

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
«ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ»

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

КІТ МАРИНА ЮРІЇВНА

УДК 619:616.98-078:578.842.2:577.2.08:636.4

ДИСЕРТАЦІЯ
**УДОСКОНАЛЕННЯ ЕКСПРЕС-ДІАГНОСТИКИ
АФРИКАНСЬКОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ ЗА ДОПОМОГОЮ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ**

09 — Біологія

091 — Біологія та біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____М. Ю. Кіт

Науковий керівник: **Палій Анатолій Павлович,**
доктор ветеринарних наук, професор

Харків–2025

АНОТАЦІЯ

Кіт М. Ю. Удосконалення експрес-діагностики африканської чуми свиней за допомогою молекулярно-генетичних методів. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 — Біологія та біохімія. — Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Харків, 2025.

Африканська чума свиней (АЧС) — це транскордонне емерджентне вірусне контагіозне захворювання домашніх та диких свиней, гостра форма якого спричиняє загибель інфікованих тварин на рівні 100 %. Захворювання поширене в країнах Африки, Європи, Азії та Океанії. Наразі засобів лікування та зареєстрованих в Україні вакцин проти АЧС немає, тому ключовою ланкою боротьби із захворюванням є його швидка та ефективна діагностика. Також відомо, що у країнах, де вірус добре вкорінився, спостерігається його циркуляція в популяціях диких свиней, у тому числі це стосується слабковірулентних штамів збудника, що не спричиняють загибелі інфікованих тварин і після захворювання роблять їх позитивними вірусоносіями. З огляду на вищесказане, розробка вітчизняних методів діагностики є важливим завданням, а проведення скринінгових досліджень необхідне для встановлення ситуації щодо АЧС у популяції диких свиней на території України.

Дисертаційна робота присвячена розробці інструментів серологічної (ІФА, вестерн-блот) та молекулярно-генетичної (класична ПЛР, ПЛР у режимі реального часу, петльова ізотермічна ампліфікація) діагностики, удосконаленню методу прижиттєвого відбору зразків ротової рідини диких свиней в польових умовах, а також проведенню скринінгових досліджень щодо АЧС у популяції диких свиней на території Харківської області.

За використання методів ПЛР, молекулярного клонування, афінної хроматографії та вестерн-блоту було отримано 6 рекомбінантних білків вірусу

АЧС, мічених поліпептидною послідовністю Tween-Strep-tag для хроматографічного очищення, а саме p10, p32, p54, p54ΔTM, лігаза, лігазаΔДЗД. Очищення експресованих білків за фізіологічних та денатуруючих умов не було ефективним, тому було розроблено протокол солюбілізації білків з тілець включення за допомогою детергентів і оптимізовано процес хроматографічного очищення. Таким чином, остаточний протокол приготування лізатів, що використовували для подальшого хроматографічного очищення, включав обробку буфером із дезоксихолатом натрію та літичними ферментами у співвідношенні 2 мл буферу на пелету зі 100 мл бактеріальної культури *E. coli*, обробку ультразвуком до прозорості суспензії клітин (як правило, два рази по 20 циклів), 4 цикли заморожування–відтавання, а також інкубацію із саркозил-вмісним буфером впродовж 16 год.

Тестування специфічності експресованих та очищених білків проводили методом вестерн-блоту з позитивною та негативною щодо вірусу АЧС референтними сироватками крові свиней. Було встановлено, що білки p32 та p54 володіють антигенними властивостями і не демонструють фонового сигналу під час дослідження з негативною щодо вірусу АЧС сироваткою. У той час як білок p10, а також ДНК-лігаза усічена та повної довжини продемонстрували негативну реакцію з позитивною щодо вірусу АЧС сироваткою, а білок p54ΔTM показав позитивний результат з обома типами сироваток.

Установлено ефективність використання очищеного за протоколом солюбілізації з використанням детергентів рекомбінантного білка p32 як антигена при проведенні ІФА з позитивними та негативними щодо вірусу АЧС сироватками. Робочі концентрації компонентів для проведення аналізу методом непрямого ІФА становили 5 мкг/мл антигена, досліджувані сироватки використовувалися у розведенні 1:100, а вторинні антитіла — у розведенні 1:10000. При тестуванні за допомогою розробленого протоколу проведення ІФА панелі позитивних і негативних референтних щодо вірусу АЧС сироваток крові свиней, отримані результати співпали з очікуваними: ані хибно

позитивних, ані хибно негативних результатів не спостерігали, при чому співвідношення значень оптичної щільності отриманих для позитивних і негативних зразків складала щонайменше 5,8. Середнє внутрішньосистемного коефіцієнту варіативності становило 3,18 % для позитивної та 1,56 % для негативної сироваток, міжсистемного — 7,59 % для позитивної та 7,30 % для негативної сироваток, що знаходиться в межах допустимих для ІФА значень.

Із залученням комерційних реагентів було розроблено «Тест-систему для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней методом полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus», що дозволяє виявляти фрагмент гена *b646l* вірусу АЧС. При дослідженні чутливості тест-системи було встановлено здатність ідентифікувати всі позитивні зразки, що містили ДНК збудника АЧС. Також за допомогою діагностикуму було проведено детекцію плазмідної ДНК у розведеннях від 10 до 10^5 копій/мкл і встановлено, що тест-система виявляє плазмідну ДНК при розведенні до 10 копій/мкл або 20 копій/реакцію. Специфічність тест-системи підтверджується відсутністю значень C_t при дослідженні генетичного матеріалу інших вірусів та бактерій, що спричиняють захворювання свиней. Відсутність хибнонегативних результатів підтверджується наявністю значень C_t для внутрішнього контрольного зразка. Також при аналізі ДНК, виділеного з клітин лінії РК-15 показано, що праймери не гібридизуються з ДНК свині. Шляхом проведення всіх досліджень у трьох повтореннях за однакових умов було встановлено, що результати аналізу з використанням тест-системи для детекції вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus» є відтворюваними, що підтверджується низьким значенням внутрішньосистемного коефіцієнту варіативності отриманих позитивних щодо АЧС результатів, який становить 1,07 %.

Було отримано ампіцилін-резистентні клони *E. coli* штаму DH5 α , що несуть рекомбінантну плазмиду pTZ57R/T_ASF зі вставкою фрагмента гена *b646l* довжиною 1763 п. н. Розмножена та очищена з бактеріальної культури плазміда може бути використана як позитивний контрольний зразок при

проведенні ПЛР-детекції вірусу АЧС усіма рекомендованими ВООЗТ методами (класична ПЛР та ПЛР у режимі реального часу) у розведенні до 10 копій/мкл.

Було розроблено протокол проведення детекції гена *c962r* вірусу АЧС за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації. Ліміт детекції становив 10 копій цільової послідовності в 1 мкл, що відповідає 50 копіям на реакцію. Розроблений спосіб детекції ДНК вірусу АЧС продемонстрував абсолютну специфічність, не показавши ані хибно позитивних, ані хибно негативних результатів при дослідженні панелі референтних зразків ДНК вірусу АЧС та панелі гетерологічних зразків ДНК інших бактеріальних та вірусних патогенів свиней. Синтез продукту реакції не спостерігався і при дослідженні зразків ДНК, екстрагованих з лімфовузлів свині. Середній внутрішньосистемний коефіцієнт варіативності результатів для позитивних зразків складає 3,18 %, що є досить низьким значенням і знаходиться в межах 10 %, що є загальноприйнятим максимальним допустимим значенням для діагностичних методів. Завдяки простоті проведення реакції та мінімальній кількості обладнання, необхідній для цього, можливим є використання даної методики для проведення експрес-діагностики АЧС у лабораторіях з обмеженими ресурсами.

Було вдосконалено спосіб відбору зразків ротової рідини від диких свиней у польових умовах методом оральних змивів на канат з приманкою. Розроблено та оптимізовано метод детекції генетичного матеріалу свині (*S. scrofa*) у зразках такого типу за допомогою реакції петльової ізотермічної ампліфікації. Під час польових досліджень на території Харківського та Чугуївського районів Харківської обл. у 2020 та 2021 рр. було розповсюджено 250 приманок, за допомогою яких зібрано 101 зразок ротової рідини від диких свиней, серед яких при дослідженні пулами 28 пулів з 51 містили генетичний матеріал *S. scrofa*. При дослідженні зразків ротової рідини, які належали диким свиням, було встановлено, що 15 зразків (26,7 %) містили генетичний матеріал збудника АЧС. Усі позитивні щодо вірусу АЧС зразки було зібрано в лісах на території Чугуївського району Харківської обл., де у 2017 р. фіксували випадки

АЧС та проводили депопуляцію диких свиней, а у 2024 р. спалах захворювання був зафіксований вдруге.

Новизна роботи полягає в тому, що вперше в Україні розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантних аналогів протеїнів р32 та р54 вірусу АЧС для детекції антитіл проти збудника АЧС у сироватках крові від свиней методом ІФА, розроблено методику детекції ДНК вірусу АЧС за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації, а також розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантного позитивного контрольного зразка для детекції генетичного матеріалу вірусу АЧС методом ПЛР, розроблено тест-систему для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у реальному часі. Уперше на території України було проведено прижиттєвий збір зразків ротової рідини від диких свиней у польових умовах та показано можливість виявлення у таких зразках генетичних маркерів *Sus scrofa* та вірусу АЧС за допомогою розроблених нами відповідних методик на основі петльової ізотермічної ампліфікації. Установлено носійство вірусу АЧС у популяції диких свиней на території Харківської області.

Результати розробок впроваджено в науково-дослідну роботу ННЦ «ІЕКВМ» та використано для розробки нормативної документації щодо виготовлення, контролювання та застосування тест-системи для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus» (деклараційний патент України на корисну модель № 133163 «Тест-система для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції «Sui-DNA-test-ASF virus»). Підготовано та подано до реєстрації патент на корисну модель «Спосіб отримання рекомбінантного антигену р32 для діагностики африканської чуми свиней за допомогою ІФА». Розроблено методичні рекомендації «Детекція ДНК вірусу африканської чуми свиней методом петльової ізотермічної ампліфікації» та «Отримання рекомбінантного антигену р32 для ІФА-діагностики АЧС», що призначені для фахівців діагностичних лабораторій, науковців, викладачів та студентів вищих

навчальних закладів та співробітників науково-дослідних установ ветеринарного профілю.

Ключові слова: антиген, африканська чуми свиней, вірус АЧС, векторне захворювання, діагностичні дослідження, дикі свині, домашні свині, імуноферментний аналіз, молекулярно-генетичний скринінг, петльова ізотермічна ампліфікація (LAMP), полімеразна ланцюгова реакція, рекомбінантні білки, рекомбінантний позитивний контроль, тест-система, Україна.

ANNOTATION

Kit M. Yu. Improvement of African swine fever rapid diagnostics by molecular methods. — Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 “Biology and Biochemistry”. — National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, 2025.

African swine fever (ASF) is a transboundary emergent viral contagious disease of domestic pigs and wild boars. An acute form of the disease causes up to 100 % mortality rate. ASF is spread in African, European, Asian, and Pacific countries. Since there are neither registered and widely used vaccine nor treatment, diagnostics remains one of the crucial issues for the disease control. It is also known that the virus circulates in wild boar populations in the countries where the virus is well-established. It includes low virulent strains that do not cause death of infected animals but make them lifelong virus carriers. Considering these facts, the development of domestic diagnostic tools is an important task, whereas a screening study is essential for clarification of the ASF situation among wild boars in Ukraine

The dissertation is devoted to the development of serological (ELISA, Western blot) and molecular (conventional and qPCR, loop-mediated isothermal amplification) tools for ASF diagnostics, improvement of a method for lifetime oral

fluid sampling from wild boars, and screening study of ASF situation in wild boar population in Kharkiv oblast in Ukraine.

Using PCR, molecular cloning, affinity chromatography and Western blot methods, 6 recombinant ASFV proteins (p10, p32, p54, p54 Δ TM, DNA ligase and DNA ligase Δ DBD) labelled with polypeptide sequence Tween-Strep-tag for purification have been obtained. Native and denaturing purification of the expressed proteins was not successful, for this reason, the protocol for protein solubilisation from inclusion bodies using detergents has been developed and the process of protein purification has been optimised. Thus, the final protocol for a lysate preparation used for further chromatographic purification included treatment with buffers containing sodium deoxycholate and lytic enzymes (2 ml buffer for the pellet from 100 ml culture), sonication until the suspension is translucent (usually, 20 cycles twice), 4 cycles freeze-thawing and overnight incubation with sarkosyl-containing buffer. Specificity of purified and expressed proteins was performed by Western blot with ASF positive and negative referent swine sera. Proteins p32 and p54 were proven to have antigenic properties and did not produce a background signal with ASF negative serum. Proteins p10, full length and truncated DNA-ligase showed negative result with ASF positive serum, whereas p54 Δ TM was positive with both sera types.

The effectiveness of the use of recombinant p32 protein purified by solubilization protocol with detergents as an antigen in ELISA with ASF positive and negative sera was established. Working concentrations of components for analysis by indirect ELISA were 5 μ g/ml of antigen, 1:100 sera dilution 1:10000 secondary antibodies dilution. While testing the ASF reference swine sera panel using the developed ELISA protocol, the results were the same as expected: neither false-positive nor false-negative results were observed, the ratio of optical density values obtained for positive and negative samples was at least 5.8. The intra-assay coefficient of variability of the results obtained using the developed protocol was 3.18% for positive and 1.56% for negative sera samples, inter-assay — 7.59% for positive and 7.30 % for negative serum, which is within acceptable values for ELISA.

With the involvement of commercial reagents, the real-time PCR-based ASFV DNA detection kit "Sui-DNA-test-ASF virus" was developed to detect a fragment of the ASF virus *b646l* gene. In the study of the kit sensitivity, the ability to detect all positive samples containing ASFV DNA was proved. The detection of plasmid DNA at 10^1 – 10^5 copies/ μ l dilution was tested and the kit was found to detect plasmid DNA when diluted to 10 copies/ μ l or 20 copies/reaction. The specificity of the kit was proven by the absence of Ct values while testing genetic material of other viruses and bacteria causing swine diseases. The absence of false-negative results was confirmed by the presence of CT values for the internal control sample. When testing DNA isolated from PK-15 cell culture, it was shown that the primers do not hybridize with swine DNA. By conducting all tests in triplicate under the same conditions, the results of the analysis using the kit for ASFV DNA detection by real-time PCR "Sui-DNA-test-ASF virus" have been proven to be reproducible, as evidenced by a low intra-assay coefficient of variability for positive results, which is 1.07%.

Ampicillin-resistant *E. coli* clones of DN5 α strain carrying the recombinant plasmid pTZ57R/T_ASF with insertion of a 1763 bp *b646l* gene fragment were obtained. The plasmid amplified and purified from bacterial culture can be used as a positive control sample for ASFV PCR detection by all OIE-recommended methods (conventional and real-time PCR) at a dilution of up to 10 copies/ μ l.

A protocol for the detection of the ASFV *c962r* gene by loop-mediated isothermal amplification has been developed. The limit of detection was 10 copies of the target sequence in μ l, which corresponds to 50 copies per reaction. The developed method of ASFV DNA detection showed absolute specificity, generating neither false-positive nor false-negative results in the study of the panel of ASFV DNA reference samples and the panel of heterologous DNA samples of other bacterial and viral pathogens of swine. Synthesis of the reaction product was not observed in the study of DNA samples extracted from swine lymph nodes. The average intra-assay variability coefficient of results for positive samples is 1.81%, which is quite low and is within 10%, the generally accepted maximum allowable value for diagnostic methods. The method for oral fluids sampling from wild boars under field conditions

rope in a bait was improved. A method for detecting *S. scrofa* DNA in oral fluids samples using loop-mediated isothermal amplification has been developed and optimized. During field studies in Kharkiv and Chuhuiv rayons of Kharkiv Oblast in 2020 and 2021, 250 baits were distributed and 101 samples of oral fluid from wild animals were collected, among which 28 pools out of 51 contained genetic material of *S. scrofa*. In the study of oral fluids samples belonging to wild boars, it was found that 15 samples (26.7%) contained genetic material of ASFV. All ASF positive samples were collected in forests in Chuhuiv rayon of Kharkiv oblast, where ASF cases had been recorded and depopulation of wild boars was performed in 2017, and the second outbreak was registered in 2024.

The novelty of the work is that for the first time in Ukraine, the efficiency of recombinant analogues of p32 and p54 ASFV proteins for anti-ASFV antibodies detection in swine sera by ELISA use was developed and proved, a loop-mediated isothermal amplification-based method for ASFV DNA detection was developed, as well as a recombinant positive control sample for PCR detection of ASFV DNA was developed and the effectiveness of its use was proved, a kit for the detection of ASFV DNA by real-time PCR was developed. For the first time in Ukraine, lifetime sampling of oral fluids from wild boars under field conditions was performed and the possibility of *S. scrofa* and ASFV genetic markers LAMP detection in those samples was confirmed. The carrying of the ASFV in the wild boar population in Kharkiv Oblast has been established.

Results of the study have been implemented in the research work of NSC “IECVM” and used to develop regulatory documentation for the manufacture, control and application of a kit for the detection of ASFV DNA by real-time PCR “Sui-DNA-test-ASF virus”, declarative patent of Ukraine for a utility model No. 133163 “Test kit for the detection of African swine fever virus by polymerase chain reaction “Sui-DNA-test-ASF virus””. A patent for a utility model “Method of obtaining recombinant p32 antigen for the diagnosis of African swine fever using ELISA” was prepared and submitted for registration. Methodical recommendations “Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification”

and “Production of recombinant p32 antigen for ELISA diagnosis of ASF” have been developed for specialists of veterinary diagnostic laboratories, scientists, teachers and students of higher educational institutions and employees of research institutions.

Key words: antigen, African swine fever, ASF virus, vector-borne disease, diagnostic tests, wild pigs, domestic pigs, enzyme-linked immunosorbent assay, molecular genetic screening, looped isothermal amplification (LAMP), polymerase chain reaction, recombinant proteins, recombinant positive control, test system, Ukraine.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Розділ у колективній монографії

1. Gallardo, C., P. Sastre, P. Rueda, A. P. Gerilovych, **M. Kit**, I. Nurmoja, and M. F. Le Potier. 2021. “5. Methods for African swine fever diagnosis in clinical and environmental samples.” in *Understanding and Combatting African Swine Fever*, 141–60. Wageningen, the Netherlands: Wageningen Academic Publishers. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-910-7_5. (Дисертантка провела польові дослідження та підготувала рукопис частини розділу монографії).

Стаття у науковому фаховому виданні України категорії «А»

2. **Kit, M.**, J. Schwarz, and A. Gerilovych. 2021. “Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on the C962R gene for African swine fever virus detection”. *Agricultural Science and Practice* 8, no. 3: 3–12. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.03.003>. (Дисертантка брала участь у плануванні та проведенні досліджень, оформила результати та підготувала рукопис статті).

Статті у наукових фахових виданнях України категорії «Б»

3. Стегній, Б. Т., О. С. Солодянкін, О. Ю. Лиманська, М. Ю. Кіт, А. І. Бузун, та В. Л. Ареф'єв. 2018. “Вивчення специфічності та чутливості тест-системи для детекції вірусу африканської чуми свиней методом ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus»”. *Ветеринарна медицина* 104: 359–62. https://jvm.kharkov.ua/sbornik/104/VetMed_104.pdf. (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень та підготовці рукопису статті).

4. Kit, M., O. Zlenko, O. Solodiankin, V. Bolotin, and A. Gerilovych. 2020. “Development of recombinant positive control for African swine fever virus PCR detection.” *Biotechnologia Acta* 13, no. 6: 58–63. <https://doi.org/10.15407/biotech13.06.058>. (Дисертантка брала участь у плануванні та проведенні досліджень, оформила результати та підготувала рукопис статті).

5. Kit, M. Yu. 2021. “Development of recombinant antigen expression and purification for African swine fever serological diagnostics.” *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety* 7, no. 3: 24–31. <https://doi.org/10.36016/jymbbs-2021-7-3-4>.

Праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Матеріали наукових доповідей

6. Kit, M., O. Solodyankin, V. Arefiev, V. Bolotin, and A. Gerilovych. 2018. “Development of universal positive DNA-control of ASF virus and validation of real-time PCR with its use.” in *3rd Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Kyiv, Ukraine, April, 16–20, 2018*, 118. (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень та підготувала текст тез).

7. Kit, M., and A. Gerilovych. 2021. “Development of DNA detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification.” in *2021 International BioThreat Reduction Symposium, Kyiv, Ukraine, 29 June, 29–July, 2*, 64. (Дисертантка брала участь у плануванні та проведенні досліджень, оформила результати та підготувала текст тез).

8. **Kit, M.**, C. Popp, H. von Buttlar, A. Gerilovych, and J. Schwarz. 2021. “Oral fluid-based surveillance study of African swine fever among wild boars in Ukraine.” in *17th Medical Biodefence Conference, Munich, Germany, September, 28–October, 1*, 54. (Дисертантка брала участь у плануванні та проведенні досліджень, оформила результати та підготувала текст тез).

9. Buzun, A.-I., **M. Kit**, M. Stegnyy, and I. Bobrovickaya. 2022. “Vers l’farm initiative: Comment un antigène artificiel de la peste porcine africaine peut aider l’exportation agricole de l’Ukraine”. *ΛΟΓΟΣ*, no. July 8, 2022 [3rd International Scientific and Practical Conference “Débats Scientifiques et Orientations Prospectives du Développement Scientifique”, Paris, France, July 8, 2022]: 138–42. <https://doi.org/10.36074/logos-08.07.2022.037>. (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень).

10. **Kit, M. Ю.**, та О. Б. Зленко. 2024. “Скринінгове дослідження вірусу африканської чуми свиней у популяції диких кабанів на території Харківської області”. у *Онлайн-конференція аспірантів і молодих вчених у сфері Єдиного здоров’я та біотехнології «VetBioConnect», м. Харків, 3–4 червня 2024 р.*, 29–31. https://www.iekvm.kharkov.ua/documents/VetBioConnect_2024_theses.pdf. (Дисертантка брала участь у плануванні та проведенні досліджень, оформила результати та підготувала текст тез).

11. **Kit, M. Ю.** 2024. “Розробка способу детекції ДНК свині (*Sus scrofa*) за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації”. у *Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції: II міжнародна науково-практична конференція науково-педагогічних працівників та молодих науковців, м. Одеса, 17–18 жовтня 2024 р.*, 113–5. https://osau.edu.ua/wp-content/uploads/2024/11/2024_ZBIRNYK_FVM.pdf.

Праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

Патент України на корисну модель

12. Стегній, Б. Т., О. С. Солодянкін, А. П. Герілович, О. В. Піщанський, А. О. Меженський, М. А. Сапачова, Н. Г. Рудова, **М. Ю. Kit**, та А. В. Кузьмінов.

2019. Тест-система для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції «Sui-DNA-test-ASF virus». Патент України на корисну модель 133163, поданий 22 жовтня 2018 р., та опублікований 25 березня 2019 р. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1340792>. (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень та оформленні документів на патент).

Методичні рекомендації

13. Герілович, А. П., та **М. Ю. Кіт**. 2021. *Детекція ДНК вірусу африканської чуми свиней методом петльової ізотермічної ампліфікації (методичні рекомендації)* [затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 3 від 3.11.2021 р.]. Харків: ННЦ «ІЕКВМ». (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та оформленні методичних рекомендацій).

14. **Кіт, М. Ю.**, О. Б. Зленко, та Т. Б. Дідик. 2024. *Методичні рекомендації «Отримання рекомбінантного антигену р32 для ІФА-діагностики АЧС»* [затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 8 від 23.10.2024 р.]. Харків: ННЦ «ІЕКВМ». (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та оформленні методичних рекомендацій).

З М І С Т

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	17
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1 Загальна характеристика вірусу африканської чуми свиней	25
1.2 Епізоотологічні особливості	33
1.3 Епізоотична ситуація щодо АЧС у світі	42
1.4 Лабораторна діагностика АЧС	52
1.5 Специфічна профілактика АЧС	59
1.6 Висновок з огляду літератури	60
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	63
2.1 Матеріали для проведення досліджень	63
2.2 Методи проведення досліджень	71
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	83
3.1 Розробка рекомбінантних антигенів вірусу АЧС та протоколу проведення ІФА для серологічної діагностики захворювання	83
3.2 Розробка рекомбінантного позитивного контрольного зразка для ПЛР-детекції вірусу АЧС	102
3.3 Розробка тест-системи для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу	106
3.4 Розробка способу детекції ДНК вірусу АЧС за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації (LAMP)	110
3.5 Удосконалення методу відбору зразків ротової рідини від диких свиней в польових умовах та скринінг генетичного матеріалу збудника АЧС у цих зразках	119

РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

ДОСЛІДЖЕНЬ.....	124
ВИСНОВКИ.....	143
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	145
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	146
ДОДАТКИ	175

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АГТ — ангідротетрациклін

АЧС — африканська чума свиней

ВООЗТ — Всесвітня організація охорони здоров'я тварин

ДЗД — ДНК-зв'язуючий домен

ДНК — дезоксирибонуклеїнова кислота

ДСН-ПААГ електроелектрофорез — електрофорез у поліакриламідному гелі з
додецилсульфатом натрію

ІФА — імуноферментний аналіз

КЧС — класична чума свиней

ПЛР — полімеразна ланцюгова реакція

РІФ — реакція імунофлуоресценції

РНК — рибонуклеїнова кислота

РРСС — респіраторно-репродуктивний синдром свиней

ПААГ — поліакриламідний гель

ПВС — парвовірус свиней

ТМ — тансмембранний домен

УФ — ультрафіолет

УЗ — ультразвук

ФСБ — фосфатно-сольовий буфер

ЦВС — цирковірус свиней

EDTA — ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt dihydrate

HRP — horseradish peroxidase

LAMP — loop-mediated isothermal amplification

LB — Lysogeny broth

MGF — multigene family

MES — 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

MOPS — 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

TMB — Tetramethylbenzidine

X-Gal — 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside

ВСТУП

Актуальність теми. Африканська чума свиней (АЧС) — це вірусне контагіозне захворювання домашніх та диких свиней. Гостра форма захворювання спричиняє смертність інфікованих тварин, що сягає 100 % [1]. Захворювання поширене у країнах Африки, Східної та Західної Європи, Азії та Океанії. Тільки у 2016–2020 рр. понад 8 млн домашніх свиней загинуло внаслідок АЧС або було забито у рамках запроваджених у зв'язку із захворюванням карантинних заходів [2]. Перший спалах захворювання на території України був зафіксований у 1977 р. За часів незалежності, перший випадок АЧС було лабораторно підтверджено у 2012 р. Починаючи з 2012 р., у 24 областях України зареєстровано 723 випадки захворювання [3]. Економічні збитки, яких зазнала наша країна в результаті епізоотії АЧС становлять понад 200 млн грн [4].

АЧС внесена до Переліку особливо небезпечних (карантинних) хвороб тварин та є обов'язковою для реєстрації у ВООЗТ (Всесвітня організація охорони здоров'я тварин). На сьогодні засоби лікування та зареєстровані і загальноприйняті методи профілактики захворювання відсутні, тому єдиним способом контролю є швидка діагностика та запровадження суворих карантинних заходів [1].

Популяції диких свиней є важливим середовищем еволюції вірусу в напрямку зниження його вірулентності. У країнах, де вірус циркулює протягом тривалого часу, під час моніторингових досліджень серед диких свиней значну частку позитивних щодо АЧС результатів виявляють серологічними методами, що свідчить про виникнення помірно- та низьковірулентних штамів вірусу, що дозволяє тваринам виживати після інфікування та бути позитивними вірусоносіями [5, 6]. Наразі в Україні серологічний моніторинг серед диких свиней не проводять, тому дані з цього питання відсутні.

Зважаючи на вказані вище факти, удосконалення системи діагностики АЧС в Україні, у тому числі шляхом розробки та вдосконалення молекулярно-генетичних та серологічних методів, а також проведення відбору та дослідження прижиттєвих зразків від диких свиней щодо наявності в них збудника АЧС, є актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася впродовж 2017–2025 рр. згідно з планами наукових досліджень ННЦ «ІЕКВМ», затвердженими Національною академією аграрних наук України за завданнями 38.01.01.02 Ф «Встановити видо- та родоспецифічні генетичні маркери збудників емерджентних інфекційних захворювань ВРХ, свиней, птиці та розробити методологію їх моніторингу і діагностики на основі молекулярно-генетичних технологій» (2016–2019 рр., номер держреєстрації 0116U000237), 39.00.03.16 Ф (Пш) «Розробити методику виявлення ДНК вірусу АЧС на основі ізотермічної полімеразної реакції» (2019 р., номер держреєстрації 0119U100134), 34.02.01.02 Ф «Створення методології розробки рекомбінантних контрольних зразків нуклеїнових кислот і протеїнів збудників інфекційних хвороб для використання у лабораторній ветеринарній діагностиці» (2021–2025 рр., номер держреєстрації 0121U108358), а також за підтримки Інституту мікробіології Бундесверу та GIZ GmbH у рамках проекту «Українсько-німецька ініціатива «Біологічна безпека для управління ризиками зоонозів на територіях, які розташовані біля зовнішніх кордонів країн-членів Європейського союзу» (2020–2022 рр.).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у розробці і вдосконаленні засобів діагностики АЧС на основі полімеразної ланцюгової реакції, петльової ізотермічної ампліфікації та імуноферментного аналізу, а також проведенні молекулярно-генетичного скринінгу щодо циркуляції збудника АЧС у популяції диких свиней.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Отримати в експресуючій культурі *E. coli* рекомбінантні аналоги антигенів p10, p32, p54, p54ΔTM, лігази, лігазиΔДЗД вірусу АЧС для виявлення антитіл до збудника АЧС методом ІФА.

2. Розробити тест-систему для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу.

3. Розробити регламент отримання рекомбінантного позитивного контрольного зразка на основі інсерції ділянки гена *b646l* вірусу АЧС для детекції вірусу АЧС методом ПЛР у реальному часі.

4. Розробити методику детекції ДНК вірусу АЧС та методику детекції ДНК свині на основі петльової ізотермічної ампліфікації.

5. Здійснити збір польових зразків ротової рідини та провести дослідження вірусоносійства серед диких свиней (за скринінгом зразків ротової рідини щодо наявності генетичного матеріалу вірусу АЧС) за допомогою розроблених методик на основі петльової ізотермічної ампліфікації.

Об'єкт дослідження: африканська чума свиней.

Предмет дослідження: лабораторна діагностика та епізоотична ситуація щодо АЧС, молекулярні маркери та антигенні детермінанти вірусу АЧС, рекомбінантні антигени та плазмідний контроль для серологічної та молекулярної діагностики АЧС.

Методи дослідження: робота виконана з використанням мікробіологічних (культивування та отримання компетентних клітин *E. coli*), молекулярно-генетичних (ПЛР, петльова ізотермічна ампліфікація, секвенування), молекулярно-біотехнологічних (молекулярне клонування, хроматографія), серологічних (ІФА, вестерн-блот), біоінформатичних, у т. ч. статистичних методів досліджень (аналіз нуклеотидних послідовностей, дизайн праймерів, обчислення описових статистичних параметрів).

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше в Україні розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантних аналогів протеїнів p32 та p54 вірусу АЧС для детекції антитіл проти збудника АЧС у сироватках крові від свиней методом ІФА, розроблено методику детекції ДНК вірусу АЧС за

допомогою петльової ізотермічної ампліфікації, а також розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантного позитивного контрольного зразка для детекції генетичного матеріалу вірусу АЧС методом ПЛР, розроблено тест-систему для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у реальному часі. Уперше на території України було проведено прижиттєвий збір зразків ротової рідини від диких свиней у польових умовах та показано можливість виявлення у таких зразках генетичних маркерів *Sus scrofa* та вірусу АЧС за допомогою розроблених нами методик на основі петльової ізотермічної ампліфікації. Установлено носійство вірусу АЧС у популяції диких свиней на території Харківської області.

Практичне значення отриманих результатів. Результати досліджень використано для розробки нормативної документації щодо виготовлення, контролювання та застосування тест-системи для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus» (деклараційний патент України на корисну модель № 133163 «Тест-система для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції «Sui-DNA-test-ASF virus») (Додаток А). Підготовано та подано до реєстрації патент на корисну модель «Спосіб отримання рекомбінантного антигену р32 для діагностики африканської чуми свиней за допомогою ІФА».

Розроблено методичні рекомендації «Детекція ДНК вірусу африканської чуми свиней методом петльової ізотермічної ампліфікації» та «Отримання рекомбінантного антигену р32 для ІФА-діагностики АЧС», розглянуті та схвалені методкомісією ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 3 від 3.11.2021 р. та протокол № 8 від 23.10. 2024 р. відповідно. Методичні рекомендації призначені для фахівців діагностичних лабораторій, науковців, викладачів та студентів вищих навчальних закладів та співробітників науково-дослідних установ ветеринарного профілю.

Розроблено та вдосконалено серологічні (ІФА) та молекулярно-генетичні (ПЛР, петльова ізотермічна ампліфікація) методики досліджень щодо АЧС

клінічних зразків, оптимізовано спосіб відбору та тестування ротової рідини від диких свиней, що рекомендовані до використання у роботі спеціалістами ветеринарної медицини.

Результати наукових досліджень рекомендуються до використання під час підготовки здобувачів вищої освіти за спеціальністю Біологія та біохімія, Ветеринарна медицина, при вивченні освітніх програм Біотехнологія та Промислова біотехнологія у закладах вищої освіти України та в наукових дослідженнях підрозділів Інституту ветеринарної медицини НААН України.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто проведено основний обсяг пошукових та експериментальних досліджень, аналіз, трактування та узагальнення отриманих результатів, статистичний аналіз даних, формулювання висновків, а також оформлення рукопису дисертації. Отримання рекомбінантних протеїнів та розробка протоколу проведення ІФА були здійснені на базі Інституту мікробіології Бундесверу (Німеччина) спільно з доктором Ю. Шварц та доктором К. Попп, обговорення результатів щодо цієї частини роботи відбувалося за участі доктора Х. фон Бутлера. Збір польового матеріалу для скринінгових досліджень проведено здобувачем спільно зі старшим науковим співробітником ННЦ «ІЕКВМ», кандидатом біологічних наук О. Б. Зленко. Створення карти місця відбору зразків від диких свиней здійснювали спільно зі старшим викладачем ХНУ ім. Каразіна В. В. Гарькавенком. Планування напрямів роботи, обговорення результатів і структури дисертації здійснювали спільно з доктором ветеринарних наук, професором, членом-кореспондентом НААН А. П. Геріловичем та науковим керівником доктором ветеринарних наук, професором А. П. Палієм.

Апробація результатів дисертації. Основні результати були представлені, обговорені та схвалені на звітних сесіях вченої ради ННЦ «ІЕКВМ» у 2018–2021 та 2024 рр., а також на таких наукових конференціях: 3rd Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium (Київ, Україна, 2018), Biosafety and Biosecurity Symposium “One Health — One Vision” (Тбілісі, Грузія, 2019), 2021 International BioThreat Reduction Symposium

(Київ, Україна, 2021), 17th Medical Biodefence Conference (Мюнхен, Німеччина, 2021), International Online Science Symposium “Know Your Pathogens — Eurasian Symposium on Biological Health Hazards” (2021), онлайн-конференції аспірантів і молодих вчених у сфері Єдиного здоров’я та біотехнології “VetBioConnect” (Харків, Україна, 2024), II міжнародній науково-практичній конференції науково-педагогічних працівників та молодих науковців «Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції» (Одеса, Україна, 2024).

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 14 наукових праць, у тому числі 1 розділ у колективній монографії, виданій за кордоном, 1 стаття у науковому фаховому виданні України категорії «А» та 3 статті — категорії «Б», 6 тез доповідей на наукових конференціях, 1 опис до патенту України на корисну модель і 2 методичних рекомендацій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 184 сторінках комп’ютерного тексту, ілюстрована 14 таблицями та 22 рисунками, і включає: анотації українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати власних досліджень, обговорення та узагальнення результатів досліджень, висновки, пропозиції виробництву, список використаних джерел, якій налічує 207 найменувань, додатки.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика вірусу африканської чуми свиней

Організація віріона. Африканська чума свиней (АЧС) — це вірусна контагіозна хвороба диких і домашніх свиней, вперше описана у 1921 р. у Кенії [7]. Збудник захворювання, вірус АЧС, є єдиним представником роду *Asfivirus* родини *Asfarviridae* [8]. Це великий за розміром вірус, вкритий оболонкою, що має ікосаедричну морфологію. Розмір віріонів становить близько 200 нм. Віріон складається із 4 концентричних шарів і зовнішньої мембрани [9]. Нуклеоїд, що являє собою зв'язаний із нуклеопротейнами вірусний геном, оточує тонка коропа оболонка, утворена переважно поліпротейнами pp220 та pp62. Цей шар також називають внутрішнім капсидом, у якому триангуляційне число $T=19$. Над ним розташований внутрішній ліпопротейновий шар та складний капсид, який є зовнішньою частиною вірусної частки, що перебуває в клітині [10]. Зовнішній капсид з $T=277$ складається приблизно з 2000 капсомерів, головним компонентом яких є білок p72 (відомий також як p73), що складає 33 % загальної маси віріона [11]. Кожен капсомер являє собою гексагональну призму діаметром 13 нм з отвором в центральній частині. Позаклітинні віріони оточені додатковою ліпідною оболонкою, яку вони отримують під час виходу з клітини через плазматичну мембрану [10].

Геном являє собою лінійну дволанцюгову молекулу ДНК довжиною 170–190 тис. п. н., залежно від штаму. Вірус АЧС є єдиним ДНК-вмісним арбовірусом з дволанцюговою ДНК. Ковалентно замкнені на кінцях ланцюги ДНК містять термінальні інвертовані повтори, що формують шпильки. Кодуючі гени розташовані на відстані меншій за 200 п. н. один від одного і кодуються на обох ланцюгах ДНК. Оскільки транскрипція вірусу відбувається в цитоплазмі, геном не містить інтронів, а РНК не піддається сплайсингу [12].

Геном вірусу АЧС складається з центрального консервативного регіону (CCR), всередині якого знаходиться центральний варіабельний регіон (CVR), а також лівого і правого варіабельного регіонів (LVR та RVR відповідно) та згаданих вище термінальних інвертованих повторів. Розмір консервативного ядра генома CCR становить 125 тис. п. н., у ньому закодовані переважно гени, які відповідають за реплікацію вірусної ДНК, збірку віріона та модифікацію функцій клітини господаря [13]. Разом із тим, функція багатьох генів корової ділянки лишається невідомою. Варіабельні гени та міжгенні ділянки, розташовані у CVR, використовують при інтрагенотипуванні, що доповнює основний підхід, заснований на типуванні гена р72. Багато генів вірусу АЧС отримали свою назву на основі гомології з поксвірусами [14].

Вміст GC-пар у геномах більшості штамів збудника АЧС складає в середньому 38 %, однак у варіабельних частинах генома спостерігається їх низький вміст. Такі відмінності ймовірно пов'язані з еволюцією вірусу і пояснюються вищою біохімічною витратністю синтезу пуринових основ [14].

Геном вірусу містить від 151 до 167 відкритих рамок зчитування [9, 12]. Варіабельність розміру обумовлена наявністю, відсутністю та кількістю копій певних членів мультигенних родин (MGF, multy-gene family) у лівому і правому варіабельних регіонах. MGF є характерною особливістю вірусу АЧС та не мають гомологів у геномах інших збудників. Наразі відомо 5 мультигенних родин: MGF 100, MGF 110, MGF 300, MGF 360, MGF 530/505. Назви генів, що належать до MGF, походять від середньої кількості кодованих ними амінокислот, напрямку зчитування та розташування у родині відносно лівого краю генома [12, 15]. В MGF регіонах спостерігаються делеції та інсерції повторюваних фрагментів генома розміром до 20 тис. п. н., що ймовірно забезпечує антигенну варіабельність вірусу і допомагає йому уникнути імунної відповіді господаря. Також варіації пов'язують із ступенем вірулентності та діапазоном видів-господарів серед кліщів [9]. Штами вірусу АЧС, що містять більшу кількість копій MGF часто асоційовані із більш вірулентним фенотипом. У той же час було встановлено, що при адаптації штаму

Georgia/2007 до культивування у перещеплюваних клітинах лінії Vero та його атенуації, відбулися численні мутації у різних частинах генома, включаючи низку делецій у MGF505 [14]. Подібний ефект виявлено при дослідженні ізоляту Estonia 2012, атенуований фенотип якого асоціюють із великою делецією в LVR, що включала 12 із 14 генів MGF110 [5].

Віріон містить щонайменше 28 структурних білків, коли знаходиться всередині клітини, та 54 поза її межами. Зовнішня оболонка містить білок прикріплення вірусу p12 та протеїн p24 (p22). Також на поверхні внутрішньоклітинного віріона знаходиться білок p14,5 (E120R), необхідний для транспорту віріонів від вірусних фабрик всередині клітини до плазматичної мембрани. Капсид, окрім головного капсидного білка p72, включає протеїни p49, H240R та M1249L. Внутрішня ліпопротеїнова оболонка містить білки p12, p17, p54 та pE248R. Внутрішній капсид містить поліпротеїни pp220 (p5, p14, p34, p37 і p150) та pp60 (p8, p15, p35) та фермент pS273R, що відповідає за процесинг поліпротеїнів. Головним капсидним білком внутрішнього капсиду може вважатися p15. До нуклеопротеїнів належать p10 та гістон-подібний білок p11,6 (A104R), також коро́ва частина містить білки, що забезпечують транскрипцію. Деякі вірусні білки проявляють високі антигенні властивості, у тому числі капсидний білок p72 та мембранні протеїни p54, p30 і p12. Понад 50 вірусних білків індують утворення антитіл, однак протективні властивості цих антитіл не встановлені. Натомість, вони дають змогу проводити серологічну діагностику АЧС [9, 10, 12, 16].

