



Методы отбора крови для выявления антител к вирусу африканской чумы свиней у диких кабанов и домашних свиней в полевых условиях

А. С. Першин¹, А. Р. Шотин², Е. О. Морозова³, А. С. Иголкин⁴, О. А. Мануйлова⁵, И. В. Шевченко⁶, А. А. Шевцов⁷, Н. Н. Власова⁸

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0002-5099-3050>, e-mail: daredron@gmail.com

² <https://orcid.org/0000-0001-9884-1841>, e-mail: shotin@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0002-0955-9586>, e-mail: morozova_eo@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-4616-5316>, e-mail: o.manuylova@list.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0001-6482-7814>, e-mail: shevchenko@arriah.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0002-2555-6043>, e-mail: shevcov@arriah.ru

⁸ <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Считается, что вследствие высокой вирулентности вируса африканской чумы свиней его циркуляция на территории Российской Федерации сопровождается низкой серопревалентностью. Однако ввиду длительного неблагополучия, внедрения в популяцию дикого кабана и появления ослабленных вариантов вируса повышается значимость серологических исследований, направленных на выявление антител к возбудителю болезни. Для сбора полевых образцов биологического материала от животных с целью проведения молекулярно-генетических, вирусологических и серологических исследований можно использовать фильтровальную бумагу, а также зонд-тампоны. Специфичность и чувствительность твердофазного иммуноферментного анализа при исследовании образцов крови, нанесенной на фильтровальную бумагу, уступают результатам, получаемым при исследовании сыворотки крови, но тем не менее позволяют с успехом выявлять специфические антитела к вирусу африканской чумы свиней. Показана возможность использования фильтровальной бумаги, пропитанной кровью животных, для исследования методом иммуноблоттинга, однако оптимального результата удалось добиться при использовании иммунопероксидазного метода в сочетании с пробами, отобранными зонд-тампоном. При сравнении результатов твердофазного иммуноферментного анализа сывороток крови, полученных от домашних свиней (зараженных вирусом африканской чумы свиней изолятов Антоново 07/14 и Собинка 07/15), и крови, отобранной на фильтровальную бумагу при скарификации ушных вен, чувствительность составила 88,9%, специфичность – 90,6%. Однако использование иммунопероксидазного метода при исследовании образцов высушенной на зонд-тампоне крови показало 100%-е совпадение с иммуноферментным анализом, в то время как при исследовании сыворотки крови иммунопероксидажный метод превзошел иммуноферментный анализ по чувствительности. Следовательно, отбор крови с применением зонд-тампонов может быть рекомендован для проведения исследований после соответствующей валидации. Данный метод может быть особенно полезен для сбора информации об инфицированных диких кабанах, так как ее отсутствие делает невозможным применение эффективных стратегий эрадикации.

Ключевые слова: африканская чума свиней, серологическая диагностика, твердофазный иммуноферментный анализ, иммунопероксидажный метод, иммуноблоттинг, фильтровальная бумага, зонд-тампоны

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Першин А. С., Шотин А. Р., Морозова Е. О., Иголкин А. С., Мануйлова О. А., Шевченко И. В., Шевцов А. А., Власова Н. Н. Методы отбора крови для выявления антител к вирусу африканской чумы свиней у диких кабанов и домашних свиней в полевых условиях. *Ветеринария сегодня*. 2021; 10 (4): 285–294. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-10-4-285-294.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Шотин Андрей Романович, аспирант, ведущий биолог референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: shotin@arriah.ru.

Techniques of blood sampling for detection of African swine fever virus in wild boar and domestic pigs in the field conditions

A. S. Pershin¹, A. R. Shotin², E. O. Morozova³, A. S. Igolkin⁴, O. A. Manuylova⁵, I. V. Shevchenko⁶, A. A. Shevtsov⁷, N. N. Vlasova⁸

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

© Першин А. С., Шотин А. Р., Морозова Е. О., Иголкин А. С., Мануйлова О. А., Шевченко И. В., Шевцов А. А., Власова Н. Н., 2021

¹ <https://orcid.org/0000-0002-5099-3050>, e-mail: daredron@gmail.com

² <https://orcid.org/0000-0001-9884-1841>, e-mail: shotin@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0002-0955-9586>, e-mail: morozova_eo@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-4616-5316>, e-mail: o.manuylova@list.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0001-6482-7814>, e-mail: shevchenko@arriah.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0002-2555-6043>, email: shevcov@arriah.ru

⁸ <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

SUMMARY

It is thought that due to the high virulence of the African swine fever virus its circulation in the Russian Federation is accompanied by a low seroprevalence. However taking into account a long-term ASF unfavourable situation, the introduction of the virus into the wild boar population, and the occurrence of attenuated viral variants, the significance of serological testing aimed at the detection of viral antibodies is increasing. To collect field samples of biological material from animals for molecular genetic, virological, and serological tests, filter paper, as well as swabs, can be used. The specificity and sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay when testing blood absorbed by filter paper are worse than those shown when testing sera, but they allow effective detection of African swine fever virus antibodies. It was demonstrated that blood absorbed on filter paper can be used for the immunoblot analysis, but the optimum performance could be achieved when the immunoperoxidase technique in combination with samples, taken by swabs was used. When comparing results of enzyme-linked immunosorbent assay performed on sera collected from domestic pigs (infected with ASFV isolates Antonovo 07/14 and Sobinka 07/15), and blood from ear veins absorbed on filter paper the sensitivity was 88.9%, specificity – 90.6%. However, the use of the immunoperoxidase technique for testing blood from swabs showed 100% coincidence with ELISA, while testing of sera with immunoperoxidase technique was superior to ELISA in sensitivity. This means blood sampling using swabs may be recommended for tests after proper validation. This technique can be especially useful for collecting data about infected wild boars because effective eradication strategies are impossible without such data.

Keywords: African swine fever, serological diagnosis, enzyme-linked immunosorbent assay, immunoperoxidase technique, immunoblot analysis, filter paper, swabs

Acknowledgements: The study was funded by the FGBI “ARRIAH” within the framework of “Veterinary Welfare” research work.

For citation: Pershin A. S., Shotin A. R., Morozova E. O., Igolkin A. S., Manuylova O. A., Shevchenko I. V., Shevtsov A. A., Vlasova N. N. Techniques of blood sampling for detection of African swine fever virus in wild boar and domestic pigs in the field conditions. *Veterinary Science Today*. 2021; 10 (4): 285–294. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-10-4-285-294.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Andrey R. Shotin, Post-Graduate Student, Leading Biologist, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI “ARRIAH”, 600901, Russia, Vladimir, Yur’evets, e-mail: shotin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) – контагиозная септическая болезнь домашних, в том числе декоративных, свиней и диких кабанов. Болезнь может проявляться в формах от сверхострой до бессимптомной [1–3]. Глобальная ситуация по АЧС продолжает ухудшаться, угрожая мировой продовольственной безопасности. На данный момент болезнью поражено более 50 стран. Очень большие потери регистрируют в азиатских странах. Например, только в Китае уже уничтожено и погребено более 100 млн свиней [4].

Для предотвращения распространения и искоренения АЧС в популяции домашних свиней требуется применение строгих мер биологической безопасности, политики стемпинг аут, пресечение незаконного оборота свиноголовья и мясопродуктов. Применение аналогичных мер в популяции дикого кабана затруднено сложностью обеспечения мер биобезопасности в местах обитания животных и тенденцией болезни становиться эндемичной при использовании неоптимальных стратегий ликвидации. При этом оценка эффективности применяемых мер борьбы с АЧС невоз-

можна без функционирующей надлежащим образом системы эпизоотологического надзора [5].

