S. V. Bhagwat [et al.] // *Indian Veterinary Journal*. – 1962. – Vol. 39. – P. 527-529.
209. Outbreak of classical swine fever in regularly vaccinated pig herd / N. N. Barmann, A. J. Nath, M. P. Hazarika [et al.] // *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*. – 2003. – Vol. 24, № 1. – P. 89-90.
210. Pathogenicity and Genetic Characterization of Vietnamese Classical Swine Fever Virus: 2014–2018 / S. Choe, V. Ph. Le, J. Shin [et al.] // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9, No. 3. – P. 169.
211. Pathogenicity of genotype 2.1 classical swine fever virus isolated from Japan in 2019 in pigs / M. Yamashita, S. Iwamoto, M. Ochiai [et al.] // *Microbiology and Immunology*. – 2024. – Vol. 68, № 8. – P. 267-280.
212. Paton, D. J. Classical swine fever – an update / D. J. Paton, I. Greiser-Wilke // *Research in Veterinary Science*. – 2003. – Vol. 75, № 3. – P. 169-178.
213. PCR Past, Present and Future / H. Zhu, H. Zhang, Y. Xu [et al.] // *BioTechniques*. – 2020. – Vol. 69, No. 4. – P. 317-325.
214. Penrith, M. L. Classical swine fever (hog cholera): review of aspects relevant to control / M. L. Penrith, W. Vosloo, C. Mather // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2011. – Vol. 58, № 3. – P. 187-196.
215. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry / T. L. Poole, C. Wang, R. A. Popp [et al.] // *Virology*. – 1995. – Vol. 206, № 1. – P. 750-754.

216. Phylodynamics of classical swine fever virus in Brazil / A. A. F. Júnior, M. Laguardia-Nascimento, A. A. S. Barbosa [et al.] // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2022. – Vol. 53, No. 2. – P. 1065-1075.
217. Phylodynamics of classical swine fever virus with emphasis on Ecuadorian strains / A. D. Garrido Haro, M. Barrera Valle, A. Acosta, F. J. Flores Flor // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2018. – Vol. 65, № 3. – P. 782-790.
218. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus (CSFV) by cloning and sequencing of partial 5' non-translated genomic region / V. K. Singh [et al.] // *Indian Journal of Animal Sciences*. – 2004. – Vol. 74, № 11. – P. 1093-1097.
219. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus (CSFV) field isolates from outbreaks in South and Central America / A. J. Pereda, M. E. Piccone, I. Greiser-Wilke [et al.] // *Virus Research*. – 2005. – Vol. 110, No. 1-2. – P. 111-118.
220. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus isolates from Peru / M. Araínga, T. Hisanaga, K. Hills [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2010. – Vol. 57, № 4. – P. 262-270.
221. Phylogenetic analysis of recent classical swine fever virus (CSFV) isolates from Assam, India / D. K. Sarma, N. Mishra, K. Rajukumar [et al.] // *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. – 2011. – Vol. 34, No. 1. – P. 11-15.
222. Phylogenetic analysis of recent isolates of classical swine fever virus from Colombia / Z. Y. Sabogal, J. D. Mogollón, M. A. Rincón [et al.] // *Virus Research*. – 2006. – Vol. 115, № 1. – P. 99-103.
223. Phylogenetic and phylodynamic analysis of a classical swine fever virus outbreak in Japan (2018–2020) / K. Sawai, Y. Hayama, T. Yamamoto [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2021.
224. Phylogenetic Comparison and Molecular Epidemiology of Classical Swine Fever Virus / H. Bjorklund, P. Lowings, T. Stadejek [et al.] // *Virus Genes*. – 1999. – Vol. 19, No. 3. – P. 189-195.
225. Phylogenetic comparison of classical swine fever virus in China / C. Tu, Z. Lu, H. Li [et al.] // *Virus Research*. – 2001. – Vol. 81, No. 1-2. – P. 29-37.
226. Pig farm vaccination against classical swine fever reduces the risk of transmission from wild boar / Y. Hayama, K. Sawai, M. Yoshinori [et al.] // *Preventive Veterinary Medicine*. – 2022. – Vol. 198. – P. 105554.
227. Porvac® Subunit Vaccine Protects Against Three Field Isolates of Classical Swine Fever Virus / Y. Sordo-Puga, M. P. Rodríguez-Moltó, D. Pérez-Pérez [et al.] // *Vaccines*. – 2025. – Vol. 13, № 2. – P. 1-15.
228. Postel, A. Classical swine fever in Europe--the current situation / A. Postel, V. Moennig, P. Becher // *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*. – 2013. – Vol. 126, № 11-12. – P. 468-475.