До функціональних білків вірусу АЧС належать ферменти, задіяні у нуклеотидному метаболізмі (рибонуклеотидредуктаза, тимідинкіназа, гуанілінтрансфераза, дезоксиуридинтрифосфатаза), реплікації, репарації і транскрипції нуклеїнових кислот (ДНК-полімераза, ДНК-полімераза Х, ДНК-лігаза, РНК-полімераза, полі (А) полімераза, топоізомераза II, гуанілінтрансфераза, 3 ДНК-гелікази із суперродини II, АП ендонуклеаза та ін.) Крім того, вірус кодує білки, що є компонентами редокс-метаболічних шляхів, серед яких pB119L, pA151R. До інших функціональних білків віріону належать

шаперонний білок pB602L, що є необхідним для збирання капсидного білку p72, p49, відповідальний за формування верхівок ікосаедра капсиду, залучені до посттрансляційних модифікацій білків убіквітин-кон'югуючий білок та серин-треонін протеїнкіназа, а також транс-пренілтрансфераза, що бере участь у синтезі терпеноїдів [10, 12, 17].

На поверхні віріона знаходиться білок CD2v, що є вірусним гомологом рецептору поверхневої адгезії Т-лімфоцитів і бере участь у явищі гемадсорбції, ремоделюванні клітинного транспорту, а також є важливим для процесу патогенезу та розмноження у кліщових векторах. Також до білків, що відповідають за взаємодію з клітинами хазяїна відносять інгібітори апоптозу Bcl2, pEP153R (лектин С-типу) та IAP (інгібітор каспази 3). Білок A238L інгібує транскрипційну активність в інфікованих макрофагах, білок pDP71L бере участь у дефосфорилюванні фактора ініціації транскрипції eIF2 α , інгібуючи трансляцію. Таким чином, вказані вище білки модулюють імунну відповідь хазяїна. Останнім часом проводять багато транскриптомних та протеомних досліджень вірусу АЧС, у ході яких було ідентифіковано понад 20 білків з невизначеною функцією, що складають значну частину віріону [12, 13, 17].

Генотипування та генетична структура вірусу. Перша повногеномна послідовність вірусу АЧС була охарактеризована на прикладі невірулентного адаптованого до культури клітин Vero штаму Ba71V [18]. Останнім часом було секвеновано геноми багатьох польових ізолятів вірусу, що характеризуються різною вірулентністю, завдяки чому став можливим поділ популяції збудника на групи за генетичною ознакою. Так, у 2020 р. публічно доступними були 70 повногеномних послідовностей ДНК вірусу АЧС [19]. Генотипи і підтипи вірусу виділяють на основі варіацій у центральному варіабельному регіоні, що знаходиться в межах центрального консервативного регіону [9]. Основною цільовою послідовністю, що використовується для генотипування вірусу АЧС, є С-термінальна частина послідовності, що кодує головний капсидний білок p72 (ген *b646l*). Згідно з даним методом, для розрізнення генотипів С-термінальна послідовність гена *b646l* двох вірусів повинна відрізнятися щонайменше на

4 нуклеотиди [20]. Саме на її основі були ідентифіковані 25 генотипів збудника. Проте у 2023 році було проведено переоцінку методики виділення окремих генотипів, проаналізовані усі наявні на той момент нуклеотидні послідовності гена *b646l* вірусу АЧС, у результаті чого було виділено 6 унікальних генотипів, мінімальна відмінність між якими становить 2 амінокислоти. Для розрізнення старої та нової класифікації автори пропонують використовувати позначення генотипів за допомогою арабських чисел 1, 2, 8, 9, 15 та 23, на відміну від попередніх позначень римськими числами I–XXV [21].

Не зважаючи на недосконалість методики, завдяки відносно швидкому і легкому проведенню, метод генотипування за послідовністю гена *b646l* лишається першим, що використовується для встановлення походження при потраплянні вірусу на нову територію [22, 23]. Як правило, приналежність до певного генотипу не відображає вірулентність ізоляту, але може бути використана для епізоотологічних досліджень та для встановлення географічного поширення вірусу [1, 24].

Співставлення епізоотологічних відомостей та даних генотипування дозволило встановити зв'язок між циклами поширення вірусу, залученою до них кількістю господарів та генетичним розмаїттям вірусу. Найбільше генотипів вірусу за старою класифікацією було виявлено у країнах східної Африки, на території яких відоме існування сільватичного циклу поширення вірусу. Значна генетична дивергенція збудника у цьому регіоні пояснюється тривалою коеволюцією вірусу та його природних резервуарів: кліщів і диких свиней, зокрема, бородавочників [25]. Всі наразі відомі генотипи вірусу АЧС поширені в Африці, але тільки генотипи I та II з них були зареєстровані на інших континентах [22].

Генотип I поширений у Центральній та Західній Африці, а після потрапляння у 1957 та 1960 рр. до Португалії поширився на територію багатьох країн Західної Європи, а також Бразилії та у країнах Карибського басейну. Тривалі заходи ерадикації були успішними на всіх указаних територіях, окрім Сардинії, де даний генотип закріпився як ендемічний [24]. Однак під час

секвенування ізоляту Arm/07, виділеного від інфікованої свині у Вірменії під час спалаху 2007 р. було виявлено присутність суміші I і II генотипів вірусу. Проведені філогенетичні дослідження спростовують можливість контамінації даного ізоляту іншими лабораторними культурами вірусу АЧС. Наразі поширення I генотипу вірусу в інших країнах Кавказького регіону або Східної Європи невідоме [25].

Генотип II вірусу АЧС поширений переважно у країнах південно-східної Африки, звідки його занесли на Мадагаскар, Маврикій та до Грузії. Після інтродукції збудника в Грузію у 2007 р. даний генотип поширився до інших країн Кавказького регіону, країн Східної та Центральної Європи, включаючи Україну. Під час досліджень було отримано і секвеновано багато ізолятів, які по суті є клонами штаму Georgia/2007. Було встановлено, що секвеновані послідовності ДНК ізолятів із України, Естонії, Польщі, Литви, Латвії є на 99 % гомологічними материнському вірусу Georgia/2007. Відмінності між сиквенсами становили одонуклеотидні заміни в різних генах і міжгенних ділянках, у тому числі такі, що, згідно передбачення, індукують зсув рамки зчитування [14, 25, 27–29].

Проте р72 генотипування не дає змоги встановити філогенетичні зв'язки, крім того, використання даного методу не завжди достатньо для того, щоб встановити різницю між ізолятами з різним фенотипом, тому для підсилення роздільної здатності використовують типування за генами білків р54 (*e183l*) та р30 (*cp205l*) [21, 25, 30, 31]. Також можливе проведення генотипування центрального варіабельного регіону (CVR) у межах гена *b602l* для точнішого встановлення дрібних відмінностей генома, які можуть проявлятися помірно-або низьковірулентним фенотипом. Ці тетрамерні повтори, що відрізняються за кількістю та нуклеотидними послідовностями, вважаються одним із найбільш варіабельних локусів генома вірусу АЧС [22, 30].

Загалом вірус АЧС є надзвичайно стабільним і показує дуже низький рівень мутацій, тому в уражених захворюванням регіонах рівень генетичної різноманітності вірусу є низьким й іноді навіть NGS-секвенування не дає

можливості відстежити поширення за молекулярними маркерами. Тільки за допомогою повногеномного секвенування можна провести дискримінацію ізолятів. Цей підхід також використовують для ідентифікації штамів вірусу з делеціями [32]. Загалом же було встановлено, що відмінності в окремих генах є незначними і являють собою тандемні повтори, а варіабельність геномів спричинена переважно втратою або набуттям генів із різних MGF, рідше — тандемними повторами у некодуючих регіонах. Саме на основі цих повторів часто базується встановлення відмінностей між близькоспорідненими ізолятами вірусу. Так, за наявності тандемних повторів, розташованих у міжгенному регіоні між *i73r* та *i329l* у правій частині генома було встановлено спорідненість між ізолятами вірусу АЧС, виділеними на території України, Білорусі, Польщі та Литви [14, 30].

Варто відмітити, що філогенетичні дерева, побудовані на основі послідовностей окремих білків, можуть відрізнятися від дендрограм, що базуються на послідовностях генів конкатенованих консервативних білків збудника. Ймовірно, це зумовлено тим, що тривала персистенція вірусу АЧС у м'яких кліщах та африканських видах диких свиней створює сприятливі умови для коінфекції різними генотипами, між якими можливі явища рекомбінації генів [12].

Більшість штамів вірусу АЧС спричиняють гемадсорбцію (ГАд) еритроцитів до інфікованих клітин, однак деякі не володіють такою здатністю. Як правило, ці ізоляти асоціюють із неспецифічним або безсимптомним перебігом інфекції [33].

Систематичне положення та еволюція. Вірус АЧС до 1984 р. відносили до родини Iridoviridae, після чого у складі невизначеного роду (unassigned genus) він був перенесений до *African swine fever virus group*, перейменованої у 1995 р. на *African swine fever-like viruses*. У 1998 р. роду присвоїли назву *Asfivirus* та віднесли до новоствореної родини *Asfarviridae* (Asfar — African swine fever and related viruses), єдиним представником якої він досі й лишається [16].

Вірус належить до «суперродини» великих ядерно-цитоплазматичних ДНК-вмісних вірусів (nucleocytoplasmic large DNA virus, NCLDV), спільною рисою яких є перебіг щонайменше однієї частини реплікаційного циклу в цитоплазмі уражених клітин. Їхня відносна незалежність від ядра забезпечується за рахунок кодування консервативних білків, залучених до основних етапів реплікації і трансляції. Крім Asfarviridae даної групи відносять такі родини вірусів як Poxviridae (уражають комах, рептилій, птахів та ссавців), Iridoviridae (інфікують комах та холонокровних тварин), Phycodnaviridae (віруси водоростей), Mimiviridae, Marseilleviridae, Megaviridae, Pandoraviridae, Pithoviridae (включають кілька видів, здатних до реплікації в акантоамебах, три останні родини станом на березень 2021 року не зареєстровані в базі даних Міжнародного комітету з таксономії вірусів), Ascoviridae (інфікують комах) [33]. Реконструкція встановила наявність близько 40 генів, які могли б належати потенційному спільному предкові, і зустрічаються у всіх або кількох представників групи NCLDV[12].

Нуклеотидні послідовності, подібні до послідовностей вірусу АЧС, були виявлені в ході метагеномних досліджень вірусних фракцій, отриманих із ставків у дельті р. Міссісіпі, стічних та океанічних вод, сироватки крові людини тощо. Сумарно для 48 таких послідовностей була встановлена подібність до 23 генів вірусу АЧС [12, 14, 16].

Також віддалена спорідненість на основі 30 спільних генів була показана між вірусом АЧС та такими нещодавно відкритими некласифікованими гігантськими вірусами як *Faustovirus*, *Kaumobavirus*, *Pacmanvirus*. Однак розмір геномів вказаних вірусів (близько 400 тис. п. н.) значно перевищує геном вірусу АЧС (170–194 тис. п. н.), а структура потенційно споріднених рамок зчитування відрізняється наявністю інтронів та екзонів у генах гігантських вірусів. Також на відмінність вказує те, що гігантські віруси розмножуються в клітинах акантоамеб та комах [14, 16].

Нещодавно було виявлено новий асфар-подібний вірус, що спричиняє масову загибель морських моллюсків-абалонів. Зі 159 його ідентифікованих

білків 48 є спорідненими з білками вірусу АЧС. Цей факт, а також подібний консервативний порядок генів робить ці два віруси філогенетично найближчими, згідно сучасним даним, хоча спорідненість і є віддаленою [35].

Також інтегровані фрагменти подібні до вірусу АЧС (ASFLI, African swine fever virus-like integrated elements) розміром близько 20 тис. п. н. (приблизно 10 % генома вірусу) були виявлені у м'яких кліщах роду *Ornithodoros*, представники якого є природним вектором вірусу. Вказані фрагменти інтегрувалися до генома близько 1,46 млн років тому, що вказує на тривалу коеволюцію вірусу та вектора його поширення [23, 36].

1.2 Епізоотологічні особливості

Тварини, що уражаються вірусом, природні резервуари та вектори. Вірус АЧС здатен інфікувати диких та домашніх представників родини Suidae будь-якого віку та статі. Однак, з-поміж інших тільки у представників видів *Sus scrofa domesticus* та *S. scrofa scrofa* розвиваються клінічні прояви, а гостра форма хвороби, як правило, у 100 % випадків закінчується летально. Африканські дикі свині заражаються вірусом, але є безсимптомними його носіями. Бородавочники (*Phacochoerus aethiopicus*, *Ph. africanus*), кущові (*Potamochoerus larvatus*) та червоні річкові свині (*Potamochoerus porcus*), а також великі лісові свині (*Hylochoerus meinertzhageni*) вважаються природними резервуарами вірусу в Африці [1, 38, 39].

М'які кліщі роду *Ornithodoros* (*O. moubata* complex в Африці та *O. erraticus* на Піренейському півострові) родини Argasidae є як специфічним кліщовим вектором для передачі вірусу АЧС, так і природним резервуаром вірусу. В Португалії була показана здатність цих кліщів підтримувати у своїй колонії життєздатний вірус до 5 років без контакту із зовнішніми джерелами вірусу. А на Мадагаскарі вірус було виявлено в кліщах через 4 роки після повної депопуляції свиней. Однак також спостерігалось повне очищення колонії кліщів від вірусу. Ймовірно, для тривалої персистенції вірусу в кліщах у високому титрі без підвищення їх смертності останніх необхідна адаптація

інфекційного агента до вектора [39]. Вірус може передаватися статевим шляхом між особинами, трансоваріально до яєць і трансстадіально протягом життя членистоногого [1, 38]. Передача від свині до кліща і у зворотному напрямі відбувається під час живлення ектопаразитів. Експериментально була показана здатність передавати вірус АЧС для видів *O. coriaceus* та *O. turicata*, що розповсюджені на території США, та потенційно можуть стати векторами у разі поширення вірусу до цієї країни. Також було підтверджено, що кліщі виду *O. puertoricensis* з Карибських островів є ефективними векторами, однак вірус не було виявлено у кліщах, зібраних під час спалаху на Гаїті та в Домініканській республіці [1]. У країнах Центральної та Східної Європи не доведена епізоотична роль жодного виду *Ornithodoros*. Однією з причин цього явища є особливості екології євразійських диких свиней. Так, представники *Sus scrofa* не мають постійних місць відпочинку, як наприклад, нори, які могли би бути підходящим оселищем для ендofільних кліщів [38]. М'які кліщі *O. verrucosus*, зібрані на півдні України, не передають вірус АЧС свиням через укуси, принаймні в лабораторних умовах [40]. Крім того, на території України представники *O. verrucosus* трапляються лише в норах змій та дрібних ссавців, а також на вапнякових скелях берегів річок, тобто в місцях, куди доступ диких свиней обмежений [38].

Механічне поширення збудника здійснюють мухи з роду *Stomoxys*, при чому вірус лишається інфекційним в тілі мухи протягом 12 годин [41]. В іншому дослідженні було показано можливість зараження домашніх свиней при проковтуванні контамінованих мух [42]. Слідові кількості ДНК вірусу АЧС були виявлені в мухах домових (*Musca domestica*) та комарах, зібраних на свинофермі, ураженій АЧС. Роль комах в епідемічному процесі АЧС не встановлена, але можливість локального поширення не виключається [43]. Тверді кліщі *Dermacentor reticulatus* та *Ixodes ricinus*, зібрані з трупів позитивних щодо АЧС диких свиней містили ДНК вірусу АЧС. Це дає підстави припускати, що тверді кліщі теж можуть бути потенційними факторами

механічного поширення вірусу, однак це питання потребує більш глибокого дослідження [44].

Клінічні прояви АЧС. Африканські дикі свині при інфікуванні вірусом зазвичай не мають жодних симптомів захворювання. Клінічні прояви у домашніх та євразійських диких свиней є дуже різноманітними і залежать від таких факторів як вірулентність вірусу, порода свиней, шлях передачі та інфекційна доза. Виділяють три групи ізолятів вірусу АЧС: високо-, помірно- та низьковірулентні. Клінічні форми АЧС варіюють від надгострої до безсимптомної, при цьому високовірулентні ізоляти (смертність 90–100 %) спричиняють надгостру та гостру форми, помірновірулентні (смертність близько 20–40 % серед дорослих тварин та 70–80 % — серед поросят) — гостру і підгостру, низьковірулентні (смертність на рівні 2–10 %) — хронічну та безсимптомну. В середньому інкубаційний період триває від 4 до 19 діб. При надгострій формі захворювання розвивається блискавично, підвищується температура тіла, тварина втрачає апетит і помирає протягом 1–3 діб після появи симптомів. Надгостра форма зазвичай реєструється на вільних від АЧС територіях [9]. Такими неспецифічними проявами як гарячка, втрата апетиту, сонливість характеризується і гостра форма АЧС. Різною мірою можуть проявлятися такі клінічні ознаки як геморагії на вухах, животі, задніх ногах, виділення з очей і носа, у тому числі криваві, гіперемія шкіри на грудях, животі, промежині, ногах, закреп або діарея (може бути з кров'ю), блювання, аборти у вагітних свиноматок, важке та поверхневе дихання. Тварини помирають через 6–15 діб. При посмертному огляді спостерігаються масові крововиливи під шкірою, в селезінці, нирках, печінці, збільшені геморагічні лімфовузли. Симптоми проявляються однаково у диких і домашніх свиней, однак через темний колір шкіри та густу темну шерсть перших, іноді їх складніше помітити. Ця форма теж зустрічається переважно на наївних щодо АЧС територіях [1, 3, 9, 32, 45, 47].

Підгостра та хронічна форми АЧС зустрічаються в ендемічних регіонах. Клінічні прояви підгострої форми хвороби подібні до описаних вище, але менш

інтенсивні, іноді у тварин спостерігається ускладнене дихання та пневмонія. Вагітні свиноматки можуть абортувати. Від 30 до 70 % тварин помирає через 1–3 тижні, тварини, що вижили, у середньому через місяць одужують. Хронічна форма, як правило, спричинена природно атенуйованими вірусами. Симптоми проявляються через 2–3 тижні після інфікування, при цьому підвищується температура, ускладнюється дихання, часто виникають почервоніння шкіри, що з часом припіднімаються і некротизуються. Помирає не більше 30 % заражених тварин. Підгостру форму реєструють переважно в ендемічних регіонах, хронічну — на Піренейському півострові та в країнах, де поширені ізоляти з Піренейського півострова [1, 3, 9, 33, 45, 47].

АЧС часто супроводжується не всіма або слабо вираженими клінічними проявами, описаними вище, особливо на ранніх етапах захворювання. Ці симптоми можна сплутати з іншими захворюваннями і станами. Так, класична чума свиней (КЧС) за симптомами є практично ідентичною АЧС. Крім КЧС, при проведенні диференційної діагностики треба враховувати респіраторно-репродуктивний синдром свиней (PPCS), бешиху, хворобу Ауескі, сальмонельоз [1, 3, 47].

Поширення вірусу АЧС. Загалом для АЧС було описано чотири основні епізоотичні цикли: сільватичний, домашній, цикл зараження тварин кліщами та інфікування диких свиней через середовище існування [48].

Сільватичний (природний) цикл поширення вірусу є найбільш древнім і зустрічається у Південній і Східній Африці та включає природних господарів вірусу АЧС: бородавочників та м'яких кліщів *O. moubata* complex. При цьому новонароджені поросята бородавочників інфікуються вірусом через укуси кліщів, що масово заселяють їх нори, протягом перших 6–8 тижнів життя. Після цього у молодняка розвивається віремія, рівень якої достатній для інфікування інтактних кліщів (щонайменше 10^3 HAD50/мл). Через 2–3 тижні тварини відновлюються, при чому жодні клінічні ознаки інфекції не проявляються. У дорослих бородавочників титр вірусу зрідка буває вищим за 10^2 HAD50/мл, чого не достатньо для інфікування кліщів [39]. Завдяки цьому циклу трансмісії

в ендемічних районах до 100 % популяції бородавочників мають антитіла до вірусу. Навіть у разі відсутності віремійного господаря вірус циркулює у кліщах, що лишаються інфікованими та здатними до інфікування від кількох місяців до кількох років після живлення на інфікованому бородавочнику. Однак присутність бородавочників та кліщів на одній території не обов'язково означає існування сільватичного циклу, як це наприклад відбувається у Західній Африці, де ці тварини, що вважаються традиційними природними резервуарами вірусу, рідко бувають інфіковані. Інші африканські дикі свині також можуть інфікуватися від укусу кліщами та передавати вірус, але їхня роль в сільватичному циклі значно менша за роль бородавочників [1, 25, 48].

Цикл зараження домашніх свиней кліщами зіграв велику роль у поширенні вірусу на Іберійському півострові у 1960-х та 1970-х роках, а також був описаний у деяких регіонах Африки та на Мадагаскарі. У Європі здатним до поширення вірусу господарем є кліщ *Ornithodoros erraticus*, що масово зустрічається в місцях утримання свиней. Деякі спалахи АЧС в Іспанії, у тому числі ремерджентні, були достовірно пов'язані з присутністю кліщів. Таким чином, цей цикл поширення включає домашніх свиней, які утримуються на вільному вигулі, та кліщів, що забезпечуються персистенцією вірусу у навколишньому середовищі [1, 25, 39, 48, 49].

Основною ланкою домашнього циклу поширення вірусу, який пов'язаний із переважною більшістю спалахів АЧС по всьому світу, є домашні свині, а будь-які природні резервуари вірусу відсутні. Як правило, свині заражаються під час безпосереднього контакту ороназальним шляхом з кров'ю, слиною, калом, сечею, слізьми, секретами генітального тракту та носовим слизом інфікованих тварин [1, 47]. Однак чітко відомо, що зараження можливе і повітряним шляхом за відсутності безпосереднього контакту хворої та здорової тварин, а повітря, відібране в приміщеннях з експериментально інфікованими тваринами, протягом перших 25 діб містило вірус АЧС при дослідженні молекулярними та вірусологічними методами [44].

Діяльність людини є майже винятковим фактором поширення вірусу з ферми на ферму, перенесення вірусу можливе при перевезенні тварин або обладнання, годівля інфікованими рештками їжі або кормовими добавками. Мінімальна інфекційна доза вірусу при потраплянні з твердим рослинним кормом шляхом природного годування становить 10^4 TCID₅₀ (50 % tissue culture infectious dose), при потраплянні з рідиною під час природного пиття — 10^0 TCID₅₀ [50]. Як фоміти можуть виступати транспортні засоби, одяг та взуття працівників та самі приміщення для утримання тварин [49]. Антропогенний фактор вважається найбільш ймовірною причиною випадків перенесення вірусу на значні дистанції, наприклад, його інтродукції до Грузії у 2007 та до Китаю у 2018 р. [51].

Однак описані вище 3 цикли передачі не могли повністю пояснити епідеміологічний патерн, що спостерігався у Центральній та Східній Європі, на Кавказі та Сардинії. Базуючись на цих висновках, було описано четвертий, так званий «цикл диких свиней», що включає популяцію євразійського дикого кабана (*Sus scrofa*), а також оселища і трупи цих тварин [48]. Цей цикл характеризується прямою передачею між тваринами та непрямою передачею, опосередкованою навколишнім середовищем. Так, контаміновані тканини, послід, трупи можуть бути джерелом вірусу і забезпечувати персистенцію вірусу в природних ландшафтах протягом багатьох місяців. Останнє твердження є особливо актуальним для країн Східної Європи, де АЧС стала ендемічним захворюванням, а температура нижче 0 °C, що полегшує виживання вірусу в трупах, є звичайною протягом осінньо-зимового періоду [51, 52, 53].

Поведінка диких свиней відносно трупів представників їхнього виду була досліджена Probst та ін. [54]. У цьому дослідженні доказів внутрішньовидового поїдання трупів не було зафіксовано, але тварини проявляли зацікавленість, обнюхували та рили землю під трупами, що призводило до непрямого контакту живої і мертвої тварини в третині випадків. Також спостерігали деяких поросят, що жували кістки, що оголилися в результаті скелетизації. Зразки просякненого кров'ю ґрунту, відібрані з-під трупів загиблих від АЧС диких свиней, містили

живий вірус протягом 7 діб. Це потенційно може означати можливість інфікування диких свиней під час обнюхування контамінованого ґрунту навіть без прямого контакту з мертвою твариною [55]. Водночас у ході досліджень, проведених в Іспанії та Чехії, були зареєстровані факти внутрішньовидового канібалізму серед диких свиней. Це ще більше підвищує ризик розповсюдження вірусу АЧС у популяції диких свиней. Такий спосіб передачі збудників інфекційних хвороб не є новим, наприклад, раніше спалахи хвороби Ауескі також пов'язували з внутрішньовидовим канібалізмом *S. scrofa* [56, 57].

Полювання та підгодовування тварин в період обмеження кормової бази сприяє розповсюдженню вірусу, оскільки тварини долають великі дистанції, втікаючи від пострілів або мігруючи в місця підгодівлі. Дикі свині можуть контамінувати зелений корм та свіжі овочі на полях та в садах, передаючи таким чином вірус домашнім свиням. У свою чергу, дикі свині можуть заражатися, поїдаючи контаміновані харчові відходи, що люди викидають на міські смітники [52, 53].

Незважаючи на те, що при контакті тварини із зараженим середовищем, може передаватися мала кількість вірусних часток, довготривале існування джерела інфекції полегшує розповсюдження вірусу АЧС у локальній популяції диких свиней. Дуже низької інфекційної дози (10–100 гемадсорбуючих одиниць) достатньо для інфікування ороназальним шляхом молодих та ослаблених диких свиней, в яких вірус розмножується та може бути переданий далі здоровим тваринам, спричиняючи летальну форму захворювання [58].

Моніторингові дослідження популяцій диких свиней щодо АЧС вважаються одним зі способів контролю захворювання [59]. При чому корисним є не тільки активний моніторинг, а й пасивний, оскільки полювання, що є основним джерелом зразків для активного моніторингу, обмежене в часі, крім того, не всі вікові групи диких свиней дозволені для полювання [60].

Виживання вірусу в об'єктах довкілля. Складна організація вірусу забезпечує його тривале виживання у клінічних зразках, екскрементах свиней, зразках навколишнього середовища, м'ясних продуктах тощо. Присутність

відповідного багатого на білки середовища полегшує виживання вірусу при широкому діапазоні температур та значень рН протягом тривалого часу, а також підвищує стійкість до різноманітних дезінфектантів.

Кров хворих тварин містить дуже велику кількість вірусних часток, а при зберіганні за температури 4 °С вірус у зразках цього матеріалу виявляється протягом 18 місяців. У крові, що піддалася розкладанню, а також у внутрішніх органах виявити вірус можна протягом 15 тижнів. У шкірі та салі (у тому числі сушених) вірус лишається життєздатним до 300 днів, в кістковому мозку — до 188 [1, 44, 61]. У фекаліях і сечі інфікованих свиней, що зберігаються при 4 °С, вірус АЧС можна виявити протягом 8 та 15 діб відповідно. З підвищенням температури виживання вірусу зменшується, однак навіть при 37 °С вірус виживає в екскрементах свиней протягом 3 діб [62]. У ротовій рідині ДНК вірусу АЧС можна детектувати після 35 діб зберігання при 4 °С, після 14 діб при 12 °С та 21 °С. Після зберігання при 37 °С протягом 1 доби ДНК вірусу виявити не вдалося [62, 63]. В обох дослідженнях не вдалося виділити інфекційний вірус АЧС зі зразків ротової рідини. Ймовірно, це пов'язано з тим, що у даному типі зразків титр вірусу є нижчим за інфекційну дозу.

Поширення вірусу АЧС із сирими та обробленими продуктами зі свинини є одним із найбільш ймовірних способів передачі вірусу, у тому числі транскордонно та трансконтинентально. З поширенням захворювання Євразією, став більш систематичним моніторинг м'ясних продуктів у великих транспортних вузлах. Так, вірус було виявлено в м'ясних продуктах, конфіскованих у таких вільних на момент дослідження від АЧС країнах як Японія, Тайвань, Південна Корея, Австралія, Великобританія тощо. Зазвичай такі продукти перевіряють методом ПЛР, який не дає інформації щодо інфекційності вірусу, однак деякі продукти, конфісковані в Японії, містили саме живий вірус АЧС. У разі згодовування свиням контамінованих харчових відходів або потрапляння м'ясної сировини на смітники, до яких мають доступ дикі або домашні свині, що утримуються на вільному вигулі, ймовірним є виникнення нового спалаху хвороби [64, 65, 66, 67].

Час виживання вірусу в обробленому м'ясі знаходиться під впливом таких процесів як соління, копчення, в'ялення і може сильно варіювати залежно від типу продукту та обробки. Повністю інактивувати вірус можна шляхом теплової обробки при 70 °C протягом 30 хв. Mebus та ін. (1993, 1997) показали, що вірус лишається життєздатним у таких традиційних іспанських сиров'ялених продуктах як серанський та іберійський хамон, лопатка, вирізка до 140 днів. Разом із тим, комерційний час в'ялення цих типів продуктів довший за час життєздатності вірусу, тобто вірус буде інактивований до закінчення процесу обробки м'яса [68, 69]. В дослідженні щодо витривалості вірусу АЧС у традиційних італійських сиров'ялених продуктах були отримані суперечливі результати. Так, було показано, що у в'ялених очеревині та лопатці вірус був життєздатним між 60-ю або 80-ю відповідно і 137-ю добою спостереження, що більше за загальний період обробки і терміну придатності цих типів продуктів. Натомість саямі не містить вірусу АЧС вже на 26 добу в'ялення, що менше за час її дозрівання [70].

Sindryakova та ін. (2016) досліджували виживання вірусу у контамінованому салі і солонині, що зберігалися при кімнатній температурі (+22–25 °C) та у побутовому холодильнику (+4–6 °C). Інфекційний вірус було виявлено в солонині після 16 діб зберігання за кімнатної температури та після 60 діб зберігання в холодильнику. Засолене сало не містило вірулентного вірусу АЧС. Консервована свинина, завдяки тепловій обробці, якій вона підлягала під час приготування, не містила ані самого вірусу, ні його ДНК з першого дня дослідження [71].

У зразках навколишнього середовища вірус зберігається теж досить довго. Загалом контаміновані приміщення, в яких утримують свиней, вважаються інфекційними протягом 1-го місяця [1]. У лісовому ґрунті вірус лишається інфекційним до 112 діб, при 22 °C вірус зберігає інфекційність до 42 діб, особливо у присутності еритроцитів. Вірусна ДНК може бути виявлена в ґрунті протягом 210 діб після контамінації. [72].

Також відомо, що у кормі і воді, контамінованих інфікованою кров'ю при зберіганні за температури 4 °C вірус лишався життєздатним протягом щонайменше 60 діб. При кімнатній температурі у контамінованих кормах вірус лишався життєздатним 1 добу, а у воді — до 50 діб [71]. При дослідженні виживання вірусу АЧС у контамінованих кормах за умов, що моделювали трансатлантичне перевезення, було встановлено, що вірус лишається життєздатним від 9 діб у соєвому борошні до 14 діб у комбікормі [73].

Інактивація вірусу та заходи дезінфекції. У необробленому м'ясі вірус інактивується після нагрівання до 70 °C протягом 30 хв, а у сироватці крові та інших рідинах організму при 60 °C протягом того ж часу. Віріони лишаються стабільними у середовищі без сироватки при рН від 4 до 10, але вірус інактивується через 1 хв при рН нижче 4 та вище 11,5. Сироватка крові значно підвищує стійкість вірусу, так у середовищі з 25 % вмістом сироватки та рН 13,4 вірус не втрачає інфекційної здатності протягом 7 днів [9, 44].

Багато дезінфектантів є неефективними проти вірусу АЧС, однак віріони чутливі до гіпохлориту натрію, хлороформу, бета-пропіолактону, лимонної кислоти, етерів, фенолів, гліцеральдегідів, деоксихолатів, йодовмісних сполук та четвертинних сполук амонію. Зокрема, принцип дії органічних розчинників на вірус полягає у розриванні зв'язків його ліпідної оболонки, але в той же час вірус АЧС стійкий до дії протеаз та нуклеаз. Мила, детергенти та луги використовують для дезінфекції свинарників, транспортних засобів, одягу та територій, заселених людьми. Контаміновані вірусом корми, стоки та гній закопують або спалюють. Органофосфатні та піретроїдні інсектициди використовують для ерадикації кліщів [9].

1.3 Епізоотична ситуація щодо АЧС у світі

Наразі африканська чума свиней розповсюджена на італійському острові Сардинія, у країнах Субсахарської Африки, Східної та Центральної Європи, Кавказького регіону, Азії, Океанії (рис. 1.1).

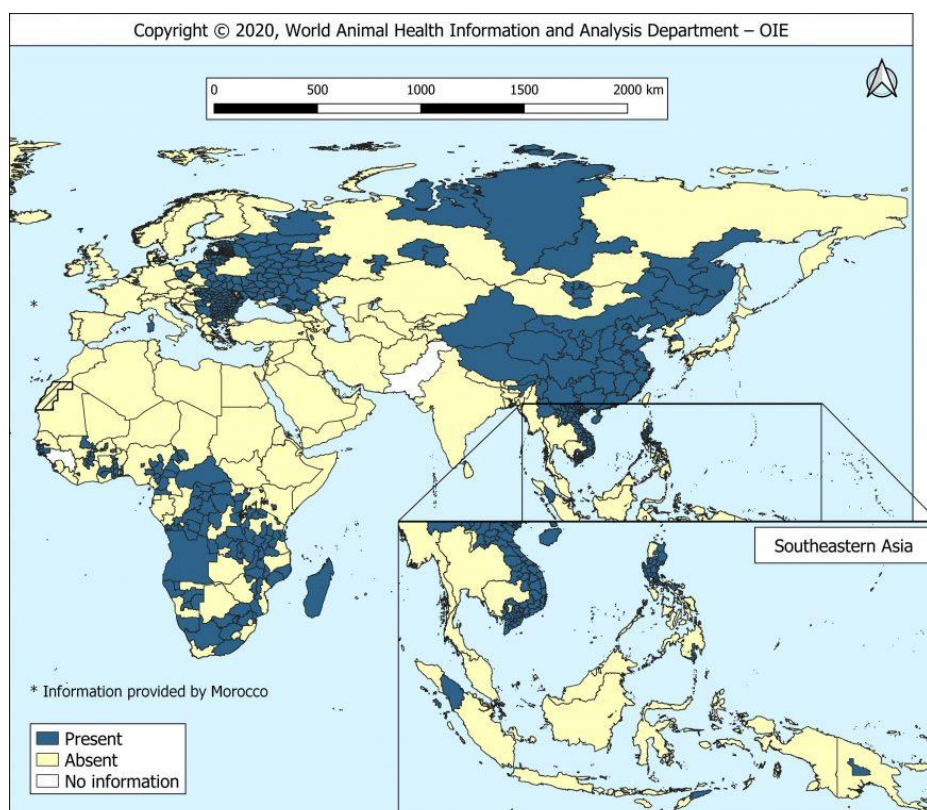


Рис. 1.1. Епізоотична ситуація у світі щодо АЧС (2016–2020).

Однак вірус має великий потенціал транскордонного і навіть трансокеанічного поширення, що уже не раз було зафіксовано. На великі відстані вірус переноситься переважно з м'ясом, що транспортують кораблями та літаками, а потім неправильно утилізують, та з м'ясними продуктами, що ввозять до вільних від АЧС країн мандрівники.

Епізоотична ситуація в Африці. АЧС є ендемічним захворюванням у більшості країн Субсахарської Африки, де вірус, ймовірно і виник та пройшов тривалу коєволюцію з господарями, внаслідок чого утворився сільватичний цикл передачі вірусу, що включає місцевих м'яких кліщів та диких свиней. Підтверджує це припущення і генетичне різноманіття вірусу АЧС на Африканському континенті. Вперше захворювання зареєстрували в Кенії у 1909 році, коли захворіли домашні свині, привезені з Європи до європейського поселення місіонерів [7]. Після того, як встановили, що огороження ферм парканами, що перешкоджають контакту домашніх свиней з дикими та з кліщами, дає можливість безпечного свинарства, спалах вдалося зупинити. Однак з розвитком свинарства та розповсюдженням по континенту тварин,

сприйнятливих до вірусу, АЧС поступово поширювалася серед домашніх свиней, досягнувши Західної Африки у 1950-х роках. Поширення вірусу в Африці не завдає шкоди дикій природі, але сильно впливає на розвиток промислового свиначства та розведення тварин у присадибних господарствах [1].

В Кенії, Малаві, Замбії, Анголі, Мозамбіку, Республіці Конго, Демократичній Республіці Конго, Південноафриканській республіці та інших країнах спалахи АЧС реєструють постійно. Останнім часом поголів'я свиней в африканських країнах стрімко зростає, що сприяє поширенню вірусу. Так, після 2010 року вперше за час спостереження спалахи АЧС зареєстровані в Чаді, Нігері, Малі тощо. Острови Індійського океану тривалий час були історично вільними від АЧС, але у 1997 відбулася інтродукція вірусу на Мадагаскар, де захворювання стало ендемічним. У 2007 році спалах АЧС зареєстрували на Маврикії, але наступного року на острові було проведено успішну ерадикацію захворювання [1, 25].

На Африканському континенті ерадикація вірусу АЧС серед домашніх свиней є малоімовірною, особливо враховуючи низький рівень біобезпеки, оскільки свиначство розвинене переважно в присадибних господарствах, та через відсутність механізму компенсації збитків, що заохочувало б населення сповіщати про нові випадки захворювання [1].

Поширення АЧС в Європі та Кавказькому регіоні. Вперше за межами Африки вірус АЧС виявили у 1957 р. в Португалії, куди він потрапив із Західної Африки. Ймовірно, причиною інтродукції вірусу стали контаміновані харчові відходи з літаків Африканських авіаліній або кораблів, що зупинялися у морських портах, які пізніше згодували свиням [37, 73]. Після ерадикації І генотип вірусу повторно виявили у країні в 1960 р., звідки він розповсюдився до інших країн Західної Європи: Італії (1967), Іспанії (1969), Франції (1977), Мальти (1978), Бельгії (1985), Нідерландів (1986). Протягом короткого часу спалахи у всіх країнах вдалося взяти під контроль, крім Іспанії та Португалії, де боротьба із вірусом тривала до 1990-х рр. Ерадикацію захворювання на

території Піренейського півострова ускладнювали низка факторів, серед яких традиційне екстенсивне свинарство з утриманням тварин на вільному вигулі, присутність компетентного кліщового вектора *O. erraticus* та тісний контакт диких і домашніх свиней [1, 75].

На Італійському острові Сардинія, куди АЧС було інтродуковано у 1978 році, захворювання стало ендемічним та лишається таким донині, циркулюючи переважно серед диких свиней, разорбеків (здичавілих диких свиней) та домашніх свиней на вільному вигулі. Причини вкорінення АЧС на острові також полягають у тому, що понад 70 % популяції домашніх свиней утримується в екстенсивній системі та присадибних господарствах, а дикі свині мають вільний доступ до пасовищ [1, 74].

У червні 2007 р. кілька спалахів АЧС зареєстрували у Грузії. Найімовірнішим способом інтродукції вірусу вважають згодовані свиням контаміновані харчові відходи із міжнародного корабля, що причалив у чорноморському порту Поті. При дослідженні молекулярних маркерів грузинського ізоляту було встановлено, що він належить до II генотипу та є спорідненим до ізолятів, що циркулюють в Мозамбіку, Замбії та на Мадагаскарі. Незважаючи на проведені заходи для обмеження розповсюдження вірусу, вже у серпні 2007 р. захворювання зареєстрували у Вірменії, у листопаді — в Росії, а в січні 2008 р. — в Азербайджані [74, 76, 77].

Перші випадки АЧС у Російській Федерації виявили у популяції диких свиней у 2007 р., де вірус масово поширювався протягом наступного року. У домашніх свиней перший на території РФ випадок АЧС було зареєстровано в червні 2008 р. Після цього захворювання поступово поширилося на всю територію країни, звідки вірус потрапив до сусідніх країн. Так, у 2012 році АЧС зареєстровано в Україні, у 2013 — в Білорусі, в 2014 — у Польщі, Литві, Латвії та Естонії. Майже у всіх вищевказаних випадках перенесення вірусу через державні кордони відбувалося у популяціях диких свиней. Винятком є перший зареєстрований випадок на території Білорусі, де причина встановлена не була. Ці тварини також є важливим фактором розповсюдження захворювання

всередині країн, особливо у Балтійському регіоні, де щільність популяції диких свиней є високою (0,5 і більше особин/км²). Разом із тим, під час тривалої циркуляції серед диких свиней спостерігається зниження вірулентності вірусу, про що свідчить зростання частки сепорозитивних тварин та виявлення мутантних штамів. Наразі спалахи АЧС серед домашніх свиней у країнах Балтії трапляються дуже зрідка [16, 38, 74, 78, 79].

У червні 2017 р. зареєстрували 2 випадки АЧС серед диких свиней у Чехії. Завдяки ефективним карантинним заходам, що включали обмеження полювання, заборону на підгодовування тварин, встановлення загороджень та електричних парканів, контроль біобезпеки на фермах площу циркуляції вірусу вдалося обмежити до дуже малого регіону. У Румунії АЧС вперше було виявлено у липні 2017 р. у домашніх свиней. Значне розповсюдження вірусу в цій країні пов'язують із кровосисними комахами, багато випадків спостерігалось вздовж річки Дунай, вода в якій могла бути контамінована. Більшість випадків припадала на домашніх свиней, у той час як серед диких свиней випадків реєструють на порядок менше, що ймовірно пов'язано з людським фактором [38, 74, 79].

У квітні 2018 р. відбулася інтродукція АЧС на територію Угорщини, після чого протягом року реєстрували випадки захворювання серед диких свиней. Ймовірним шляхом занесення вірусу була природна експансія диких свиней, оскільки першу мертву тварину виявили за 1 км від українського кордону. Випадків захворювання серед домашніх свиней зареєстровано не було. Після першого випадку АЧС, зареєстрованого у липні 2018 р. на малій свинофермі, нечисленні випадки захворювання серед диких і домашніх свиней час від часу реєструють у Болгарії. У Молдові спалах захворювання, виявлений у липні 2018 р. серед домашніх свиней, швидко вдалося ліквідувати без поширення вірусу в популяції диких свиней. Вперше після ерадикації у другій половині минулого століття, у вересні 2018 р. АЧС зареєстрували у Бельгії, де наразі захворювання вдалося взяти під контроль. Спосіб інтродукції вірусу на

цю територію не встановили, але спалах пов'язують з інтенсивним рухом транспорту та контамінованими продуктами [38, 74, 79].