Присутствие вируса в популяции дикого кабана создает риск заражения для домашних свиней. После внедрения вируса АЧС в популяцию кабана наблюдается длительное неблагополучие, растущее в пространстве и времени. В большинстве стран Европейского союза с момента выявления инфекции у дикого кабана с целью предотвращения передачи вируса между инфицированными и восприимчивыми животными предпринимались попытки сдерживания инфекции путем снижения плотности поголовья и, как следствие, числа контактов между ними. Однако результаты применения данной стратегии на ранней стадии эпизоотии в зараженной области оказались неудовлетворительными [6].

Считается, что в распространении АЧС важнейшую роль играет так называемый человеческий фактор, связанный с нарушением людьми ветеринарно-санитарных правил [7]. При этом I. Iglesias et al. с помощью метода пространственно-временного анализа установили, что в 2007–2013 гг. в Российской

Федерации кабаны могли являться источником инфекции в популяциях домашних свиней в 32,23% случаев и диких свиней в 28,77% случаев [8].

Наличие инфицированных диких кабанов увеличивает сложность эрадикации АЧС в районах с большим количеством личных подсобных хозяйств, имеющих низкий уровень биозащиты. Кабаны способны к интенсивному нашествию в агроценозы, что вовлекает их в антропогенный цикл передачи АЧС и позволяет им участвовать в распространении и сохранении вируса в ранее благополучных районах [9]. Различные биотехнические мероприятия, такие как отстрел хищников и зимняя подкормка животных, могут приводить к увеличению численности популяции диких кабанов и создавать условия для быстрого распространения инфекции [10]. Таким образом, в системе эпизоотологического надзора за АЧС и в комплексе проводимых мероприятий при ликвидации эпизоотических очагов необходимо учитывать наличие восприимчивой популяции дикого кабана на территории России. Кроме того, по требованиям кодекса Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) необходимо проводить регулярный надзор за популяцией диких животных при определении статуса страны по африканской и классической чуме свиней.

На данный момент для раннего обнаружения инфицированных животных серодиагностика менее результативна, чем методы выявления антигена или генетического материала вируса. Так, с момента регистрации первых очагов инфекции в 2007 г. и по настоящее время при исследовании проб сывороток крови свиней с применением иммуноферментного анализа (ИФА) лишь у небольшого числа животных обнаружены антитела к вирусу АЧС [11].

Однако не исключена возможность и имеются доказательства появления ослабленных вариантов вируса АЧС, а заражение ими может не приводить к быстрой гибели свиней. Различные исследования показывают, что в эндемичных по АЧС районах снижается летальность и увеличивается число случаев бессимптомного и хронического течения, что в дальнейшем может потребовать коррекции стратегии применяемых методов диагностики и борьбы [12, 13].

Кроме того, на крупных свиноводческих предприятиях, где имеется так называемый естественный технологический отход, легкое или бессимптомное течение инфекции может оставаться незамеченным до нескольких недель [12]. Это обуславливает значимость проведения диагностических исследований, направленных на обнаружение антител к вирусу АЧС, что должно способствовать снижению риска распространения болезни.

Поэтому, чтобы определить реальную эпизоотическую ситуацию по АЧС, необходима быстрая, эффективная и надежная лабораторная диагностика. При этом помимо выявления генома вируса в полимеразной цепной реакции (ПЦР) необходимо проведение серологических исследований, направленных на выявление антител. Установлено, что если в начале эпизоотии большее число серопозитивных к АЧС животных выявляют среди молодняка, то к поздним фазам эпизоотического процесса серопревалентность выше у животных старших возрастных групп. Данный факт, вероятно, связан с присутствием инфицированных, а не переболевших кабанов [14].

Считается, что вследствие высокой вирулентности вируса АЧС его циркуляция на территории Российской Федерации сопровождается низкой серопревалентностью [15]. Тем не менее серологические исследования могут способствовать раннему обнаружению заболевания у дикого кабана и увеличить эффективность диагностических исследований путем параллельного использования с вирусологическими (молекулярно-биологическими) методами диагностики, что позволит снизить потенциальные разрушительные последствия распространения АЧС [5].

Применение этих методов требует соответствующей инфраструктуры и техники быстрого обнаружения серопозитивных кабанов [16]. Одним из возможных решений может являться применение иммунохроматографических методов [15, 17]. Однако они дороги для проведения масштабных скрининговых исследований и не всегда применимы [18]. Альтернативным решением является обнаружение антител в тканях внутренних органов (селезенки, легких, печени) либо в слюне инфицированных животных [19]. Из всех протестированных исследователями в 2008–2012 гг. пулов проб процент обнаружения антител в тканях свиней в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) составил 45% [20]. Однако концентрация антител в таких образцах, как правило, не сопоставима с их концентрацией в сыворотке крови.

Сама по себе применяемая в данный момент технология отбора проб сыворотки крови в пробирки с активатором свертывания не лишена недостатков. Так, большую проблему представляет гемолиз, поскольку в полевых условиях затруднительно соблюдать технологию подготовки и транспортировки проб, что может приводить к ложноположительным результатам при проведении лабораторной диагностики.

На рынке имеется большое количество одноразовых расходных материалов для забора крови, содержащих компоненты, ускоряющие коагуляцию и облегчающие процесс отделения сыворотки от сгустка. Однако в инструкциях по применению не всегда приводится необходимая информация о составе и свойствах всех добавок. Вследствие чего возможны ошибки в результатах иммуноанализа при использовании систем забора крови, в основном при исследовании хрупких аналитов (цитокины и др.), в число которых антитела не входят. С другой стороны, некоторые добавки способны взаимодействовать с антителами и индуцировать их конформационные изменения независимо от типа используемой твердой фазы [21], что может приводить к уменьшению иммуноспецифической активности антител [22].

В Российской Федерации нередки случаи, когда охотники не отправляют биологический материал от добытых кабанов на исследования или не сообщают о случаях обнаружения павших животных, несмотря на то что это предписано действующими ветеринарными правилами [23]. Простое объяснение этому – отсутствие у них достаточного количества соответствующих расходных материалов и сложности отбора образцов крови у мертвых животных. В целях расширения надзора за АЧС в дикой природе, повышения вероятности обнаружения инфицированных животных и увеличения выборки может быть использован простой и недорогой способ отбора крови на фильтровальную бумагу (ФБ). Простота отбора

и транспортировки проб с использованием ФБ может помочь охотникам в решении логистических проблем по доставке проб в лабораторию [24]. Образцы крови можно отбирать без использования специального оборудования и специальной подготовки, в том числе от недавно отстрелянных животных. Данный подход позволит проводить исследования, направленные на выявление как возбудителя, так и антител к нему, используя один легкополучаемый в полевых условиях образец [25].

В то же время для вирусологических исследований успешно применяются зонд-тампоны, что особенно важно при обнаружении трупов диких кабанов, так как их уничтожение является важным звеном противоэпизоотических мероприятий, а естественное разложение останков может занимать от нескольких дней в летний период до нескольких лет в соответствующих условиях [26].

Использование образцов на ФБ и зонд-тампонов для серологических исследований. Метод высушивания адсорбированной крови на ФБ с последующей эллюцией и исследованием различных анализов успешно используется в диагностических исследованиях с 1927 г. [27].