229. 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.
230. Post-Natal Persistent Infection With Classical Swine Fever Virus in Wild Boar: A Strategy for Viral Maintenance? / O. Cabezón, A. Colom-Cadena, S. Muñoz-González [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2017. – Vol. 64, № 2. – P. 651-655.
231. Potency of a Live Attenuated GPE – Vaccine Against an Antigenically Distinct Classical Swine Fever Virus Strain in Japan / T. Nishi, E. Ito, M. Nishimura [et al.] // *Vaccines*. – 2026. – Vol. 14, No. 2. – P. 170.
232. Potential Pathogenicity and Genetic Characteristics of a Live-Attenuated Classical Swine Fever Virus Vaccine Derivative Variant / Zh. Guo, G. Xing, L. Wang [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2024. – Vol. 2024. – P. 7244445.
233. Prevalence of classical swine fever in Karnataka, India / P. Choori, S. S. Patil, D. Rathnamma [et al.] // *Veterinary World*. – 2015. – Vol. 8, № 4. – P. 541-544.
234. Processing of pestivirus polyprotein: Cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus / R. Stark, G. Meyers, T. Rümenapf [et al.] // *Journal of Virology*. – 1993. – Vol. 67, № 12. – P. 7088-7095.
235. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses / T. Rümenapf, G. Unger, J. H. Strauss [et al.] // *Journal of Virology*. – 1993. – Vol. 67, № 6. – P. 3288-3294.
236. Quasispecies composition and diversity do not reveal any predictors for chronic classical swine fever virus infection / M. Jenckel, S. Blome, M. Beer [et al.] // *Archives of Virology*. – 2017. – Vol. 162, № 3. – P. 775-786.
237. Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction / S. T. Liu, S. N. Li, D. C. Wang [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 1991. – Vol. 35, № 2. – P. 227-236.
238. Rapid Differential Detection of Wild-Type Classical Swine Fever Virus and Hog Cholera Lapinized Virus Vaccines by TaqMan MGB-Based Dual One-Step Real-Time RT-PCR / Y. Zhang, M. Wang, Ya. Sun [et al.] // *Veterinary Sciences*. – 2024. – Vol. 11, No. 7. – P. 289.
239. Rapid Identification of ASFV, CSFV and FMDV from Mongolian Outbreaks with MinION Short Amplicon Sequencing / D. Bold, Ja. A. Souza-Neto, D. Gombo-Ochir [et al.] // *Pathogens*. – 2023. – Vol. 12, No. 4. – P. 533.
240. Rapid pre-clinical detection of classical swine fever by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification / H. T. Chen, J. Zhang, L. N. Ma [et al.] // *Molecular and Cellular Probes*. – 2009. – Vol. 23, № 2. – P. 71-74.