У 2019 р. АЧС зареєстрували в Словаччині серед диких та домашніх свиней та у Сербії, де серед домашніх свиней спалахи наразі закінчилися, але захворювання повільно поширюється в популяції диких свиней. Спалах АЧС у Греції зафіксували у лютому 2020 року на маленькій фермі за 40 км від кордону з Болгарією. Вперше на території Німеччини АЧС була виявлена в трупах диких свиней у вересні 2020 року [39, 79].

У 2022 році, після 40 років відсутності, вірус АЧС було реінтродуковано до материкової Італії, де в наслідок поширення серед диких та домашніх свиней, станом на 2024 р. було забито майже 100 тис свиней [80]. Також 2022 р. захворювання було вперше виявлено у Північній Македонії, після чого в 2023 р. захворювання поширилося до Боснії та Герцеговини, Хорватії, Косово, а у 2024 р. до Чорногорії та Албанії. У всіх вказаних вище країнах спалахи станом на 2025 р. продовжуються [81].

У 2023 р. АЧС було виявлено серед диких свиней на території Швеції. Однак у результаті ефективних контрольних заходів, наприкінці 2024 р. країна була оголошена вільною від АЧС [82].

Епізоотична ситуація щодо АЧС на території Азії та Океанії. Про перший випадок АЧС Китай, що на той момент був найбільшим продуцентом свинини у світі, сповістив МЕБ у серпні 2018 р., однак є численні підстави припускати, що недіагностоване захворювання циркулювало у країні ще за 2 міс. до того. За молекулярними маркерами було встановлено, що китайський ізолят вірусу належав до II генотипу і, наперекір очікуванням, був споріднений зі східноєвропейськими ізолятами, а не з тими, що циркулюють в Сибіру [44]. Вірус почав швидко розповсюджуватися країною, спричиняючи численні спалахи серед домашніх свиней. До основних причин такого швидкого поширення відносять міжрегіональні перевезення живих свиней та продуктів зі свинини, годування тварин харчовими відходами, контамінованими кормами та переміщення людей і транспортних засобів [38, 44].

Першою країною, до якої вірус поширився з Китаю, стала Монголія, де у січні 2019 р. були підтверджені перші випадки АЧС [38]. Після цього протягом 2019 р. захворювання зареєстрували у В'єтнамі, Камбоджі, Північній та Південній Кореї, на Філіппінах, у М'янмі, Східному Тиморі, Гонконгу, Лаосі та Індонезії. Більшість спалахів у цих країнах виявили серед домашніх свиней, тільки у Північній та Південній Кореї захворювання уразило не тільки домашніх, а й диких свиней [38]. У 2020 р. АЧС поширилася до Папуа-Нової Гвінеї та Індії, в 2022 — захворювання вперше зареєстровано в Таїланді та Непалі. У 2023–2024 рр. АЧС вперше зареєстрували в Сінгапурі, Бангладеш та на Шрі-Ланці [83]. У деяких країнах, як наприклад, у Камбоджі, спалахи захворювання вважаються такими, що завершилися, однак багато де епізоотична ситуація лишається напруженою. За даними МЄБ, з 2018 р. пов'язані з епізоотією АЧС втрати тварин в Азії становлять понад 7 млн голів (число загинувших і вбитих тварин у місцях спалахів, без урахування втрат у буферних зонах) [84].

Поширення АЧС у країнах Південної Америки та Карибського регіону. У 1971 р. відбулася інтродукція вірусу АЧС до країн Карибського басейну, коли на Кубі було зареєстровано перший спалах захворювання. Наприкінці 1970-х рр. вірус був занесений і до інших Карибських країн: у 1978 р. АЧС зареєстрували в Домініканській республіці та повторно на Кубі, у 1979 р. — на Гаїті. Також у 1978 р. АЧС вперше зареєстрували у Бразилії, вважається, що інтродукція відбулася з продуктовими відходами трансконтинентальних літаків або продуктами зі свинини, що привезли із собою туристи з Іспанії або Португалії. В наслідок ефективних заходів з ерадикації АЧС у цьому регіоні була повністю викорінена на початку 1980-х рр. [1, 75, 85]. Однак після 40 років відсутності, у 2021 році захворювання було повторно зареєстровано в Домініканській Республіці та на Гаїті, станом на 2025 р. в обох країнах ерадикувати захворювання не вдалося [86].

Епізоотична ситуація щодо АЧС в Україні. Перший спалах АЧС на території сучасної України було виявлено в 1977 р. в Одеській області УРСР. За

результатами епідрозслідування було встановлено, що найбільш ймовірним шляхом занесення вірусу стала свинина або продукти її переробки, завезені екіпажем судна з неблагополучної щодо АЧС країни, що пізніше були згодовані домашнім свиням. Протягом 7 міс. після занесення захворювання поширилося на 9 районів області, однак завдяки ефективним заходам та залученню до роботи фахівців, що брали участь у ліквідації спалаху АЧС на Кубі в 1971 р., спалах вдалося ліквідувати. За час епізоотії в Одеській області було забито понад 360 тис. голів свиней [45].

Незважаючи на інтродукцію вірусу АЧС до сусідніх країн, при проведенні моніторингових досліджень серед диких свиней у зразках, зібраних на території України у період з 2009 по 2013 рр., не було виявлено ані генетичного матеріалу збудника захворювання, ні антитіл до нього [88]. Після 35-річної перерви, наступний в Україні спалах АЧС зареєстрували у липні 2012 р. в с. Комишуватка Приморського району Запорізької області. У присадибному господарстві загинуло 3 гол. домашніх свиней. Найімовірнішим джерелом вірусу АЧС, що належав до II генотипу, було названо свинину або м'ясні продукти, нелегально завезені на територію України. Завдяки негайному запровадженню ефективних карантинних заходів, спалах вдалося ліквідувати і протягом наступних 2 років АЧС в Україні не була зареєстрована. Другим випадком АЧС за часів незалежності України стало виявлення двох трупів диких свиней на березі р. Деркул в Луганській області недалеко від кордону з Росією на початку січня 2014 р. Ймовірно, ці тварини проникли на територію України втікаючи від інтенсивних відстрілів інфікованої популяції диких свиней на російській стороні кордону [74, 89, 90]. Не зважаючи на запроваджені карантинні заходи, вже через 2 тижні спалах захворювання виявили на фермі, розташованій за 20 км від місця виявлення трупів диких свиней [90]. Після проникнення вірусу в популяцію диких свиней, сформувалися і почали розширюватися зони стійкого неблагополуччя [90].

Другою зоною проникнення збудника на територію України став кордон із Білоруссю на півночі країни. Кількість офіційно повідомлених випадків АЧС

у Білорусі після першого спалаху була незначною, однак у 2014 р. країна була оточена неблагополучними територіями, а ДНК вірусу АЧС виявляли у м'ясній продукції білоруських виробників. Це свідчить про ймовірне замовчування випадків та неадекватні заходи контролю захворювання представниками білоруської ветеринарної служби. У 2014–2015 рр. почалося фронтальне поширення АЧС з епіцентру в Білорусі, особливо у південному напрямку, в наслідок чого почали реєструвати численні спалахи у Чернігівській та Сумській областях, а в 2015 р. на півночі України сформувалася зона стійкого неблагополуччя, що характеризувалася захворюваністю як диких, так і домашніх свиней [3, 91]. У цей період важливу роль у поширенні вірусу відігравали дикі кабани, оскільки вони не обмежені в переміщеннях і можуть долати щодня десятки кілометрів, а м'ясо впольованих тварин вільно вживається в харчуванні без попередньої ветсанекспертизи, що сприяло контакту вірусу з домашніми свинями [92].

У 2015 р. у північних та центральних областях України проводили профілактичні відстріли диких свиней з метою виявлення носіїв вірусу АЧС, однак заходи не були ефективними, а захворювання почало поширюватися ще інтенсивніше. Особливо швидким було поширення хвороби у секторі присадибних господарств. Ймовірно це пов'язано з низьким рівнем біобезпеки цих господарств та відсутністю системи компенсації втрат, пов'язаних з поширенням АЧС. Така ситуація спонукає населення до замовчування випадків захворювання, внаслідок чого власники забивають хворих свиней, після чого контамінована продукція потрапляє у торгову мережу, або позбуваються трупів свиней, викидаючи їх у водойми, за межами населених пунктів, у лісах, що сприяє персистенції вірусу у навколишньому середовищі [3, 90–92].

У ході дослідження, яке охоплювало дані щодо випадків АЧС в Україні протягом 2012–2017 рр., було показано існування 8 значимих кластерів спалахів захворювання, при чому 7 із них розташовувалися у прикордонних зонах, переважно біля територій Білорусі та Росії, що підкреслює транскордонний характер цієї хвороби. Основне середовище поширення АЧС в

Україні — це сектор екстенсивного свинарства, хоча на початку епізоотії, у 2014 р., більшість випадків реєстрували саме серед диких свиней. Наразі ж понад 60 % випадків АЧС в Україні були зареєстровані у присадибних господарствах та на малих фермах, що характеризуються низьким або повністю відсутнім запровадженням заходів біобезпеки [91, 93, 94].

Спалахам АЧС притаманна сезонність, що може відрізнятися залежно від особливостей країни. В Україні захворюваність серед диких свиней найвища в осінньо-зимовий період з піком у грудні, при чому понад 65 % спалахів реєструють у сезон полювання, у той час, як серед домашніх свиней пік захворюваності припадає на кінець літа–початок осені з піком у серпні [95, 96].

Починаючи із 2012 р. кількість випадків АЧС в Україні щороку стрімко зростала до 2018 р., після чого почала не менш стрімко знижуватися. Так, у 2012 р. було зареєстровано один випадок, у 2014 р. — 16, у 2015 р. — 40, у 2016 р. — 91, у 2017 р. — 163, у 2018 р. — 145, у 2019 р. — 53, у 2020 р. — 28, у 2021 р. — 16 випадків, у 2022 — 10 випадків [3]. Такий патерн динаміки інфекційного захворювання на певній території свідчить про встановлення ендемічної фази, що характеризується персистенцією вірусу у середовищі та малочисельними випадками захворювання, що може супроводжуватися зниженням вірулентності збудника та виникненням мутантних штамів, як це відбулося з вірусом АЧС в Естонії [16, 52, 94]. Проте протягом минулих 3-х років спостерігається зростання кількості випадків захворювання: 2023 р. — 46 випадків, 2024 р. — 76 випадків, 2025 — 21 випадок станом на 20.02. Це може бути спричинено кількома причинами, серед яких загальне зниження біобезпеки на фоні повномасштабного вторгнення Росії, міграція диких кабанів в наслідок ведення бойових дій, але також може бути флуктуаціями, що є нормальною частиною епізоотичного процесу [97].

Африканська чума свиней стала одним із ключових факторів, що вплинули на галузь свинарства в Україні протягом останніх 13 років. Так, з 2012 по 2019 рр. поголів'я домашніх свиней скоротилося майже на 2,5 млн, з 8,414 млн до 5,986 млн. Економічні збитки, завдані захворюванням, є

надзвичайно високими, оскільки включають не тільки вартість знищених тварин та реалізацію ліквідаційних та профілактичних заходів, проведення моніторингових та діагностичних досліджень, а й ті, що спричинені торгівельними обмеженнями, накладеними для недопущення поширення хвороби.

Популяція дикого кабана за час епізоотії теж зменшилася майже на третину, з 63,7 тис. голів у 2014 р. до 42,9 тис. голів у 2019 . Це обумовлено як смертністю від самого захворювання, так і дозволами на полювання понад лімітами, що масово видавали у 2015 р. [3, 98, 99].

1.4 Лабораторна діагностика АЧС

Як матеріал для лабораторної діагностики АЧС можуть використовуватися різні типи клінічних зразків: цільна кров, відібрана переважно з яремної або нижньої порожнистої вен, отримана з неї сироватка, внутрішні органи (селезінка, лімфовузли, печінка, мигдалики, серце, легені, нирки), кістковий мозок, ротова рідина, послід свиней, а також такі зразки навколишнього середовища як ґрунт, частини рослин, корми, вода, змиви з різноманітних поверхонь. З метою встановлення наявності вірусу в середовищі можливе тестування кліщів та членистоногих, а у транспортних хабах для тестування відбирають зразки м'ясних продуктів [1, 47, 100, 101, 102].

Вибір методу діагностики АЧС залежить від особливостей досліджуваного випадку та мети тестування. Методи діагностики АЧС поділяються на такі, що направлені на ідентифікацію збудника захворювання, детекцію його антигенів або генетичного матеріалу, та серологічні тести, метою яких є виявлення імунної відповіді організму господаря. Для підтвердження нових спалахів рекомендується використовувати обидві групи методів [1, 47].

Ізоляція та культивування вірусу АЧС, реакція гемадсорбції. До методів ідентифікації вірусу АЧС відносять ізоляцію збудника в культурах клітин з ідентифікацією збудника за допомогою реакції гемадсорбції (HAD) або у первинній культурі кісткового мозку, що є золотим стандартом дослідження

даного захворювання. Майже всі вірулентні ізоляти вірусу АЧС мають гемадсорбуючий фенотип, що проявляється в адгезії еритроцитів до інфікованих вірусом моноцитів та макрофагів свиней. HAD-тестування проводять шляхом інокуляції крові або суспензії тканин від досліджуваної тварини у первинну культуру лейкоцитів або макрофагів від наївних свиней. Вірус інтенсивно розмножується в культурі клітин, у результаті чого протікає реакція гемадсорбції, розетки еритроцитів, адгезованих на поверхні клітин спостерігають під мікроскопом. Для негемадсорбуючих штамів, що найчастіше є атенуйованими або авірулентними, ізоляцію вірусу проводять з використанням свіжого кісткового мозку свиней. В такому разі інфіковані клітини виявляють шляхом використання реакції імуофлуоресценції (РІФ). Ізоляція вірусу є дорогим, довготривалим (5–10 діб) та трудомістким і тому маловживаним методом діагностики. Однак ізоляція вірусу рекомендована для фінального підтвердження клінічних випадків у референс-лабораторіях, особливо коли клінічні ознаки захворювання є нетиповими або у разі виникнення першого спалаху на новій території. Даний метод є одним із найбільш чутливих та специфічних інструментів діагностики АЧС, оскільки жоден інший вірус, що інфікує свиней, не проявляє подібної активності [1, 47, 100].

Крім діагностичної мети, ізоляцію та отримання біомаси вірусу проводять і для подальших молекулярних досліджень та встановлення біологічних особливостей ізолятів. Польові ізоляти вірусу АЧС не розмножуються у традиційних культурах клітин, для цього проводять спеціальне відновлення у первинних культурах моноцитів та макрофагів свині. Щоб уникнути використання первинних клітин, для культивування ізолятів вірусу АЧС, можна використовувати спеціально розроблені постійні культури COS-1 (фібробластоподібні клітини нирки африканської зеленої мавпи), IPAM (безсмертні альвеолярні макрофаги свині), WSL (клітини легені дикої свині). Адаптовані ізоляти можуть культивуватися на таких перещеплюваних культурах клітин як VERO, MS, CV-1. Однак для розробки вакцин від АЧС

лишається актуальною необхідність отримання нових клітинних ліній, що могли б забезпечувати реплікацію вірусу без генетичних змін, які впливають на імуногенність ізолятів [1, 9, 33, 101].

Виявлення антигена вірусу АЧС. Реакція прямої імунофлуоресценції спрямована на виявлення антигена вірусу АЧС за допомогою специфічних мічених антитіл. Принцип методу полягає у зв'язуванні антитіл мічених ізоціанатом флуоресцеїну з вірусними антигенами при дослідженні відбитків або тонких кріозрізів внутрішніх органів. Флуоресцентні комплекси виявляють за допомогою люмінесцентної мікроскопії. Це швидкий, простий та надійний метод, який раніше широко застосовували для діагностики, однак зараз в масовому тестуванні його витіснила полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Важливо, що РІФ характеризується зниженою чутливістю (40 %) у разі підгострої форми захворювання з м'якими симптомами, а також при тестуванні зразків, отриманих більше, ніж через 10 діб після інфікування. Тому даний метод зазвичай використовують у випадках, коли з якихось причин неможливим є проведення ПЛР. Кожен негативний результат РІФ потрібно підтверджувати іншим методом [1, 47, 100].

Раніше для детекції вірусних антигенів використовували імуноферментний аналіз (ІФА) для детекції антигена. Наразі комерційно доступна лише одна тест-система для тестування зразків крові, селезінки та лімфовузлів, заснована на використанні методу сендвіч-ІФА, принцип якого полягає у взаємодії специфічних моноклональних антитіл, кон'югованих на поверхні лунок планшета, з антигеном вірусу у позитивних зразках. Після промивання додають пероксидазний кон'югат, у результаті чого антиген зв'язується з вторинними антитілами, кон'югованими пероксидазою хрому. Таким чином формується «сендвіч» антитіло–антиген–антитіло. Виявляють формування таких трикомпонентних комплексів шляхом додавання субстрату для пероксидазної реакції. Однак порівняльні дослідження показали, що ефективність ІФА для виявлення антигена є досить низькою, особливо при дослідженні польових зразків. Також існують тест-смужки для детекції

вірусних антигенів, що засновані на методі імунохроматографії, однак їх ефективність при дослідженні зразків, що були попередньо заморожені, є низькою. Таким чином, результати тестів для виявлення антигена рекомендують підтверджувати іншими серологічними або вірусологічними методами [33, 47, 103].

Детекція генома збудника АЧС. Молекулярно-генетичні методи є найбільш широковживаними для рутинної діагностики, скринінгу та підтвердження випадків АЧС, оскільки вони швидкі, специфічні, чутливі, ними (потенційно) можна виявити всі відомі генотипи вірусу незалежно від здатності до гемадсорбції та вірулентності, а для дослідження можна використовувати різноманітні зразки, у тому числі ті, в яких вірус міг бути інактивованим під час транспортування або відібрані з трупів давно загиблих тварин.

Основним молекулярно-генетичним методом діагностики та золотим стандартом ранньої діагностики АЧС є ПЛР, принцип якої полягає у використанні специфічних олігонуклеотидних праймерів, за допомогою яких відбувається багаторазове копіювання специфічного висококонсервативного фрагмента ДНК досліджуваного організму. В результаті реакції кількість генетичного матеріалу вірусу, виділеного з досліджуваної проби збільшується настільки, що може бути візуалізована або детектована спеціальними приладами. За допомогою ПЛР ДНК вірусу АЧС можна виявити вже на 2 добу після інфікування, ще до появи симптомів захворювання [1, 47, 100, 101].

Наразі розроблено, валідовано та рекомендовано до використання багато варіацій методу, у тому числі класичну та ПЛР у режимі реального часу, в якій флуоресцентний сигнал, що супроводжує синтез та накопичення ДНК, зчитується безпосередньо в ході реакції. Як цільову послідовність ПЛР найчастіше використовують ген *b646l*, що кодує головний капсидний білок вірусу р72. Також існує методика гніздової ПЛР для детекції ДНК вірусу АЧС у кліщах роду *Ornithodoros*, заснована на ампліфікації двох ділянок того ж білка [33, 101, 104, 105, 106, 107].

До інших ефективних молекулярних тестів належать різноманітні ізотермічні методи. Їх особливістю є швидкість та постійна температура, за якої перебігає реакція, що дає можливість використовувати ці методи поза лабораторіями. Реакція петльової ізотермічної ампліфікації (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) проходить за постійної температури. Це є можливим завдяки використанню *Bst* ДНК-полімерази, що володіє властивістю витіснення ланцюга ДНК, що дає змогу пропустити етап плавлення ДНК при 95°C. Для проведення реакції використовується 2 пари праймерів, що називаються внутрішніми та зовнішніми, залежно від їх локалізації на таргетній ділянці ДНК. Кожен із внутрішніх праймерів складається з двох фрагментів, один з яких є комплементарним смислового, а другий — антисмислового ланцюгу. Завдяки цьому під час ампліфікації на продукті формуються численні петлі, що значно прискорюють реакцію. Також для прискорення реакції можливе додавання спеціальних петлевих праймерів, що забезпечують початок синтезу нового ланцюга на ділянках петлеутворення. Принцип полімеразної спіральної реакції подібний до вказаного вище і включає використання полімерази з властивістю витіснення ланцюга (*Bst*, *Bsm* або *GspSSD*), однак продукт реакції має форму спіралі, а для його отримання використовують 3 праймери. Рекомбіназна полімеразна ампліфікація передбачає використання трьох основних ферментів: рекомбінази, полімерази з властивістю витіснення ланцюга та SSB-білка, що зв'язується з одноланцюговою ДНК. Рекомбіназа поєднує праймери з гомологічною послідовністю ДНК, SSB-білок зв'язується з одноланцюговою ДНК і перешкоджає витісненню праймерів, а полімераза починає синтез нового ланцюга в ділянці зв'язування праймера і матриці. Жодні інші маніпуляції на кшталт плавлення ДНК не є необхідними, реакція протікає при температурі (37–42)°C і протягом короткого часу (від 10 хв) можливе напрацювання придатних до детекції кількостей ДНК, навіть якщо початкова кількість аналіту складає кілька копій [33, 101, 108, 109, 110].

Методи серологічної діагностики АЧС. Серологічні методи є ефективним інструментом діагностики АЧС, зокрема й тому, що наразі

офіційно зареєстрованих і комерційно доступних вакцин проти даного захворювання немає у більшості країн, тому випадки детекції антитіл означають виявлення інфекції. Імуногенними є як структурні, так і функціональні білки вірусу. Оскільки антитіла проти вірусу АЧС формуються не раніше, ніж через 7–10 діб після зараження, при надгострій і гострій формах хвороби тварини гинуть до утворення антитіл. В той час на територіях, де АЧС є ендемічним захворюванням і де циркулюють атенуйовані і низьковірулентні ізоляти, у тварин після інфікування формуються антитіла і циркулюють в крові протягом місяців і навіть років. Таким чином, серомоніторинг є критично важливим для виявлення тварин, що одужали або хворіють безсимптомно [1, 47, 101].

Існує кілька різновидів ІФА, для діагностики АЧС використовують непрямий або конкурентний варіанти. При проведенні непрямого ІФА антиген, іммобілізований на поверхні лунок планшету, зв'язується з антитілами у досліджуваних сироватках. Після промивання та видалення незв'язаних антитіл для візуалізації утворених комплексів антиген–антитіло, до лунок вносять специфічні до сироваткових вторинні антитіла, мічені ферментом. Після додавання субстрату, проходить ферментативна реакція, у результаті якої змінюється забарвлення в лунках із позитивними зразками. Принцип методу конкурентного ІФА полягає в конкуренції за зв'язування з антигеном на планшеті між антитілами у досліджуваних зразках та кон'югованими ферментом конкурентними антитілами. Після відмивання та видалення всіх незв'язаних антитіл, додають субстрат ферментативної реакції, в наслідок чого змінюється забарвлення розчину в планшеті. Чим більше у досліджуваному зразку містилося антитіл, тим менше конкурентних мічених антитіл зв'язалося з антигеном, і тим нижча буде оптична густина розчину в лунках. Антигени, використовувані в ІФА, найчастіше білки р32, р54, р72, рр62, можуть бути як нативними, так і рекомбінантними [1, 47, 100, 101].

ІФА є найбільш поширеним методом, що використовується для детекції антитіл до вірусу АЧС у плазмі та сироватці крові. Але використання для

тестування зразків, що транспортували з порушенням умов, або гемолізованої сироватки може давати хибнопозитивні або хибнонегативні результати, тому позитивні або сумнівні в ІФА зразки підтверджують за допомогою альтернативних серологічних методів (непряма РІФ, імуноблоттинг, непрямий імунопероксидазний тест). Крім того, за допомогою непрямой РІФ та непрямого імунопероксидазного тесту можна досліджувати на вміст антитіл не тільки сироватку крові, а й цільну кров, ексудат з тканин, кістковий мозок тощо, що є особливо важливим при дослідженні зразків від загинув тварин, особливо при пасивному моніторингу захворюваності серед диких свиней. Два останні методи є чутливими і специфічними, але інтерпретація їх результатів є суб'єктивною і залежить від дослідника [47, 101].

При проведенні імуноблотингу до розділеного за допомогою електрофорезу антигена, зафіксованого на нітроцелюлозній мембрані, додають сироватку крові, антитіла в якій зв'язуються з антигеном. Комплекс антиген–антитіло візуалізують на мембрані шляхом пероксидазної реакції з використанням вторинних антитіл. За допомогою імуноблоту можна досліджувати зразки, відібрані починаючи з 7–9 діб після інфікування, однак можливе отримання хибнопозитивних результатів у разі тестування зразків від тварин, що раніше були вакциновані проти інших вірусних інфекцій [1, 47, 101].

Непрямий імунопероксидазний тест — це імуноцитохімічний метод, при якому комплекс антиген–антитіло виявляють за допомогою пероксидазної реакції, що проходить завдяки приєднанню кон'югованих пероксидазою вторинних антитіл. При цьому в якості антигена використовують зафіксовану культуру клітин африканської зеленої мавпи, інфіковану адаптованим вірусом АЧС, до якої додають досліджуваний зразок [47].

Непряма РІФ заснована на зв'язуванні антитіл у досліджуваних зразках з моношаром інфікованої вірусом АЧС культури клітин нирок африканської зеленої мавпи. Для візуалізації комплексу антиген–антитіло додають йодований протеїн А або кон'юговані флуоресцентним маркером антитіла до IgG свині. За

допомогою флуоресцентного мікроскопа реєструють флуоресценцію цитоплазми інфікованих клітин після додавання позитивних зразків [1, 39, 101].

1.5 Специфічна профілактика АЧС

Проведення ефективної специфічної профілактики АЧС вважається єдиною можливістю повністю викоринити захворювання. Наразі науковці в усьому світі проводять дослідження, спрямовані на розробку комерційної вакцини від АЧС, але поки що не досягли загально визнаної безпечності й ефективності. Основним фактором у затримці отримання ефективної вакцини є складна організація вірусу АЧС. При цьому використовують різні стратегії отримання препарату [111].

До інактивованих вакцин відносять екстракт з інфікованих вірусом АЧС клітин, очищені інактивовані віріони, інактивовані глутаральдегідом або детергентами інфіковані вірусом культури макрофагів. Проте перевищені вище препарати не індукують протективної імунної відповіді [111, 112].

Субодиничні векторні та ДНК-вакцини не показують послідовних результатів, спричиняючи разом з тим підвищення смертності від захворювання. Атенуйовані живі вакцини, отримані шляхом делеції цільових генів або тривалим пасажуванням на культурах клітин, можуть забезпечувати до 100 % захисту, але їх ефективність знижується при інфікуванні іншим штамом вірусу. Крім того, живі атенуйовані вакцини можуть спричинити тяжкі побічні наслідки, серед яких хронічна інфекція [38, 39, 111].

На сьогодні на ринку є 2 комерційно доступні живі атенуйовані вакцини, обидві розроблені та дозволені до використання у В'єтнамі. Перша вакцина NAVET-ASFVAC являє собою атенуйований штам вірусу АЧС ASFV-G-ΔI177L з делецією висококонсервативного гена 177l, передбачувана функція якого полягає в модуляції імунної відповіді. Препарат став першою затвердженою до використання у В'єтнамі вакциною від АЧС, проте вже через кілька місяців використання вакцини було призупинено, коли на різних фермах загинуло близько 600 свиней, щеплених вакциною [111]. Пізніше, під час дослідження

безпеки вакцини на поросних свиноматках було встановлено, що 43 % поросят народилися мертвими, а у народжених живими розвинулися специфічні симптоми АЧС та віремія, в наслідок чого до кінця дослідження живими лишилися лише 17 % поросят, оскільки вірус передавався через плаценту. Крім того, було встановлено, що після 3 пасажів у свинях, вірус повернувся до вірулентної форми, що спричиняла симптоми гострої форми АЧС та високу смертність [113].

Другою зареєстрованою вакциною є AVAC ASF LIVE, в основі якої лежить вакцинний штам ASFV-G-ΔMGF з численними делеціями та дуплікаціями генів, що належать до різних MGF. Наразі цю вакцину імпортують до Малайзії, Філіппін, Індонезії, М'янми та Індії, реєстраційні випробування проводять у Румунії, однак наявних досліджень безпеки недостатньо для широкого застосування препарату у світі [114].

1.6 Висновок з огляду літератури

Африканська чума свиней — це вірусне контагіозне захворювання диких та домашніх свиней, гостра форма якого спричиняє смертність, що сягає 100 %. Збудником захворювання є вірус АЧС — великий покритий оболонкою ДНК-вмісний вірус ікосаедральної симетрії. Вірус АЧС є одним із найбільш складно організованих вірусів тварин, завдяки чому він є дуже стійким до великого діапазону несприятливих факторів довкілля та багатьох дезінфектантів, а у інфікованих тварин розвивається неповноцінна імунна відповідь, що у свою чергу ускладнює отримання комерційної вакцини проти даного захворювання.

За різними класифікаціями виділяють 25 або 6 генотипів вірусу, але цей поділ не відображає вірулентності ізолятів, а лише дозволяє встановити їх географічне походження. Найбільша генетична різноманітність вірусу зафіксована у Африці, де поширені всі генотипи вірусу. За межами цього континенту виявляли тільки І (циркулював у країнах Західної Європи, на Карибських островах та в Бразилії у другій половині XX століття, наразі є

ендемичним на о. Сардинія) та II генотипи вірусу (у 2007 р. був занесений до Грузії, звідки поширився до країн Східної та Центральної Європи, Азії та Океанії).

Існує чотири основні епізоотичні цикли вірусу АЧС: природний, домашній, цикл зараження тварин кліщами та інфікування диких свиней через середовище існування. У Африці природним резервуаром вірусу є різні види диких свиней (бородавочники, кущові, червоні лісові свині тощо). Деякі м'які кліщі роду *Ornithodoros* виступають у ролі природного резервуару та специфічного кліщового вектору. Механічними переносниками вірусу можуть бути інші кліщі, комахи, птахи, дрібні ссавці. Представники виду *Sus scrofa*, до якого належать дикі і домашні свині, що заселяють Євразійський континент, є надзвичайно чутливими до вірусу АЧС. При інфікуванні у них розвиваються такі симптоми як гарячка, численні геморагії, втрата апетиту, діарея, блювання тощо.

Для лабораторної діагностики вірусу АЧС використовують методи ізоляції вірусу, детекції його антигенів або генетичного матеріалу та антитіл проти вірусу.

Ізоляцію вірусу проводять методом гемадсорбції вірусу на поверхні інфікованих лейкоцитів, для негемадсорбуючих ізолятів проводять ізоляцію в первинних культурах кісткового мозку. Даний метод є дорогим, довготривалим та трудомістким, однак вважається золотим стандартом діагностики АЧС у референс-лабораторіях. З метою детекції вірусних антигенів використовують РІФ та ІФА для детекції антигенів. Проте ефективність цих методів є досить низькою, тому їх результати рекомендують підтверджувати серологічними або вірусологічними методами.

Для масової діагностики АЧС використовують такі молекулярно-генетичні методи, як класична та ПЛР у режимі реального часу (золотий стандарт молекулярної діагностики), а також методи ізотермічної ампліфікації (петльова ізотермічна ампліфікація, полімеразна спіральна реакція, рекомбіназна полімеразна ампліфікація тощо), які вважаються хорошими

інструментами для експрес-діагностики. Найчастіше в якості цільової послідовності при розробці молекулярних методів використовують ген *b646l*, що кодує головний капсидний білок вірусу p72.

Для виявлення імунної відповіді господаря використовують непрямий та конкурентний варіанти ІФА, непрямий пероксидазний тест, непрямую РІФ, та вестерн-блотинг. Три останні методи вважаються менш надійними, тому їх використовують в якості альтернативних способів детекції антитіл для підтвердження результатів ІФА. Антигени, використовувані для проведення серологічних тестів, найчастіше білки p32, p54, p72, pp62, можуть бути як нативними, так і рекомбінантними.

Після інтродукції на територію України у 2012 р., вірус значно поширився в популяції диких та домашніх свиней. Найбільше спалахів, та відповідно найбільше збитків, зазнав сектор екстенсивного свиначства. Оскільки наразі повністю безпечні методи лікування та профілактики захворювання відсутні, основним методом його контролю є швидка діагностика та негайне запровадження карантинних заходів. Таким чином, в Україні актуальною є розробка вітчизняних тест-систем, у тому числі для експрес-діагностики вірусу АЧС.

На території України АЧС увійшла в ендемічну фазу епізоотичного процесу. Відомо, що в такому випадку на уражених територіях циркулюють ослаблені ізоляти збудника, після інфікування якими тварини можуть одужувати і ставати носіями вірусу. Отже, важливим і актуальним є проведення серологічного моніторингу серед диких та домашніх свиней з метою виявлення вірусоносіїв, а також розробка вітчизняних діагностиків для здійснення цієї важливої ланки контролю АЧС.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження, результати яких викладені в дисертаційній роботі, виконані в період з 2017 по 2025 рр. у лабораторії молекулярної діагностики Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Частина експериментальних даних було отримано на базі Інституту мікробіології Бундесверу (Мюнхен, Німеччина) у рамках проекту Українсько-німецька ініціатива «Біологічна безпека для управління ризиками зоонозів біля зовнішніх кордонів країн-членів Європейського Союзу».

2.1 Матеріали для проведення досліджень

Зразки нуклеїнових кислот. Референтні зразки. При проведенні досліджень були використані референтні зразки ДНК вірусу АЧС ізоляту UKR12/Zаро, надані співробітниками Референс лабораторії Європейського союзу з африканської чуми свиней CISA-INIA (Мадрид, Іспанія), зразки ДНК вірусу АЧС, виділені з матеріалу від диких та домашніх свиней, надані Державною референс-лабораторією з АЧС Республіки Польща Національного ветеринарного дослідного інституту (м. Пулави, Польща), а також зразки ДНК вірусу АЧС ізолятів Sardinia, Estonia, Kenia05, Netherlands86, надані завідувачкою Референс-лабораторії ВООЗТ з АЧС в Інституті Фрідріха Леффлера д-р С. Бльоме (Грайфсвальд, Німеччина).

Гетерологічні зразки. Для тестування специфічності розроблених методів ампліфікації вірусного генома використовували зразки ДНК парвовірусу свиней (ПВС), цирковірусу свиней (ЦВС) 2-го генотипу, вірусу хвороби Ауєскі, *Pasteurella multocida*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, РНК тешовірусу, вірусу респіраторно-репродуктивного синдрому свиней (РРСС), що були люб'язно надані канд. вет. наук А. І. Бузуном (лабораторія вивчення

хвороб свиней ННЦ «ІЕКВМ»). Також були використані ДНК вірусу хвороби Ауєскі та РНК вірусу класичної чуми свиней (КЧС), люб'язно надані завідувачкою Референс-лабораторії ВООЗТ з АЧС в Інституті Фрідріха Леффлера доктором С. Бльоме.

Зразки ротової рідини від диких тварин. Для дослідження методом петльової ізотермічної ампліфікації на наявність генетичного матеріалу *Sus scrofa* та вірусу АЧС було використано зразки ротової рідини від диких тварин (n=101), що були відібрані дисертантом власноруч методом збору оральних змивів на канат з приманкою [115]. Збір польового матеріалу здійснювали у лютому–березні 2020–2021 року у лісах Харківської області під час сумісних польових виїздів з с. н. с. лабораторії молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ», канд. біол. наук О. Б. Зленко.

Позитивні та негативні сироватки, використані для проведення серологічних досліджень. При проведенні непрямого ІФА та вестерн-блотингу як позитивні і негативні контролю були використані позитивні і негативні референтні сироватки (n=15), люб'язно надані д-р С. Бльоме (Інститут Фрідріха Леффлера) та д-р Х. фон Бутлером (Інститут мікробіології Бундесверу).

Послідовності ДНК вірусу АЧС та *Sus scrofa*. Для розробки праймерів для проведення LAMP було створено базу даних усіх повногеномних послідовностей ДНК вірусу АЧС, що були верифіковані у базі даних GenBank станом на 25.03.2018 р. (n=28). Послідовності ДНК було отримано з інфекційних та атенуйованих ізолятів, виділених в країнах Африки, Азії та Європи від диких та домашніх свиней, а також м'яких кліщів у період з 1950 по 2018 рр.

Для розробки праймерів для петльової ізотермічної ампліфікації ДНК *Sus scrofa* було використано фрагмент розміром 313 п. н. гена *nd5*, що кодує 5 субодиницю NADH дегідрогенази (GenBank: DQ926981.1).

Матеріали для екстракції нуклеїнових кислот. Екстракцію сумарних нуклеїнових кислот з польового матеріалу проводили з використанням

комерційного набору MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit (Lucigen, Велика Британія).

Матеріали для проведення ампліфікації. Реакцію ампліфікації проводили з використанням полімерази та комплекту реагентів «AmpliTaq Gold DNA Polymerase» (Applied Biosystems, США). ПЛР у режимі реального часу здійснювали з використанням TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, США). Для проведення реакції ізотермічної ампліфікації було використано ДНК-полімеразу *Bst* 2.0 (NEB, США) та буфер для неї, «dNTP Set 100 mM Solutions» (Invitrogen, США) та бетаїн (Acros Organics, Китай).

Ампліфікацію у режимі реального часу проводили за допомогою приладу FAST 7500 (Applied Biosystems, США), класичну ПЛР та петльову ізотермічну ампліфікацію за допомогою термоциклера «BioMetra» (Німеччина).

Матеріали для проведення горизонтального електрофорезу. Для приготування гелю використовували ME-агарозу (Biozym, Німеччина). Для приготування TAE буферу застосовували EDTA, Tris та оцтову кислоту (Serva, США). У роботі використовували маркери молекулярної маси «Quick load 100 bp purple DNA-ladder» та «GeneRuler Low Range DNA Ladder» (ThermoFisher Scientific, США). Амплікони фарбували барвником «6x TriTrack DNA Loading Dye» (ThermoFisher Scientific, США). Для візуалізації ДНК використовували бромід етидію (Sigma-Aldrich, США). Електрофорез у агарозному гелі проводили в електрофоретичній камері Sub Cell з наступною візуалізацією результатів в УФ-світлі в транслюмінаторі Gel Doc XR (Biorad, США).

Матеріали для молекулярного клонування рекомбінантного позитивного контролю. Для молекулярного клонування використовували культуру *E. coli* штаму DH5 α , ферменти та плазмідний вектор для клонування pTZ57R/T з комерційного набору «InsTAclone PCR Cloning Kit» (Fermentas, Литва). Для вирощування культур клітин *E. coli* DH5 α використовували рідке та тверде поживне середовище LB (Sigma-Aldrich, США). Для проведення біло-блакитного скринінгу використовували X-Gal і IPTG (Sigma-Aldrich, США).

Екстракцію плазмід з трансформованих культур проводили за допомогою комерційного набору «Plasmid Miniprep Kit» (GeneJET, Литва). Для екстракції ампліконів з агарозного гелю застосовували комерційний набір «Gel Extraction Kit» (ThermoFisher Scientific, США).

Матеріали для молекулярного клонування рекомбінантних антигенів. Очищення ПЛР-продуктів проводили за допомогою набору Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (NEB, Великобританія). Для клонування були використані IIS рестриктаза *ESP31*, Т4-ДНК-лігаза та буфер CutSmart (NEB, США), а також вектори pASG-IBA103 та pASG-IBA105 (IBA, Німеччина). Кільтури *E. coli* вирощували на рідкому та твердому середовищі LB (Sigma-Aldrich, США). Для проведення біло-блакитного скринінгу використовували X-Gal і IPTG (Sigma-Aldrich, США). Екстракцію плазмід з трансформованих культур проводили за допомогою комерційного набору «Monarch Plasmid Miniprep Kit» (NEB, Великобританія). Секвенування плазмід проводили в компанії Eurofins BioPharma Product Testing (Мюнхен, Німеччина) з використанням набору «Mix2Seq NightXpress».

Матеріали для проведення хроматографічної очистки рекомбінантних білків. Для проведення очистки рекомбінантних білків використовували афінні хроматографічні колонки Strep-TactinXT 4Flow та гравітаційні колонки власноруч заповнені смолою Strep-TactinXT 4Flow (IBA, Німеччина).

Буфери для хроматографії готували із наступних комерційних буферів: «10x Buffer W» та «10x Buffer BXT» (IBA, Німеччина). При використанні модифікованих буферів, додавали хлорид натрію (ThermoFisher Scientific, США), сечовину (Sigma-Aldrich, США), дезоксихолат натрію (Carl Roth, Німеччина), саркозил (Sigma-Aldrich, США), лізоцим (Sigma-Aldrich, США) та бензоназу (Novagen, Німеччина).

Матеріали для проведення вертикального електрофорезу. Для проведення вертикального електрофорезу у ПААГ використовували 10-, 12- та 15-лункові комерційні гелі NuPAGE™ 4 to 12 %, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein

Gel (Invitrogen, США). Вертикальний електрофорез проводили у буферній системі MOPS або MES, що готували з комерційних буферів NuPAGE MES SDS Running Buffer (20X) або NuPAGE MES SDS Running Buffer (20X) (Invitrogen, США) відповідно. Для визначення молекулярної маси використовували маркер SeeBlue Plus 2 Prestained Standard (Invitrogen, США). Перед завантаженням зразків у гель їх змішували з NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) (Invitrogen, США). Електрофорез проводили у камері Xcell SuperLock (ThermoFisher Scientific, США).

Матеріали для проведення вестерн-блотингу. Для проведення вестерн-блотингу використовували камеру для проведення напівсухого блоту Novex Semi-Dry Blotter США (Invitrogen, США). Блотинг проводили в розчині, який готували з комерційного буферу NuPAGE Transfer Buffer (20X) (Invitrogen, США) та додавали 10 % спирту 96 % (Sigma-Aldrich, США). Білки переносили на нітроцелюлозну мембрану, що входила до набору Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich, 0.45 мкм (Invitrogen, США). У реакції використовували поліклональні вторинні антитіла Rabbit-anti-Pig IgG Secondary Antibodies, HRP (ThermoFisher Scientific, США) для детекції антитіл у свинячих сироватках та Strep-MAB-Classic HRP антитіла (IBA, Німеччина) для тестування рекомбінантних білків. Для колориметричної візуалізації реакції використовували субстрат TMB SeramunBlau прес (Seramun, Німеччина). Для хемілюмінесцентної візуалізації використовували 0,1M Tris-HCl, перекис водню 30 %, кумарову кислоту та люмінол (усі реактиви Sigma-Aldrich, США). Буфер для очищення мембрани готували з ФСБ (pH 7,3) та 1 M NaCl (ThermoFisher Scientific, США).