В настоящее время ФБ является доступной альтернативой хранения биологических образцов, полученных для диагностики различных инфекционных заболеваний серологическими и молекулярно-биологическими методами. При этом чувствительность и специфичность твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА) при использовании ФБ снижается по сравнению с применением сыворотки крови, хотя в большинстве случаев остается на приемлемо высоком уровне [25, 28–30]. Тем не менее пониженная чувствительность является потенциальным ограничением при исследовании образцов в протоколах, требующих применения неразбавленной сыворотки [28].

Современную ФБ можно разделить на 2 основных типа. Первый – носители, специально созданные для хранения и выделения нуклеиновых кислот. Данный вид ФБ пропитывают веществами, лизирующими клетки, денатурирующими белки, инактивирующими биологический материал и защищающими нуклеиновые кислоты от действия нуклеаз. Носители второго типа не содержат инактивационного компонента и могут быть использованы для выделения вируса и серологических исследований [31].

При сравнении эффективности выявления антител методом ИФА для проб крови, нанесенных на ФБ, и образцов сыворотки крови, полученной от свиней, результаты исследований показали сопоставимую чувствительность [31]. Также показано, что вирус АЧС из пропитанной кровью ФБ через 9 месяцев хранения при 37 °С выделяется на чувствительной культуре клеток и поддается генотипированию. Тем не менее использование ФБ при выявлении генетического материала сопровождается снижением чувствительности реакции [32].

Сыворотки крови могут длительно храниться в замороженном виде. Однако при их последующем исследовании отмечается прогрессирующее снижение количества выявляемых антител большинством используемых методов диагностики [28]. Различные исследования показали, что нанесенные на ФБ образцы могут храниться в течение относительно длительного периода с небольшим снижением титра в результате

разрушения антител. Методом иммуоблоттинга установлено, что снижение титра антител наблюдается на всем спектре выявляемых белковых эпитопов [33].

Важную роль в деградации аналита играют температура и влажность [29]. Например, титр антител к вирусу иммунодефицита человека снижается приблизительно на 15% в течение 30 сут хранения при комнатной температуре и неконтролируемой влажности. При более высоких температурах потеря титра увеличивается. Образцы, хранящиеся в контролируемых условиях влажности (с диссектантом) при комнатной температуре, остаются стабильными до 190 сут. При низкой температуре и влажности антитела к вирусу иммунодефицита человека на ФБ стабильны в течение не менее 56 месяцев [33].

В экспериментах P. S. Curry et al. при сравнении проб на ФБ после года экспозиции с пробами сыворотки крови, хранившейся замороженной в течение того же периода времени, чувствительность исследований с образцами на ФБ составила более 88% (кроме двух отдельных исследований), а специфичность – более 90% [28].

Общими рекомендациями для увеличения срока хранения является необходимость полного подсушивания крови, нанесенной на ФБ, хранение в недоступном для прямых солнечных лучей месте и при влажности не более 30%. Для непродолжительного хранения (до двух лет) при температуре 4 °С рекомендуется использовать пакеты с замком (zip-lock), диссектантом, индикатором влажности. Длительное хранение рекомендуется проводить при минус 70 °С [28, 33].

Таким образом, важным звеном диагностики различных инфекционных заболеваний является соблюдение температурных режимов при транспортировке образцов в лабораторию и их хранении. Например, по сообщениям Всемирной организации здравоохранения, в мире теряется более 50% произведенных вакцин. При этом потери препаратов в неоткрытых флаконах обычно связаны с проблемами холодовой цепи и логистики [34]. Двадцать пять процентов произведенных в мире вакцин доставляются в пункт назначения в различных стадиях деградации из-за нарушения условий во время доставки [35]. Более того, согласно сведениям Глобального альянса по вакцинам и иммунизации, половина медицинских учреждений в беднейших странах вообще не имеют электроснабжения, и только 10% обеспечивают электроэнергией на надежном бесперебойном уровне [36].

В то же время практика использования многими лабораториями зонд-тампонов для отбора проб на исследования различными методами (ПЦР, коммерческие наборы ИФА) демонстрирует универсальность полученных образцов, а также простоту их адаптации к условиям конкретной лаборатории.

Поэтому для пробоотбора зонд-тампоны и ФБ являются хорошей альтернативой сыворотке крови при проведении исследований на АЧС. Они имеют ряд преимуществ: от простоты обращения до возможности длительного хранения, а также возможности разделения и исследования образца, адсорбированного с использованием зонд-тампона или куска ФБ, для проведения требуемого количества повторных или дополнительных диагностических тестов. Таким образом, это практичный, недорогой и простой подход для эпизоотологического надзора за АЧС у дикого кабана [30].

Целью работы являлось экспериментальное подтверждение возможности использования в пробоотборе фильтровальной бумаги и зонд-тампонов для серологического исследования, направленного на обнаружение специфических антител к вирусу АЧС, а также сравнение различных методов исследования и отбора проб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении комплекса исследований и экспериментов использовались:

- домашние свиньи (помесные пород крупная белая, ландрас, дюркок), завезенные из благополучного по основному инфекционному болезням свиней хозяйства Владимирской области;
- дикие европейские кабаны (8 гол. в возрасте 3–4 мес.), завезенные из благополучного по АЧС хозяйства Костромской области;
- изоляты вируса АЧС: Шихобалово 10/13, выделенный от павшего дикого кабана на территории Юрьев-Польского района Владимирской области; Антоново 07/14, выделенный от домашней свиньи в деревне Лобок Невельского района Псковской области; Собинка 07/15, выделенный от дикого кабана в охотхозяйстве Владимирской области; слабовирулентный вирус АЧС 60-го пассажа, полученный на культуре клеток CV-1 – АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1/60;
- фильтровальная бумага класса 3 (Whatman®, Великобритания);
- зонд-тампон (тупфер, или сваб) с вискозным наконечником (Ningbo Greetmede Medical Instruments Co., Ltd, Китай).

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых в научных целях.

Иммуноферментный анализ проводили с использованием набора INgezim PPA Compac (Ingenasa, Испания) в соответствии с инструкцией к тест-системе.

Иммуноблоттинг проводили с использованием коммерческих реагентов (CISA INIA, Испания) в соответствии с инструкцией производителя.

Иммунпероксидазный метод (ИПМ) выявления антител к вирусу АЧС проводили в соответствии с методическими рекомендациями ФГБУ «ВНИИЗЖ»¹.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во время постановки биопробы на диких кабанах и домашних свиньях, зараженных вирусом АЧС изолята Шихобалово 10/13 [3], проводили оценку возможности использования ФБ для отбора проб крови от павших диких кабанов с последующим обнаружением антител. Для этого через несколько часов после гибели животных во время патолого-анатомического вскрытия промокали ФБ несвернувшуюся кровь, вытекающую при

рассечении сосудов в процессе частичной эвисцерации, обычно у места входа сосудов в грудную полость. Поскольку после гибели животного в крови проходят комплексные биохимические процессы, отбор крови необходимо проводить в максимально короткие сроки. Желательно использовать цельную кровь, так как, несмотря на то что серосангвальная жидкость содержит антитела, она не эквивалентна цельной крови [28]. От домашних свиней отбирали парные пробы крови в пробирки с активатором свертывания и на ФБ.