241. Real-Time Fluorogenic Reverse Transcription-PCR Assays for Detection of Bacteriophage MS2 / K. P. O'Connell, J. R. Bucher, P. E. Anderson [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – Vol. 72, № 1. – P. 478-483.
242. Recent Advances in the Diagnosis of Classical Swine Fever and Future Perspectives / L. Wang, R. Madera, Yu. Li [et al.] // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9, No. 8. – P. 658.
243. Reemergence of Classical Swine Fever, Japan, 2018 / A. Postel, T. Nishi, K. I. Kameyama [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2019. – Vol. 25, № 6. – P. 1228-1231.
244. Resolutions adopted by the World Assembly of the OIE Delegates during their 83rd General Session [Электронный ресурс] / OIE. – Paris : World Organisation for Animal Health, 2015. – 114 p. – URL: <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/a-reso-2015-public.pdf> (дата обращения: 31.07.2026).
245. Revisiting the genetic diversity of classical swine fever virus: A proposal for new genotyping and subgenotyping schemes of classification / L. Rios, J. I. Núñez, H. Díaz De Arce [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2018. – Vol. 65, No. 4. – P. 963-971.
246. Risk Factors and Spatiotemporal Analysis of Classical Swine Fever in Ecuador / A. Acosta, K. Dietze, O. Baquero [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, No. 2. – P. 288.
247. RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by Erns of pestiviruses / I. Magkouras, P. Mätzener, T. Rümenapf [et al.] // *Journal of General Virology*. – 2008. – Vol. 89, № 10. – P. 2501-2506.
248. Role of wild boar in the spread of classical swine fever in Japan / S. Ito, N. Isoda, C. Jurado [et al.] // *Pathogens*. – 2019. – Vol. 8, No. 4. – P. 206.
249. Rovac is the possible ancestor of the Russian lapinized vaccines LK-VNIVViM and CS strains but not the Chinese strain (C-strain) vaccine against classical swine fever / W. Zhou, S. Gao, K. Podgórska [et al.] // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32, № 49. – P. 6639-6642.
250. Safety of classical swine fever virus vaccine strain LOM in pregnant sows and their offspring / S. I. Lim, J. Y. Song, J. Kim [et al.] // *Vaccine*. – 2016. – Vol. 34, № 17. – P. 2021-2026.
251. Secreted expression of the classical swine fever virus glycoprotein E(rns) in yeast and application to a sandwich blocking ELISA / C. Huang, M. S. Chien, C. M. Hu [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2006. – Vol. 132, № 1-2. – P. 40-47.
252. Sequence analysis of E2 glycoprotein genes of classical swine fever viruses: identification of a novel genogroup in Thailand / S. Parchariyanon, K. Inui, S.

- Damrongwatanapokin [et al.] // Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. – 2000. – Vol. 107. – P. 236-238.
253. Serine protease of pestiviruses: Determination of cleavage sites? / N. Tautz, H. J. Thiel, K. Elbers [et al.] // Journal of Virology. – 1997. – Vol. 71, No. 7. – P. 5415-5422.
 254. Structure of a pestivirus envelope glycoprotein E2 clarifies its role in cell entry / K. El Omari, O. Iourin, K. Harlos [et al.] // Cell Reports. – 2013. – Vol. 3, № 1. – P. 30-35.
 255. Tautz, N. The Molecular Biology of Pestiviruses / N. Tautz, B. A. Tews, G. Meyers // Advances in Virus Research. – 2015. – Vol. 93. – P. 47-160.
 256. Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus / T. Lackner, A. Müller, A. Pankraz [et al.] // Journal of Virology. – 2004. – Vol. 78, No. 19. – P. 10765-10775.
 257. Terpstra, C. The 1997/1998 epizootic of swine fever in the Netherlands: control strategies under a non-vaccination regimen / C. Terpstra, A. J. De Smit // Veterinary Microbiology. – 2000. – Vol. 77, No. 1-2. – P. 3-15.
 258. Terpstra, C. The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus / C. Terpstra, M. Bloemraad, A. L. J. Gielkens // Veterinary Microbiology. – 1984. – Vol. 9, № 2. – P. 113-120.
 259. Tews, B. A. The pestivirus glycoprotein Erns is anchored in plane in the membrane via an amphipathic helix / B. A. Tews, G. Meyers // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282, № 45. – P. 32730-32741.
 260. The 1997-1998 epidemic of classical swine fever in the Netherlands / A. Stegeman, A. Elbers, H. De Smit [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2000. – Vol. 73, No. 2-3. – P. 183-196.
 261. The core protein of classical Swine Fever virus is dispensable for virus propagation in vitro / C. Riedel, B. Lamp, M. Heimann [et al.] // PLoS Pathogens. – 2012. – Vol. 8, № 3. – P. 1-13.
 262. The Development of Classical Swine Fever Marker Vaccines in Recent Years / F. Li, B. Li, X. Niu [et al.] // Vaccines. – 2022. – Vol. 10, No. 4.
 263. The first study on analysis of the codon usage bias and evolutionary analysis of the glycoprotein envelope E2 gene of seven Pestiviruses / M. Shueb, Sh. K. Prasad, K. P. Suresh [et al.] // Veterinary World. – 2022. – P. 1857-1868.
 264. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments / S. A. Bustin, V. Benes, J. A. Garson [et al.] // Clinical Chemistry. – 2009. – Vol. 55, № 4. – P. 611-622.
 265. The Npro product of classical swine fever virus interacts with IkappaBalpha, the NF-kappaB inhibitor / V. Doceul, B. Charleston, H. Crooke [et al.] // Journal of General Virology. – 2008. – Vol. 89, № 8. – P. 1881-1889.