Матеріали для проведення непрямого ІФА. При проведенні непрямого ІФА як антиген використовували отримані в ході дослідження рекомбінантні білки. Антиген іммобілізували на поверхні полістирольних 96-лункових планшетів «MaxiSorp» (Nunc, Данія).

Карбонатний буфер для розведення готували за наступними пропорціями (на 1 л): 5,84 г Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich, США) та 3,2 г NaHCO_3 (Sigma-Aldrich,

США), pH 9,5. Фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) готували за наступним протоколом (на 5 л): 2,15 г KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, США), 5,96 г Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, США) та 33,95 г NaCl (Sigma-Aldrich, США), pH 7,2. Буфер для відмивання готували із ФСБ та 0,2 % TWEEN-20 (AppliChem, Німеччина). Блокуючий буфер готували із ФСБ, 10 % сухого молока (Merck Millipore, США) та 1 % сироватки крові кролів. Буфер для розведення сироваток та вторинних антитіл складався ФСБ, 0,2 % TWEEN-20, 10 % сухого молока, 1 % сироватки крові кролів. Як стоп-розчин використовували 0,25 М розчин H_2SO_4 (Завод хімічних реактивів, Україна). Вторинні антитіла використовували такі ж, як і для вестерн-блоту, субстрат пероксидази хрому TMB slow виробництва «Seramun» (Німеччина). Оптичну щільність розчину визначали за допомогою ІФА-рідера Multiscan FC (ThermoFisher Scientific, США).

Праймерні системи, використані під час проведення досліджень. Під час виконанні досліджень використовували праймери для детекції ДНК вірусу АЧС, *S. scrofa*, а також для отримання рекомбінантних конструктів, розроблені самостійно та опубліковані в науковій літературі (табл. 2.1, табл. 2.2).

Усі праймери, наведені в табл. 2.2, є власною розробкою.

Олігонуклеотидні послідовності були синтезовані фірмою TIP MOLBIOL (Німеччина).

Програмне забезпечення. Дизайн праймерів для петлевої ізотермічної ампліфікації проводили за допомогою онлайн-інструменту PrimerExplorer V5 [117]. Аналіз сиквенсів проводили в програмах BioEdit та Genius. Дизайн плазмідного вектору pTZ57_ASF_R/T здійснено в програмі Clone Manager v. 7. Передбачення трансмембранних доменів білків визначали за допомогою онлайн-інструменту Phobius [118]. Карти створювали з використанням програми qGIS v. 2.6.1. за допомоги старшого викладача кафедри фізіології людини та тварин ХНУ ім. В. Каразіна Гарькавенка В. В.

Системи праймерів для проведення ПЛР

Назва праймера	Послідовності праймерів, 5'→3'	Таргет- ний ген	Довжина фрагмен- та, п.н.	Дже- рело	Використання під час роботи
1	2	3	4	5	6
ND5 F	CATTCGCCTCACTCACATTA ACC	nd5	250	[116]	скринінг щодо генома <i>S. scrofa</i> у ПЛР
ND5 R	AAGAGAGAGTTCTACTGGG TCTGTAG				
PPA_1	AGTTATGGGAAACCCGACCC	b646l	1763	[47]	розробка рекомбінантного позитивного контролю
ASFV-2	GATACCACAAGATC(AG) GCCGT				
ASFV-1	CTGCTCATGGTATCAATCTT ATCGA	b646l	250	[47]	розробка тест- системи для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу
ASFV-2	GATACCACAAGATC (AG)GCCGT				
ASFV-probe	FAM-CCACGGGA GGAATACCAACCCAGTG- TAMRA				
p10_F	AGCGCGTCTCCAATGCCTAC AAAAGCTGGC	k78r	237	влас- на роз- робка	отримання рекомбінантних антигенів вірусу АЧС
p10_R	AGCGCGTCTCCTCCCTTTTG ACCGTTTAATTTTTTCTCC				
p32_F	AGCGCGTCTCCAATGGATTT TATTTTAAATATATCCATG	cp204l	615		
p32_R	AGCGCGTCTCCTCCCAAACA TTAAATGTAGGTGAG				
p54_F	AGCGCGTCTCCAATGGATTC TGAATTTTTTCAACCGG	e183l	552		
p54_R	AGCGCGTCTCCTCCCCAAGG AGTTTTCTAGGTC				
ligase_F	AGCGCGTCTCCAATGCTAAA TCAATTTCTGGG	np419l	1260		
ligase_R	AGCGCGTCTCCTCCCAATGA TTTCTAAAACATTTATCGG				
p54ΔTM_F1	GCCGCGTCTCGAATGGATTC TGAATTTTTTCAAC	e183lΔ	115		
p54ΔTM_R1	CACCACACGTCTCGAACCGC CACCGAAGAAGCTCGG	e183lΔ	115		
p54ΔTM_F2	GCCGCGTCTCAGGTTTCGATT ATTATCATCG		461		

1	2	3	4	5	6
p54ΔTM_R2	CGGCCGTCTCATCCCCAAGG AGTTTTCCAGGTC	<i>e183lΔ</i>	461	влас- на роз- робка	отримання рекомбінантних антигенів вірусу АЧС
ligaseΔDBD_F	TAATCGTCTCAAATGAGAG GAATGATCCCCCCTATG	<i>np419lΔ</i>	928		
ligaseΔDBD_R	CGGCCGTCTCATCCCAATGA TTTCTAAAAC				

Таблиця 2.2

Системи праймерів для проведення петльової ізотермічної ампліфікації

Назва праймера	Послідовності олігонуклеотидів (праймерів), 5'→3'	Таргет- ний ген	Використання під час роботи
1ASFV_F3	CTGAAGTGGTCCAGGGCA	<i>c962r</i>	розробка методу детекції ДНК вірусу АЧС
1ASFV_B3	GTTGGTAGGGCTTGTGGTT		
1ASFV_FIP	GGCATCGTGCTGTAGGGATCC- CCATGTGCTCATTC TGGTC		
1ASFV_BIP	AGCAGGGCGTTGCAAATCCT- TGGAGGAGCCGTAGAG GA		
1ASFV_LF	GGTAGAAGCCGCCAGCTTGA		
1ASFV_LB	GAGTCCTGTCTGGACCCCCA		
2ASFV_F3	GCGGGGATATGGGTACTTTG		розробка методу детекції ДНК вірусу АЧС, скринінг польових зразків ротової рідини від диких свиней
2ASFV_B3	GCAGTCTTCTCCATGTGCC		
2ASFV_FIP	TCGCCCCGATTTACCATTTCCT- GGAAACCAACAAAAGCGAGG		
2ASFV_BIP	TTCAGATGACGGCCACCATGG- GTCCGTCTGTCAATGATGA		
2ASFV_LF	TCAGCCGCGACGTATTTAGA		
2ASFV_LB	CGCCGCGTCCAACCTATAACT		
3ASFV_F3	GGGCAACAAGTTTGTGGT		розробка методу детекції ДНК вірусу АЧС
3ASFV_B3	TGGTATTTGATGTGCTCCG		
3ASFV_FIP	TCCCTGATTCATTGGCTGGC- ACTCAAACGGGAAGTACG		
3ASFV_BIP	GAAGTGGCGCAAGGAGGTAA- ATTCGGTCCATCACCTT		
Ss1_F3	ATGAGAAGGCGTAGGAATC	<i>nd5</i>	розробка методу детекції ДНК <i>S. scrofa</i> , скринінг польових зразків ротової рідини від диких свиней
Ss1_B3	ATGTTTGGGCATTTCATTGT		
Ss1_FIP	AGGATTGCTTGTAGTGCAGCGCTAATTG GATGATGACACG		
Ss1_BIP	ATACAACCGCATCGGAGACATTGAAGAT CTCATGCGTTTGA		
Ss1_LF	GTGTTGGCGTCTGTTCGTC		
Ss1_LB	GGATTTGTCCTATCCATAGCATGAT		

2.2 Методи проведення досліджень

Методика збору польових зразків ротової рідини від диких свиней.

Для приготування приманок для диких свиней було проведено підбір оптимального співвідношення компонентів суміші і з огляду на консистенцію обрано наступний рецепт:

кукурудзяне борошно — одна частина, сухе молоко — одна частина, кокосова олія — дві частини, парафін — одна частина, мигдальний ароматизатор — 5 крапель на кожні 20 г олії.

Тверді компоненти розтоплювали, змішували із борошном та сухим молоком, після чого суміш розливали по формах та занурювали в неї нефарбовану мотузку із сирової бавовни діаметром 0,8 см. Готові приманки зберігали при +4 °С до використання.

Для відбору ротової рідини від диких свиней приманки розповсюджували в лісах Харківської області у лютому–березні 2020 та 2021 рр. прив'язуючи до дерев так, щоб приманка звисала на висоті 15 см від землі. Для всіх точок відбору фіксували GPS координати. Час експозиції в різних локаціях становив від 7 до 20 днів, що є прийнятним, враховуючи низьку температуру навколишнього середовища протягом періоду відбору проб.

Після експозиції поживані частини приманки відрізали і поміщали у марковані пластикові пробірки поміщені в герметичний пластиковий пакет. У лабораторії всі зразки зберігали при мінус 20 °С до подальшого аналізу.

Пробопідготовка та екстракція нуклеїнових кислот зі зразків ротової рідини від диких свиней. До мотузок для відбору зразків слини від диких свиней додавали 5 мл фізіологічного розчину, перемішували на вортексі протягом 1 хв та інкубували протягом 30 хв при 25 °С. Після інкубації мотузку поміщали у шприц і видавлювали, збираючи рідину в індивідуальні стерильні пробірки і зберігали при температурі –20 °С.

Пробірки з ротовою рідиною центрифугували протягом 2 хв при 2000 g для осадження крупних часток. До чистої пробірки вносили 1,5 мл ротової рідини і центрифугували протягом 5 хв при 14000 g, після чого видаляли

супернатант. До осаду, що лишився, додавали 150 мкл розчину 2X T and C Lysis solution та 2 мкл протеїнази К, після чого вміст пробірки ретельно перемішували на вортексі. Далі екстракцію сумарних нуклеїнових кислот проводили з використанням набору MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit (Lucigen, Велика Британія) згідно інструкції виробника. Проводили серію десятих розведень виділених НК. Розведення 10^{-1} та 10^{-2} використовували для виявлення гена *nd5 Sus scrofa* за допомогою ПЛР та петльової ізотермічної ампліфікації.

Методи ампліфікації нуклеїнових кислот. Ампліфікацію нуклеїнових кислот проводили методами класичної ПЛР, ПЛР у режимі реального часу та петльової ізотермічної ампліфікації.

Класична ПЛР. Напрацювання фрагментів генів *c962r* та *b646l* вірусу АЧС, повних послідовностей, що кодують білки вірусу АЧС p10, p32, p54, ДНК-лігазу, білок p54ΔTM, ДНК-лігазуΔDBD здійснювали шляхом класичної ПЛР (табл. 2.3). Як матрицю використовували ДНК вірусу АЧС або плазмідну ДНК. Скринінг зразків ротової рідини на наявність генетичного маркера *S. scrofa* також проводили за допомогою класичної ПЛР. Реакційну суміш готували за протоколом, наведеним у таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Протокол приготування суміші для проведення класичної ПЛР

Реактив	Фінальна концентрація	Кількість на одну реакцію, мкл
Вода деіонізована, вільна від нуклеаз, для ПЛР		13,37
10x PE-буфер	1x	2,5
10 mM dNTP Мікс	0,2 mM	0,5
25 mM MgCl ₂	1,5 mM	1,5
10 пМ/мкл праймер F	0,4 мкМ	1,0
10 пМ/мкл праймер R	0,4 мкМ	1,0
5 од/мкл полімераза AmpliTaq Gold	0,65 од/мкл	0,13
Досліджуваний зразок		5
Загальний об'єм реакційної суміші		25

ПЛР проводили в ампліфікаторі за однією з наступних програм (табл. 2.4).

Таблиця 2.4

**Програми ампліфікації генів вірусу АЧС та *S. scrofa*
методом класичної ПЛР**

Праймерні системи	Режими ампліфікації				
	Первинна денатурація	Денатурація	Відпал	Елонгація	Фінальна елонгація
ND5	95°C — 5 хв	95°C — 60 с	54 °C — 60 с	72 °C — 60 с	72 °C — 7 хв
	1 цикл	40 циклів		1 цикл	
P72 (PPA1/ASFV2)	95 °C — 5 хв	95 °C — 30 с	60 °C — 30 с	72 °C — 30 с	72 °C — 5 хв
	1 цикл	40 циклів		1 цикл	
F3/B3_1 F3/B3_2 F3/B3_3	95 °C — 5 хв	95 °C — 15 с	60 °C — 30 с	72 °C — 30 с	72°C — 5 хв
	1 цикл	40 циклів		1 цикл	
p10	95 °C — 5 хв	95 °C — 60 с	59 °C — 60 с	72 °C — 60 с	72 °C — 7 хв
	1 цикл	40 циклів		1 цикл	
p32	95 °C — 5 хв	95 °C — 30 с	52 °C — 30 с	72 °C — 30 с	72 °C — 5 хв
	1 цикл	40 циклів		1 цикл	
p54	95 °C — 5 хв	95 °C — 15 с	52 °C — 30 с	72 °C — 30 с	72 °C — 5 хв
	1 цикл	40 циклів		1 цикл	
Ligase	95 °C — 5 хв	95 °C — 60 с	52 °C — 60 с	72 °C — 60 с	72 °C — 7 хв
	1 цикл	40 циклів		1 цикл	
p54ΔTM	95 °C — 5 хв	95 °C — 30 с	50 °C — 30 с	72 °C — 30 с	72 °C — 5 хв
	1 цикл	40 циклів		1 цикл	
ligaseΔDBD	95 °C — 5 хв	95 °C — 15 с	60 °C — 30 с	72 °C — 30 с	72 °C — 5 хв
	1 цикл	40 циклів		1 цикл	

ПЛР у режимі реального часу проводили з використанням реактивів із розробленої нами тест-системи для детекції ДНК вірусу АЧС «Sui-DNA-test-ASF virus» за наступним протоколом (таблиця 2.5).

Таблиця 2.5

**Протокол приготування реакційної суміші
для проведення ПЛР у режимі реального часу**

Реактив	Фінальна концентрація	Кількість на одну реакцію, мкл
Вода деіонізована, вільна від нуклеаз, для ПЛР		4,7
RT-PCR Master Mix	1x	10
10 пМ/мкл зонд ASF probe	250 нМ	0,5
20 пМ/мкл праймер ASFV-1	0,4 мкМ	0,4
20 пМ/мкл праймер ASFV-2	0,4 мкМ	0,4
IC-mix	0,5 мкМ	2
Досліджуваний зразок		2
Загальний об'єм реакційної суміші		18

Реакцію ампліфікації проводили за допомогою ампліфікатору із системою детекції флуоресцентного сигналу за наступною програмою (табл. 2.6).

Таблиця 2.6

**Програма ампліфікації гена *p72* вірусу АЧС
методом ПЛР у режимі реального часу**

Праймерна система	Режим ампліфікації			
	Первинна денатурація	Денатурація	Відпал	Елонгація
ASFV1/ASFV2	95 °C — 5 хв	95 °C — 15 с	58 °C — 30 с	60 °C — 30 с
	1 цикл	40 циклів		

Петльову ізотермічну ампліфікацію проводили для встановлення наявності генетичного матеріалу *Sus scrofa* та вірусу АЧС у польових зразках ротової рідини від диких тварин з використанням наборів специфічних праймерів (табл. 2.2). Реакційну суміш готували за протоколом, поданим у таблиці 2.7. Для ампліфікації гена *nd5* ампліфікатор програмували на підтримання сталої температури 57 °C протягом 40 хв, для ампліфікації гена *c962r* — 60°C протягом того ж часу.

**Протокол приготування реакційної суміші
для проведення петльової ізотермічної ампліфікації**

Реактив	Фінальна концентрація	Кількість на одну реакцію, мкл
Вода деіонізована, вільна від нуклеаз, для ПЛР		6,25
Isothermal Amplification Buffer	1x	2,5
100 мМ dNTP Мікс	6 мМ	1,5
100 мМ MgSO ₄	6 мМ	1,5
Суміш праймерів ASFV_F3/B3, ASFV_FIP/ BIP, ASFV_LF/ LB (5 пМ/мкл:40 пМ/мкл:10 пМ/мкл)	0,2:1,6:0,4	6,0
25 мМ бетаїн	1 мМ	1,0
8 од./мкл Bst 2.0 ДНК-полімераза	10	1,25
Досліджуваний зразок		5
Загальний об'єм реакційної суміші		25

У разі проведення аналізу з детекцією результатів у режимі реального часу, до реакційної суміші додавали 1,25 мкл EvaGreen, та 0,15 мкл барвника ROX, а кількість води зменшували на 1,4 мкл.

Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР та петльової ізотермічної ампліфікації. Електрофорез проводили з використанням агарозного гелю з фарбуванням бромідом етидію у кінцевій концентрації 0,3 мкг/мл. Концентрація агарози у гелі при цьому становила 1,5 %. Для завантаження продуктів реакції ампліфікації використовували барвник Thermo Scientific 6X TriTrack DNA Loading Dye (ThermoFisher Scientific, США).

Електрофорез проводили за напруги 100 В впродовж 40 хвилин. Облік результатів електрофорезу проводили з використанням транслюмінатора в пронизуючих УФ-променях з довжиною хвилі 310 нм.

Методика створення рекомбінантного позитивного контролю. Для отримання рекомбінантного позитивного контролю до тест-системи для

виявлення ДНК вірусу АЧС з використанням ПЛР у режимі реального часу було проведено ампліфікацію фрагмента гена *b646l* вірусу АЧС (табл. 2.1, 2.4).

Проходження ампліфікації перевіряли шляхом візуалізації ампліконів в 1 % агарозному гелі. Розмір ПЛР-продукту становив 1763 п. н. Після цього амплікони виділяли з гелю за допомогою комерційного набору Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit. Для проведення лігації був використаний TA-вектор pTZ57_R/T, T4 ДНК-лігаза і супровідні буфери з набору «InsTAclone PCR Cloning Kit», згідно з протоколом виробника. Лігіювання донорної та векторної ДНК проводили протягом ночі при 4°C.

Для трансформації заздалегідь готували хемокомпетентні клітини *E. coli* штаму DH5 α методом Chang та ін. [119]. 2,5 мкл отриманої після лігації плазмідної ДНК змішували з 50 мкл компетентних клітин, інкубували протягом 30 хв на льоду, після чого тримали у водяній бані при 42°C протягом 30 секунд та знову поміщали на лід на 5 хв. Трансформовані клітини інкубували протягом 1 год при 37°C у 800 мкл С-середовища і пересівали в чашки Петрі на тверде LB-середовище з ампіциліном у концентрації 100 мкг/мл. Для контролю трансформації методом синьо-білого скринінгу на поверхню середовища наносили IPTG та X-Gal у концентрації 50 мкг/мл. Після нічної інкубації чашок при 37 °C було відібрано 10 білих колоній, які перевірили на наявність вставки за допомогою ПЛР. Після того, як було встановлено, що колонії містили плазмиду, бактерії з цих колоній підростили у LB-середовищі з ампіциліном (100 мкг/мл). З рекомбінантної культури *E. coli* було проведено екстракцію плазмід згідно інструкції виробника набору.

Квантифікація ДНК. Концентрацію попередньо очищеної цільової ДНК (плазміди або амплікони) визначали спектрофотометричним методом за довжиною хвилі 260 нм, наявність домішок визначали за довжиною хвилі 230 нм та 280 нм. Кількість копій гена визначали за формулою (2.1) :

$$N = C(\text{DNA}) \times 6,022 \times 10^{23} / n \times 1 \times 10^9 \times 650, \quad (2.1)$$

де: N — кількість копій,

C (DNA) — концентрація ДНК,

n — кількість пар нуклеотидів в молекулі.

Розробка тест-системи для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу. Розробку тест-системи для виявлення ДНК вірусу АЧС «Sui-DNA-test-ASF virus» проводили у лабораторії молекулярної епізоотології ННЦ «ІЕКВМ».

Для цього розробили рекомбінантний позитивний контрольний зразок, приготували панель серійних розведень з концентрацією плазмідної ДНК від 10 до 10^5 копій цільового гена в 1 мкл, яку використали для тестування аналітичної чутливості тест-системи. Специфічність тест-системи перевіряли з використанням панелі позитивних та гетерологічних зразків ДНК. Повторюваність тестували шляхом проведення досліджень у трьох повторях.

Дизайн праймерів для петлевої ізотермічної ампліфікації для детекції молекулярних маркерів вірусу АЧС та *S. scrofa*. З метою визначення молекулярних маркерів для детекції вірусу африканської чуми свиней було проведено вирівнювання повногеномних послідовностей ДНК вірусу АЧС та пошук консервативних фрагментів генома.

Перед проведенням дизайну праймерів для детекції генетичного маркеру *S. scrofa* обрану цільову послідовність було перевірено на специфічність за допомогою онлайн-інструменту Nucleotide BLAST.

Серед згенерованих систем внутрішніх і зовнішніх праймерів було відібрано ті, що відповідають необхідним критеріям, та далі для них проведено дизайн петлевих праймерів.

Оптимізація протоколу проведення реакції петлевої ізотермічної ампліфікації. При оптимізації протоколу проведення реакції петлевої ізотермічної ампліфікації було встановлено оптимальні значення таких параметрів: температура перебігу реакції (57–64 °C, крок 1 °C), концентрація $MgSO_4$ у реакційній суміші (4–10 ммоль, крок 1 ммоль), концентрація бетаїну (0,8–1,2 ммоль, крок 0,1 ммоль), концентрація *Bst* ДНК-полімерази (2 од.–8 од., крок 2 од.), тривалість перебігу реакції (10–60 хв, крок 10 хв). Як матрицю в

ході оптимізації протоколу проведення реакції було використано очищені амплікони, отримані шляхом ПЛР з використанням праймерів F3/B3.

Візуалізацію результатів реакції петльової ізотермічної ампліфікації здійснювали шляхом горизонтального електрофорезу у 1,5 % гелі. Також результати візуалізували шляхом додавання безпосередньо в пробірки з продуктом реакції 1 мкл броміду етидію концентрацією 0,5 мкг/мл з подальшим опроміненням світлом довжиною хвилі 310 нм.

Методика створення рекомбінантних антигенів. Для розробки рекомбінантних антигенів було обрано чотири білки вірусу АЧС, що були охарактеризовані як імуногенні, серед яких три структурні: p10 (ген *k78r*), p32 (ген *cp204l*), p54 (ген *e183l*) та один неструктурний — ДНК-лігаза (ген *np419l*) [120]. Для полегшення очистки також розробили білки з делеціями трансмембранного (p54) та ДНК-зв'язуючого (ДНК-лігаза) доменів.

Ампліфікацію фрагментів генома, що кодують вказані білки, було проведено шляхом класичної ПЛР з використанням реактивів та праймерних систем вказаних у таблиці 2.1, за протоколом, вказаним у таблиці 2.3. Отримані продукти ампліфікації очистили згідно з інструкцією виробника набору.

Рестрикцію та лігацію проводили в один крок, для чого готували реакційну суміш, що складалася з 5 нг вектору (pASG-IBA103 або pASG-IBA105), 25 нг очищеного ПЛР-продукту, 2,5 мкл буферу, 1 мкл ДТТ/АТФ-суміші, 1 мкл Т4-ДНК-лігази та 0,5 мкл рестриктази, суміш доводили до кінцевого об'єму 25 мкл деіонізованою водою та інкубували при 30 °C протягом 1 години.

Для трансформації 50 мкл компетентних клітин *E. coli* NEB Turbo змішували з 10 мкл реакційної суміші після рестрикції та інкубували 30 хв на льоду. Після цього клітини піддавали тепловому шоку, інкубуючи суміш протягом 35 с за 42 °C. До пробірки з трансформованими клітинами додавали 250 мкл рідкого середовища LB та інкубували в термошейкері протягом 1 години при 37 °C та 150 об./хв. Трансформовані клітини висівали на чашки

Петрі з середовищем LB, що містив 100 мг/л карбеніциліну та 40 мг/л X-Gal, та інкубували протягом ночі за 37 °C.

Для перевірки успішності трансформації відбирали білі колонії та проводили класичну ПЛР з використанням тих же праймерних систем, що і для ампліфікації цільових послідовностей. Колонії, що містили цільову вставку, культивували у рідкому середовищі LB з карбеніциліном (100 мг/л) при 37 °C протягом ночі, після чого проводили екстракцію плазмід. Для підтвердження правильності лігованих послідовностей та рамки зчитування проводили секвенування плазмід.

Рекомбінантними плазмідами, правильність яких була підтверджена секвенуванням, трансформували компетентні клітини експресуючого штаму *E. coli* BL21 Lemo (D3) при 42 °C протягом 45 с. Трансформовані клітини висівали на чашки Петрі з твердим середовищем LB та карбеніциліном (100 мг/л) та інкубували протягом ночі при 37 °C. В подальшому чашки зберігали при 4 °C.

Для експресії білка вирощували нічну культуру отриманих експресуючих клонованих бактерій у LB-середовищі з карбеніциліном за 37 °C при помішуванні 150 об./хв. Наступного дня нічну культуру розводили у свіжому LB-бульйоні з карбеніциліном у співвідношенні 1:50 та культивували при 37 °C та помішуванні 150 об./хв до отримання культури зі значенням оптичної щільності OD₆₀₀ 0,4-0,8. Після цього проводили індукцію експресії білка, додаючи до культури ангідротетрациклін (0,2 мкг/мл), та інкубували у термошейкері за попередньою програмою протягом на 3 год. Після закінчення індукції клітини центрифугували при 6000 g протягом 7 хв, видаляли супернатант, а пелети зберігали за температури мінус 20 °C до подальшої очистки білків.

Методика хроматографічної очистки рекомбінантних білків.
Методика очистки рекомбінантних білків у нативних умовах з використанням проточної колонки. Перед хроматографічною очисткою пелету з бактеріальних клітин розчиняли у буфері W з розрахунку 1 мл на

100 мл бактеріальної культури. Після цього клітини гомогенізували протягом 30 с за швидкості 6 м/с. Розчин центрифугували при 10000 g упродовж 7 хвилин та пропускали через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Якщо колонку власноруч заповнювали сорбентом Strep-Tactin XT 4 Flow, то його попередньо еквілібрували буфером W. Після цього зразок змішували із сорбентом та інкубували протягом ночі при 4 °C в ротаторі. Очистку здійснювали згідно інструкції виробника колонки. Усі фракції збирали та зберігали при –20 °C до проведення наступних аналізів.

Методика очистки рекомбінантних білків в денатуруючих умовах з використанням проточної колонки. Процес очистки відбувався за тим же протоколом, що і очистка за нативних умов, але буфер W та буфер для елюції ВХТ містили 6 М сечовини, що забезпечувало денатурацію білків. Діаліз та рефолдинг білків проводили з використанням касет Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassette згідно інструкції виробника.

Методика очистки рекомбінантних білків з попереднім розчиненням білків із тілець включення. Пелету зі 100 мл культури ресуспендували в 2 мл буферу W, що додатково містив 150 мМ NaCl та 0,1 % дезоксихолату натрію. До суспензії клітин додавали 10 мкл лізоциму, 2 мкл бензонази, 2 мкл 2М $MgCl_2$ та інкубували 20 хв за кімнатної температури, після чого на 15 хв поміщали на лід. Пробірки обробляли УЗ, після чого центрифугували 20 хв при 11000 g. Супернатант видаляли, а пелету ресуспендували в 1 мл буферу W, що додатково містив 150 мМ NaCl та 0,3 % саркозилу. Суспензію піддавали дії 4 циклів заморожування (–80 °C 15 хв) та розморожування (37 °C 10 хв), після чого ще раз обробляли УЗ та центрифугували. Супернатант використовували для подальшої очистки, а пелету ресуспендували у 2 мл буферу W із саркозилом та інкубували протягом ночі при 4 °C в ротаторі. Після цього суспензію знову центрифугували, а супернатант використовували для очистки. Очистку проводили згідно інструкції виробника колонки. Очищення білків від домішок детергентів проводили безпосередньо під час очистки на етапі відмивання, покроково знижуючи концентрацію саркозилу в буфері до 0 %.

Для перевірки якості очистки білків проводили ДСН-ПААГ електрофорез та вестерн-блотинг з HRP-коагульованими Strep-tag-антитілами згідно з протоколом виробника колонок та з сироваткою крові свиней, негативною щодо вірусу АЧС.

Методика проведення вестерн-блотингу. Для тестування специфічності рекомбінантних білків, а також ефективності їх очистки проводили вестерн-блот з використанням позитивної або негативної щодо АЧС сироватки крові свині як первинних антитіл. Для цього досліджувані зразки змішували з барвником, нагрівали за температури 95 °C впродовж 5 хвилин, після чого інкубували їх впродовж 2 хвилин на льоду та вносили по 15 мкл зразка до кожної лунки ПААГ. Проводили вертикальний електрофорез протягом однієї години за напруги 160 В. Складали блотинг-сендвіч, попередньо намочивши всі його компоненти у трансфер-буфері. Напівсухий вестерн-блот проводили за напруги 30 В протягом однієї год. На мембрану наносили 10 мл блокуючого буферу та інкубували протягом ночі за кімнатної температури. До блокуючого буферу додавали сироватку крові у співвідношенні 1:500 та інкубували одну годину за кімнатної температури. Мембрану промивали відмивочним буфером 3 рази по 10 хв, після чого наносили вторинні HRP-кон'юговані anti-Pig IgG антитіла, розведені у 10 мл блокуючого буферу у співвідношенні 1:5000. Мембрану інкубували одну годину за кімнатної температури, після чого промивали 3 рази по 10 хв відмивочним буфером та 1 раз ФСБ. Наносили на мембрану субстрат SeramunBlau прес та інкубували 10 хв у темряві. Зупиняли реакцію відмиванням мембрани ультрачистою водою та проводили облік результатів. У разі необхідності проведення блотингу зразків з іншими первинними антитілами, після відмивання вторинних антитіл проводили візуалізацію хемілюмінесцентним методом Mruk та Cheng [121]. Після цього для очищення мембрани наносили стріппінг-буфер та інкубували протягом ночі, після чого промивали один раз розчином для відмивки та повторювали процедуру блотингу з етапу блокування мембрани.

Методика проведення непрямого ІФА з використанням рекомбінантних антигенів. Антигени розводили і титрували у карбонатному буфері (рН 9,8) та додавали по 50 мкл у лунки планшету, планшет накривали плівкою та інкубували за температури 4 °С впродовж ночі. Буфер видаляли і планшет блокували блокуючим розчином (10 % знежиреного сухого молока та 1 % кролячої сироватки у ФСБ), потім планшет інкубували за температури 26 °С впродовж однієї години. Планшет спорожняли, сироватки та контрольні зразки розводили і титрували з буфером для розведення (10 % знежиреного сухого молока та 1 % кролячої сироватки у ФСБ з 0,2 % Твін) та додавали по 50 мкл у лунки, після чого планшет інкубували за температури 26 °С впродовж 2 год. Планшет відмивали 4 рази відмивочним буфером (ФСБ з 0,2 % Твін). Вторинні антитіла rabbit-anti-Pig IgG розводили у співвідношенні 1:10000 і титрували у буфері для розведення та додавали по 50 мкл до кожної лунки, після чого планшет інкубували за температури 26 °С впродовж однієї год. Планшет відмивали 4 рази відмивочним буфером, до кожної лунки додавали 50 мкл субстрату ТМВ, інкубацію проводили в темряві за кімнатної температури протягом 10 хвилин. Реакцію зупиняли, додаючи 50 мкл 0,25 М розчину H_2SO_4 , та досліджували оптичну щільність зразків за допомогою ІФА-рідера.

Порогове значення оптичної щільності при проведенні ІФА визначали за формулою (2.2):

$$ПЗ = \text{середнє значення негативних контролів} + (3 \times \text{стандартне відхилення негативних контролів}). \quad (2.2)$$

Внутрішньосистемний коефіцієнт варіативності (Intra-assay CV) розробленого методу визначали за формулою (2.3):

$$Intra\ CV = \frac{\text{стандартне відхилення}}{\text{середнє значення}} \times 100 \%. \quad (2.3)$$

Міжсистемний коефіцієнт варіативності (Inter-assay CV) визначали за формулою (2.4):

$$Inter\ CV = \frac{\text{середнє значення стандартних відхилень повторів у різних планшетах}}{\text{середні значення повторів у різних планшетах}} \times 100 \%. \quad (2.4)$$

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Розробка рекомбінантних антигенів вірусу АЧС та протоколу проведення ІФА для серологічної діагностики захворювання

При проведенні досліджень щодо моніторингу АЧС за допомогою серологічних методів в якості антигена використовують вірусні білки. У Керівництві ВООЗТ щодо діагностичних тестів та вакцин для наземних тварин вказаний спосіб отримання вірусних антигенів з перещеплюваної культури клітин мавпи, інфікованої збудником АЧС [47]. Проте отримання таких антигенів для in-house діагностики стикається з багатьма труднощами, оскільки робота з живим вірусом АЧС потребує створення в лабораторіях умов біозахисту не нижче рівня BSL-3. Тому при розробці імуноферментного аналізу ми вирішили використати в якості антигена білки вірусу АЧС рекомбінатного походження.

Для досліджень як таргетні було обрано 4 вірусні протеїни з вираженими антигенними властивостями: p10 — ДНК-зв'язуючий білок нуклеоїда масою 8,3 кДа, p32 — структурний білок, відповідальний за проникнення вірусу в клітину хазяїна масою 22,4 кДа, p54 — білок внутрішньої оболонки, що забезпечує зв'язування вірусної частки з клітиною хазяїна розміром 20 кДа та фермент ДНК-лігазу розміром 48 кДа. Також було розроблено усічені білки з делеціями трансмембранного (p54 Δ TM) та ДНК-зв'язуючого (лігаза Δ ДЗД) доменів масою 18,3 та 34,6 кДа відповідно.

Було проведене молекулярне клонування послідовностей, що кодують 6 вищезгаданих білків вірусу АЧС, до векторів pASG-IBA103 та pASG-IBA105, що несуть кодуючі послідовності Twin-Strep-tag для хроматографічного очищення на С- та N- кінцях відповідно. Означені вектори використовуються для прямого клонування з використанням рестриктази Esp3I та експресії рекомбінантних білків у клітинах *E. coli* та несуть послідовності, що

забезпечують резистентність отриманих клонів до дії ампіциліну, висококопійність плазміди, а також кодують індукований тетрацикліном *tet* промотор. Для очистки використовували систему Strep-Tactin XT, а кожен рекомбінантний протеїн також вміщував мітку Twin-Strep-tag, що представлена амінокислотною послідовністю WSHPQFEK-(GGGS)₂GG-SA-WSHPQFEK масою 2,9 кДа.

Клонування до обох типів векторів пройшло успішно для усіченої ДНК-лігази та цього ж білка повної довжини, а також для p54ΔTM, в той час як для інших білків вдалося отримати тільки по одному конструкту: pASG-IBA103_p10, pASG-IBA105_p32, pASG-IBA105_p54. Ампліфіковані в *E. coli* NEB Turbo векторні молекули з послідовностями, що кодують білки вірусу АЧС, було очищено та трансформовано ними клітини *E. coli* Lemo21(DE3). Індукцію експресії білка проводили шляхом додавання ангідротетрацикліну (АГТ) до бактеріальної культури та подальшого культивування впродовж 3 годин за 37 °С. Для всіх білків індукція експресії проходила успішно, а для p10, p54, а також усіченої та повної ДНК-лігази спостерігалася «підтікаюча експресія», тобто базова експресія гена на низькому рівні навіть за відсутності АГТ. Оскільки клоновані білки не є токсичними для бактерій, це не перешкоджає успішній експресії цільових генів.

На першому етапі очищення вірусних білків проводили за фізіологічних умов, готуючи лізати експресуючих культур шляхом подрібнення за допомогою гомогенізатора та наступного центрифугування з метою усунення клітинного дебрису. Проте, при проведенні вестерн-блоту очищених таким способом білків з антитілами до Twin-Strep-tag було встановлено, що білки перебувають у нерозчинній формі. У наслідок цього в лізат потрапляє тільки незначна частина синтезованої кількості протеїну (концентрація пулів фракцій елюйованого білку не перевищувала 70 мкг/мл), а більшість протеїнів випадала в осад (рис. 3.1). Винятком був лише білок p10, частина якого теж випадала в осад, однак незважаючи на це, велика кількість протеїну підлягала очистці, а концентрація пулу фракцій отриманого білку становила 3,5 мг/мл.

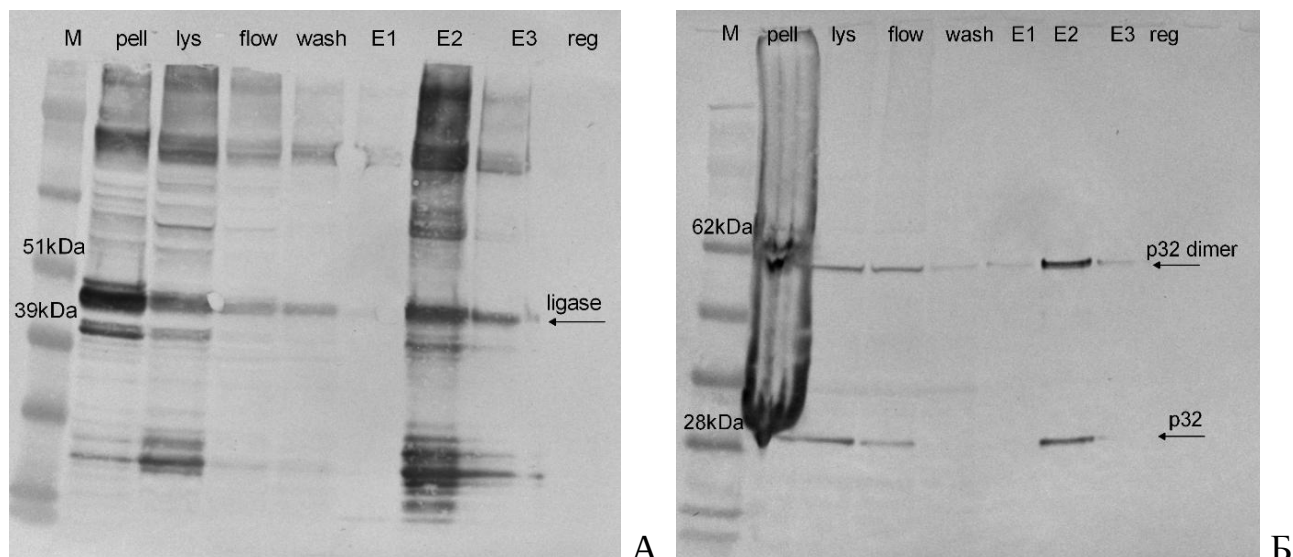


Рис. 3.1. Приклади вестерн-блоту з Twin-Strep-tag-антитілами фракцій, отриманих в процесі очищення протеїнів за фізіологічних умов: А — ДНК-лігаза, Б — p32; М — маркер молекулярної маси, pell — пелета клітинного дебрису, lys — лізат до нанесення на колонку, flow — проточна рідина отримана після нанесення лізату на колонку, wash — фракція промивання колонки, E1, E2, E3 — фракції елюйованих білків, reg — фракція отримана після регенерації колонки.

Присутність цільових білків у пелетах клітинного дебрису свідчить про те, що вони перебувають у нерозчинній формі, отже, найбільш ймовірно, утворюють тільця включення. Одним із найбільш поширених способів перевести рекомбінантні білки з тілець включення у розчинну форму є приготування лізату культури бактерій та проведення хроматографічного очищення за денатуруючих умов у присутності сечовини. Для цього до всіх розчинів, що використовували для денатуруючої хроматографічної очистки, додавали 6 М сечовини, оскільки саме така концентрація є сумісною з матриксом колонки Strep-Tactin XT.

За денатуруючих умов у розчинний стан переходило більше білків, ніж за нативних, проте основна маса синтезованих протеїнів лишалася в пелеті, що свідчило про необхідність подальшого вдосконалення протоколу очищення (рис. 3.2 А, 3.2 Б). p10 був винятком, оскільки не зважаючи на те, що не всі

білки перейшли у розчинну форму, усі фракції елюції містили значну кількість цільового продукту (рис. 3.2 В).