Фильтровальную бумагу подсушивали при комнатной температуре в условиях вивария и помещали в отдельные пакеты с застежкой. Для пропитывания 1 см² ФБ требовалось около 0,5 см³ крови. Иммуноферментный анализ проводили через 3 дня после отбора проб. В продаже есть набор для выявления антител к АЧС ID Screen® African Swine Fever Indirect (IDvet, Франция), который имеет протокол для исследования высушенной на ФБ крови [24]. Также существуют специально изготовленные версии коммерческих наборов для исследования образцов на ФБ [31]. Однако в данном эксперименте опробована возможность использования набора INgezim PPA Compac (Ingenasa, Испания) с подтверждением в реакции иммуноблоттинга.

При исследовании методом иммуноблоттинга образца, отобранного от дикого кабана, наблюдали появление нескольких слабоокрашенных полос на нитроцеллюлозной мембране, что говорит об образовании иммунного комплекса на участках, содержащих белки вируса АЧС и, следовательно, о наличии антител в образце. Полосы не образуются при исследовании отрицательных образцов, отобранных на ФБ. При сравнении образцов, полученных от гипериммунного поросенка традиционным методом и с использованием ФБ, видно, что интенсивность окрашивания снижается на всех участках нитроцеллюлозной мембраны, сенсibilизированной специфическим антигеном. Однако образцы остаются положительными.

Исследовались различные методы использования ФБ. В первом случае бумага помещалась в буфер для образца в объеме 5 см³ на 5 см² площади ФБ, что является сопоставимым с соотношением, прописанным в инструкции к набору для сыворотки крови, и выдерживалась при комнатной температуре в течение 5 мин для элюции. Полученный элюат вносился в объеме 0,1 см³ на лунку в качестве исследуемых образцов.

Во втором случае ФБ, помещенная в буфер для образца, выдерживалась 3 мин в гомогенизаторе при активном перемешивании. Перед внесением в лунки микропланшета элюат центрифугировали для осаждения форменных элементов крови и частиц ФБ в течение 3 мин при 1000 g.

В третьем случае из сухой ФБ вырезали окружности диаметром около 3 мм и помещали в лунку микропланшета с внесенным буфером. По данным В. Г. Помеловой и соавт., в течение одного часа из диска диаметром 3,2 мм, помещенного в лунку сенсibilизированного микропланшета, экстрагируется более 90% антител [25]. Однако, учитывая среднюю емкость пропитывания ФБ, соотношение кровь:буфер составило примерно 1:30, что ниже рабочего разведения сыворотки используемого набора (1:2).

Для достоверного сравнения методов исследования образцов, полученных разными способами, необходи-

¹ Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу африканской чумы свиней иммунопероксидазным методом: утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 19.11.2020 № 68-20. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2019. 12 с.

Таблица 1
Сравнение чувствительности и специфичности ТФ ИФА и иммуноблоттинга при исследовании сыворотки крови и отобранной на фильтровальную бумагу крови

Table 1
Comparison of sensitivity and specificity of LP-ELISA and immunoblot analysis when testing sera and blood absorbed on filter paper

образец крови на ФБ	ТФ ИФА			Иммуноблоттинг		
	Пол.	Отр.	Всего	Пол.	Отр.	Всего
Пол.	16	5	21	3	1	4
Отр.	2	48	50	0	4	4
Всего	18	53	71	3	5	8

пол. – положительный результат (positive result);

отр. – отрицательный результат (negative result).

мо сопоставлять парные пробы крови, нанесенной на ФБ, и сыворотки крови, отобранной от живых животных. Однако в нашем опыте из-за высокой вирулентности вируса, приводящей к быстрой гибели, у животных не успевали выработаться антитела. В пробах крови, отобранных за 2 или 3 дня до гибели (6–12-е сут после заражения, согласно графику отбора проб – один раз в 3 дня), антител в сыворотке обнаружить не удалось. Поэтому исследование крови, нанесенной на ФБ во время вскрытия, проводили в ТФ ИФА и сравнивали с результатами иммуноблоттинга, так как данный метод является высокоспецифичным и высокочувствительным.

При сравнении результатов ТФ ИФА сыворотки крови, полученной от домашних свиней (зараженных вирусом АЧС изолятов Антоново 07/14 и Собинка 07/15), и крови, отобранной на ФБ при скарификации ушных вен, чувствительность составила 88,9% (при 95%-м доверительном интервале – от 65,3 до 98,6%), специфичность – 90,6% (79,3–96,9%).

Чувствительность метода с использованием вырезанных по диаметру лунок кругов из ФБ, помещенных непосредственно в лунку микропланшета с буфером, была низкой при исследовании в данном наборе. Ве-

роятно, этот метод можно рекомендовать только для использования в системах, допускающих высокое разведение образцов либо использующих усилители окрашивания. Метод без центрифугирования показал большое количество ложноположительных результатов. Лучшую чувствительность и специфичность показал метод с гомогенизацией и центрифугированием образца (табл. 1).

При рассмотрении результатов, представленных в таблице 1, видно, что использование ФБ приводит к появлению как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов. При сравнении данных, полученных при исследовании методами иммуноблоттинга и ТФ ИФА отобранных на ФБ образцов крови, установлено, что одна отрицательная проба показала также ложноположительный результат и в ТФ ИФА.

Полученные в настоящем эксперименте результаты согласуются с данными, опубликованными Т. Randriamparany et al. [31], которые исследовали на АЧС образцы крови, собранные с помощью ФБ. В указанной работе также отмечено о незначительном снижении чувствительности. При этом авторы заключили, что метод отбора крови на ФБ является подходящим способом для сбора и хранения образцов.

В опытах, проведенных J. Carlson et al., при исследовании коммерческим набором для ИФА образцов крови, собранных с помощью зонд-тампонов, в сравнении с пробами сыворотки крови чувствительность составила 93,1% (95%-й доверительный интервал, 83,3–98,1%), специфичность – 100% (95,9–100,0%). На основании чего авторы заключили, что тупферы пригодны для отбора проб с последующим обнаружением антител к вирусу АЧС методом ИФА. Кроме того, полевые испытания зонд-тампонов при отборе проб от разложившихся туш диких кабанов в эндемичном районе Эстонии при постановке ПЦР также показали высокую точность результатов [26].

В текущих условиях, когда практически не проводится исследований на обнаружение антител к вирусу АЧС в образцах от дикого кабана, применение методов, упрощающих процедуру отбора проб от диких животных, даже с учетом некоторого снижения чувствительности, позволит собирать ценную информацию о динамике распространения АЧС. Поэтому была апробирована возможность выявления антител с использованием более чувствительного иммунопероксидазного метода (ИПМ).

Для сравнения способов отбора крови использовали ИПМ и ИФА. Пробы представляли собой кровь, взятую при скарификации ушных вен и нанесенную на зонд-тампоны (рис. 1), а также сыворотку, полученную из крови домашних свиней на 10-е и 31-е сут после заражения вирусом АЧС (изолят АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1/60). Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таким образом, использование ИПМ при исследовании образцов высушенной на зонд-тампоне крови (рис. 2) показало 100%-е совпадение с ИФА, в то время как ИПМ при исследовании сыворотки крови даже превзошел по чувствительности ИФА. Следовательно, отбор крови с применением тупферов может быть рекомендован для проведения исследований после соответствующей валидации. Данный метод будет особенно полезен для сбора информации об инфицированных диких кабанов, так как ее отсутствие

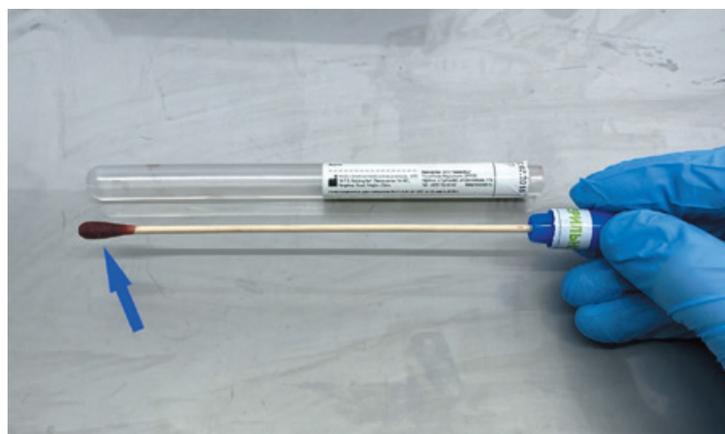


Рис. 1. Проба крови, нанесенная на зонд-тампон

Fig. 1. Blood sample absorbed on the swab

делает невозможным применение эффективных стратегий эрадикации АЧС.