266. The viral RNase E(rns) prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and double-stranded RNAs / P. Mätzner, I. Magkouras, T. Rümenapf [et al.] // *Virus Research*. – 2009. – Vol. 140, № 1-2. – P. 15-23.
267. Time-calibrated phylogenomics of the classical swine fever viruses: genome-wide bayesian coalescent approach / T. Kwon, S. H. Yoon, K. W. Kim [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. 1-17.
268. Titov, I. Genotyping of classical swine fever virus using high-resolution melt analysis / I. Titov, S. Tsybanov, A. Malogolovkin // *Journal of Virological Methods*. – 2015. – Vol. 224. – P. 53-57.
269. Transmission of hog cholera virus by horseflies (Tabanidae: Diptera) / M. A. Tidwell, W. D. Dean, G. P. Combs [et al.] // *American Journal of Veterinary Research*. – 1972. – Vol. 33, № 3. – P. 615-622.
270. Transmission of hog cholera virus by mosquitoes / W. C. Stewart, E. A. Carbrey, E. W. Jenney [et al.] // *American Journal of Veterinary Research*. – 1975. – Vol. 36, № 5. – P. 611-614.
271. Validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for visualised detection of wild-type classical swine fever virus / X. J. Zhang, Y. Sun, H. J. Qiu [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2010. – Vol. 167, No. 1. – P. 74-78.
272. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever / B. Hoffmann, M. Beer, C. Schelp [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2005. – Vol. 130, № 1-2. – P. 36-44.
273. Van Oirschot, J. T. A congenital persistent swine fever infection. I. Clinical and virological observations / J. T. Van Oirschot, C. Terpstra // *Veterinary Microbiology*. – 1977. – Vol. 2. – P. 121-132.
274. Van Oirschot, J. T. Classical swine fever / J. T. Van Oirschot // *Diseases of Swine* / ed.: B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, D. J. Taylor. – 8th ed. – Ames : Iowa State University Press, 1999. – P. 159-172.
275. Vandeputte, J. Classical swine fever: the European experience and a guide for infected areas / J. Vandeputte, G. Chappuis // *Revue Scientifique et Technique*. – 1999. – Vol. 18, № 3. – P. 638-647.
276. Vargas Terán, M. Situation of classical swine fever and the epidemiologic and ecologic aspects affecting its distribution in the American continent / M. Vargas Terán, N. Calcagno Ferrat, J. Lubroth // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 1026, № 1. – P. 54-64.
277. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from chinese provinces / Z. Wu, X. Ren, L. Yang [et al.] // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86, No. 20. – P. 10999-11012.
278. Virulence evaluation of classical swine fever virus subgenotype 2.1 and 2.2 isolates circulating in China / W. Gong, J. Li, Z. Wang [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2019. – Vol. 232. – P. 114-120.