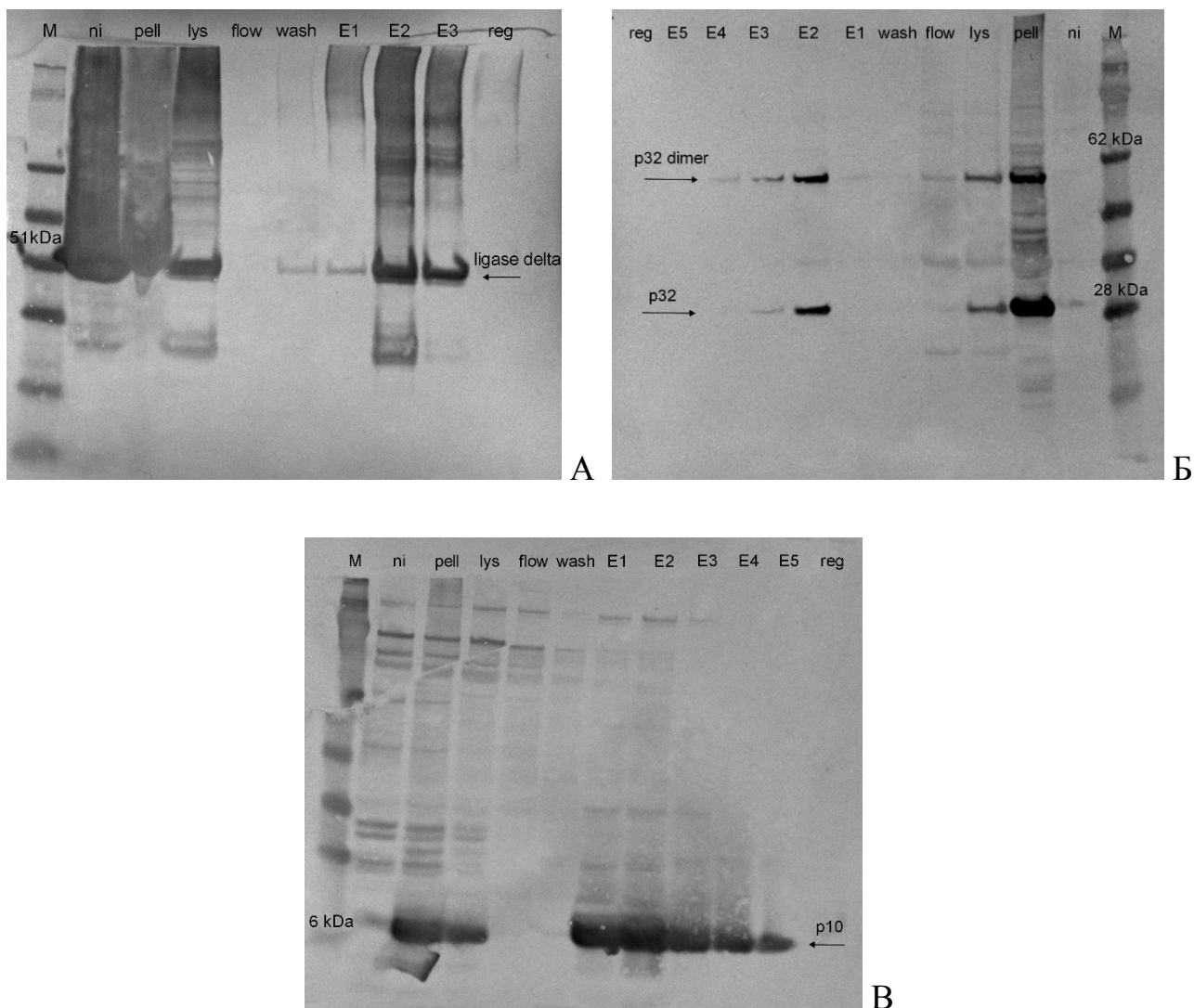


Рис. 3.2. Приклади вестерн-блоту з Twin-Strep-tag-антитілами фракцій, отриманих в процесі очищення рекомбінантних білків за денатуруючих умов: А — лігазаΔДЗД, Б — p32, В — p10; М — маркер молекулярної маси, пі — контрольний зразок культури до індукції, pell — пелета клітинного дебрису, lys — лізат до нанесення на колонку, flow — проточна рідина отримана після нанесення лізату на колонку, wash — фракція промивання колонки, E1, E2, E3, E4, E5 — фракції елюйованих білків, reg — фракція отримана після регенерації колонки.

Для повернення нативної конформації та відновлення функціональності після очищення за денатуруючих умов, білки піддавали діалізу для поступового

зниження концентрації сечовини та рефолдингу отриманих рекомбінантних вірусних протеїнів. Однак після проведення діалізу об'єм фракцій елюйованих білків збільшився за рахунок осмотичного проникнення буферу, відносно якого проводили діаліз, через мембрану касети. Внаслідок розведення елюйованих фракцій концентрація білка p10 становила 190 мкг/мл, для інших протеїнів вона була ще меншою, а для p32 та p54 взагалі не перевищувала 20 мкг/мл. Для білка p10 було обрано очистку за нативних умов, оскільки такий спосіб давав можливість отримати велику кількість цільового продукту без необхідності проводити діаліз, а для всіх інших рекомбінантних протеїнів продовжили удосконалення протоколу.

Для підбору оптимального методу очищення рекомбінантних білків було комбіновано та модифіковано кілька протоколів, у тому числі протокол вивільнення білків з мембрани бактерій (не опубліковано, in-house метод Інституту мікробіології Бундесверу) та протокол очистки мічених His-тегом білків з використанням саркозилу [122]. На першому етапі пелету обробляли буфером W із 0,1 % дезоксихолату натрію та літичними ферментами (бензоназа, лізоцим), інкубували з буфером W, що містив 0,3 % саркозилу, піддавали дії ультразвуку та послідовним циклам заморожування-відтавання, після цього інкубували за кімнатної температури з буфером W, що містив 6 М сечовини, а потім кип'ятили в присутності того ж буферу. Після обробки кожним буфером лізат центрифугували та відбирали до окремої пробірки, додаючи до пелети наступний розчин. Після цього провели вестерн-блот з анти-Twin-Strep-tag антитілами для визначення етапу, що був найбільш ефективним для вивільнення білків з пелети (рис. 3.3). Так, було встановлено, що супернатант після обробки буфером W з дезоксихолатом натрію містив дуже малу кількість цільового білка, в той час як буфер W із саркозилом забезпечував солюбілізацію близько половини експресованого цільового білка, хоча ще половина лишалася в нерозчинній формі у пелеті. Обробка пелети сечовиною за кімнатної температури та при 95 °C бажаного ефекту не дала, оскільки після цього до супернатанту виходила незначна частка білка, тому

було вирішено в подальшому не використовувати два останні етапи модифікованого протоколу приготування лізату.

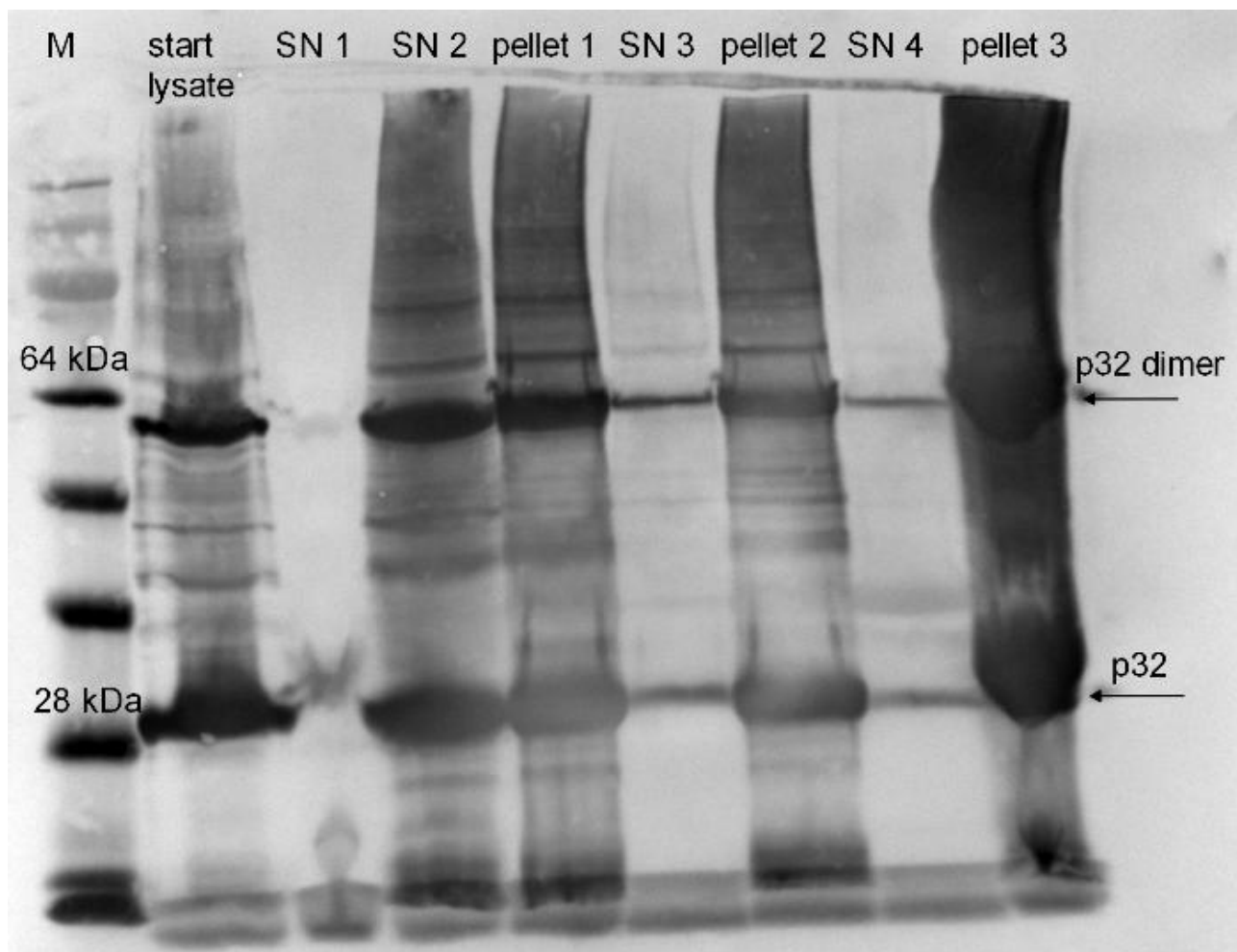


Рис. 3.3. Вестерн-блот з Twin-Strep-tag-антитілами зразків, отриманих в процесі приготування лізату культури бактерій, що продукує білок p32, за комбінованим протоколом: М — маркер молекулярної маси, start lysate — початкова суспензія бактерій, оброблена літичними ферментами, SN1 — супернатант отриманий після обробки буфером W із 0,1 % дезоксихолату натрію, SN2 — супернатант отриманий після обробки буфером W із 0,3 % саркозилу, pellet 1 — пелета, отримана після відбору супернатанту 2, SN3 — супернатант отриманий після 1 год інкубації за кімнатної температури з буфером W із 6 М сечовини, pellet 2 — пелета, отримана після відбору супернатанту 3, SN4 — супернатант отриманий після 10 хв інкубації за 95°C з буфером W із 6 М сечовини, pellet 3 — пелета, отримана після відбору супернатанту 4.

Оскільки з рисунку 3.3 видно, що супернатант 1 містить незначну кількість цільового білка, при подальшій оптимізації протоколу було вирішено пропустити етап обробки пелети дезоксихолатом натрію. Проте супернатант, отриманий після обробки саркозилем у цьому випадку містив значно меншу кількість розчинних цільових білків, ніж при попередній обробці дезоксихолатом натрію. Також було встановлено, що тривалість інкубації із саркозил-вмісним буфером W відіграє більшу роль у переведенні білків у розчинну форму, ніж збільшення об'єму буферу, у якому ресуспендують пелету. Збільшення кількості циклів обробки ультразвуком теж позитивно впливало на солюбілізацію цільових білків. Таким чином, остаточний протокол приготування лізатів, що використовували для подальшої хроматографічної очистки, включав обробку буфером із дезоксихолатом натрію та літичними ферментами у співвідношенні 2 мл буферу на пелету зі 100 мл бактеріальної культури, обробку ультразвуком до прозорості суспензії клітин (як правило, два рази по 20 циклів), 4 цикли заморожування–відтавання, а також інкубацію із саркозил-вмісним буфером впродовж 16 годин. Детально фінальний протокол описаний у підрозділі 2.2.

Незважаючи на те, що розроблений протокол солюбілізації рекомбінантних білків не є денатуруючим, необхідно видаляти детергенти з отриманих продуктів, оскільки саркозил у фракціях елюйованих білків може впливати на взаємодію антигена та антитіла при проведенні ІФА. Ми проводили градієнтне елюювання саркозилу на колонці, безпосередньо під час очистки на етапі відмивання незв'язаних білків, покроково знижуючи концентрацію саркозилу в буфері для відмивання на 0,05 %, в кінці процесу провели триразове промивання колонки буфером W без саркозилу. Результат хроматографічного очищення білків p32 та p54 з попередньою солюбілізацією за допомогою детергентів представлено на рисунку 3.4.

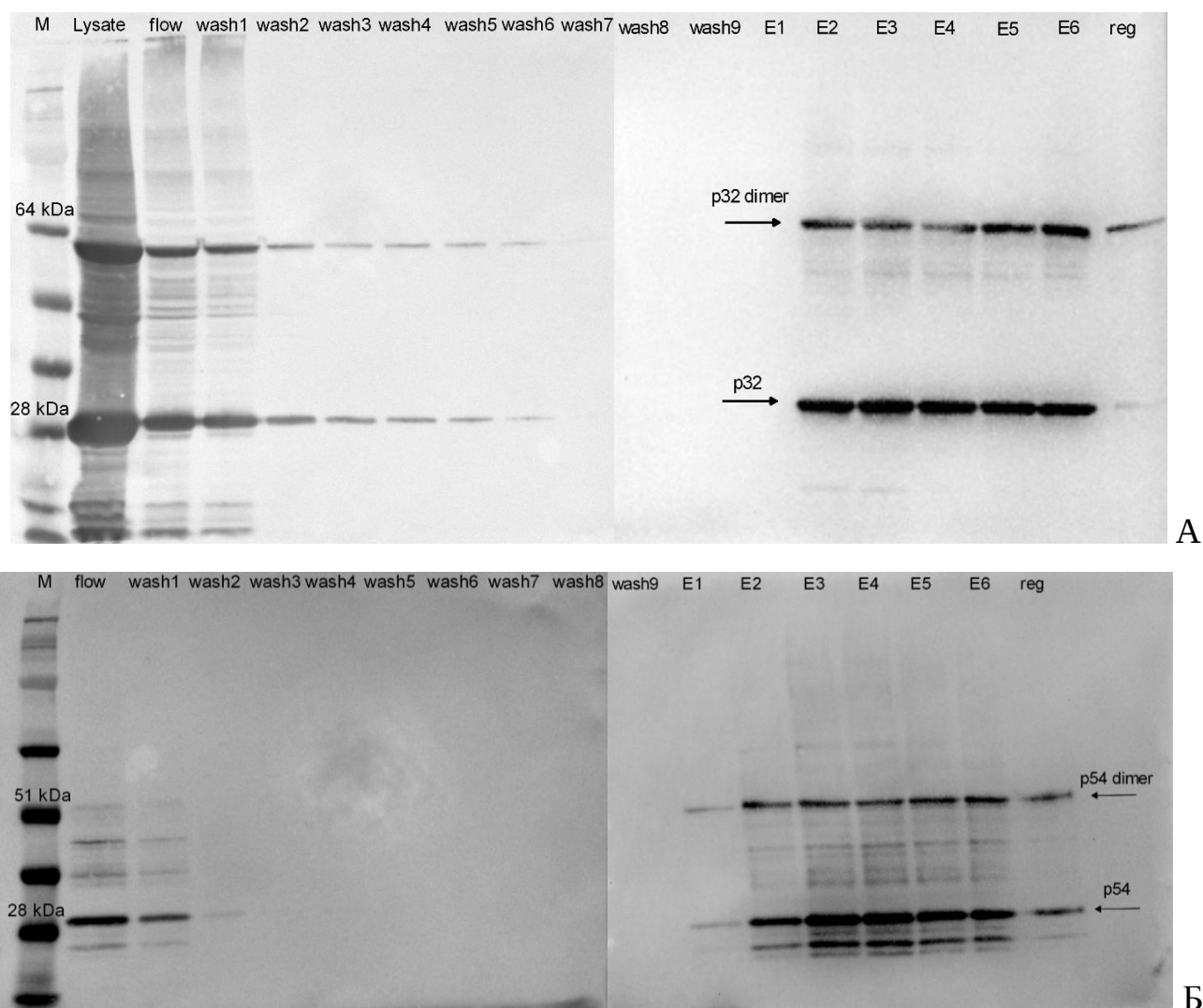


Рис. 3.4. Вестерн-блот з Twin-Strep-tag-антитілами фракцій, отриманих в процесі очищення рекомбінантних білків за протоколом з попередньою солюбілізацією з використанням детергентів: А — p32, Б — p54; М — маркер молекулярної маси, lys — лізат до нанесення на колонку, flow — проточна рідина після нанесення лізату на колонку, wash 1-wash 9 — фракції отримані в результаті промивання колонки, E1-E6 — фракції елюйованих білків, reg — фракція отримана після регенерації колонки.

Як видно з рисунку 3.4, використання оптимізованого протоколу очищення рекомбінантних протеїнів з попередньою їх солюбілізацією дало можливість отримати велику кількість очищених цільових білків з достатньо низьким вмістом контамінуючих білкових фракцій. Концентрація елюйованих фракцій білка p32 становила від 137 до 290 мкг/мл, а білка p54 — від 55 до

70 мкг/мл, що є високим значенням у порівнянні з концентраціями цих білків, отриманих при нативній та денатуруючій очистці, оскільки об'єм кожної елюйованої фракції становив 1 мл.

При очищенні білка p54ΔTM з попередньою солюбілізацією, концентрація фракцій елюйованих білків була значно вищою і становила від 337 до 980 мкг/мл, однак усі фракції, крім першої, містили дуже багато контамінуючих домішок, що, ймовірно, і робили вклад у підвищення значення концентрації при вимірюванні (рис. 3.5).

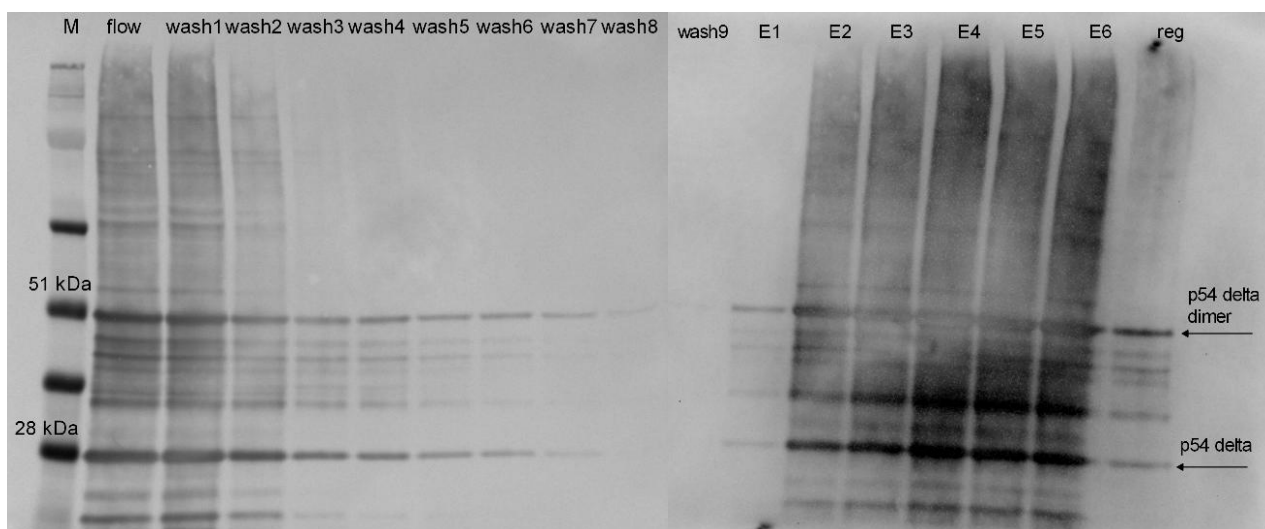


Рис. 3.5. Вестерн-блот з Twin-Strep-tag-антитілами фракцій, отриманих в процесі очищення рекомбінантного білка p54ΔTM за протоколом з попередньою солюбілізацією з використанням детергентів: М — маркер молекулярної маси, flow — проточна рідина отримана після нанесення лізату на колонку, wash 1-wash 9 — фракції отримані в результаті промивання колонки, E1-E6 — фракції елюйованих білків, reg — фракція отримана після регенерації колонки.

Крім білків, фракції очищеного білка p54ΔTM містили ДНК та РНК, що могло впливати на точність вимірювання концентрації білків, та спричиняти утворення шлейфів, що візуалізуються у вестерн-блоті. Щоб позбутися контамінуючих нуклеїнових кислот, до елюйованої фракції № 6 додавали бензоназу у кількості 90 од. та інкубували протягом 3 год за температури 37 °C,

проте це ніяк не вплинуло на кількість контамінантів, що візуалізувалися у вестерн-блоті з анти-Twin-Strep-tag антитілами, що показано на рисунку 3.6.

Одним зі способів уникнути формування тілець включення, а відповідно і ускладнень в процесі очищення рекомбінантних білків, є зниження температури та подовження тривалості експресії. З метою перевірки цього підходу культуру бактерій, що була трансформована плазмідною рASG-IBA105_p54, після додавання АГТ культивували 16 годин за температури 16 °С, після чого було проведено очищення білків за фізіологічних умов та з попередньою солюбілізацією за допомогою детергентів.

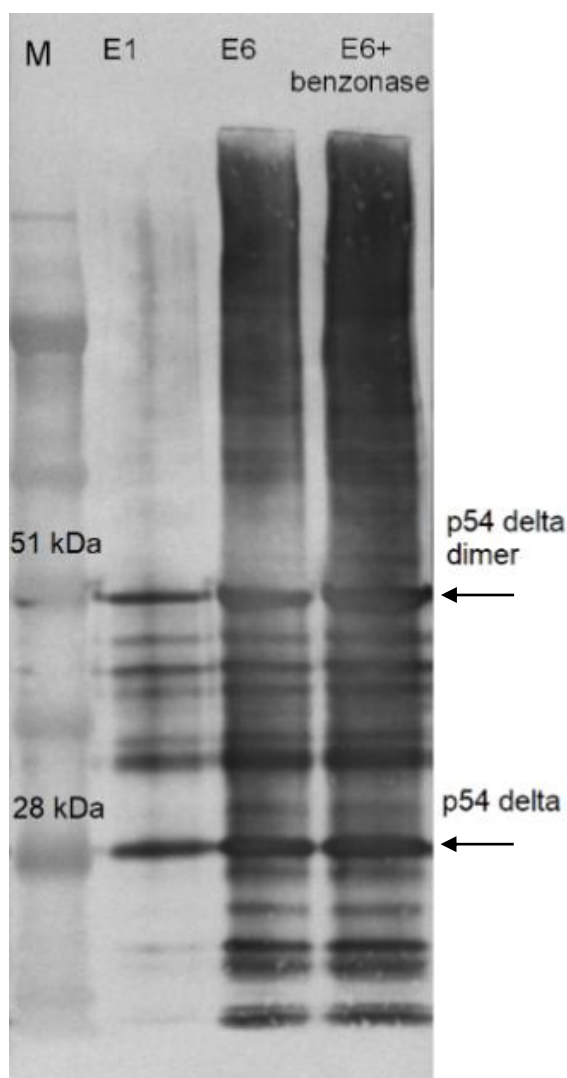


Рис. 3.6. Вестерн-блот з Twin-Strep-tag-антитілами фракцій елюйованого білка p54 Δ TM: М — маркер молекулярної маси, E1 — фракція елюйованого білка 1, E6 — фракція елюйованого білка 6, E6+benzonase — фракція елюйованого білка 6 після обробки бензоназою.

Як видно з рисунку 3.7, навіть при експресії за зниженої температури, білки перебувають у нерозчинній формі та не можуть бути очищені у великій кількості стандартним способом, рекомендованим виробником афінних колонок для очищення білків, мічених Twin-Strep-tag. У той же час, при проведенні попередньої солюбілізації з використанням детергентів, очищення рекомбінантних протеїнів проходило так само ефективно, як і з культури, яку інкубували за 37 °С.

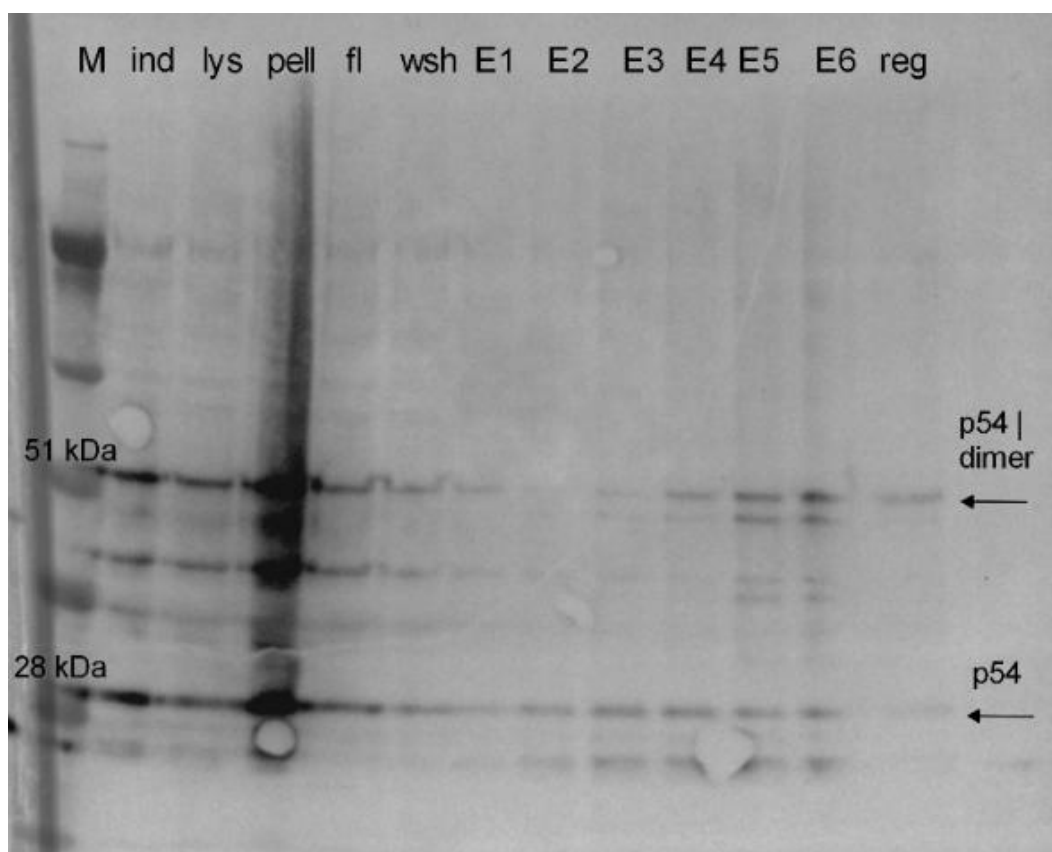


Рис. 3.7. Вестерн-блот з Twin-Strep-tag-антитілами фракцій, отриманих в процесі нативної очистки рекомбінантного білка p54, експресованого за зниженої температури: М — маркер молекулярної маси, ind — контрольний зразок культури після індукції, lys — лізат до нанесення на колонку, pell — пелета клітинного дебрису, fl — проточна рідина після нанесення лізату на колонку, wsh — фракція отримана після промивання колонки, E1–E6 — фракції елюйованих білків, reg — фракція отримана після регенерації колонки.

Після очищення, перевіряли антигенні властивості та специфічність отриманих рекомбінантних білків методом вестерн-блоту з позитивною та

негативною щодо вірусу АЧС референтними сироватками крові від свиней. Було встановлено, що білки p32 та p54 володіють антигенними властивостями та не демонструють фонового сигналу при дослідженні з негативною щодо вірусу АЧС сироваткою. У той час як білок p10, а також ДНК-лігаза усічена та повної довжини продемонстрували негативну реакцію з позитивною щодо вірусу АЧС сироваткою (рис. 3.8). Отже, білки p32 та p54 відібрали як антигени для проведення подальшої розробки ІФА з отриманими протеїнами.

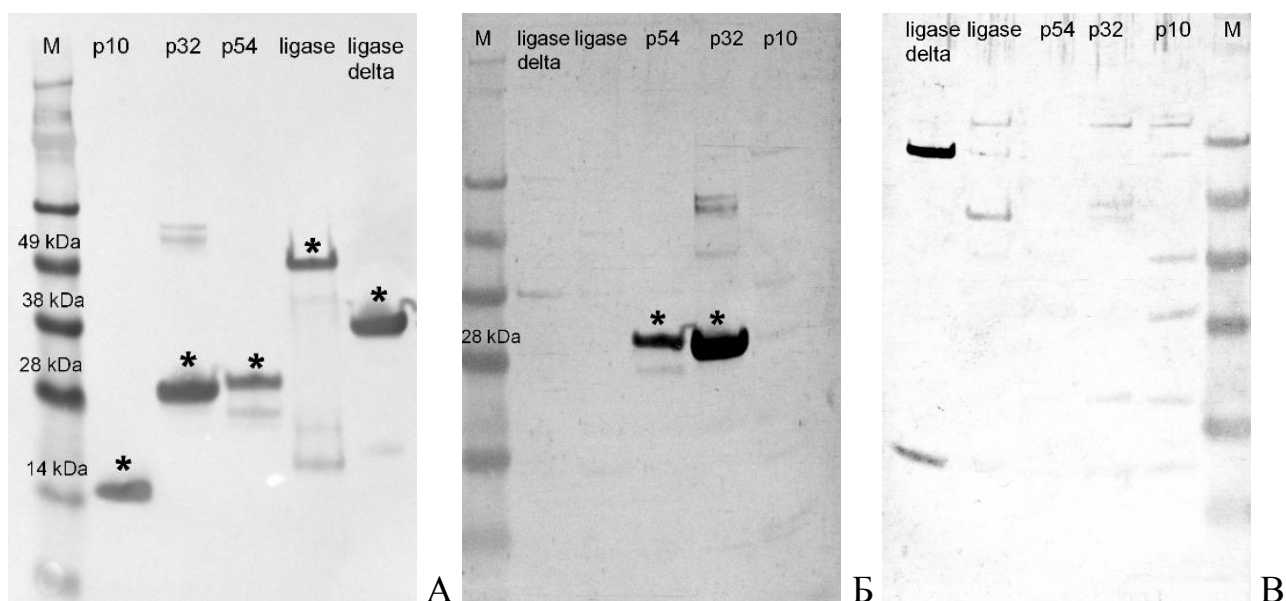


Рис. 3.8. Результати вестерн-блоту очищених рекомбінантних білків з анти-Twin-Strep-tag антитілами (А), позитивною (Б) та негативною (В) щодо вірусу АЧС сироватками крові від свиней: М — маркер молекулярної маси білків, p10, p32, p54, ligase, ligase delta — очищені рекомбінантні білки. Зірочками позначені рекомбінантні протеїни цільового розміру.

Окремо було перевірено антигенні властивості та специфічність білка p54ΔTM. Результат вестерн-блоту як з позитивною, так і з негативною щодо вірусу АЧС сироватками був позитивним, що свідчить про неспецифічне зв'язування антигена з антитілами у крові свиней (рис.3.9). У зв'язку із цим рекомбінантний білок p54ΔTM не може використовуватися в якості антигена для серологічної діагностики АЧС.

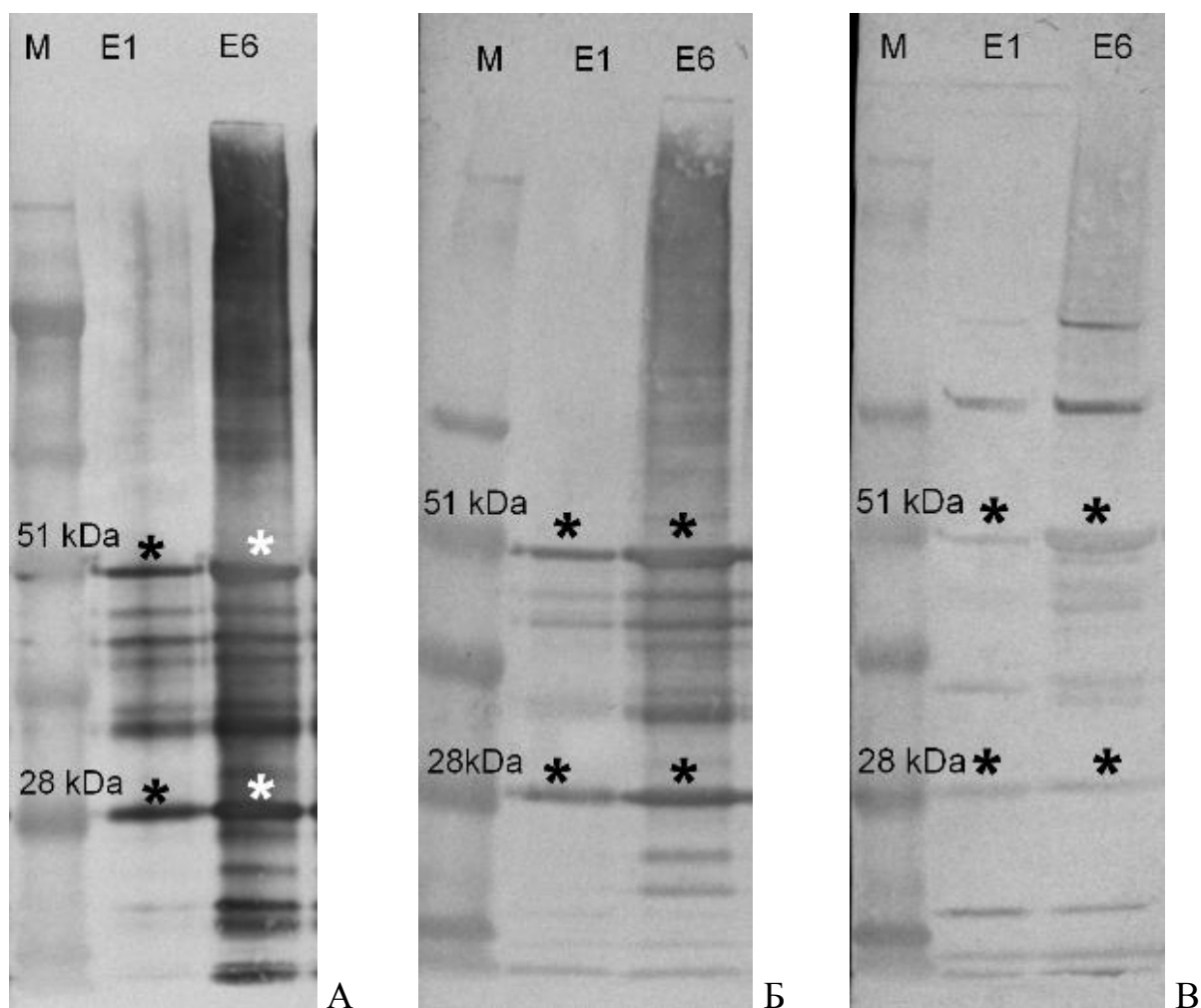


Рис. 3.9. Результати вестерн-блоту очищеного білка p54 Δ TM з анти-Twin-Strep-tag антитілами (А), позитивною (Б) та негативною (В) щодо вірусу АЧС сироватками крові від свиней: М — маркер молекулярної маси білків, E1, E6 — фракції елюйованих білків. Зірочками позначено мономери та димери білка p54 Δ TM.

На наступному етапі розробки непрямого ІФА проводили титрування білків p32 та p54 для встановлення оптимальної концентрації антигена. Для цього використали фракцію E4 білка p32 (концентрація 200 мкг/мл) та фракцію E2 білка p54 (концентрація 211 мкг/мл). Лунки планшету сенсibiliзували антигеном, серійно розведеним у карбонатному буфері до концентрації 10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 1,25 мкг/мл, 0,625 мкг/мл, 0,3125 мкг/мл та 0,156 мкг/мл. Позитивні та негативні щодо вірусу АЧС сироватки титрували у співвідношенні 1:50, 1:100, 1:200 та 1:400. Результати титрувань білків p32 та p54 наведено у табл. 3.1.

**Результати оптичної щільності серійних розведень
рекомбінантних білків р32 та р54 вірусу АЧС та титрування
досліджуваних сироваток при проведенні ІФА**

Концентрація антигена, мкг/мл	Розведення позитивної сироватки				Розведення негативної сироватки			
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:50	1:100	1:200	1:400
Блок р32								
10	1,5	1,531	1,569	1,499	0,39	0,28	0,193	0,159
5	1,397	1,46	1,379	1,233	0,239	0,188	0,139	0,097
2,5	0,997	1,015	0,903	0,7	0,136	0,095	0,075	0,043
1,25	0,926	0,876	0,776	0,568	0,102	0,073	0,05	0,033
0,625	0,799	0,672	0,534	0,43	0,075	0,051	0,037	0,036
0,3125	0,555	0,504	0,368	0,273	0,063	0,041	0,033	0,052
0,156	0,363	0,343	0,237	0,161	0,063	0,036	0,023	0,024
—	0,074	0,082	0,039	0,022	0,054	0,039	0,031	0,028
Блок р54								
10	1,282	0,883	0,553	0,36	0,357	0,218	0,129	0,087
5	0,931	0,63	0,38	0,248	0,213	0,135	0,093	0,046
2,5	0,656	0,411	0,237	0,151	0,141	0,072	0,043	0,027
1,25	0,388	0,171	0,127	0,075	0,082	0,04	0,026	0,02
0,625	0,241	0,137	0,086	0,051	0,059	0,032	0,023	0,014
0,3125	0,15	0,078	0,056	0,033	0,04	0,025	0,008	0,034
0,156	0,11	0,068	0,042	0,025	0,041	0,028	0,015	0,012
—	0,043	0,017	0,012	0,01	0,028	0,016	0	0,007

При виборі оптимальних значень концентрації антигенів та антитіл враховували співвідношення значень оптичної щільності для позитивних та негативних зразків та динаміку зменшення сигналу. Так, при різкому нелінійному зменшенні значення оптичної щільності обирали найближчу попередню концентрацію антигена, оскільки саме вона забезпечувала максимальне насичення поверхні лунки антигеном без надмірного його використання (рис. 3.10).

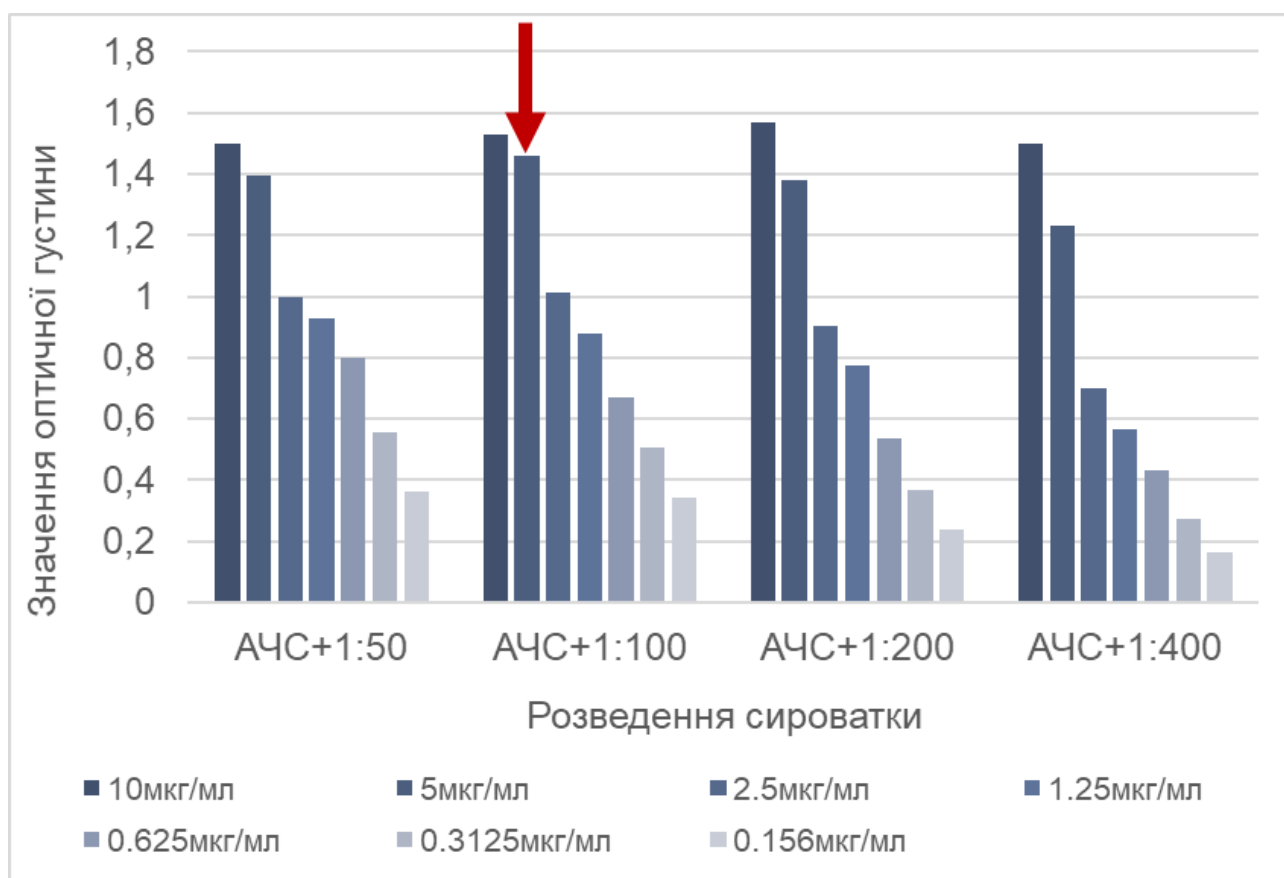


Рис. 3.10. Титрування рекомбінантного білка р32 з позитивною щодо АЧС сироваткою: обрана концентрація позначена стрілкою.

Лінійність титрування визначали за величиною коефіцієнту достовірності апроксимації R^2 для лінійного рівняння, при чому чим ближчим до 1 є значення R^2 , тим точнішою є лінія тренду. Після відбору оптимальної концентрації антигена, обирали оптимальне розведення сироваток, за якого значення оптичної щільності для позитивного зразка були б все ще високими, у той час, як значення оптичної щільності у лунках з негативною сироваткою становило б

приблизно 0,2, що є оптимальним фоновим сигналом при розробці ІФА для тестування зразків від тварин. За цими критеріями оптимальною робочою концентрацією білка р32 було обрано значення 5 мкг/мл. Оптимальне співвідношення значень оптичної щільності для позитивних та негативних зразків спостерігали при розведенні сироваток у співвідношенні 1:100.

Лінійність титрування підтверджується значеннями R^2 , що для різних розведень становили від 0,925 до 0,975 (рис. 3.11).