Дикий кабан играет важную роль в распространении вируса АЧС. Надзор за болезнью может быть основан как на тестировании трупов павших животных (пассивное наблюдение), так и на обнаружении вируса или антител у отстрелянных/пойманных кабанов (активный надзор). Кабаны могут являться резервуаром сохранения инфекции, независимо от циркуляции вируса в популяции домашних свиней. При этом пассивное наблюдение обеспечивает более высокую вероятность раннего обнаружения АЧС, особенно в течение первого года на ранних стадиях эпизоотии.

Использование серологических методов тестирования имеет низкую диагностическую ценность на начальных этапах эпизоотии. Тем не менее активное наблюдение, направленное на выявление серопозитивных кабанов, может быть предпочтительным на более поздних стадиях (в эндемическую фазу) эпизоотии [5].

Следовательно, для повышения эффективности эпизоотологического надзора за АЧС у дикого кабана, особенно на поздних этапах эпизоотии, необходимо проведение серологических исследований, при этом оправданно применение альтернативных методов пробоотбора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение даже самых высокоточных диагностических методов может лимитироваться качеством доставленных образцов. А поскольку требуется выявлять не только наличие антигена или генетического материала вируса АЧС, но и антител к нему, альтернативой может стать отбор крови на ФБ или зонд-тампоны. Таким образом можно проводить отбор проб от недавно павших и отстрелянных животных. У домашних свиней можно осуществлять забор проб крови путем простой скарификации ушной вены без использования пробирок, что уменьшает риск контаминации окружающей среды при их разрушении или непреднамеренном вскрытии, так как полученный образец пробы не текучий. Использование ФБ в качестве носителя образца может уменьшить объем пространства, необходимого для длительного хранения пробы в замороженном состоянии. К недостаткам такой пробоподготовки следует отнести снижение чувствительности используемых методов диагностики, однако использование ФБ позволяет увеличить массовый охват исследований для основных преследуемых целей надзора (раннее обнаружение, определение превалентности, доказательство благополучия субпопуляции). Поэтому концепция использования зонд-тампонов и ИПМ является весьма перспективной, а в ряде случаев и безальтернативной, особенно после соответствующей валидации и, возможно, подбора тупферов, обеспечивающих более эффективную адсорбцию образцов, что позволяет ее рекомендовать для обнаружения антител к вирусу АЧС у дикого кабана и домашних свиней. Данный подход сочетает в себе преимущества использования ФБ с высокой чувствительностью и специфичностью данного диагностического метода.

Применение ФБ или зонд-тампонов наиболее целесообразно при проведении массовых обследований популяций целевых животных в рамках надзора за АЧС (в т. ч. при проведении государственного мониторинга). Сбор образцов крови таким способом может

Таблица 2

Сравнение результатов исследования сыворотки крови и нанесенной на зонд-тампон пробы крови в ИФА и иммунопероксидазным методом

Table 2

Comparison of results of serum and blood swab testing by ELISA and immunoperoxidase technique

Срок после заражения, сут	ИФА (сыворотка крови)	ИПМ (зонд-тампоны)	ИПМ (сыворотка крови)
10	+	1:20	1:320
10	+	1:5160	1:81920
10	-	-	1:20
10	+	1:640	1:640
31	+	1:20	1:320
31	+	1:1280	1:20480
31	+	1:1280	1:10240
31	+	1:80	1:5160
31	+	1:160	1:40960
31	+	1:160	1:81920

выполняться в любом месте минимально обученным персоналом, при отсутствии необходимости поддержания холодной цепи.

Существуют различные специальные виды ФБ и зонд-тампонов, поэтому необходимо проведение подбора материала, обеспечивающего эффективную адсорбцию образца, оптимальную стоимость сбора, транспортировки и хранения проб. Перед использованием потребуется калибровка под соответствующую систему исследования либо диагностический набор.

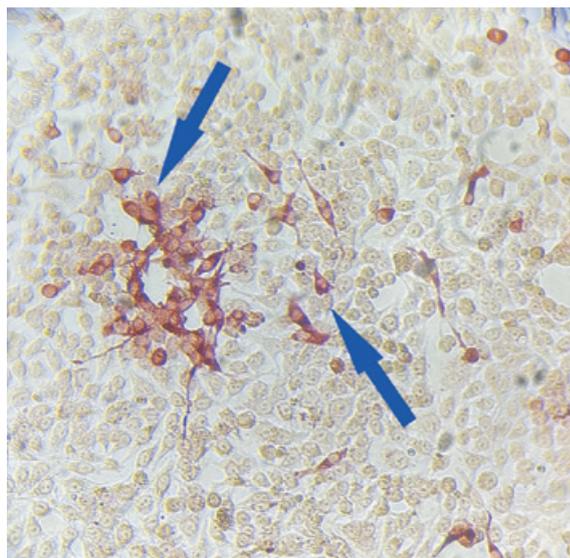


Рис. 2. Окрашивание цитоплазмы инфицированных клеток при исследовании пробы крови, нанесенной на зонд-тампон (увеличение $\times 400$)