279. Virus-neutralizing monoclonal antibodies against bovine viral diarrhea virus and classical swine fever virus target conformational and linear epitopes on E2 glycoprotein subdomains / G. Roman-Sosa, D. Meyer, M. Dellarole [et al.] // *Microbiology Spectrum*. – 2025. – Vol. 13, No. 4. – P. e02041-24.
280. WAHIS: World Animal Health Information System [Электронный ресурс] / WOAH. – URL: <https://wahis.woah.org> (дата обращения: 31.07.2026). – Загл. с экрана.
281. Yang, Z. H. Development of multiple ELISAs for the detection of antibodies against classical swine fever virus in pig sera / Z. H. Yang, L. Li, P. Z. S. Pan // *Virologica Sinica*. – 2012. – Vol. 27, № 1. – P. 48-56.
282. Zhou, B. Classical Swine Fever in China-An Update Minireview / B. Zhou // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2019. – Vol. 6, № 187. – P. 1-6.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ОБНАРУЖЕНИЮ ГЕНОМА ВИРУСА КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ОТ-ПЦР-РВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА

Авторы: Садчикова А.С.
Мазлум А.
Чернышев Р.С.
Иголкин А.С.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 06
от «29» ноября 2023 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 08
от «30» ноября 2023 г.

Владимир 2023

ЮЛИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

УЧЕБНЫЙ ЭКЗЕМПЛЯР № 1

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по НИР
ФГБУ «ВНИИЗЖ»

И.А. Чвала

« 23 » июля 2025 г.



Заместитель руководителя
службы качества ФГБУ «ВНИИЗЖ»

М.П. Чепурная

« 25 » июля 2025 г.

СТАНДАРТ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА
КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
«ПЦР-КЧС-ВНИИЗЖ»

СТО 00495527-0532-2025

Технические условия

Владимир
2025



КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТНОВА Л. Б.

УДК

ОКС

СТО 00495527-0532-2025

ОКПД 2.21.20.23.11

Ключевые слова: тест-система, выявление генома, КЧС, полимеразная цепная реакция, праймеры, внутренний контрольный образец, ВКО, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени.

Руководитель разработки:

Заместитель руководителя центра
заведующий референтной лабораторией
по АЧС лабораторно-диагностического центра

А.С. Иголкин

Ответственные исполнители:

Ветеринарный врач референтной лаборатории по АЧС

А.С. Садчикова

Исполнители:

Младший научный сотрудник
референтной лаборатории по АЧС

Р.С. Чернышев

Младший научный сотрудник
референтной лаборатории по АЧС

И.С. Колбин

Биолог референтной лаборатории по АЧС

Е.О. Морозова

Согласовано:

Руководитель испытательной лаборатории
Ветпрепаратов

Е.А. Яснева

Начальник отдела регистрации
ветеринарных препаратов

М.Г. Суровцева



КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕБНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРЕДСТАВИТЕЛЬ Л. Б.

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по НИР

И.А. Чвала

2025 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЧИСЛА КОПИЙ ГЕНОМА ВИРУСА КЧС В ВИРУССОДЕРЖАЮЩЕМ МАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОТ-ПЦР-РВ

Авторы: А.С. Садчикова
Р.С. Чернышев
А.С. Игolkин

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 03
от «26» июня 2025 г.

Рассмотрено учёным советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 05
от «27» июня 2025 г.



Владимир 2025

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора
по НИР

И.А. Чвала

2025 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО СУБГЕНОТИПИРОВАНИЮ ВИРУСА КЧС МЕТОДОМ
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОТ-ПЦР И
НУКЛЕОТИДНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Авторы Садчикова А.С.
Чернышев Р.С.
Грехнева А.Д.
Иголкин А.С.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 06
от «27» ноября 2025 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 08
от «28» ноября 2025 г.



Владимир 2025

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.