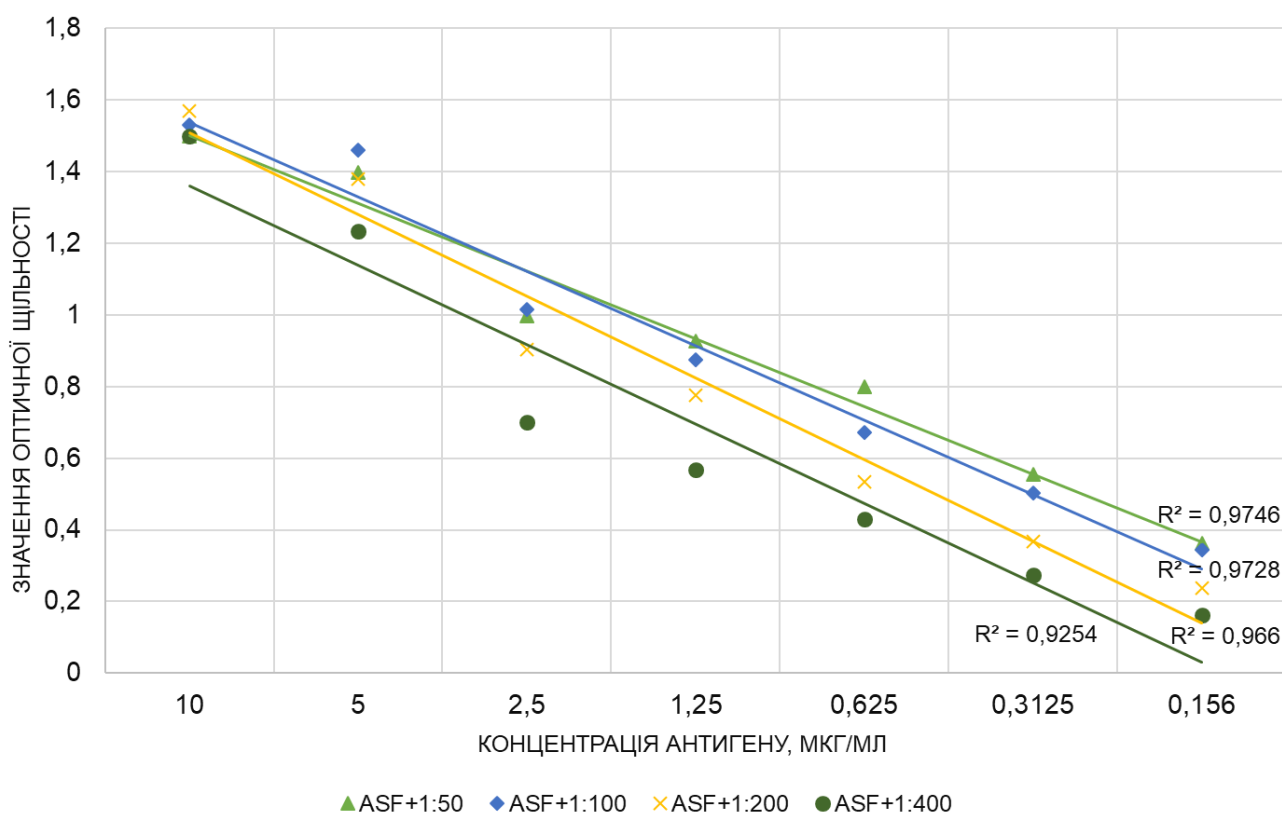


Рис. 3.11. Випробування рекомбінантного білка р32 як антигена з позитивною сироваткою щодо вірусу АЧС.

Також з метою встановлення оптимального розведення вторинних антитіл, проводили їх титрування у двох повторах у співвідношенні 1:10000, 1:20000, 1:30000. У даному випадку нелінійне зниження сигналу спостерігали після розведення 1:10000, тому ця концентрація була відібрана для подальшої роботи як оптимальна.

Титрування білка р54 проводили кілька разів, але не зважаючи на кількаразове підвищення концентрації антигена, який вносили в лунки, максимуму сатурації поверхні планшета, про яке свідчило б різке нелінійне зменшення значення оптичної щільності, досягти не вдавалося. Після цього провели повторне вимірювання концентрації білків в очищених фракціях і з'ясували, що при зберіганні пробірок з аліквотами білка за температури -20°C спостерігалось різке зниження концентрації, що не дало змоги продовжити експерименти з його використанням як антигена для ІФА. Проте, після виявлення причини зниження концентрації та оптимізації умов зберігання очищеного білка, р54 може бути використаний як антигена для ІФА з огляду на його специфічність та низький фоновий сигнал при дослідженні з негативними сироватками.

Після цього за допомогою непрямого ІФА, заснованого на використанні рекомбінантного білка р32, дослідили панель позитивних і негативних референтних щодо вірусу АЧС сироваток крові свиней, усі зразки дослідили у двох повторях. Отримані результати співпали з очікуваними: ані хибно позитивних, ані хибно негативних результатів не спостерігали (рис. 3.12).

Також було проведено дослідження внутрішньосистемного (intra-assay CV, повторюваність) та міжсистемного (inter-assay CV, відтворюваність) коефіцієнтів варіативності розробленого непрямого ІФА. Для ІФА коефіцієнти варіативності відображають розбіжності в значеннях оптичної щільності, отриманих для одних і тих же зразків при тестуванні у повторях в одному та різних планшетах. Для їх визначення використали панель сироваток, що включала один позитивний та один негативний щодо вірусу АЧС зразки. При визначенні повторюваності зразки досліджували на одному планшеті у трьох повторях, при визначенні відтворюваності — у двох повторях на п'яти різних планшетах протягом п'яти днів.

Середнє значення внутрішньосистемного коефіцієнту варіативності становило 3,18 % для позитивної та 1,56 % для негативної сироватки, міжсистемного — 7,59 % для позитивної та 7,30 % для негативної сироватки, що знаходиться в межах допустимих для ІФА значень (табл. 3.2, 3.3).

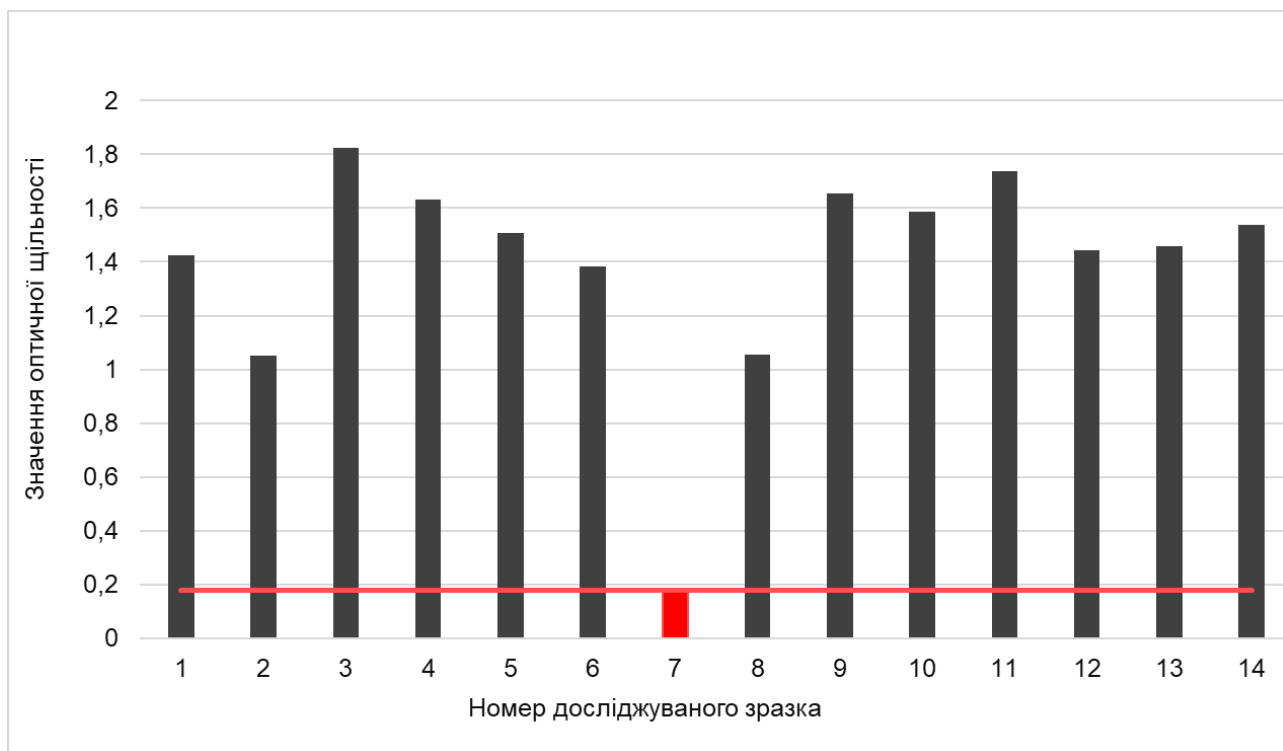


Рис. 3.12. Випробування розробленого ІФА з панеллю позитивних і негативних референтних сироваток від свиней: червоною лінією показане середнє порогове значення оптичної щільності для негативних результатів (0,18).

Таблиця 3.2

Значення міжсистемних коефіцієнтів варіативності результатів ІФА з рекомбінантним білком р32 як антигена при дослідженні позитивної та негативної щодо вірусу АЧС сироватки від свиней

Зразок	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	Середнє значення	Стандартне відхилення	CV, %
Позитивна сироватка	1,626	1,56	1,5065	1,499	1,319	1,502	0,114	7,59
Негативна сироватка	0,1755	0,1735	0,16	0,16	0,19	0,171	0,0125	7,30

**Значення внутрішньосистемних коефіцієнтів варіативності результатів
ІФА з рекомбінантним білком р32 як антигена при дослідженні позитивної
та негативної щодо вірусу АЧС сироватки від свиней**

Зразок	Результати повтору 1	Результати повтору 2	Результати повтору 3	Середнє значення	Стандартне відхилення	CV, %
Позитивна сироватка	1,469	1,554	1,475	1,49	0,0474	3,18
Негативна сироватка	0,16	0,158	0,163	0,16	0,0025	1,56

Таким чином, нами було розроблено регламент отримання рекомбінантних білків вірусу АЧС р10, р32, р54, лігаза, р54ΔТМ, лігазаΔДЗД, і одержано їх експериментальні зразки. Також удосконалено протокол очищення вказаних продуктів. Для білків р32 та р54 показані антигенні властивості та специфічність при тестуванні з позитивними та негативними щодо вірусу АЧС сироватками крові від свиней. Встановлено ефективність використання очищеного за протоколом солюбілізації з використанням детергентів рекомбінантного білка р32 як антигена при проведенні ІФА з позитивними та негативними щодо вірусу АЧС сироватками. Робочі концентрації компонентів для проведення аналізу методом непрямого ІФА становили 5 мкг/мл антигена, досліджувані сироватки використовувалися у розведенні 1:100, а вторинні антитіла — у розведенні 1:10000.

Результати експериментальних досліджень, наведені у даному підрозділі, опубліковано у таких працях [46, 201, 205]:

1. **Kit, M. Yu.** 2021. “Development of recombinant antigen expression and purification for African swine fever serological diagnostics.” *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety* 7, no. 3: 24–31. <https://doi.org/10.36016/jymbbs-2021-7-3-4>.

2. Buzun, A.-I., **M. Kit**, M. Stegnyy, and I. Bobrovickaya. 2022. “Vers l’farm initiative: Comment un antigène artificiel de la peste porcine africaine peut aider l’exportation agricole de l’Ukraine”. *ΛΟΓΟΣ*, no. July 8, 2022 [3rd International Scientific and Practical Conference “Débats Scientifiques et Orientations Prospectives du Développement Scientifique”, Paris, France, July 8, 2022]: 138–42. <https://doi.org/10.36074/logos-08.07.2022.037>.

3. **Kit, M. Ю.**, О. Б. Зленко, та Т. Б. Дідик. 2024. *Методичні рекомендації «Отримання рекомбінантного антигену р32 для ІФА-діагностики АЧС»* [затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 8 від 23.10.2024 р.]. Харків: ННЦ «ІЕКВМ».

3.2 Розробка рекомбінантного позитивного контрольного зразка для ПЛР-детекції вірусу АЧС

Методи молекулярної діагностики вважаються золотим стандартом при проведенні рутинної діагностики та моніторингових досліджень у лабораторіях першої лінії, особливо при спалахах емерджентних інфекційних хвороб, якою є АЧС. Перевагами цих методик є висока чутливість та швидкість проведення аналізу, а також можливість тестувати за їх допомогою різноманітний клінічний матеріал та виявляти різні генотипи вірусу, у тому числі негемадсорбуючі штами. Згідно рекомендацій ВООЗТ, для детекції ДНК вірусу АЧС використовують класичну ПЛР та ПЛР у режимі реального часу. Ці методики направлені на ідентифікацію послідовностей ДНК у позиціях 115–371 [105], 648–714 [106] and 1627–1877 [107] гена *b646l*, що кодує головний капсидний білок вірусу.

При проведенні ПЛР для отримання надійних результатів необхідно використовувати позитивний контрольний зразок. З міркувань біобезпеки використання ДНК з культури вірусу як позитивний контроль є небажаним, безпечною та надійною альтернативою у такому випадку є плазмідний контроль. Тому ми розробили універсальний позитивний контрольний зразок,

який може бути використаний при проведенні усіх трьох рекомендованих ВООЗТ варіантів ПЛР-детекції вірусу АЧС.

На першому етапі була розроблена карта плазмід (рис. 3.13). За допомогою програми була проведена віртуальна лігація ПЛР-продукту фрагмента цільового гена та обраного вектору рTZ57R/T та отримана фінальна карта з урахуванням клонованого продукту. Для цього нуклеотидні послідовності вектору рTZ57R/T та вставки було завантажені до програми Clone Manager Professional v. 9. За її допомогою визначили та візуалізували всі функціональні елементи плазмід. На карті вказано гени, що відповідають за селективні маркери *LacZ* і *Amp*, точку початку реплікації *ori*, рестрикційні сайти та вставку фрагмента цільового гена вірусу АЧС.

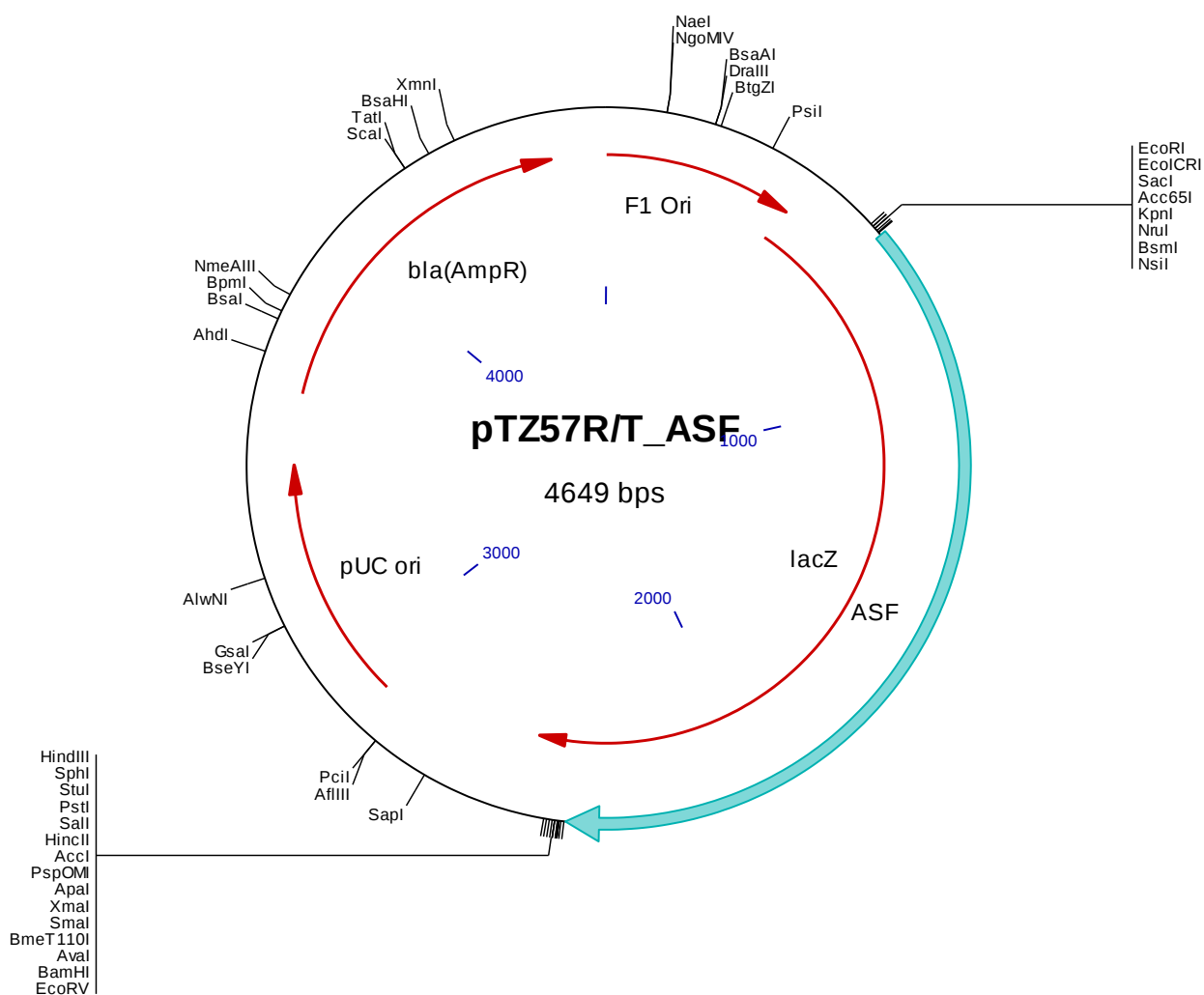


Рис. 3.13. Карта рекомбінантної плазміді рTZ57R/T_ASF: блакитною стрілкою позначено вставку фрагмента генома вірусу АЧС.

Попередньо ампліфікований фрагмент гена *b646l* розміром 1763 п. н. було лігійовано до плазмідного вектора pTZ57R/T. Загальна довжина результуючої плазміди становила 4649 п. н. Після проведення селекції трансформованих клітин, було проведено ПЛР-скринінг 10 білих колоній і встановлено, що всі вони містять цільовий фрагмент гена *b646l* розміром 1763 п. н.

Для визначення мінімальної кількості копій плазміди, що детектується ПЛР було отримано панель серійних десятикратних розведень, що містила 10^5 , 10^4 , 10^3 , 100 та 10 копій плазмідної ДНК в 1 мкл. Плазміда pTZ57R/T_ASF виявляється класичною ПЛР (рис. 3.14) та ПЛР у режимі реального часу (рис. 3.15) у розведенні до 10 копій/мкл, що відповідає 20 копіям цільового гена на реакцію. Позитивний результат, отриманий двома методами, підтверджує, що цільовий фрагмент було правильно лігійовано до вектору та сконструйована плазміда може бути використана як позитивний контрольний зразок для ПЛР-детекції вірусу АЧС.

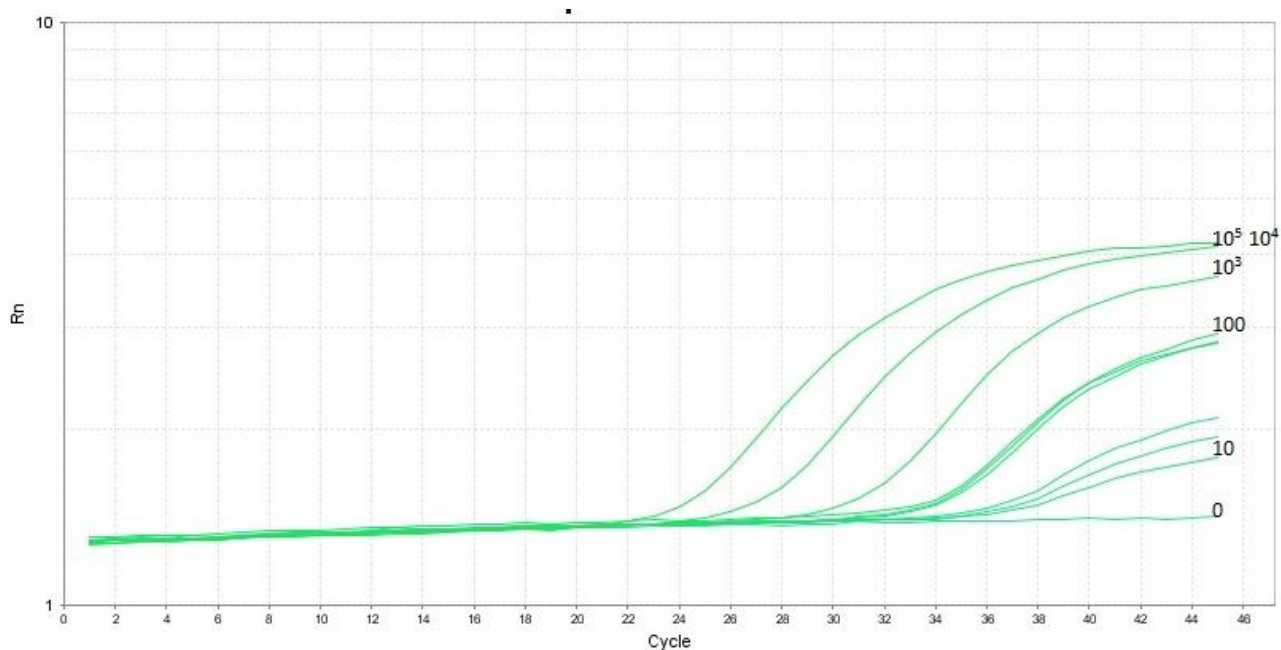


Рис. 3.14. Результат детекції мінімальної кількості копій плазміди pTZ57R/T_ASF за допомогою ПЛР у режимі реального часу.

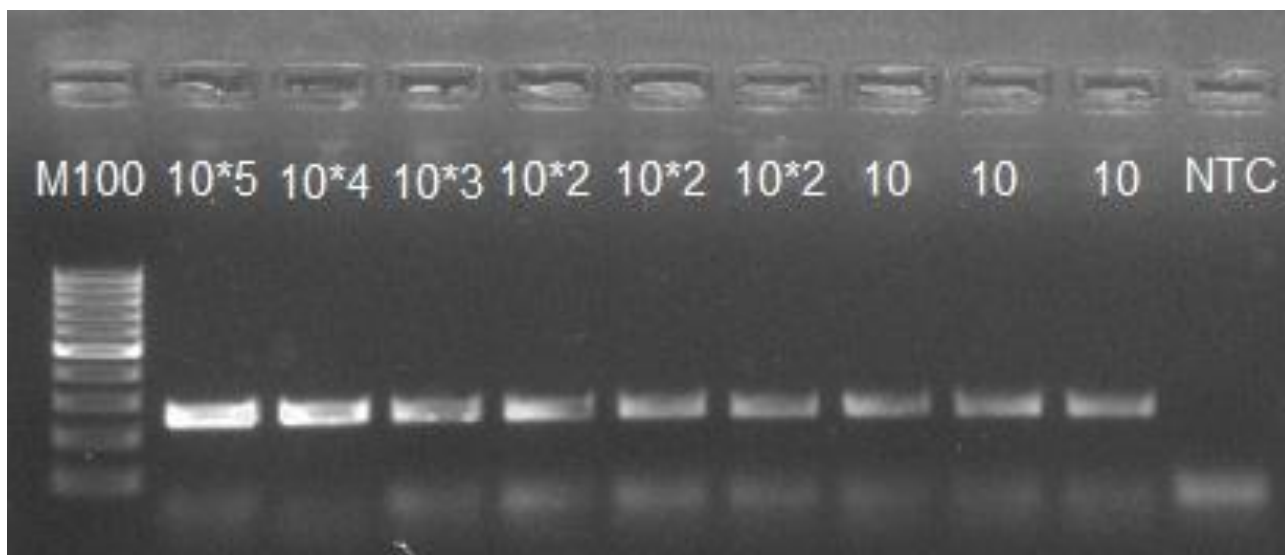


Рис. 3.15. Результат детекції мінімальної кількості копій плазміди pTZ57R/T_ASF за допомогою класичної ПЛР: M100 — маркер молекулярної маси, 10*5 — 10 концентрація аналіту (коп./мкл), NTC — негативний контроль (дейонізована вода).

Отже, ми отримали ампіцилін-резистентні клони *E. coli* штаму DH5α, що несуть сконструйовану плазмиду pTZ57R/T_ASF зі вставкою фрагмента гена *b646l* довжиною 1763 п. н. Розмножена та очищена з бактеріальної культури плазмідна може бути використана як позитивний контрольний зразок при проведенні ПЛР-детекції вірусу АЧС усіма рекомендованими ВООЗ методами.

Результати експериментальних досліджень, наведені у даному підрозділі, опубліковано у таких працях [124, 202]:

1. **Kit, M.,** O. Zlenko, O. Solodiankin, V. Bolotin, and A. Gerilovych. 2020. “Development of recombinant positive control for African swine fever virus PCR detection.” *Biotechnologia Acta* 13, no. 6: 58–63. <https://doi.org/10.15407/biotech13.06.058>.

2. **Kit, M.,** O. Solodyankin, V. Arefiev, V. Bolotin, and A. Gerilovych. 2018. “Development of universal positive DNA-control of ASF virus and validation of real-time PCR with its use.” in *3rd Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Kyiv, Ukraine, April, 16–20, 2018*, 118.

3.3 Розробка тест-системи для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу

Після розробки рекомбінантного позитивного контрольного зразка для ПЛР-детекції вірусу АЧС, його використали при розробці «Тест-системи для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней методом полімеразної ланцюгової реакції «Sui-DNA-test-ASF virus». Також у цій тест-системі використовували праймери для детекції фрагмента гена *b646l* вірусу АЧС [47], комерційні реагенти для проведення ПЛР у режимі реального часу виробництва Applied Biosystems (США) та внутрішній контрольний зразок ДНК (Quiagen, Німеччина).

До складу тест-системи на проведення 50 аналізів, включаючи контрольні зразки, входили:

- «RT-PCR MasterMix» — 1 пробірка, 0,5 мл;
- розчин зонду ASFV probe (10 пмоль/мкл) — 1 пробірка, 0,025 мл;
- розчин праймерів ASFV-1 та ASFV-2 (20 пмоль/мкл) — по 1 пробірці, 0,02 мл (кожного);
- вода деіонізована — 1 пробірка, 0,5 мл;
- позитивний контрольний зразок (на 5 реакцій) — 1 пробірка, 0,01 мл.
- суміш розчинів праймерів та зонду для детекції внутрішнього позитивного контролю IC-mix (20 пмоль/мкл) — 1 пробірка, 0,1 мл;
- внутрішній позитивний контроль (на 50 реакцій) — 1 пробірка, 0,25 мл.

Було проведено дослідження її специфічності і чутливості, а також повторюваності результатів, отриманих за допомогою розробленої тест-системи, що представлено у таблиці 3.4. Усі дослідження проводили без змін у рекомендованих умовах перебігу реакції, вказаних у листівці-вкладці до тест-системи для детекції вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus».

**Результати випробовування тест-системи для детекції вірусу АЧС методом
ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus» з використанням
панелі позитивних, негативних і гетерогенних зразків**

№	Матеріал	Результат повтору 1 (досліджу- ваний зразок/ВКЗ)	Результат повтору 2 (досліджува- ний зразок/ВКЗ)	Результат повтору 3 (досліджува- ний зразок/ВКЗ)
1	2	3	4	5
1	ДНК дикої свині, інфікованої вірусом АЧС	Ct 18,6/Н/в*	Ct 19,1/Н/в	Ct 18,2/Н/в
2	ДНК домашньої свині, інфікованої вірусом АЧС	Ct 19,3/Н/в	Ct 18,7 /Н/в	Ct 18,5/Н/в
3	Плазмідна ДНК pTZ57R/T_ASF, концентрація $1 \cdot 10^5$ копій/мкл	Ct 23,2/Н/в	Ct 23,4/Н/в	Ct 23,1/Н/в
4	Плазмідна ДНК pTZ57R/T_ASF, концентрація $1 \cdot 10^4$ копій/мкл	Ct 26,1/Н/в	Ct 25,9/Н/в	Ct 26,2/Ct Н/в
5	Плазмідна ДНК pTZ57R/T_ASF, концентрація $1 \cdot 10^3$ копій/мкл	Ct 30,1/Н/в	Ct 30,3/Н/в	Ct 30,4/Н/в
6	Плазмідна ДНК pTZ57R/T_ASF, концентрація $1 \cdot 10^2$ копій/мкл	Ct 33,7/Н/в	Ct 33,7/Н/в	Ct 33,9/Н/в

1	2	3	4	5
7	Плазмідна ДНК pTZ57R/T_ASF, концентрація 10 копій/мкл	Ct 37,9/Н/в	Ct 37,3/Н/в	Ct 37,6/Н/в
8	ПВС (штам «Nadle»)	Н/д**/Ct 29,7	Н/д/Ct 28,3	Н/д/Ct 28,5
9	Артеріовірус свиней (штам «Lellistad»)	Н/д/Ct 26,8	Н/д/Ct 26,1	Н/д/Ct 26,1
10	ЦВС II (штам «I-1024»)	Н/д/Ct 29,5	Н/д/Ct 28,3	Н/д/Ct 28,0
11	Тешовірус (штам «Буча»)	Н/д/Ct 26,7	Н/д/Ct 26,2	Н/д/Ct 27,4
12	Вірус хвороби Ауєскі (штам УНДІЕВ-18в)	Н/д/Ct 27,9	Н/д/Ct 29,1	Н/д/Ct 28,3
13	<i>S. Typhimurium</i>	Н/д/Ct 28,7	Н/д/Ct 28,2	Н/д/Ct 27,9
14	<i>E. coli</i>	Н/д/Ct 28,4	Н/д/Ct 28,2	Н/д/Ct 27,7
15	ДНК з культури клітин РК-15	Н/д/Ct 29,5	Н/д/Ct 29,9	Н/д/Ct 30,3
16	Негативний контроль виділення нуклеїнових кислот (вода дейонізована)	Н/д/Ct 26,7	Н/д/Ct 27,2	Н/д/Ct 26,2
17	Негативний контроль реакційної суміші (вода дейонізована)	Н/д/Н/д	Н/д/Н/д	Н/д/Н/д

Примітки: Н/в — не визначали; Н/д — не детектовано.

Таким чином, при дослідженні чутливості тест-системи було встановлено здатність ідентифікувати всі позитивні зразки, що містили ДНК вірусу АЧС. Також за допомогою діагностикуму було проведено детекцію плазмідної ДНК у всіх розведеннях і встановлено, що тест-система виявляє плазмідну ДНК при розведенні до 10 копій/мкл або 20 копій/реакція. Специфічність тест-системи підтверджується відсутністю значень C_t при дослідженні генетичного матеріалу інших вірусів та бактерій, що спричиняють захворювання свиней. Відсутність хибнонегативних результатів підтверджується наявністю значень C_t для внутрішнього контрольного зразка. Також при аналізі ДНК, виділеного з клітин лінії РК-15 показано, що праймери не гібридизуються з ДНК свині. Шляхом проведення всіх досліджень у трьох повторях за однакових умов було встановлено, що результати аналізу з використанням тест системи для детекції вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus» є відтворюваними, що підтверджується низьким значенням внутрішньосистемного коефіцієнту варіативності отриманих позитивних щодо АЧС результатів, який становить становить 1,07 %.

Тест-система для детекції вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus» пройшла державні комісійні випробування на базі Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів та є зареєстрованим в Україні ветеринарним імунобіологічним препаратом (реєстраційне посвідчення №ВВ-00896-06-18).

Результати експериментальних досліджень, наведені у даному підрозділі, опубліковано у таких працях [87, 123]:

1. Стегній, Б. Т., О. С. Солодянкін, О. Ю. Лиманська, **М. Ю. Кіт**, А. І. Бузун, та В. Л. Ареф'єв. 2018. "Вивчення специфічності та чутливості тест-системи для детекції вірусу африканської чуми свиней методом ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus»". *Ветеринарна медицина* 104: 359–62. https://jvm.kharkov.ua/sbornik/104/VetMed_104.pdf.

2. Стегній, Б. Т., О. С. Солодянкін, А. П. Герілович, О. В. Піщанський, А. О. Меженський, М. А. Сапачова, Н. Г. Рудова, **М. Ю. Кіт**, та А. В. Кузьмінов.

2019. Тест-система для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції «Sui-DNA-test-ASF virus». Патент України на корисну модель 133163, поданий 22 жовтня 2018 р., та опублікований 25 березня 2019 р. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1340792>. (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень та оформленні документів на патент).

3.4 Розробка способу детекції ДНК вірусу АЧС за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації (LAMP)

Петльова ізотермічна ампліфікація (LAMP) є методом молекулярної діагностики, що може бути швидкою альтернативою ПЛР. Проведення аналізу за допомогою LAMP не вимагає використання складного та високовартісного обладнання. Використання 6 пар праймерів, що розпізнають 8 цільових послідовностей, робить даний метод високо специфічним, а застосування *Bst* ДНК-полімерази забезпечує швидке отримання результату. Оскільки реакція проходить за сталої температури, можливим є проведення діагностичних досліджень з використанням такого простого обладнання як твердотільний термостат або водяна баня. Тому нами був розроблений новий спосіб виявлення ДНК вірусу АЧС на основі LAMP, що міг би бути використаний для проведення експрес-діагностики АЧС в лабораторіях з обмеженими ресурсами та, у разі необхідності, навіть у польових умовах.

При розробці праймерів було сформовано базу даних повногеномних послідовностей вірусу АЧС, проведено їх множинне вирівнювання, пошук консервативних фрагментів та проведено дизайн праймерів. Так, було розроблено 19 систем праймерів для детекції ДНК вірусу АЧС методом петлевої ізотермічної ампліфікації, з яких далі було відібрано ті, що відповідають необхідним фізичним критеріям (довжина, вміст GC основ, температура плавлення, зміна вільної енергії) (табл. 3.5).

**Консервативні фрагменти генома вірусу АЧС,
обрані для дизайну праймерів**

№	Фрагмент згідно геномної карти ізоляту Georgia 2007/1 (GenBank: FR682468.2)	Ген	Кількість розроблених систем праймерів	
			загальна	відповідають критеріям
1	83951–84259	<i>c717r</i>	2	0
2	102990–103219	<i>b385r</i>	1	0
3	84984–85345	<i>c257l</i>	5	0
4	90310–90639	<i>c962r</i>	5	1
5	91091–91368	<i>c962r</i>	1	1
6	89036–89931	<i>c962r</i>	5	1

За вказаними вище критеріями було відібрано 3 системи праймерів (табл. 2.2), що ампліфікують різні фрагменти гена *c962r*, який кодує потенційну ДНК праймазу вірусу АЧС. До двох систем праймерів вдалося підібрати петлеві праймери, що прискорюють перебіг реакції та підвищують інтенсивність ампліфікації.

Після цього ми провели попереднє дослідження всіх трьох розроблених систем праймерів. Електрофоретичний аналіз продуктів реакції показав, що дві системи праймерів з трьох забезпечують специфічний перебіг реакції, що супроводжується синтезом амплікону (рис. 3.16).

Проте у реакції з використанням системи праймерів № 2 ступінчатий патерн був більш чітким і виразним. Перебіг реакції з використанням тільки зовнішніх і внутрішніх праймерів (система праймерів № 3) не був успішним і синтез амплікону не відбувався.

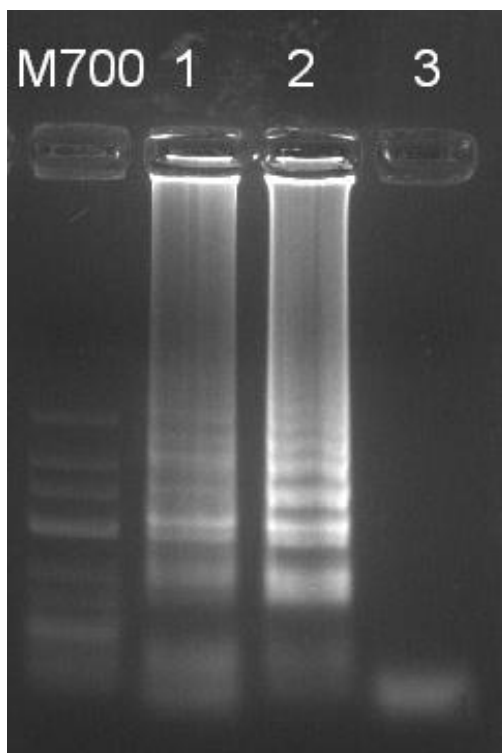


Рис. 3.16. Результат електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі продуктів реакції петльової ізотермічної ампліфікації з використанням розроблених систем праймерів: сет 1 (1), сет 2 (2), сет 3 (3).

Для подальших досліджень нами було обрано систему праймерів 2, оскільки амплікон за її використання синтезувався найбільш ефективно. Іноді під час оптимізації протоколу проведення реакції, різниця інтенсивності флуоресценції при візуалізації різних зразків за допомогою гель-електрофорезу була незначною. У такому випадку продукт реакції додатково візуалізували шляхом додавання броміду етидію безпосередньо до пробірок з ампліконом з подальшим переглядом в умовах опромінення світлом УФ діапазону довжиною хвилі 312 нм, що давало можливість визначити пробірку з найінтенсивнішим синтезом продукту реакції (рис. 3.17).

При проведенні реакції за різних температур різниця ефективності її перебігу була незначною, проте найяскравішу флуоресценцію спостерігали при ампліфікації за температури 59 °C та 60 °C. Підвищення тривалості перебігу реакції до значень більших за 40 хв не впливало на результат ампліфікації. Зважаючи на це, оптимальними умовами проведення реакції було обрано ампліфікацію за температури 60 °C упродовж 40 хв.

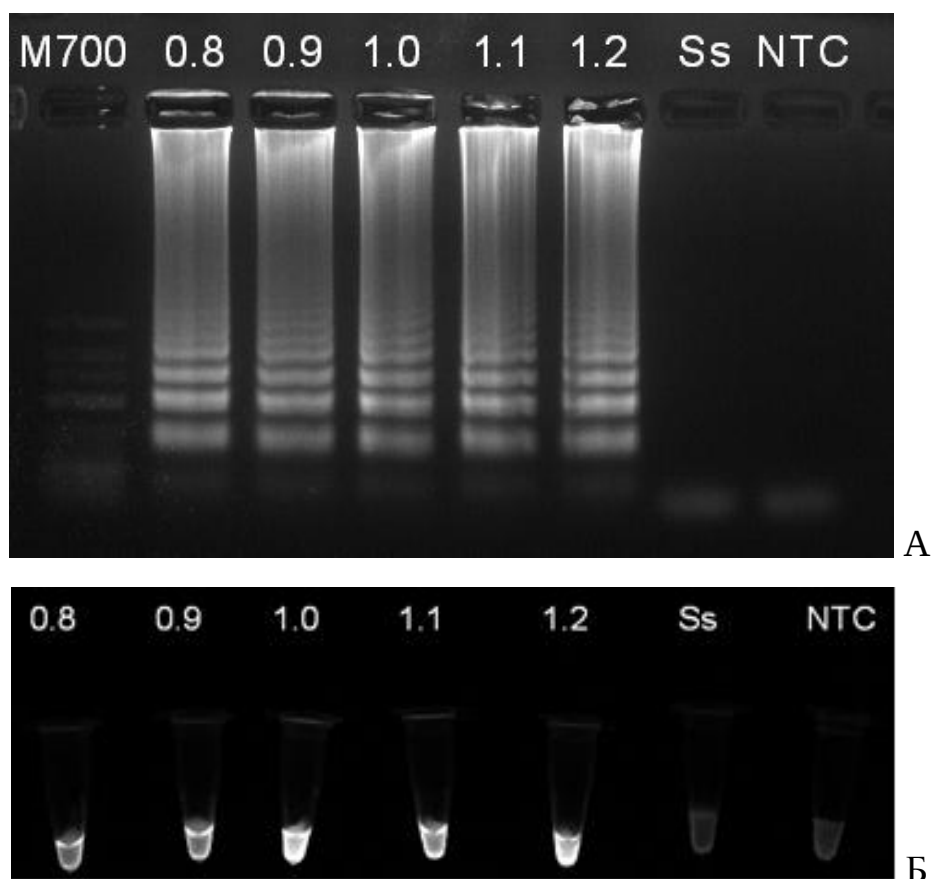


Рис. 3.17. Візуалізація продуктів LAMP шляхом проведення електрофорезу в агарозному гелі (А) та опромінення УФ-світлом після додавання броміду етидію (Б): 0,8–1,2 — концентрація бетаїну (мМ), Ss — ДНК *Sus scrofa*, NTC — негативний контроль (деіонізована вода).

Оптимізований пропис приготування 25 мкл реакційної суміші включав 0,2 мкМ праймерів F3/B3, 0,4 мкМ праймерів LF/LB, 1,6 мкМ праймерів FIP/BIP, 6 мМ суміші ДНТФ, 1х буфер для ізотермічної ампліфікації, 6 мМ MgSO_4 , 1 мМ бетаїну, 10 од. *Bst* ДНК полімерази. До 20 мкл реакційної суміші додавали 5 мкл досліджуваного зразка.

Для визначення ліміту детекції було використано панель серійних 10-кратних розведень цільової послідовності довжиною 170 п. н., що була попередньо синтезована за допомогою ПЛР, очищена та для якої була обчислена кількість копій цільового гена. У результаті проведення реакції ампліфікації зі зразками з концентрацією цільової послідовності від 10^{10} до однієї копії в мікролітрі, продукт з чітким ступінчастим патерном був синтезований у 10 зразках із 11 (рис. 3.18).