Fig. 2. Stained cytoplasm of infected cells when testing blood samples from swabs (magnification $400\times$)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Груздев К. Н., Иголкин А. С., Рахманов А. М., Шевцов А. А. Африканская чума свиней в России: распространение и клинико-анатомическое проявление. *Ветеринария сегодня*. 2014; (4): 10–24. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=22445544>.
2. Ремыга С. Г., Першин А. С., Шевченко И. В., Иголкин А. С., Шевцов А. А. Клинические и патологоанатомические изменения у диких европейских кабанов и домашних свиней при заражении вирусом африканской чумы свиней. *Ветеринария сегодня*. 2016; (3): 46–51. Режим доступа: <https://veterinary.ariah.ru/jour/article/view/260>.
3. Шевченко И. В., Ремыга С. Г., Першин А. С., Иголкин А. С., Рахманов А. М. Клинико-анатомическое проявление африканской чумы свиней при заражении разными методами вирусом, выделенным от дикого кабана. *Современные проблемы патологической анатомии, патогенеза и диагностики болезней животных: материалы 18-й Международной научно-методической конференции*. М.: МГАВМиБ им. К. И. Скрябина; 2014; 82–84. eLIBRARY ID: 22496854.
4. Schoder M. E., Tignon M., Linden A., Vervaeke M., Cay A. B. Evaluation of seven commercial African swine fever virus detection kits and three Taq polymerases on 300 well-characterized field samples. *J. Virol. Methods*. 2020; 280: 113874. DOI: 10.1016/j.jviromet.2020.113874.
5. Chenais E., Depner K., Guberti V., Dietze K., Viltrop A., Ståhl K. Epidemiological considerations on African swine fever in Europe 2014–2018. *Porcine Health Manag.* 2019; 5:6. DOI: 10.1186/s40813-018-0109-2.
6. Marcon A., Linden A., Satran P., Gervasi V., Licoppe A., Guberti V. R₀ estimation for the African swine fever epidemics in wild boar of Czech Republic and Belgium. *Vet. Sci.* 2019; 7 (1):2. DOI: 10.3390/vetsci7010002.
7. Груздев К. Н., Закутский Н. И., Диев В. И. Африканская чума свиней: современное состояние, эпизоотология и меры борьбы (аналитический обзор). *Ветеринарный врач*. 2017; 5: 3–8. Режим доступа: <http://vetvrach-vnivi.ru/attachments/5ac1ea7624c56.pdf>.
8. Iglesias I., Montes F., Jesús Muñoz M., Arias M., Gogin A., Kolbasov D., de la Torre A. Role of wild boars and domestic pigs in the spread of African swine fever in the Russian Federation (2007–2013). *8th Annual EPIZONE Meeting, 23–25 September 2014 Copenhagen, Denmark*. Режим доступа: <https://www.epizone-eu.net/en/Home/Sitemap/Annual-meeting-1/Abstract-book-and-poster-abstracts.htm>.
9. Макаров В. В., Гусев А. А., Гусева Е. В., Сухарев О. И., Коломыцев А. А. Природная очаговость африканской чумы свиней. *Ветеринарная патология*. 2011; 3: 9–18. Режим доступа: https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/news/asf/asf_makarov/public2.pdf.
10. Фертиков В. И., Егоров А. Н., Тихонов А. Н., Колбасов Д. В., Хрипунов Е. М., Куриннов В. В. и др. Классическая и африканская чума свиней: стратегия профилактики в охотничьих угодьях России. *Сельскохозяйственная биология*. 2010; 4: 7–12. Режим доступа: <https://www.agriculture.ru/pdf/0131-6397/2010/4/7-12.pdf>.
11. Першин А. С., Шевченко И. В., Иголкин А. С., Жуков И. Ю., Власова Н. Н., Мануйлова О. А. Динамика антителообразования при экспериментальном заражении вирусом африканской чумы свиней. *Ветеринария Кубани*. 2019; 4: 3–7. DOI: 10.33861/2071-8020-2019-4-3-7.
12. Nurmoja I., Petrov A., Breidenstein C., Zani L., Forth J. H., Beer M., et al. Biological characterization of African swine fever virus genotype II strains from north-eastern Estonia in European wild boar. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64 (6): 2034–2041. DOI: 10.1111/tbed.12614.
13. Pershin A., Shevchenko I., Igolkin A., Zhukov I., Mazloum A., Aronova E., et al. Long-term study of the biological properties of ASF virus isolates originating from various regions of the Russian Federation in 2013–2018. *Vet. Sci.* 2019; 6 (4):99. DOI: 10.3390/vetsci6040099.
14. Cerbule A. R. Prevalence and age structure of African swine fever survivor animals in the wild boar population during the epidemic in Estonia: Final Thesis Curriculum in Veterinary Medicine. Tartu; 2020. Режим доступа: <http://hdl.handle.net/10492/5775>.
15. Mur L., Igolkin A., Varentsova A., Pershin A., Remyga S., Shevchenko I., et al. Detection of African swine fever antibodies in experimental and field samples from the Russian Federation: implications for control. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63 (5):e436–440. DOI: 10.1111/tbed.12304.
16. Rodríguez-Prieto V., Vicente-Rubiano M., Sánchez-Matamoros A., Rubio-Guerri C., Melero M., Martínez-López B., et al. Systematic review of surveillance systems and methods for early detection of exotic, new and re-emerging diseases in animal populations. *Epidemiol. Infect.* 2015; 143 (10): 2018–2042. DOI: 10.1017/S095026881400212X.
17. Цибезов В. В., Терехова Ю. О., Верховский О. А., Першин А. С., Власова Н. Н., Иголкин А. С. и др. Эффективность иммунохроматографической тест-системы для быстрого выявления вируса африканской чумы свиней. *Ветеринария*. 2015; 5: 58–64. eLIBRARY ID: 23527048.
18. Новиков А. А., Исаев Д. В., Павлов П. М., Дежкин А. В., Пантелева О. А. Апробация экспресс-методов выявления возбудителей заболеваний охотничьих ресурсов в полевых условиях (АЧС). *Состояние среды обитания и фауна охотничьих животных России и сопредельных территорий: материалы II Международной, VII Всероссийской научно-практической конференции (10–11 марта 2016 г.)*. Балашиха; 2016; 381–386.
19. Середа А. Д., Дубровская О. А., Имамдинов А. Р., Стрижакова О. М., Васильев А. П., Синдрякова И. П., Луницин А. В. Лабораторная диагностика хронической и бессимптомной форм африканской чумы свиней. *Сельскохозяйственная биология*. 2016; 51 (4): 459–466. DOI: 10.15389/agrobiology.2016.4.459rus.
20. Куриннов В. В., Белянин С. А., Васильев А. П., Стрижакова О. М., Лыска В. М., Ногина И. В. и др. Экспериментальные и полевые исследования специфических антител в тканях органов у инфицированных вирусом АЧС домашних свиней и кабанов с острым течением болезни. *Ветеринария Кубани*. 2012; 4: 9–11. Режим доступа: http://vetkuban.com/num4_20124.html.
21. Pendergraph G. E., Pendergraph C. B. *Handbook of Phlebotomy and Patient Service Techniques*. 4th ed. Baltimore: Williams&Wilkins; 1998; 245 p.
22. Власов Г. С., Пономарева А. М., Польшцев Д. Г., Головаченко В. А., Фадин Д. В. Системы забора крови и интерференция в иммуноанализе. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2007; 4: 24–29.
23. Vergne T., Guinat C., Petkova P., Gogin A., Kolbasov D., Blome S., et al. Attitudes and beliefs of pig farmers and wild boar hunters towards reporting of African swine fever in Bulgaria, Germany and the Western Part of the Russian Federation. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63 (2):e194–204. DOI: 10.1111/tbed.12254.
24. Blome S., Goller K. V., Petrov A., Dräger C., Pietschmann J., Beer M. Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar – extension towards African swine fever virus antibody detection. *Vet. Microbiol.* 2014; 174 (3–4): 607–608. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.09.018.
25. Помелова В. Г., Быченкова Т. А., Бекман Н. И., Козлова Е. Г., Воробьева Н. Н., Фризен В. И. Тестирование антител к вирусу клещевого энцефалита с применением высущенной на фильтровальной бумаге крови. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008; 1: 50–55. eLIBRARY ID: 9943075.
26. Carlson J., Zani L., Schwaiger T., Nurmoja I., Viltrop A., Vilem A., et al. Simplifying sampling for African swine fever surveillance: Assessment of antibody and pathogen detection from blood swabs. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65 (1):e165–e172. DOI: 10.1111/tbed.12706.
27. Bang I. Mikromethoden zur Blutuntersuchung. In: *Mikromethoden zur Blutuntersuchung*. ed. by G. Blix. Munich: J. F. Bergmann-Verlag; 1922; 9–54. DOI: 10.1007/978-3-662-34421-7_1.
28. Curry P. S., Ribble C., Sears W. C., Orsel K., Hutchins W., Godson D., et al. Blood collected on filter paper for wildlife serology: evaluating storage and temperature challenges of field collections. *J. Wildl. Dis.* 2014; 50 (2): 308–321. DOI: 10.7589/2012-06-150.
29. Duncombe L., Commander N. J., Erdenlig S., McGiven J. A., Stack J. Investigating the use of protein saver cards for storage and subsequent detection of bovine anti-*Brucella abortus* smooth lipopolysaccharide antibodies and gamma interferon. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20 (11): 1669–1674. DOI: 10.1128/CVI.00033-13.
30. Wasniewski M., Barrat J., Combes B., Guiot A. L., Cliquet F. Use of filter paper blood samples for rabies antibody detection in foxes and raccoon dogs. *J. Virol. Methods*. 2014; 204: 11–16. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.04.005.
31. Randriamparany T., Kouakou K. V., Michaud V., Fernández-Pinero J., Gallardo C., Le Potier M. F., et al. African swine fever diagnosis adapted to tropical conditions by the use of dried-blood filter papers. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63 (4): 379–388. DOI: 10.1111/tbed.12295.
32. Каторкин С. А., Газаев И. Х., Кудряшов Д. А., Аронова Е. В., Бурдинская О. Н., Луницин А. В. и др. Использование «сухих пятен крови» для выявления ДНК вируса африканской чумы свиней с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Молекулярная диагностика – 2014: материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (18–20 марта 2014 г.)*. Т. 2. М.: МБА; 452–453. eLIBRARY ID: 21410394.
33. Arya S. C. Stability of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in whole blood-impregnated filter papers under various tropical conditions. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31 (3): 765–766. DOI: 10.1128/jcm.31.3.765-766.1993.
34. World Health Organization. Monitoring vaccine wastage at country level: guidelines for programme managers. WHO; 2005. Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68463>.
35. CEIV Farma. How to become CEIV Pharma Certified. Режим доступа: https://www.iata.org/contentassets/494bc14afd-934b0193735e9a47091d72/iata_ceiv-pharma_how2to20become20ceiv-20pharma20certified.pdf.
36. GAVI Alliance. Report to the Programme and Policy Committee: GAVI's supply chain strategy framework, 9–10 October 2013.