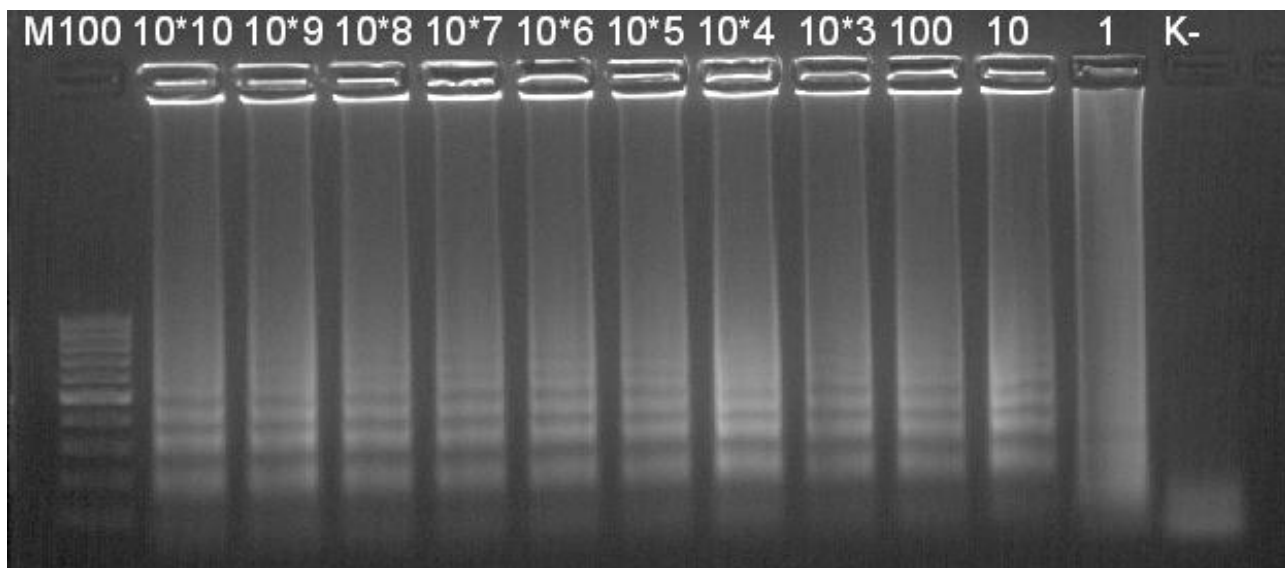


Рис. 3.18. Аналітична чутливість способу детекції гена *c962r* вірусу АЧС на основі петльової ізотермічної ампліфікації: M100 — маркер молекулярної маси, 10^{10} –1 — концентрація аналіту (копій/мкл), K — негативний контроль (дейонізована вода).

Продукт реакції, що містила зразок з однією копією/мкл, не показав наявності специфічного патерну при електрофоретичному аналізі, але певна кількість ДНК, що може бути детектована методом гель-електрофорезу, була синтезована. Таким чином, ліміт детекції розробленого способу детекції ДНК вірусу АЧС за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації становив 10 копій цільової послідовності в мкл, що відповідає 50 копіям на реакцію.

Дослідження аналітичної специфічності розробленої методики проводили шляхом тестування зразків ДНК та кДНК вірусу АЧС та інших вірусних і бактеріальних патогенів, що спричиняють у свиней схожі на АЧС симптоми, детектуючи результати у режимі реального часу. Панель референтних зразків ДНК вірусу АЧС включала зразки, що належали до 3 генотипів, виділені з матриксів різного типу. Розроблений спосіб детекції ДНК вірусу АЧС продемонстрував абсолютну специфічність, не показавши ані хибно позитивних, ані хибно негативних результатів (рис. 3.19, табл. 3.6). Синтез продукту реакції не спостерігався і при дослідженні зразків ДНК,

екстрагованих з лімфовузлів свині, що були використані як негативний контроль при оптимізації протоколу проведення реакції.

Таблиця 3.6

**Результати тестування панелі гетерологічних зразків
нуклеїнових кислот за допомогою методу LAMP**

№	Досліджуваний зразок	Результати повтору 1, хв до отримання позитивного результату	Результати повтору 2, хв до отримання позитивного результату	Результати повтору 3, хв до отримання позитивного результату
1	кДНК вірусу РРСС	н/д	н/д	н/д
2	ДНК ЦВС-2	н/д	н/д	н/д
3	ДНК <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	н/д	н/д	н/д
4	ДНК вірусу хвороби Ауескі	н/д	н/д	н/д
5	ДНК <i>Pasteurella multocida</i>	н/д	н/д	н/д
6	кДНК вірусу КЧС	н/д	н/д	н/д
7	Вода деіонізована	н/д	н/д	н/д
8	Амплікони цільового фрагмента, 10 ⁵ копій/мкл	25,8	26,91	26,79

Примітка. н/д — не детектовано.

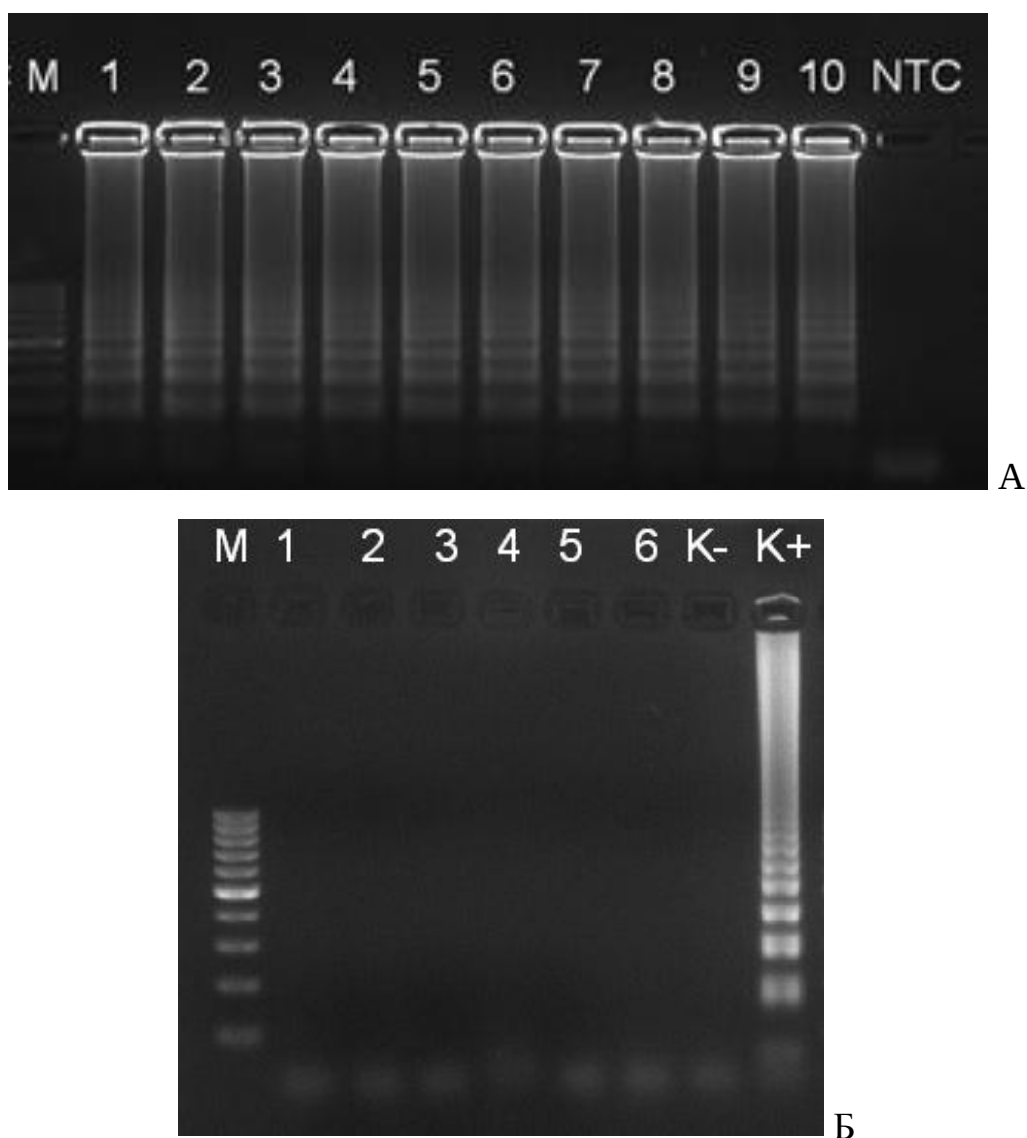


Рис. 3.19. Дослідження специфічності розробленої методики з використанням позитивних (А) та гетерологічних зразків ДНК: А. 1–10 — референтні зразки ДНК вірусу АЧС (нумерація згідно табл. 3.6), NTC — негативний контрольний зразок (дейонізована вода); Б. 1 — вірус РРСС, 2 — ПЦВ, 3 — вірус хвороби Ауєскі, 4 — вірус КЧС, 5 — *P. multocida*, 6 — *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

При дослідженні панелі референтних зразків з детекцією у режимі реального часу, було встановлено повторюваність отриманих за допомогою розробленої методики результатів (табл. 3.7). Середній коефіцієнт варіативності для різних зразків складає 1,81 %, що є досить низьким значенням і знаходиться в межах 10 %, що є загальноприйнятим максимальним допустимим значенням для діагностичних методів.

Результати тестування панелі референтних зразків ДНК вірусу АЧС за допомогою методу петльової ізотермічної ампліфікації

№	Досліджу- ваний зразок	Результати повтору 1, хв до отримання позитивного результату	Результати повтору 2, хв до отримання позитивного результату	Результати повтору 3, хв до отримання позитивного результату	Середнє значення для трьох повторів	Повторю- ваність (Intra- assay CV, %)
1	2	3	4	5	6	7
1	ДНК вірусу АЧС, ізолят Sardinia	12,87	12,58	12,6	12,68± 0,162	1,28
2	ДНК вірусу АЧС, ізолят Sardinia	13,85	13,9	13,62	13,79± 0,149	1,08
3	ДНК вірусу АЧС, ізолят Estonia	15,15	14,91	14,87	14,98± 0,151	1,01
4	ДНК вірусу АЧС, ізолят Estonia	16,4	15,67	15,72	15,93± 0,408	2,56
5	ДНК вірусу АЧС, ізолят Kenia05	13,48	13,13	13,46	13,36± 0,197	1,47

Таблиця 3.7

1	2	3	4	5	6	7
6	ДНК вірусу АЧС, ізолят Kenia05	13,52	13,6	13,69	13,60± 0,085	0,63
7	ДНК вірусу АЧС, ізолят Netherlands86	13,56	13,34	13,13	13,34± 0,215	1,61
8	ДНК вірусу АЧС, ізолят Estonia	16,76	15,31	16,79	16,29± 0,846	5,19
9	ДНК вірусу АЧС, ізолят Kenia05	14,71	14,38	14,94	14,68± 0,281	1,92
10	ДНК вірусу АЧС, ізолят Sardinia	13,92	14,22	14,26	14,13± 0,186	1,31
11	Вода деіонізована	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д

Примітка. н/д — не детектовано.

Отже, було розроблено швидкий та специфічний метод детекції гена *c962r* вірусу АЧС на основі петльової ізотермічної ампліфікації, за допомогою якого можна детектувати 10 копій цільової послідовності в 1 мкл досліджуваного зразку протягом 40 хв. Завдяки простоті проведення реакції та мінімальній кількості обладнання, необхідній для цього, можливим є використання даної методики для проведення експрес-діагностики АЧС у лабораторіях з обмеженими ресурсами.

Результати експериментальних досліджень, наведені у даному підрозділі, опубліковано у таких працях [125, 200, 203]:

1. **Kit, M.**, J. Schwarz, and A. Gerilovych. 2021. “Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on the C962R gene for African swine fever virus detection”. *Agricultural Science and Practice* 8, no. 3: 3–12. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.03.003>.

2. Герілович, А. П., та **М. Ю. Кіт**. 2021. *Детекція ДНК вірусу африканської чуми свиней методом петльової ізотермічної ампліфікації (методичні рекомендації)* [затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 3 від 3.11.2021 р.]. Харків: ННЦ «ІЕКВМ».

3. **Kit, M.**, and A. Gerilovych. 2021. “Development of DNA detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification.” in *2021 International BioThreat Reduction Symposium, Kyiv, Ukraine, 29 June, 29–July, 2*, 64.

3.5 Удосконалення методу відбору зразків ротової рідини від диких свиней в польових умовах та скринінг генетичного матеріалу збудника АЧС у цих зразках

Відбір зразків ротової рідини є однією з небагатьох альтернатив іншим типам зразків біологічного матеріалу від диких свиней, що може бути проведений прижиттєво. Під час польових досліджень на території Харківського та Чугуївського районів Харківської обл. у 2020 та 2021 рр. було розповсюджено 250 приманок, за допомогою яких зібрано 101 зразок ротової рідини від диких тварин (49 та 52 зразки у 2020 та 2021 рр. відповідно).

Після цього підібрали протокол виділення ротової рідини з приманок, для чого встановили оптимальний час та температуру інкубації поживаних тваринами канатів з буфером (25 °C впродовж 30 хв), а також удосконалили метод екстракції нуклеїнових кислот з отриманих зразків. Було показано, що центрифугування зразка об'ємом 1,5 мл та використання для подальшої

екстракції ДНК отриманої пелети, є більш ефективним за екстракцію з власне ротової рідини.

Усі зразки досліджували щодо наявності ДНК свині за ампліфікацією ділянки гена *nd5* з метою встановлення видової приналежності тварин, ротову рідину яких було відібрано. На першому етапі досліджень, виявлення генетичного матеріалу свині проводили за допомогою ПЛР, однак ампліфікація екстрагованих зразків ДНК проходила дуже слабо або не відбувалася взагалі, про що свідчила присутність маловиразних ампліконів або взагалі їх відсутність. Ми припустили, що це може бути пов'язано з наявністю у зразках екстрактів ДНК слідових кількостей компонентів приманки (ліпіди, білки), що інгібували перебіг ПЛР. Для зменшення вмісту цих інгібіторів зробили серійне розведення екстрагованих зразків ДНК та провели ПЛР з їх використанням. Ампліфікацію спостерігали в реакціях з використанням розведень ДНК-екстрактів 10^{-1} та 10^{-2} , проте існував ризик, що концентрація ДНК у такому розведенні може бути занадто низькою для успішної детекції за допомогою ПЛР.

Відомо, що реакція петльової ізотермічної ампліфікації є менш чутливою до дії інгібіторів, тому нами були розроблені праймери для детекції ДНК свині (гена *nd5*) за допомогою цього методу. Досліджуючи первинні зразки ДНК та їх розведення 10^{-1} і 10^{-2} , порівняли ефективність ампліфікації цільового гена методом ПЛР та LAMP. Було встановлено, що при дослідженні зразків ДНК, виділеної з різних зразків ротової рідини, петльова ізотермічна ампліфікація проходила для розведення 10^{-1} , а для деяких зразків навіть при використанні первинних екстрагованих ДНК (рис. 3.20). Для детекції генетичного матеріалу свині у подальших дослідженнях було обрано метод петльової ізотермічної ампліфікації. При цьому зразки екстрагованої з ротової рідини ДНК у розведенні 10^{-1} об'єднували у пули по 2. Було встановлено, що 28 пулів з 51 містили генетичний матеріал *S. scrofa*, відповідно, ці зразки ротової рідини належали диким свиням.

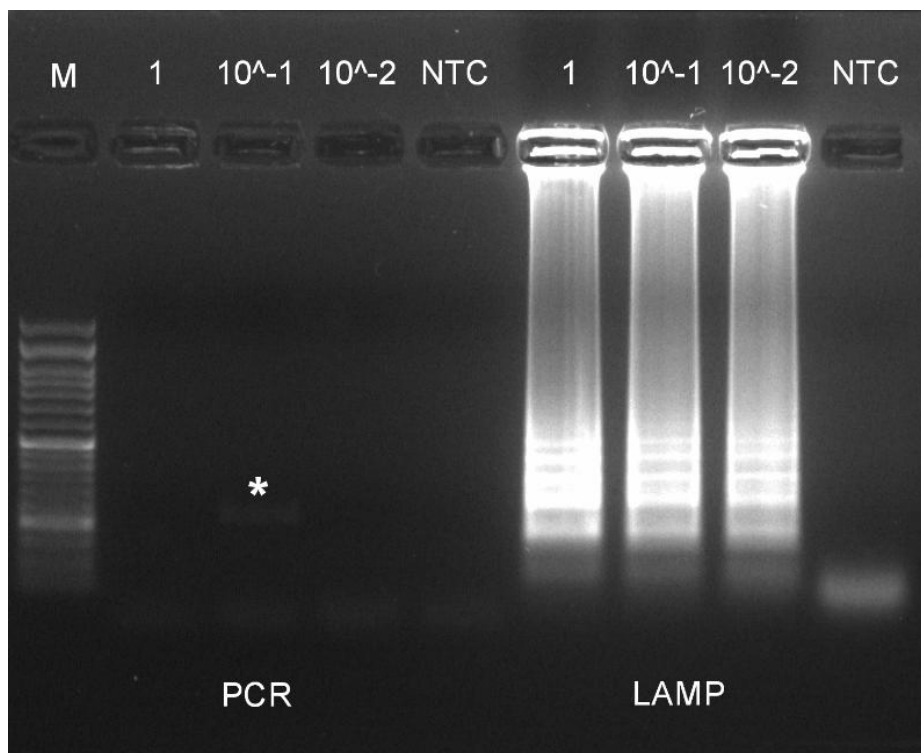


Рис. 3.20. Порівняння ампліфікації фрагментів гена *nd5* *S. scrofa* за допомогою ПЛР (PCR) та петльової ізотермічної ампліфікації (LAMP): 1 — первинна ДНК, виділена зі зразка ротової рідини, 10^{-1} , 10^{-2} — послідовні десяткові розведення ДНК, 10^{-1} та 10^{-2} відповідно; зірочкою позначено амплікон цільової довжини (250 пн).

Після цього, зразки, що входили до позитивних щодо генетичного матеріалу свині пулів, досліджували за допомогою розробленого нами методу LAMP для детекції фрагмента гена *c962r* вірусу АЧС. Було встановлено, що 8 зразків, із 49 зібраних у 2020 році (16 %) та 7 зразків із 52 зібраних у 2021 (13,5 %) містили генетичний матеріал збудника АЧС. Усі позитивні щодо вірусу АЧС зразки було зібрано в лісах на території Чугуївського р-ну Харківської обл. (рис. 3.21).

Таким чином, було вдосконалено спосіб відбору зразків ротової рідини від диких свиней методом оральних змивів на канат з приманкою, розроблено метод детекції генетичного матеріалу *S. scrofa* за допомогою реакції петльової ізотермічної ампліфікації, зібрано зразки ротової рідини від диких свиней та показана можливість виявлення в таких зразках генетичного матеріалу свині та вірусу АЧС.

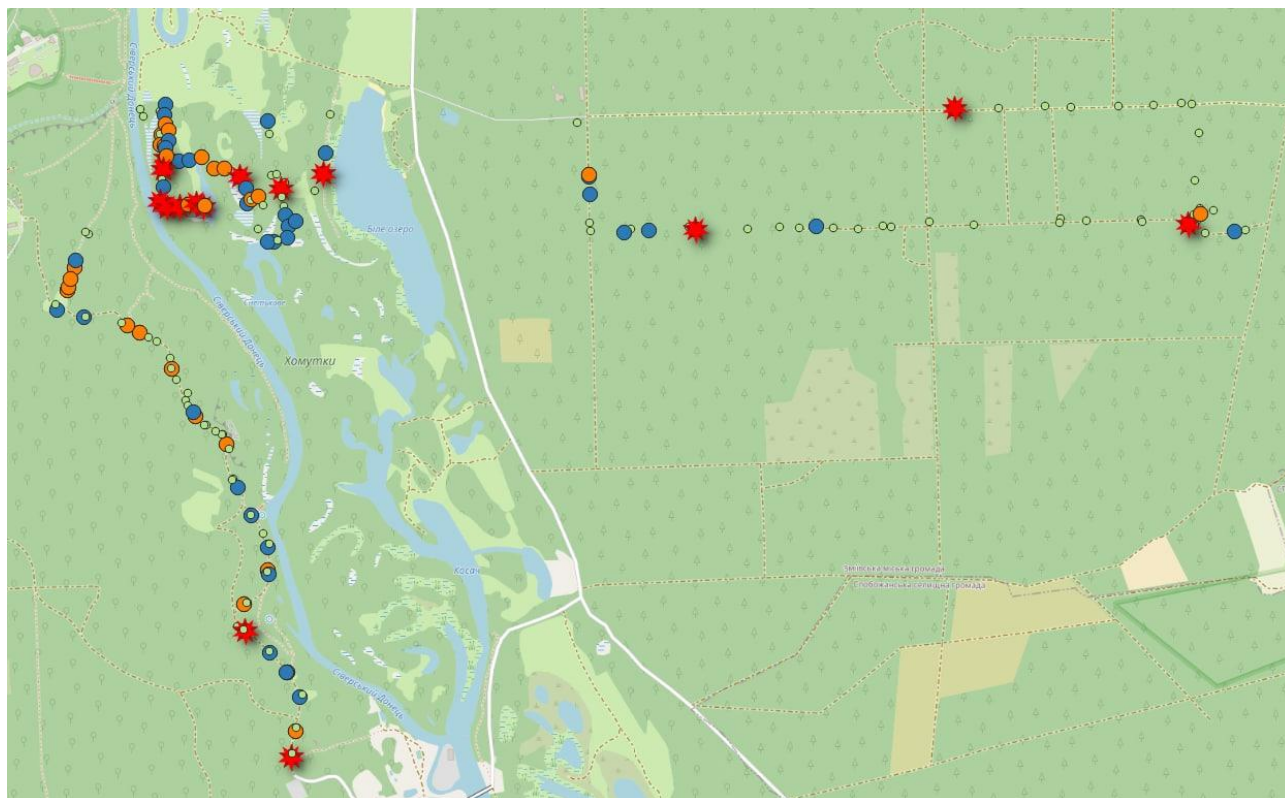


Рис. 3.21. Результати скринінгових досліджень щодо АЧС серед диких свиней у Чугуївському р-ні Харківської обл.: синім кольором позначено негативні щодо генетичного матеріалу свині зразки; оранжевим — позитивні; червоним — зразки, позитивні щодо геномів свині та вірусу АЧС; світло-зеленим — непожовані приманки.

Результати експериментальних досліджень, наведені у даному підрозділі, опубліковано у таких працях [101, 204, 206, 207]:

1. Gallardo, C., P. Sastre, P. Rueda, A. P. Gerilovych, **M. Kit**, I. Nurmoja, and M. F. Le Potier. 2021. “5. Methods for African swine fever diagnosis in clinical and environmental samples.” in *Understanding and Combatting African Swine Fever*, 141–60. Wageningen, the Netherlands: Wageningen Academic Publishers. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-910-7_5.

2. **Kit, M.**, C. Popp, H. von Buttlar, A. Gerilovych, and J. Schwarz. 2021. “Oral fluid-based surveillance study of African swine fever among wild boars in Ukraine.” in *17th Medical Biodefence Conference, Munich, Germany, September, 28–October, 1*, 54.

3. Кіт, М. Ю., та О. Б. Зленко. 2024. “Скринінгове дослідження вірусу африканської чуми свиней у популяції диких кабанів на території Харківської області”. у *Онлайн-конференція аспірантів і молодих вчених у сфері Єдиного здоров'я та біотехнології «VetBioConnect»*, м. Харків, 3–4 червня 2024 р., 29–31. https://www.iekvm.kharkov.ua/documents/VetBioConnect_2024_theses.pdf.

4. Кіт, М. Ю. 2024. “Розробка способу детекції ДНК свині (*Sus scrofa*) за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації”. у *Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції: II міжнародна науково-практична конференція науково-педагогічних працівників та молодих науковців*, м. Одеса, 17–18 жовтня 2024 р., 113–5. https://osau.edu.ua/wp-content/uploads/2024/11/2024_ZBIRNYK_FVM.pdf.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Африканська чума свиней є особливо небезпечною інфекцією, кожен спалах якої завдає тяжких економічних збитків. Починаючи з першого випадку захворювання за часів незалежності в Україні у 2012 році, у всіх регіонах нашої держави було зареєстровано понад 700 випадків хвороби [3]. Відомо, що у країнах, де вірус є ендемічним і циркулює в навколишньому середовищі та в популяціях диких і домашніх свиней, можливим є виникнення мутантних варіантів вірусу, що спричиняють більш м'які форми захворювання, внаслідок чого тварина виживає, у неї утворюються антитіла і тварина при цьому може лишатися вірусоносієм. Однак у разі інфікування молодих або ослаблених особин, певних порід або гібридів, може розвиватися гостра форма перебігу АЧС [1, 10, 16, 25, 32].

Оскільки засоби лікування та офіційно зареєстровані засоби специфічної профілактики АЧС відсутні, основним способом контролю захворювання є якомога швидке виявлення нових спалахів і запровадження суворих карантинних заходів з метою їх локалізації та зупинення поширення вірусу [101, 126]. На сьогодні в Україні бракує вітчизняних діагностикумів для проведення як молекулярно-генетичної детекції вірусу, так і серологічної діагностики. Закордонні розробки коштують досить дорого і їх постачання може бути ускладнене, що особливо часто спостерігається внаслідок призупинення та порушення логістичних зв'язків під час пандемії COVID-19 та повномасштабного вторгнення Росії. З цієї причини важливою є розробка ефективних та чутливих вітчизняних методів діагностики АЧС, у тому числі таких, що можуть бути використані у лабораторіях з обмеженими ресурсами у віддалених регіонах, а також безпосередньо у польових умовах. Зазначене вище обумовлює необхідність розробки рекомбінантних антигенів вірусу АЧС для

серологічної діагностики, методу петльової ізотермічної ампліфікації для детекції ДНК вірусу АЧС, а також рекомбінантного позитивного контрольного зразка для ПЛР-діагностики захворювання.

У разі інфікування високовірулентним штамом вірусу АЧС, тварини помирають до формування антитіл, однак у разі зараження вірусом з низькою вірулентністю, тварини виживають [47]. Антитіла до вірусу АЧС починають утворюватися на 7–10 добу після інфікування і персистують у крові тварин протягом місяців, а іноді років [100]. Оскільки наразі комерційні вакцини проти захворювання не мають широкого застосування за межами В'єтнаму, наявність антитіл у крові свиней в більшості випадків вказує на інфікування вірусом АЧС. На територіях, де вірус АЧС давно вкорінився, відоме виникнення мутантних варіантів вірусу зі зниженою вірулентністю. Так, завдяки серомоніторингу щодо АЧС серед диких свиней у Естонії вдалося виявити такий ізолят [5]. Крім моніторингових досліджень, ІФА для детекції антитіл до вірусу АЧС проводять з метою підвищення ефективності стратегій ерадикації захворювання, а також для підтвердження статусу території, вільної від інфекції, що є важливим при переміщенні тварин та міжнародній торгівлі [47].

Оскільки отримання і використання як антигенів для серологічної діагностики АЧС нативних вірусних білків є неможливим за межами лабораторій, в яких забезпечено щонайменше рівень біобезпеки BSL-3, ми вирішили розробити рекомбінантні діагностичні антигени. Перевагами даного підходу є те, що після отримання рекомбінантних клонів бактерії-продуцента цільового білка, їх утримання, культивування та очищення рекомбінантних антигенів є легким, швидким і безпечним завданням, що не потребує створення спеціальних умов біозахисту та заходів з гарантування біобезпеки.

Для подальшої роботи серед інших було обрано структурні білки р54 та р32, які є одними з найсильніших антигенів вірусу АЧС [120]. Ці білки, експресовані в культурах бакуловірусів, клітинній лінії HEK293F та *E. coli* раніше використовувалися в якості рекомбінантних антигенів при розробці ІФА [127, 128, 129, 130, 131, 132] проте система афінної очистки Strep-Tactin XT

вперше була використана при отриманні цих білків нами. Оскільки взаємодія стрептавідину, біотину та Twin-Strep-tag, на якій базується використаний нами спосіб очистки, є більш специфічною за систему очистки за допомогою His-tag та GST-tag, що використовувалися для отримання цих білків раніше, новий підхід дозволяє підвищити чистоту отриманих фракцій антигена [133, 134, 135]. Це у свою чергу могло знизити фоновий сигнал при розробці ІФА та відповідно, дозволити з більшою точністю розрізняти результати, отримані для негативних та слабо позитивних зразків. ДНК-зв'язуючий білок p10 та ДНК-лігаза належать до числа 14 основних серологічних імунодетермінант вірусу АЧС, проте раніше не використовувалися при розробці ІФА [120]. Після аналізу літературних даних та використання інструментів для передбачення структури цільових білків, ми з'ясували, що трансмембранний домен білка p54 та ДНК-зв'язуючий домен лігази потенційно можуть ускладнювати очистку рекомбінантних продуктів, тому додатково вирішили розробити усічені білки, що не містили вказаних доменів [136, 137].

Після експресії та фізіологічної очистки рекомбінантних білків було встановлено, що всі білки, крім p10 перебувають у бактеріальній клітині в нерозчинній формі. Ми припустили, що білки сформували тільця включення, що являють собою щільні сферичні агрегати білків одного типу, які утворюються в бактеріальних клітинах під час експресії гетерологічних білків. Відомо, що Twin-Strep-tag не впливає на фолдинг та агрегацію мічених ним білків, найчастіше тільця включення формуються, коли рівень експресії гетерологічного білка перевищує 2 % сумарної кількості білків клітини [133, 138]. Близько 70 % оверекспресованих в *E. coli* рекомбінантних білків формують тільця включення [139]. Це може бути спричинено високою температурою під час експресії білка, високою концентрацією речовини-індуктора, експресією під регуляцією «сильного» промотора, великою кількістю копій цільового гена. Внаслідок накопичення великої кількості експресованого цільового білка, формуються агрегати, що складаються з неправильно укладених молекул, таких, що не завершили фолдинг, та білків

нативної структури. Білки, що формують тільця включення, також можуть зворотно дезагрегуватися та укладатися до нативної конформації. Саме на цій властивості базуються способи відновлення білкових молекул з тілець включень [138].

Класичним способом солюбілізації білків, що формують тільця включення, є використання хаотропних агентів, таких як сечовина або гідрохлорид гуанідину, у високій концентрації [138, 140]. Матрикс колонок, які ми використовували для очистки, сумісний з буферами, що містять до 6 М сечовини, тому очищення всіх розроблених білків проводили використовуючи буфери з таким вмістом обраного хаотропа [135]. Проте, очистка за денатуруючих умов не була ефективною, оскільки значна частина білків все ще лишалася в нерозчинній формі, що ми спостерігали дослідивши пелету клітинного дебрису у вестерн-блоті з антитілами до Twin-Strep-tag. Крім того, недоліком методу очистки у присутності сечовини є необхідність проведення діалізу отриманих фракцій для їх звільнення від домішок сечовини. Оскільки білки перебувають в денатурованій формі, діаліз та рефолдинг треба проводити поступово та повільно, щоб не допустити повторної агрегації білків після видалення сечовини [141]. Окрім того, що такий підхід не тільки вимагає тривалого часу, елюйовані фракції можуть розводитися буфером, відносно якого проходить діаліз, внаслідок його проникнення через мембрану. Якщо початкова концентрація отриманих білкових фракцій була невисокою, вона може знизитися ще більше і в такому разі треба проводити додатковий етап — концентрацію білків.

Оскільки використання денатуруючого очищення не дало очікуваного результату, ми продовжили підбір оптимального протоколу для солюбілізації цільових білків. Відомо, що використання детергентів у низьких концентраціях призводить до м'якої солюбілізації білків, що дозволяє отримати активні рекомбінантні білки без проведення рефолдингу, а поєднання різних детергентів може підвищити ефективність солюбілізації та подальшої очистки [134, 138, 142, 143]. Так, для очищення білків за оптимізованим нами

протоколом, використовували два аніонні детергенти: дезоксихолат натрію та лаурилсаркозинат натрію (саркозил). Перший детергент використовується для лізису мембран та солюбілізації білків з тілець включення, є особливо ефективним для розриву білок-білкових взаємодій [143, 144, 145]. Використання саркозилу при очищенні рекомбінантних білків теж є досить поширеним, до його переваг можна віднести неденатуруючу дію, відсутність інтерференції при спектрофотометричному вимірюванні концентрації білків при низькій концентрації сурфактанту, інгібуючу дію на протеази, невисоку вартість [143, 144, 143]. Не зважаючи на досить широке застосування в білкових дослідженнях, саркозил для солюбілізації білків, мічених Twin-Strep-tag, був використаний вперше. Дезоксихолат натрію чинить слабку денатуруючу дію, в той час як саркозил допомагає рефолдингу білків [145, 146], тому, незважаючи на обробку денатуруючим агентом, білки після солюбілізації за удосконаленим нами протоколом, який включає 16-годинну інкубацію білків у присутності саркозилу, не потребують додаткового етапу рефолдингу. Попри те, що супернатант, отриманий після обробки бактерій буфером з дезоксихолатом натрію містив дуже малу кількість цільового білка, даний крок у протоколі був важливим, оскільки його вилучення і наступна безпосередня обробка саркозилмісним буфером призводять до слабшої солюбілізації білків. Ймовірно, це пов'язано з тим, що в присутності дезоксихолату натрію ефективніше проходить лізис клітин та видалення із лізату нативних бактеріальних білків [143]. Також це може бути пов'язано з тим, що під м'якою денатуруючою дією дезоксихолату натрію розпочинається процес солюбілізації тілець включень, який інтенсифікується після додавання саркозилу.

Проте використання саркозилу при очищенні білків має свої особливості, які необхідно враховувати при їх використанні. Так, відомо, що саркозил може впливати на процес хроматографічного очищення білків і тому перед його проведенням повинен бути видалений з розчину, однак при використанні кількостей детергенту, що перевищують значення критичної концентрації міцел (critical micelle concentration, CMC), діаліз стає складним завданням, а розчин

буде містити залишки саркозилу [142]. Хоча відомо, що підвищення концентрації саркозилу підвищує солюбілізацію тілець включень, 0,3 % вміст саркозилу у буфері, що ми використовували, складає 10 mM, в той час як СМС саркозилу, за різними даними становить від 9,5 до 15 mM [147]. Відповідно, підвищення концентрації саркозилу призвело б до утворення міцел та ускладнило б або взагалі унеможливило очищення білків. Видалити саркозил з розчину можна безпосередньо під час очистки, промиваючи зв'язані з афінною колонкою білки, поступово знижуючи вмісту детергенту в буфері, що ми успішно реалізували під час наших експериментів.

Одним зі способів уникнення формування тілець включення є зниження температури росту колонії бактерій під час експресії білка. Механізм дії цього підходу полягає у зниженні рівня експресії білка, з чого випливає і його основний недолік — менша кількість рекомбінантного білка, що може бути напрацьована в такий спосіб [148]. Ми застосували цей підхід при експресії p54, однак цільовий білок все одно перебував у нерозчинній формі, а солюбілізація за допомогою дезоксихолату натрію та саркозилу дозволила отримати рекомбінантний продукт з іншого зразка культури, експресія в якій відбувалася за тієї ж температури. Використання для клонування штаму *E. coli*, пристосованого до експресії білків за умов зниженої температури, наприклад, ArcticExpress (DE3), що додатково експресує адаптовані до холоду шапероніни Cpn10 та Cpn60, може бути одним зі способів уникнути формування тілець включень при отриманні рекомбінантних білків вірусу АЧС [149].

Після очищення рекомбінантних білків провели дослідження їх специфічності, у результаті чого було встановлено, що білок p10, усічена лігаза та лігаза повної довжини не взаємодіють з антитілами у зразку сироватки позитивному щодо вірусу АЧС. Ймовірно, це пов'язано з відсутністю необхідних посттрансляційних модифікацій, які використана система експресії не могла реалізувати. Оскільки нативні білки вірусу АЧС експресуються в еукаріотичних клітинах, ймовірно, для отримання імунореактивних рекомбінантних білків потрібно провести їх експресію в еукаріотичних

системах таких як НЕК-293, культура клітин комах або *Leishmania tarentolae* [150, 151, 152]. Втрату специфічності білком р54ΔТМ можна пояснити тим, що делеція трансмембранного домену могла вплинути на фолдинг та третинну структуру білка, в результаті чого потенційно змінилася структура епітопів, що зв'язуються з антитілами свиней.

Різке зниження концентрації білка р54 під час зберігання в морозильній камері може пояснюватися деградацією білка, його зв'язуванням з пластиком лабораторного посуду, у якому він зберігається, повторною агрегацією молекул після видалення солюбілізуєчого агента. Відомо, що білки у розчині з концентрацією меншою за 1 мг/мл можуть втрачати стабільність, інактивуватися та зв'язуватися зі стінками пробірок [153, 154]. Оскільки додавання сторонніх білків (наприклад, БСА) для підвищення концентрації та, відповідно, стабільності отриманих рекомбінантних продуктів є неможливим через подальше їх використання як антигена для ІФА, потенційним варіантом усунення цієї проблеми може бути концентрація отриманих фракцій білків, наприклад, за допомогою фільтрування. До всіх аліквот білків для довготривалого зберігання ми додавали гліцерол до фінальної концентрації 5 %, проте у випадку зразків рекомбінантного білка р54, кріопротектор не виконував своїх функцій. До інших речовин, які використовують для стабілізації білків, належать кріопротектори етиленгліколь, поліетиленгліколь, Tween 80, інгібітори протеаз, антимікробні агенти (азид натрію, тімеросал), редукуючі агенти (ДТТ, 2-меркаптоетанол) [153, 154]. Однак необхідно враховувати, що ці речовини можуть впливати на активність білків та взаємодію антигена з антитілами, особливо у високих концентраціях, тому перед використанням потрібно з'ясувати їх потенційний вплив на перебіг ІФА. Також можливим способом вирішення проблем є використання спеціальних пробірок, матеріал яких має знижену здатність зв'язування білкових молекул. Зниження концентрації білка, зумовленого повторною агрегацією молекул, можна уникнути оптимізувавши протокол та додавши окремий крок діалізу

лізату за допомогою касет, що забезпечило б повільне видалення детергенту, можливим є проведення останньої фази діалізу протягом 16–24 годин [155].

Таким чином, ми отримали стабільний та специфічний рекомбінантний білок р32, з вираженими антигенними властивостями, що був використаний як антигена для розробки методики на основі непрямого ІФА для детекції антитіл проти вірусу АЧС у сироватках крові від свиней. Максимальна сатурація поверхні планшету антигеном без його надмірного використання спостерігалася за концентрації 5 мкг/мл, тому саме ця робоча концентрація була використана при проведенні подальших досліджень. Розведення сироватки 1:100 забезпечувало найвищу різницю значень оптичної щільності, отриманих для позитивної та негативної сироваток і було обрано для подальшої роботи. При дослідженні панелі позитивних і негативних сироваток всі отримані результати відповідали очікуванім, а порогове значення оптичної щільності негативного контролю складало 0,18, що свідчить про високий рівень очистки білка і специфічність взаємодії антиген–антитіло [156]. Значення коефіцієнтів варіативності ІФА заснованого на розробленому рекомбінантному антигені лежать в межах загальноприйнятих допустимих для серологічних методик 10 % для intra-assay CV (3,18 %) та 15 % для inter-assay CV (7,59 %) [157].

Білок р32, також відомий як р30, що продукується на ранніх стадіях інфекції, характеризується одними з найбільш виражених антигенних властивостей з-поміж інших білків вірусу АЧС [120, 128]. Антитіла до цього білка починають утворюватися на 8 день після інфікування тварини [129]. Враховуючи вищесказане, білок р32 є одним з антигенів, що використовуються при розробці методик ІФА для діагностики АЧС. Рекомбінантний білок р32 (р30) експресований у *E. coli* очищали шляхом афінної хроматографії за допомогою His-tag [129], експресований у личинках комахи *Trichoplusia ni* — за допомогою центрифугування та фільтрування лізату тканин [158]. Використана нами система очищення є набагато специфічнішою, що мало вплинути на чистоту антигена і різницю значень оптичної щільності, отриманих для позитивних та негативних зразків, проте для коректного порівняння

розробленого нами рекомбінантного антигена з вказаними вище, необхідно провести додаткову валідацію з використанням більшої кількості зразків позитивних та негативних сироваток крові свиней.

Розробка тест-системи для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу. ПЛР у режимі реального часу є одним із найбільш широко застосовуваних методів лабораторної діагностики АЧС. На сьогодні в Україні розроблена тест-система для диференційної діагностики африканської та класичної чуми свиней методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу «АЧС/КЧС-дуо ПЛР-РЧ», заснована на використанні тих же праймерів для детекції гена *b646l* вірусу АЧС, що використовуються і в розробленій нами тест-системі. Недоліком даного діагностичного методу є необхідність проведення реакції зворотної транскрипції, яка подовжує час очікування результату, що є дуже важливим при запровадженні карантинних обмежень [159]. Ген, що кодує білок р72 вірусу АЧС використовується як молекулярний маркер для ПЛР-детекції вірусу АЧС і в більшості розроблених закордонних методиках [126, 160] та комерційних тест-системах [161]. Нещодавно було розроблено кілька ПЛР-методик для диференціації тварин, інфікованих нативним вірусом та вакцинованих мутантною вірусною вакциною, заснованих на детекції варіантів вірусу ASFV-ΔMGF, ASFV-ΔI177L та ASFV-G-Δ9GL/ΔUK, перші два з яких лежать в основі розроблених вакцин від АЧС [162]. Проте, оскільки наразі безпечність цих вакцин потребує додаткового вивчення, а коло країн, що почали застосовувати вакцини, є дуже обмеженим, використання цих диференціальних тестів не є необхідним. Ліміт детекції усіх розроблених тест-систем та методик є співставним та коливається в межах від 1 до 20 копій цільового гена [123, 126, 159, 160, 162].

Розробка рекомбінантного позитивного контролю для ПЛР-детекції вірусу АЧС. ПЛР вважається золотим стандартом ранньої діагностики АЧС. Однак результати аналізу можуть вважатися достовірними тільки у разі використання позитивного та негативного контрольних зразків під час

проведення досліджень, що допомагає уникнути отримання хибно позитивних та хибно негативних результатів [163].