REFERENCES

- Gruzdev K. N., Igolkin A. S., Rakhmanov A. M., Shevtsov A. A. African swine fever in Russia: spread, clinical and anatomical manifestations. *Veterinary Science Today*. 2014; 4: 10–24. Available at: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=22445544>.
- Remyga S. G., Pershin A. S., Shevchenko I. V., Igolkin A. S., Shevtsov A. A. Clinical and post-mortem signs in European wild boars and domestic pigs infected with African swine fever virus. *Veterinary Science Today*. 2016; (3): 46–51. Available at: <https://veterinary.arriah.ru/jour/article/view/260>. (in Russ.)
- Shevchenko I. V., Remyga S. G., Pershin A. S., Igolkin A. S., Rakhmanov A. M. Kliniko-anatomicheskoe proyavlenie afrikanskoj chumy svinei pri zarazhenii raznymi metodami virusom, vydelenym ot dikogo kabana = Clinical and anatomical manifestations of African swine fever when challenged with the wild boar virus using different routes. *Sovremennye problemy patologicheskoi anatomii, patogeneza i diagnostiki bolezni zhivotnykh: materialy 18-i Mezhdunarodnoi nauchno-metodicheskoi konferentsii = Current challenges of animal disease pathological anatomy, pathogenesis and diagnostics: Proceedings of the 18th International Scientific and Practical Conference*. Moscow: Moscow SAVMB; 2014; 82–84. eLIBRARY ID: 22496854. (in Russ.)
- Schoder M. E., Tignon M., Linden A., Vervaeke M., Cay A. B. Evaluation of seven commercial African swine fever virus detection kits and three Taq polymerases on 300 well-characterized field samples. *J. Virol. Methods*. 2020; 280:113874. DOI: 10.1016/j.jviromet.2020.113874.
- Chenais E., Depner K., Guberti V., Dietze K., Viltrop A., Ståhl K. Epidemiological considerations on African swine fever in Europe 2014–2018. *Porcine Health Manag.* 2019; 5:6. DOI: 10.1186/s40813-018-0109-2.
- Marcon A., Linden A., Satran P., Gervasi V., Licoppe A., Guberti V. R₀ estimation for the African swine fever epidemics in wild boar of Czech Republic and Belgium. *Vet. Sci.* 2019; 7 (1):2. DOI: 10.3390/vetsci7010002.
- Gruzdev K. N., Zakutsky N. I., Diev V. I. African swine fever: current state and epizootological features and prospects of prevention and control (review). *Veterinarian*. 2017; 5: 3–8. Available at: <http://vetvrach-vnivi.ru/attachments/5ac1ea7624c56.pdf>. (in Russ.)
- Iglesias I., Montes F., Jesús Muñoz M., Arias M., Gogin A., Kolbasov D., de la Torre A. Role of wild boars and domestic pigs in the spread of African swine fever in the Russian Federation (2007–2013). *8th Annual EPIZONE Meeting, 23–25 September 2014 Copenhagen, Denmark*. Available at: <https://www.epizone-eu.net/en/Home/Sitemap/Annual-meeting-1/Abstract-book-and-poster-abstracts.htm>.
- Makarov V. V., Gusev A. A., Guseva E. V., Sukharev O. I., Kolomytsev A. A. Prirodnyaya ochagovost' afrikanskoj chumy svinei = Natural nidality of African swine disease. *Veterinarnaya patologiya*. 2011; 3: 9–18. Available at: https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/news/asf/asf_makarov/public2.pdf. (in Russ.)
- Fertikov V. I., Egorov A. N., Tikhonov A. N., Kolbasov D. V., Khripunov E. M., Kurinnov V. V., et al. Classical and African swine fever: about strategy for its prophylaxis on hunting territories in Russia. *Agricultural Biology*. 2010; 4: 7–12. Available at: <https://www.agricscience.ru/pdf/0131-6397/2010/4/7-12.pdf>. (in Russ.)
- Pershin A. S., Shevchenko I. V., Igolkin A. S., Zhukov I. Yu., Vlasova N. N., Manuylova O. A. Dynamics of antibodies production after experimental challenge with ASF virus. *Veterinaria Kubani*. 2019; 4: 3–7. DOI: 10.33861/2071-8020-2019-4-3-7. (in Russ.)
- Nurmoja I., Petrov A., Breidenstein C., Zani L., Forth J. H., Beer M., et al. Biological characterization of African swine fever virus genotype II strains from north-eastern Estonia in European wild boar. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64 (6): 2034–2041. DOI: 10.1111/tbed.12614.
- Pershin A., Shevchenko I., Igolkin A., Zhukov I., Mazloum A., Aronova E., et al. Long-term study of the biological properties of ASF virus isolates originating from various regions of the Russian Federation in 2013–2018. *Vet. Sci.* 2019; 6 (4):99. DOI: 10.3390/vetsci6040099.
- Cerbule A. R. Prevalence and age structure of African swine fever survivor animals in the wild boar population during the epidemic in Estonia: Final Thesis Curriculum in Veterinary Medicine. Tartu; 2020. Available at: <http://hdl.handle.net/10492/5775>.
- Mur L., Igolkin A., Varentsova A., Pershin A., Remyga S., Shevchenko I., et al. Detection of African swine fever antibodies in experimental and field samples from the Russian Federation: implications for control. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63 (5):e436–440. DOI: 10.1111/tbed.12304.
- Rodríguez-Prieto V., Vicente-Rubiano M., Sánchez-Matamoros A., Rubio-Guerri C., Melero M., Martínez-López B., et al. Systematic review of surveillance systems and methods for early detection of exotic, new and re-emerging diseases in animal populations. *Epidemiol. Infect.* 2015; 143 (10): 2018–2042. DOI: 10.1017/S095026881400212X.
- Tsibezov V. V., Terekhova Yu. O., Verkhovskiy O. A., Pershin A. S., Vlasova N. N., Igolkin A. S., et al. Efficacy of the immunochromatographic method for the rapid detection of African swine fever virus. *Veterinariya*. 2015; 5: 58–64. eLIBRARY ID: 23527048. (in Russ.)
- Novikov A. A., Isaev D. V., Pavlov P. M., Dezhkin V. A., Panteleeva O. A. Approbation of express-methods for detection of pathogens of hunting resources in the field (ASF). *Sostoyanie srede obitaniya i fauna okhotnich'ikh zhivotnykh Rossii i sopredel'nykh territorii: materialy II Mezhdunarodnoi, VII Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (10–11 marta 2016 g.) = Conditions of game habitat and fauna in Russia and neighboring regions: Proceedings of II International, VII All-Russian Scientific and Practical Conference (March 10–11, 2016)*. Balashikha; 2016; 381–386. (in Russ.)
- Sereda A. D., Dubrovskaya O. A., Imatdinov A. R., Strizhakova O. M., Vasil'ev A. P., Sindryakova I. P., Lunitsin A. V. Laboratory diagnostics of chronic and asymptomatic forms of African swine fever. *Agricultural Biology*. 2016; 51 (4): 459–466. DOI: 10.15389/agrobiol.2016.4.459eng.
- Kurinnov V. V., Belyanin S. A., Vasilyev A. P., Strizhakova O. M., Ly-ska V. M., Nogina I. V., et al. Experimental and field researches of specific antibodies in tissues of the house pigs infected with virus ASF and wild boars with a sharp clinical course. *Veterinaria Kubani*. 2012; 4: 9–11. Available at: http://vetkuban.com/num4_20124.html. (in Russ.)
- Pendergraph G. E., Pendergraph C. B. *Handbook of Phlebotomy and Patient Service Techniques*. 4th ed. Baltimore: Williams&Wilkins; 1998; 245.
- Vlasov G. S., Ponomareva A. M., Polyntsev D. G., Golovachenko V. A., Fadin D. V. Sistemy zabora krovi i interferentsiya v immunoanalize = Blood sampling tools and interference during the immunoassay. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2007; 4: 24–29. (in Russ.)
- Vergne T., Guinat C., Petkova P., Gogin A., Kolbasov D., Blome S., et al. Attitudes and beliefs of pig farmers and wild boar hunters towards reporting of African swine fever in Bulgaria, Germany and the Western Part of the Russian Federation. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63 (2):e194–204. DOI: 10.1111/tbed.12254.
- Blome S., Goller K. V., Petrov A., Dräger C., Pietschmann J., Beer M. Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar – extension towards African swine fever virus antibody detection. *Vet. Microbiol.* 2014; 174 (3–4): 607–608. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.09.018.
- Pomelova V. G., Bychenkova T. A., Bekman N. I., Kozlova E. G., Vorobyeva N. N., Frizcn V. I. Testing for antibodies to tick-borne encephalitis virus using blood dried on filter paper. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2008; 1: 50–55. eLIBRARY ID: 9943075. (in Russ.)
- Carlson J., Zani L., Schwaiger T., Nurmoja I., Viltrop A., Vilem A., et al. Simplifying sampling for African swine fever surveillance: Assessment of antibody and pathogen detection from blood swabs. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65 (1):e165–e172. DOI: 10.1111/tbed.12706.
- Bang I. Mikromethoden zur Blutuntersuchung. In: *Mikromethoden zur Blutuntersuchung*. ed. by G. Blix. Munich: J. F. Bergmann-Verlag; 1922; 9–54. DOI: 10.1007/978-3-662-34421-7_1.
- Curry P. S., Ribble C., Sears W. C., Orsel K., Hutchins W., Godson D., et al. Blood collected on filter paper for wildlife serology: evaluating storage and temperature challenges of field collections. *J. Wildl. Dis.* 2014; 50 (2): 308–321. DOI: 10.7589/2012-06-150.
- Duncombe L., Commander N. J., Erdenlig S., McGiven J. A., Stack J. Investigating the use of protein saver cards for storage and subsequent detection of bovine anti-*Brucella abortus* smooth lipopolysaccharide antibodies and gamma interferon. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20 (11): 1669–1674. DOI: 10.1128/CVI.00033-13.
- Wasniewski M., Barrat J., Combes B., Guiot A. L., Cliquet F. Use of filter paper blood samples for rabies antibody detection in foxes and raccoon dogs. *J. Virol. Methods*. 2014; 204: 11–16. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.04.005.
- Randriamparany T., Kouakou K. V., Michaud V., Fernández-Pinero J., Gallardo C., Le Potier M. F., et al. African swine fever diagnosis adapted to tropical conditions by the use of dried-blood filter papers. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63 (4): 379–388. DOI: 10.1111/tbed.12295.
- Katorkin S. A., Gazaev I. Kh., Kudryashov D. A., Aronova E. V., Burdinskaya O. N., Lunitsin A. V., et al. Ispol'zovanie «sukhikh pyaten krovi» dlya vyavleniya DNK virusa afrikanskoj chumy svinei s pomoshch'yu polimeraznoi tsepnoi reaktsii v rezhime real'nogo vremeni = Use of “dry blood dots” for ASFV DNA detection using real-time polymerase reaction. *Molekulyarnaya diagnostika – 2014: materialy VIII Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem (18–20 marta 2014 g.) = Molecular Diagnostics – 2014: Proceedings of VIII All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation (March 18–20, 2014)*. Vol. 2. Moscow: MVA; 452–453. eLIBRARY ID: 21410394. (in Russ.)
- Arya S. C. Stability of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in whole blood-impregnated filter papers under various tropical conditions. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31 (3): 765–766. DOI: 10.1128/jcm.31.3.765-766.1993.
- World Health Organization. Monitoring vaccine wastage at country level: guidelines for programme managers. WHO; 2005. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68463>.

35. CEIV Farma. How to become CEIV Pharma Certified. Available at: https://www.iata.org/contentassets/494bc14afd934b0193735e9a47091d72/iata_ceiv-pharma_how20to20become20ceiv20pharma20certified.pdf.

36. GAVI Alliance. Report to the Programme and Policy Committee: GAVI's supply chain strategy framework, 9–10 October 2013.

Поступила в редакцию / Received 13.05.2021

Доработана после рецензирования / Revised 02.07.2021

Принята к публикации / Accepted 05.08.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Першин Андрей Сергеевич, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Шотин Андрей Романович, аспирант, ведущий биолог референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Морозова Елизавета Олеговна, аспирант, сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Иголкин Алексей Сергеевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий референтной лабораторией по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Мануйлова Ольга Анатольевна, биолог референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Шевченко Иван Вячеславович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Шевцов Александр Анатольевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Власова Наталья Никифоровна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Andrey S. Pershin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Andrey R. Shotin, Post-Graduate Student, Leading Biologist, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Elizaveta O. Morozova, Post-Graduate Student, Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexey S. Igolkin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Olga A. Manuylova, Biologist, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Ivan V. Shevchenko, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexander A. Shevtsov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Natalia N. Vlasova, Doctor of Science (Biology), Chief Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.