Різноманітні форми нуклеїнових кислот, що кодують цільові гени збудника, можуть використовуватися як позитивний контрольний зразок при проведенні ПЛР. ДНК, виділена з культури збудника захворювання є оптимальним типом позитивного контролю, однак такий підхід може бути неможливим у разі діагностики особливо небезпечних інфекцій, оскільки лабораторії повинні відповідати необхідним стандартам біобезпеки, щоб отримати дозвіл на культивування таких мікроорганізмів. Навіть якщо лабораторія має дозвіл, культивування небезпечних біологічних агентів, продукування та накопичення їх біомаси пов'язане з додатковими біоризиками. У разі використання ДНК, виділеної з інактивованої культури мікроорганізмів, залишки інактивуючих речовин, таких як етанол або формальдегід, можуть впливати на ПЛР діючи як інгібітори [163]. Використання як позитивний контроль зразків ДНК, екстрагованої з клінічних зразків, також є можливим. Перевагою матеріалу такого типу є близька симуляція досліджуваних зразків, що елімінує вплив баластних речовин зразка на результат аналізу. Проте необхідно враховувати варіацію значень C_t отриманих у ПЛР у режимі реального часу при дослідженні клінічних зразків від різних тварин [164].

Рекомбінантні плазмідні набули широкого використання при проведенні ПЛР як внутрішній, так і зовнішній позитивні контрольні зразки. Багато комерційних наборів включають плазмідні зі вставками цільових генів як позитивний контрольний зразок. ВООЗТ рекомендує використання рекомбінантних плазмід при проведенні діагностичних ПЛР-досліджень [165]. Перевагою такого типу контрольного зразку є легкість його отримання у великій кількості з трансформованих бактерій протягом короткого часу. Цей процес не вимагає спеціальних умов і може бути проведений навіть в BSL-1 лабораторії, оскільки штами бактерій, що використовуються у молекулярному клонуванні, є безпечними як для дослідника, так і для довкілля. Також плазмідна ДНК є придатною для визначення кількості аналіту ДНК та валідації

кількісної ПЛР [166]. Набори для очищення плазмід забезпечують отримання у фінальному продукті чистої плазмідної ДНК, що робить підрахунок кількості копій цільового гена при використанні плазмід більш точним за аналіз екстрактів сумарної ДНК, що містить ДНК і хазяїна, і патогена.

Рекомбінантні плазмиди, що містять різні фрагменти генома вірусу АЧС (гени, що кодують білок р72, топоізомеразу II тощо) широко використовуються як позитивні контролю у діагностичних наборах та під час проведення наукових досліджень [108, 110, 167, 168]. У результаті наших досліджень було розроблено рекомбінантну плазмиду, що містить частину гена *b646l*, яка включає цільові послідовності ДНК-матриці всіх форматів ПЛР, рекомендованих ВООЗТ для проведення діагностики АЧС. Це робить розроблену плазмиду універсальним позитивним контрольним зразком для детекції вірусу АЧС методом ПЛР згідно рекомендацій ВООЗТ [47]. Для отримання рекомбінантної плазмиди було використано техніку ТА-клонування, що є швидшою і простішою за традиційне клонування та дозволяє уникнути використання рестриктаз. Принцип методу полягає у здатності аденіну (А) та тиміну (Т) гібридизуватись на різних фрагментах ДНК та лігуватись у присутності лігази. ПЛР-продукти ампліфікують за допомогою *Taq* ДНК-полімерази, яка додає аденін до їх 3' кінця. Такі ампліфіковані ПЛР-вставки клонують у лінеаризовані вектори, які мають комплементарні 3' тимінові основи [169].

Проте існують певні обмеження для роботи з плазмідами. Оскільки плазміда є кільцевою молекулою ДНК, ця структура є більш стабільною за лінійну ДНК. У разі використання багатокопійних векторів (у тому числі й рTZ57R/T), протягом процедури клонування накопичується величезна кількість плазмід. Ці дві особливості потрібно враховувати під час роботи з плазмідами, щоб уникнути контамінації реактивів, обладнання та робочих поверхонь в діагностичних лабораторіях. Попри те, що використання плазмід при проведенні лабораторної діагностики підвищує ризик контамінації, плазмідну контамінацію легко відрізнити від крос-контамінації нативною вірусною ДНК

шляхом проведення ПЛР з вектор-специфічними праймерами, наприклад, системою праймерів M13.

Таким чином, завдяки легкій квантифікації, стабільності, поновлюваності та можливості отримання у лабораторіях з низьким рівнем біобезпеки, рекомбінантні плазмиди є хорошим варіантом позитивного контрольного зразка при проведенні ПЛР-діагностики.

Розробка способу детекції ДНК вірусу АЧС за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації. Не зважаючи на запровадження суворих обмежень, вірус АЧС поступово поширюється у країнах Європи, Азії та Океанії починаючи із його інтродукції в Грузію у 2007 р. За відсутності вакцин та ефективних засобів лікування діагностика АЧС стає ключовим фактором для обмеження поширення вірусу. Розроблено численні методи молекулярної діагностики вірусу АЧС, серед яких класична ПЛР та ПЛР у режимі реального часу. Однак використання цих засобів діагностики передбачає їх проведення у добре оснащених лабораторіях з високоточними коштовними ампліфікаторами, що не завжди є можливим у віддалених регіонах та малих населених пунктах. Транспортування зразків до лабораторії часто є тривалим і унеможливорює швидке прийняття рішень щодо запровадження карантинних обмежень. Метод петльової ізотермічної ампліфікації (LAMP) чудово підходить для таких випадків, оскільки реакція може бути проведена в польових умовах з використанням такого простого обладнання як термоблок або водяна баня. Різноманітні прості техніки візуалізації результату перебігу реакції є сумісними з даним методом, що робить його хорошим інструментом експрес-діагностики.

З моменту розробки методу, використання LAMP було досить обмеженим, хоча він і зазначається як одна з альтернатив ПЛР у Керівництві щодо діагностичних тестів та вакцин для наземних тварин [47]. Проте, ситуація змінилася після початку пандемії COVID-19, коли масове експрес-тестування набуло особливого значення. Численні методи детекції коронавірусу людини SARS-CoV-2 за допомогою LAMP були розроблені для діагностики COVID-19 та набули широкого застосування у практиці [170, 171, 172].

Наразі розроблено багато заснованих на петльовій ізотермічній ампліфікації методів детекції збудників таких обов'язкових до сповіщення в ВООЗТ інфекцій свиней, як везикулярна хвороба, КЧС, АЧС, РРСС [173]. В якості цільових послідовностей для LAMP використовували гени топоізомерази II [108], головного капсидного білка p72 [174, 175], *k205r* [176], ДНК-зв'язуючого білка p10 [177] вірусу АЧС.

На відміну від попередників, ми вперше використали ген *c962r*, що кодує потенційну ДНК-праймазу вірусу АЧС, в якості молекулярного маркера для детекції збудника методом LAMP. Головною перевагою використання гена *c962r* як молекулярного маркера є те, що кодований даним геном білок є одним з найбільш консервативних білків вірусу АЧС (ідентичність серед різних ізолятів >97 %) [178, 179]. Не зважаючи на те, що білок не є ключовим для вірулентності, він залучений до реплікації вірусу і знаходиться у висококонсервативному центральному регіоні, що є ключовою частиною генома вірусу АЧС [179, 180].

Розробка методів діагностики інфекційних захворювань, що базуються на використанні нових молекулярних маркерів є важливою, оскільки це дає змогу отримати резервні діагностичні інструменти на випадок виникнення нових варіантів вірусу з мутаціями в попередніх цільових послідовностях. Крім того, ефективна ампліфікація цільової послідовності не завжди залежить тільки від обраного молекулярного маркера. Оскільки біофізичні основи методу LAMP є досить складними, не завжди розроблені праймери забезпечують ампліфікацію. Саме тому розробка кількох систем праймерів для одного гена і подальший їх скринінг є одним зі способів розробити чутливий та надійний спосіб детекції патогена, заснований на петльовій ізотермічній ампліфікації [181]. Наші дослідження підтверджують результативність такого підходу, оскільки одна з трьох розроблених систем праймерів забезпечувала ефективну ампліфікацію й утворення продукту з чітким патерном.

Відомо, що метод LAMP є менш чутливим до інгібіторів ампліфікації, що надає змогу використовувати його для тестування зразків, що містять

контамінанти-інгібітори, таких як зразки навколишнього середовища, кров з антикоагулянтами чи ротова рідина, зібрана з використанням приманок. Розведена кров, сироватка, фекалії можуть бути досліджені методом LAMP навіть без попередньої екстракції ДНК [182, 183, 184].

Завдяки можливості ампліфікувати цільову послідовність у широкому діапазоні температур LAMP вважається надійним методом діагностики. Так, у нашому дослідженні спостерігалася однаково ефективна ампліфікація при температурі від 57 до 64 °C. Діапазон у 10 °C також давав можливість отримати однакові результати ампліфікації у дослідженні щодо використання LAMP для детекції *Salmonella spp.* [182]. Продукт реакції LAMP також утворювався в діапазоні температур від 51 до 70 °C в дослідженні Tran та ін. [175]. Крім того, було показано, що ні експозиція реагентів для проведення LAMP при кімнатній температурі, ні подовжене приготування реакційної суміші не спричиняли отримання хибно негативних результатів реакції [182].

Ліміт детекції (ЛД) LAMP може значно варіювати в залежності від методу обліку результатів, цільової послідовності, способу дизайну праймерів та типу досліджуваного матеріалу. ЛД розробленого нами способу детекції гена *c962r* вірусу АЧС, оцінений з використанням серійних 10-кратних розведень очищеного та квантифікованого ПЛР-продукту, становить 10 копій цільової послідовності в мкл, що відповідає 50 копіям на реакцію. Це значення є співставним з ЛД інших методів детекції вірусу АЧС на основі LAMP, що становлять 368 копій/мкл при детекції гена білка p72 [174], 330 [108], 400 [183], та одну [175] копію на реакцію при детекції гена, що кодує топоізомеразу II, а також 30 копій при детекції гена, що кодує білок p10 [177]. Значення ЛД рекомендованих ВООЗТ молекулярних методів детекції вірусу АЧС становить 100 копій гена для TaqMan ПЛР [107] та 18 копій гена для UPL ПЛР [106]. Отже, аналітична чутливість розробленого нами методу є співставною зі значеннями цього критерію для рекомендованих ВООЗТ методів молекулярної діагностики АЧС.

Завдяки використанню 6 пар праймерів для розпізнавання 8 специфічних ділянок генома, метод є високоспецифічним і не демонструє перехресних реакцій ні в нашому, ні в дослідженнях проведених щодо інших методів детекції вірусу АЧС на основі LAMP [108, 174, 175, 177, 183]. Розроблений нами метод дозволяє проводити детекцію ДНК вірусу АЧС, екстраговану з різних джерел, включаючи внутрішні органи свиней. Специфічність методу не залежить від генотипу вірусу і дає змогу ефективно виявити генотипи I і II, що наразі поширені у країнах Європи, Азії та Океанії [10].

Для детекції результату LAMP та візуалізації продукту реакції використовують різні підходи. При додаванні флуоресцентного барвника, детекції результату можна проводити за допомогою термоциклерів для ПЛР у реальному часі. Турбідиметрія заснована на моніторингу утворення білого осаду пірофосфату магнію, що синтезується під час полімеризації ДНК, також дозволяє детектувати результат у режимі реального часу [185]. Для того, щоб зробити проведення реакції менш залежним від обладнання, використовують колориметричну детекцію результату. Гідроксинафтол синій, кальцеїн, малахітовий зелений, лейкокристал фіолетовий — це колориметричні індикатори, що змінюють колір у позитивній реакції LAMP [170, 172]. Ці барвники не впливають на перебіг реакції, але надають можливості оцінити результат реакції неозброєним оком [174, 186]. Для детекції продукту реакції за допомогою УФ-світла використовують такі інтеркалюючі барвники як SYBR Green, Picogreen, бромід етидію [185]. Тест-смужки також використовують для детекції результатів LAMP, особливо при проведенні досліджень в польових умовах. Принцип цього способу базується на взаємодії між міченим біотином продуктом LAMP та ізотіоціанатом флуоресцеїну, що забезпечує візуалізацію продукту реакції [108, 185]. Проте електрофорез у агарозному гелі лишається ефективним методом кінцевої візуалізації продукту LAMP, оскільки він забезпечує візуальне розпізнавання ступінчастого патерну, що є характерним для LAMP амплікону. Цей підхід є більш точним і може бути використаний для

підтвердження результатів, отриманих колориметричним способом або при використанні флуоресцентних барвників.

Відповідно, виходячи з високої специфічності та чутливості, надійності та можливості використовувати різні підходи для візуалізації результату, метод LAMP є хорошим інструментом молекулярної діагностики. Послідовність результатів, отриманих за широкого діапазону температур, що дозволяє використовувати просте обладнання для проведення реакції, а також простота візуальної детекції продукту, робить LAMP оптимальним методом для використання в лабораторіях з обмеженими ресурсами та при тестуванні безпосередньо в польових умовах, що було підтверджено численними дослідженнями [183, 184].

Зазвичай для діагностичних досліджень щодо АЧС використовують зразки крові, сироватки крові, тканин, органів, рідше фекалій або сечі. Відбір більшості згаданих типів зразків можна провести тільки посмертно від забитих, впольованих або загиблих тварин. Крім того, відбір зразків від живих тварин потребує їх фіксації, що може супроводжуватися травмуванням тварин, кровотечею, що у свою чергу призводить до підвищення ризику поширення вірусу, оскільки при АЧС у крові присутня велика кількість вірусних часток. Використання для моніторингових досліджень зразків тільки від упольованих диких тварин також є неефективним, оскільки полювання обмежене в часі і просторі [187]. Ротова рідина може бути хорошою альтернативою вищезгаданим типам клінічних зразків для проведення діагностичних досліджень, оскільки процес їх відбору є неінвазивним, безпечним та нестресовим як для тварини, так і для людини, дешевим та зручним [188].

Ротова рідина складається зі слини та транссудату з кровоносною системою і може містити антитіла класів IgA, IgM, IgG, а також різноманітні інфекційні агенти (віруси, бактерії тощо), що робить цей тип матеріалу придатним для дослідження як за допомогою ПЛР, так і з використанням серологічних тестів. Відомо про ефективне використання ротової рідини для ефективного виявлення збудників АЧС, КЧС, ящуру, РРСС та інших вірусних і бактеріальних інфекцій

свиней та антитіл до перерахованих агентів [115, 130, 188, 189, 190, 191, 192, 193].

У зразках ротової рідини свиней ДНК вірусу АЧС може бути виявлена через 4 доби після інфікування [63, 194]. Вірусна ДНК може бути детектована у таких зразках після 35 діб зберігання за 4 °С, після 14 діб зберігання за 12 °С та 21 °С, після зберігання за 37 °С вірус не виявляли [62]. Згідно цих даних, спосіб відбору зразків ротової рідини, використаний нами, повинен забезпечувати збереження вірусної ДНК та її ефективне виявлення. Однак, у жодному з вказаних досліджень не вдалося ізолювати вірус зі зразків ротової рідини. Це може пояснюватися тим, що титр вірусу в ротовій рідині є нижчим за інфекційну дозу. Зазначене свідчить про безпечність використання приманок для відбору зразків від кількох особин в популяції, оскільки вони не повинні слугувати додатковим способом поширення вірусу між тваринами. Антитіла проти вірусу АЧС детектували у зразках ротової рідини за різними даними з 3–11 доби після інфікування до 30, коли були завершені дослідження [189, 194]. Також було показано, що при інфікуванні атенуйованим штамом вірусу, ротова рідина містить більше копій ДНК, ніж кров та фекалії [194]. У крові антитіла до вірусу АЧС у разі виживання тварини присутні протягом всього життя [6].

Відбір проб ротової рідини у домашніх свиней проводять за допомогою чистої мотузки, що висить на загоні на висоті плеча свині. Тварини жують мотузку через природну цікавість. У 2014 році Mouchantat та ін. показали можливість відбору зразків ротової рідини методом «канату в приманці» («pSWAB»: pathogen sampling wild animal with baits) від диких кабанів для детекції збудників КЧС та ящуру. Для цього використовували бавовняні мотузки діаметром 8 мм, занурені в зернову приманку, розміщену на підлозі свинарника. Було доведено, що чутливість pSWAB є співставною з традиційними мазками слини [115]. При дослідженні зразків ротової рідини, відібраних від диких свиней в польових умовах методом pSWAB в Естонії, не було виявлено позитивних щодо збудника АЧС зразків [195].

Приманка на основі злаків, що складається з кукурудзяного борошна, сухого молока, ароматизатора, парафіну і кокосової олії, використовується для пероральної імунізації диких свиней проти КЧС. Її було створено за результатами досліджень смакових уподобань диких свиней [196]. Для нашого дослідження ми власноруч приготували приманки, підбравши оптимальну кількість кожного компонента, проводячи пробні дослідження з домашніми свинями.

У той же час нами було встановлено, що залишки компонентів приманки в зразках ДНК, екстрагованих з ротової рідини, інгібують ПЛР. Відомо, що метод LAMP є менш чутливим до інгібіторів ампліфікації, це дає можливість використовувати його для тестування зразків, що містять контамінант-інгібітори, таких як зразки навколишнього середовища, кров з антикоагулянтами. Розведена кров, сироватка, фекалії можуть бути досліджені методом LAMP навіть без попередньої екстракції ДНК [182, 183, 184]. Результати нашого дослідження підтвердили це припущення, оскільки було встановлено, що метод LAMP є ефективним і при дослідженні контамінованих інгібіторами ампліфікації зразків ДНК з ротової рідини, відібраної за допомогою приманок.

У 14,8 % зразків ротової рідини, зібраних на території Чугуївського р н у Харківської обл., було детектовано ДНК вірусу АЧС. Враховуючи близьку відстань між приманками, можна також припустити, що деякі з них жувала одна тварина. Зазначимо, що у 2017 році в цій місцевості фіксували випадки АЧС та проводили депопуляцію диких свиней [3, 197, 198]. А у 2024 році АЧС було повторно виявлено у 2 трупів диких свиней, виявлених на досліджуваній раніше території [199]. Ймовірно це свідчить про приховану циркуляцію вірусу АЧС у популяції диких свиней на території Харківської області, що час від часу проявляється у вигляді зареєстрованих поодиноких випадків АЧС у загинув тварин.

В літературі є свідчення про виявлення помірновірулентних та навіть атенуйованих ізолятів вірусу АЧС, що спричиняли легкий або безсимптомний

перебіг хвороби в чутливих до інфікування тварин, на територіях, де вірус циркулює протягом тривалого часу [5, 6]. Це є ознакою укорінення хвороби на певній території через створення стабільного резервуару її збудника в сприйнятливих популяціях. При дослідженні АЧС в популяціях диких свиней у країнах ЄС (на прикладі Польщі, Естонії, Литви та Латвії), було встановлено позитивну кореляцію між тривалістю присутності вірусу АЧС на території країни та частотою виявлення антитіл до вірусу у впольованих тварин. Також було показано, що починаючи із 2016 р. в Польщі та Латвії і починаючи з 2017 року в Естонії, кількість випадків АЧС за рік, підтверджених методом ПЛР є нижчою за кількість випадків, виявлених за допомогою серологічних методів [6]. Таким чином, з часом спостерігається еволюція вірусу АЧС в популяціях диких свиней у бік зниження вірулентності.

У ході виконання даної роботи було заплановано дослідження польових зразків ротової рідини від диких свиней за допомогою ІФА з використанням розроблених рекомбінантних антигенів. Проте через повномасштабне вторгнення Росії в Україну та ведення бойових дій у Харкові у 2022 році, не було можливості проконтролювати дотримання належних умов зберігання зразків, у результаті чого було вирішено не продовжувати дане дослідження, оскільки достовірність отриманих результатів не може бути гарантована. Разом із тим зростання кількості зареєстрованих на території України випадків АЧС у 2023–2025 рр., а також повторна реєстрація випадків захворювання серед диких кабанів на одній і тій же території, свідчить про перспективність таких досліджень та необхідність подальшого вивчення особливостей епізоотологічного процесу АЧС в Україні.

ВИСНОВКИ

1. У дисертаційній роботі на підставі проведених молекулярно-генетичних, молекулярно-біотехнологічних, серологічних, біоінформатичних та статистичних досліджень вдосконалено систему її лабораторної діагностики за рахунок розробки та впровадження методик виявлення ДНК збудника на основі полімеразної ланцюгової реакції, петльової ізотермічної ампліфікації та антитіл до нього на основі імуноферментного аналізу.

2. За використання експресуючої системи *E. coli* було отримано 6 рекомбінантних протеїнів вірусу АЧС (p10, p32, p54, p54ΔTM, лігаза, лігазаΔДЗД) та оптимізовано протоколи їх хроматографічного очищення. Для білків p54 та p32 показано можливість їх використання для детекції антитіл до збудника АЧС у сироватках крові свиней за допомогою ІФА та вестерн-блоту.

3. Очищений за протоколом солюбілізації за допомогою детергентів рекомбінантний вірусний білок p32 є придатним для застосування його як антигена для проведення непрямого ІФА з метою детекції антитіл до вірусу АЧС. Його оптимальна концентрація складає 5 мкг/мл, розведення досліджуваної сироватки — 1:100 та вторинних антитіл — 1:10000. Внутрішньосистемний та міжсистемний коефіцієнти варіативності отриманих за допомогою розробленої методики результатів становлять 3,18 % та 7,59 % для позитивної та 1,56 % і 7,30 % для негативної сироваток відповідно.

4. Розроблена тест-система для детекції генетичного матеріалу вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus» здійснює ампліфікацію фрагмента гена *b646l* збудника АЧС, забезпечує отримання специфічних, точних і відтворюваних результатів і виявляє 10 копій цільового гена в 1 мкл, що відповідає 20 копіям на реакцію.

5. Сконструйований на основі проведених біоінформатичних досліджень позитивний контрольний зразок на основі плазмідного вектору pTZ57R/T_ASF зі вставкою гена *b646l* розміром 1763 п. н. кодує послідовності, які є цільовими

для методів детекції ДНК вірусу АЧС, рекомендованих для використання ВООЗТ (класичної ПЛР та ПЛР у реальному часі).

6. Розроблена методика детекції фрагмента гена *s962r* вірусу АЧС за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації дозволяє проводити ефективне виявлення вірусу АЧС протягом 40 хв з лімітом детекції 10 копій цільового гена в 1 мкл досліджуваного зразка. Її специфічність за дослідження гетерологічних і референтних зразків ДНК вірусу АЧС становить 100 %, а внутрішньосистемний коефіцієнт варіативності результатів — 1,81 %, що відповідає вимогам до діагностичних тестів. Завдяки легкості проведення, метод може використовуватися в лабораторіях з обмеженими ресурсами і в польових умовах.

7. Вдосконалений нами спосіб відбору ротової рідини диких свиней на канат з приманкою дозволяє використовувати його у польових умовах. Розроблений спосіб детекції гена *nd5 Sus scrofa* за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації дозволив підтвердити приналежність диким свиням 56 зі 101 зразка, зібраного у 2020–2021 рр. на території Харківської області, з яких 15 зразків (26,7 %) містили генетичний матеріал збудника АЧС, що свідчить про вкорінення вірусу у популяції диких свиней у цьому регіоні.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для практичної ветеринарної медицини запропоновано:

1. Тест-систему для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції «Sui-DNA-test-ASF virus» (деклараційний патент України на корисну модель № 133163).

2. Методичні рекомендації «Детекція ДНК вірусу африканської чуми свиней методом петльової ізотермічної ампліфікації» (затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 3 від 3.11.2021 р.).

3. Методичні рекомендації «Отримання рекомбінантного антигену р32 для ІФА-діагностики АЧС» (затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 8 від 23.10.2024 р.).

Результати наукових досліджень рекомендуються до використання під час підготовки здобувачів вищої освіти за спеціальністю Біологія та біохімія, Ветеринарна медицина, при вивченні освітніх програм Біотехнологія та Промислова біотехнологія у закладах вищої освіти України та в наукових дослідженнях підрозділів Інституту ветеринарної медицини НААН України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Beltrán-Alcrudo, Daniel, Marisa Arias, Carmina Gallardo, Scott A. Kramer, and Mary-Louise Penrith. 2017. *African Swine Fever: Detection and Diagnosis — A Manual for Veterinarians*. FAO Animal Production and Health Manual, no. 19. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/i7228en>.
2. World Organisation for Animal Health. World Animal Health Information Department. 2021. “Global Situation of ASF. Report No°47: 2016–2020.” <https://www.woah.org/app/uploads/2022/01/asf-situation-report-18062020.pdf>.
3. Науково-впроваджувальний центр ветеринарної медицини. 2015. “Чума свиней африканська.” Дата звернення: червень 2021. <https://www.asf.vet.ua>.
4. Силивончик, Алла. 2020. “Не до жиру: Обзор украинского рынка свинины.” Latifundist.com, 13 травня 2020. [https://latifundist.com/analytics/10-ne-do-zhiru-obzor-ukrainskogo-rynka-svininy?utm_source=База+ЛатиВСЄ&utm_campaign=83e5fe0671-Пятничная+ревизия&utm_medium=email&utm_term=0_a559399ab6-83e5fe0671-\[LIST_EMAIL_ID\]&ct=t\(Пятничная+ревизия\)](https://latifundist.com/analytics/10-ne-do-zhiru-obzor-ukrainskogo-rynka-svininy?utm_source=База+ЛатиВСЄ&utm_campaign=83e5fe0671-Пятничная+ревизия&utm_medium=email&utm_term=0_a559399ab6-83e5fe0671-[LIST_EMAIL_ID]&ct=t(Пятничная+ревизия)).
5. Zani, Laura, Jan Hendrik Forth, Leonie Forth, Imbi Nurmoja, Simone Leidenberger, Julia Henke, Jolene Carlson et al. 2018. “Deletion at the 5’-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype.” *Scientific Reports* 8, no. 1: 6510. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24740-1>.
6. Martínez-Avilés, Marta, Irene Iglesias, and Ana De La Torre. 2020. “Corrigendum: Evolution of the ASF Infection Stage in Wild Boar Within the EU (2014–2018).” *Frontiers in Veterinary Science* 7: 581766. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.581766>.
7. Eustace Montgomery, R. 1921. “On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony).” *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 34: 159–91. [https://doi.org/10.1016/s0368-1742\(21\)80031-4](https://doi.org/10.1016/s0368-1742(21)80031-4).

8. “Asfarviridae and Iridoviridae.” 2017. In *Fenner’s Veterinary Virology*, 175–88. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800946-8.00008-8>.
9. Sánchez-Vizcaíno, José Manuel, Alberto Laddomada, and Marisa L. Arias. 2019. “African Swine Fever Virus.” In *Diseases of Swine*, 11th ed., 443–452. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch25>.
10. Blome, Sandra, Kati Franzke, and Martin Beer. 2020. “African swine fever — A review of current knowledge.” *Virus Research* 287: 198099. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198099>.
11. Revilla, Yolanda, Daniel Pérez-Núñez, and Juergen A. Richt. 2018. “African Swine Fever Virus Biology and Vaccine Approaches.” *Advances in Virus Research* 100: 41–74. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2017.10.002>.
12. Dixon, Linda K., David A. G. Chapman, Christopher L. Netherton, and Chris Upton. 2013. “African swine fever virus replication and genomics.” *Virus Research* 173, no. 1: 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.020>.
13. Tulman, E. R., G. A. Delhon, B. K. Ku, and D. L. Rock. 2009. “African Swine Fever Virus.” *Current Topics in Microbiology and Immunology* 328: 43–87. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68618-7_2.
14. Malogolovkin, Alexander, and Denis Kolbasov. 2019. “Genetic and antigenic diversity of African swine fever virus.” *Virus Research* 271: 197673. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197673>.
15. Portugal, Raquel, João Coelho, Dirk Höper, Nicole S. Little, Chad Smithson, Chris Upton, Carlos Martins, Alexandre Leitão, and Günther M. Keil. 2015. “Related strains of African swine fever virus with different virulence: genome comparison and analysis.” *Journal of General Virology* 96, no. 2: 408–19. <https://doi.org/10.1099/vir.0.070508-0>.
16. Alonso, Covadonga, Manuel Borca, Linda Dixon, Yolanda Revilla, Fernando Rodriguez, and Jose M. Escribano. 2018. “ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae.” *Journal of General Virology* 99, no. 5: 613–14. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001049>.

17. Takamatsu, H., C. Martins, J. M. Escribano, C. Alonso, L. K. Dixon, M. L. Salas, and Y. Revilla. 2011. "Asfarviridae." In *Virus Taxonomy*, 1st ed., 153–162. Oxford: Elsevier.
18. Yáñez, Rafael J., Javier M. Rodríguez, Maria L. Nogal, Luis Yuste, Carlos Enríquez, Jose F. Rodriguez, and Eladio Viñuela. 1995. "Analysis of the Complete Nucleotide Sequence of African Swine Fever Virus." *Virology* 208, no. 1: 249–78. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1149>.
19. Forth, Jan H., Leonie F. Forth, Sandra Blome, Dirk Höper, and Martin Beer. 2020. "African swine fever whole-genome sequencing — Quantity wanted but quality needed." *PLOS Pathogens* 16, no. 8: e1008779. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008779>.
20. Bastos, A. D. S., M. L. Penrith, C. Crucière, J. L. Edrich, G. Hutchings, F. Roger, E. Couacy-Hymann, and G. R. Thomson. 2003. "Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation." *Archives of Virology* 148, no. 4: 693–706. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>.
21. Spinard, Edward, Mark Dinhl, Nicolas Tesler, Hillary Birtley, Anthony V. Signore, Aruna Ambagala, Charles Masembe, Manuel V. Borca, and Douglas P. Gladue. 2023. "A Re-Evaluation of African Swine Fever Genotypes Based on p72 Sequences Reveals the Existence of Only Six Distinct p72 Groups." *Viruses* 15, no. 11: 2246. <https://doi.org/10.3390/v15112246>.
22. Vilem, Annika, Imbi Nurmoja, Tarmo Niine, Taavi Riit, Raquel Nieto, Arvo Viltrop, and Carmina Gallardo. 2020. "Molecular Characterization of African Swine Fever Virus Isolates in Estonia in 2014–2019." *Pathogens* 9, no. 7: 582. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070582>.
23. Urbano, A., J. H. Forth, A. S. Olesen, L. Dixon, T. B. Rasmussen, G. Cackett, F. Werner et al. 2021. "2. African swine fever virus: cellular and molecular aspects." In *Understanding and combatting African Swine Fever*, 25–61. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-910-7_2.

24. Spickler, Anna Rovid. 2019. "African swine fever factsheet." http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/african_swine_fever.pdf.
25. Costard, S., L. Mur, J. Lubroth, J. M. Sanchez-Vizcaino, and D. U. Pfeiffer. 2013. "Epidemiology of African swine fever virus." *Virus Research* 173, no. 1: 191–97. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.030>.
26. Pérez-Núñez, Daniel, Eva Castillo-Rosa, Gonzalo Vigara-Astillero, Raquel García-Belmonte, Carmina Gallardo, and Yolanda Revilla. 2020. "Identification and Isolation of Two Different Subpopulations Within African Swine Fever Virus Arm/07 Stock." *Vaccines* 8, no. 4: 625. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040625>.
27. Gallardo, Carmina, Jovita Fernández-Pinero, Virginia Pelayo, Ismail Gazev, Iwona Markowska-Daniel, Gediminas Pridotkas, Raquel Nieto et al. 2014. "Genetic Variation among African Swine Fever Genotype II Viruses, Eastern and Central Europe." *Emerging Infectious Diseases* 20, no. 9: 1544–47. <https://doi.org/10.3201/eid2009.140554>.
28. Kovalenko, Ganna, Anne-Lise Ducluzeau, Liudmyla Ishchenko, Mykola Sushko, Maryna Sapachova, Nataliia Rudova, Oleksii Solodiankin et al. 2019. "Complete Genome Sequence of a Virulent African Swine Fever Virus from a Domestic Pig in Ukraine." *Microbiology Resource Announcements* 8, no. 42. <https://doi.org/10.1128/mra.00883-19>.
29. Mazur-Panasiuk, Natalia, Grzegorz Woźniakowski, and Krzysztof Niemczuk. 2019. "The first complete genomic sequences of African swine fever virus isolated in Poland." *Scientific Reports* 9, no. 1: 4556. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36823-0>.
30. Gallardo, Carmina, Dufton M. Mwaengo, Joseph M. Macharia, Marisa Arias, Evans A. Taracha, Alejandro Soler, Edward Okoth, Elena Martín, Jackline Kasiti, and Richard P. Bishop. 2009. "Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes." *Virus Genes* 38, no. 1: 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0293-2>.

31. Chapman, David A. G., Alistair C. Darby, Melissa Da Silva, Chris Upton, Alan D. Radford, and Linda K. Dixon. 2011. "Genomic Analysis of Highly Virulent Georgia 2007/1 Isolate of African Swine Fever Virus." *Emerging Infectious Diseases* 17, no. 4: 599–605. <https://doi.org/10.3201/eid1704.101283>.
32. Blome, Sandra, Kati Franzke, and Martin Beer. 2020. "African swine fever — A review of current knowledge." *Virus Research* 287: 198099. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198099>.
33. Gallardo, C., J. Fernández-Pinero, and M. Arias. 2019. "African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation." *Virus Research* 271: 197676. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197676>.
34. "Current ICTV Taxonomy Release." n.d. Ictvonline.org. Accessed June 11, 2021. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>.
35. Matsuyama, Tomomasa, Tomokazu Takano, Issei Nishiki, Atushi Fujiwara, Ikunari Kiryu, Mari Inada, Takamitsu Sakai et al. 2020. "A novel Asfarvirus-like virus identified as a potential cause of mass mortality of abalone." *Scientific Reports* 10, no. 1: 4620. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61492-3>.
36. Forth, Jan H., Leonie F. Forth, Samantha Lycett, Lesley Bell-Sakyi, Günther M. Keil, Sandra Blome, Sébastien Calvignac-Spencer et al. 2020. "Identification of African swine fever virus-like elements in the soft tick genome provides insights into the virus' evolution." *BMC Biology* 18, no. 1: 136. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00865-6>.
37. Cisek, A. A., I. Dąbrowska, K. P. Gregorczyk, and Z. Wyżewski. 2016. "African Swine Fever Virus: A New Old Enemy of Europe." *Annals of Parasitology* 62, no. 3: 161–67.
38. Dixon, L. K., H. Sun, and H. Roberts. 2019. "African swine fever." *Antiviral Research* 165: 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.018>.
39. Gaudreault, Natasha N., Daniel W. Madden, William C. Wilson, Jessie D. Trujillo, and Juergen A. Richt. 2020. "African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus." *Frontiers in Veterinary Science* 7: 215. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00215>.

40. Pereira de Oliveira, Rémi, Evelyne Hutet, Frédéric Paboeuf, Maxime Duhayon, Fernando Boinas, Adalberto Perez de Leon, Serhii Filatov, Laurence Vial, and Marie-Frédérique Le Potier. 2019. “Comparative vector competence of the Afrotropical soft tick *Ornithodoros moubata* and Palearctic species, *O. erraticus* and *O. verrucosus*, for African swine fever virus strains circulating in Eurasia.” *PLOS ONE* 14, no. 11: e0225657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225657>.

41. Olesen, Ann Sofie, Mette Frimodt Hansen, Thomas Bruun Rasmussen, Graham J. Belsham, Rene Bødker, and Anette Bøtner. 2018. “Survival and localization of African swine fever virus in stable flies (*Stomoxys calcitrans*) after feeding on viremic blood using a membrane feeder.” *Veterinary Microbiology* 222: 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.010>.

42. Olesen, Ann Sofie, Louise Lohse, Mette Frimodt Hansen, Anette Boklund, Tariq Halasa, Graham J. Belsham, Thomas Bruun Rasmussen, Anette Bøtner, and René Bødker. 2018. “Infection of pigs with African swine fever virus via ingestion of stable flies (*Stomoxys calcitrans*).” *Transboundary and Emerging Diseases* 65, no. 5: 1152–57. <https://doi.org/10.1111/tbed.12918>.

43. Herm, Reet, Lea Tummeleht, Margret Jürison, Annika Vilem, and Arvo Viltrop. 2019. “Trace amounts of African swine fever virus DNA detected in insects collected from an infected pig farm in Estonia.” *Veterinary Medicine and Science* 6, no. 1: 100–104. <https://doi.org/10.1002/vms3.200>.

44. Mazur-Panasiuk, Natalia, Jacek Żmudzki, and Grzegorz Woźniakowski. 2019. “African swine fever virus – persistence in different environmental conditions and the possibility of its indirect transmission.” *Journal of Veterinary Research* 63, no. 3: 303–10. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0058>.

45. Папченко, І. В., та М. В. Утеченко. 2019. “Історія виникнення африканської чуми свиней та її відмінність від класичної.” У *Міжнародна науково-практична конференція “Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту”*, 31 жовтня 2019, м. Біла Церква.

46. Kit, M. Yu. 2021. “Development of recombinant antigen expression and purification for African swine fever serological diagnostics.” *Journal*

for *Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety* 7, no. 3: 24–31.
<https://doi.org/10.36016/jymbbs-2021-7-3-4>.

47. OIE (World Organisation for Animal Health). 2019. “Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.”
https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.01_ASF.pdf

48. Chenais, Erika, Karl Ståhl, Vittorio Guberti, and Klaus Depner. 2018. “Identification of Wild Boar–Habitat Epidemiologic Cycle in African Swine Fever Epizootic.” *Emerging Infectious Diseases* 24, no. 4: 810–12.
<https://doi.org/10.3201/eid2404.172127>.

49. Guinat, Claire, Andrey Gogin, Sandra Blome, Guenther Keil, Reiko Pollin, Dirk U. Pfeiffer, and Linda Dixon. 2016. “Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions.” *Veterinary Record* 178, no. 11: 262–67. <https://doi.org/10.1136/vr.103593>.

50. Niederwerder, Megan C., Ana M. M. Stoian, Raymond R. R. Rowland, Steve S. Dritz, Vlad Petrovan, Laura A. Constance, Jordan T. Gebhardt et al. 2019. “Infectious Dose of African Swine Fever Virus When Consumed Naturally in Liquid or Feed.” *Emerging Infectious Diseases* 25, no. 5: 891–97.
<https://doi.org/10.3201/eid2505.181495>.

51. Chenais, Erika, Klaus Depner, Vittorio Guberti, Klaas Dietze, Arvo Viltrop, and Karl Ståhl. 2019. “Epidemiological considerations on African swine fever in Europe 2014–2018.” *Porcine Health Management* 5, no. 1: 6.
<https://doi.org/10.1186/s40813-018-0109-2>.

52. FAO, OIE, and EC. 2019. African swine fever in wild boar ecology and biosecurity. FAO Animal Production and Health Manual No. 22. Rome.

53. Dixon, Linda K., Karl Stahl, Ferran Jori, Laurence Vial, and Dirk U. Pfeiffer. 2020. “African Swine Fever Epidemiology and Control.” *Annual Review of Animal Biosciences* 8, no. 1: 221–46. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-083741>.

54. Probst, Carolina, Anja Globig, Bent Knoll, Franz J. Conraths, and Klaus Depner. 2017. “Behaviour of free ranging wild boar towards their dead fellows:

potential implications for the transmission of African swine fever.” *Royal Society Open Science* 4, no. 5: 170054. <https://doi.org/10.1098/rsos.170054>.

55. Carlson, Jolene, Laura Zani, Julia Henke, Simone Leidenberger, I. Nurmoja, L. Tummeleht, A. Viltrop, Martin Beer, and Sandra Blome. 2017. “Soil as a vector for African swine fever virus in wild boar populations 2017.” In *EPIZONE : 11th Annual Meeting “Crossing Barriers“, 19–21 September 2017, Paris, France : Programme & Abstracts*, 35.

56. Carrasco-Garcia, Ricardo, Patricia Barroso, Javier Perez-Olivares, Vidal Montoro, and Joaquín Vicente. 2018. “Consumption of Big Game Remains by Scavengers: A Potential Risk as Regards Disease Transmission in Central Spain.” *Frontiers in Veterinary Science* 5: 4. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00004>.

57. Cukor, Jan, Rostislav Linda, Petr Václavek, Karolina Mahlerová, Petr Šatrán, and František Havránek. 2020. “Confirmed cannibalism in wild boar and its possible role in African swine fever transmission.” *Transboundary and Emerging Diseases* 67, no. 3: 1068–73. <https://doi.org/10.1111/tbed.13468>.

58. Pietschmann, Jana, Claire Guinat, Martin Beer, Valery Pronin, Kerstin Tauscher, Anja Petrov, Günther Keil, and Sandra Blome. 2015. “Course and transmission characteristics of oral low-dose infection of domestic pigs and European wild boar with a Caucasian African swine fever virus isolate.” *Archives of Virology* 160, no. 7: 1657–67. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2430-2>.

59. Guinat, C., T. Vergne, C. Jurado-Diaz, J. M. Sánchez-Vizcaíno, L. Dixon, and D. U. Pfeiffer. 2016. “Effectiveness and practicality of control strategies for African swine fever: what do we really know?” *Veterinary Record* 180, no. 4: 97. <https://doi.org/10.1136/vr.103992>.

60. Khomenko, S., T. Alexandrov, and K. Sumption. 2013. “Options for non-invasive collection of saliva from wild ungulates for disease surveillance.” *FAO EMPRES-Animal Health 360 Bulletin* no. 42: 15–17.

61. “Scientific Opinion on African Swine Fever.” 2010. *EFSA Journal* 8, no. 3: 1556. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1556>.

62. Davies, K., L. C. Goatley, C. Guinat, C. L. Netherton, S. Gubbins, L. K. Dixon, and A. L. Reis. 2015. "Survival of African Swine Fever Virus in Excretions from Pigs Experimentally Infected with the Georgia 2007/1 Isolate." *Transboundary and Emerging Diseases* 64, no. 2: 425–31. <https://doi.org/10.1111/tbed.12381>.

63. Guinat, Claire, Ana Luisa Reis, Christopher L. Netherton, Lynnette Goatley, Dirk U. Pfeiffer, and Linda Dixon. 2014. "Dynamics of African swine fever virus shedding and excretion in domestic pigs infected by intramuscular inoculation and contact transmission." *Veterinary Research* 45, no. 1: 93. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0093-8>.

64. Wang, Wen-Hung, Chih-Yen Lin, Max R. Chang Ishcol, Aspiro Nayim Urbina, Wanchai Assavalapsakul, Arunee Thitithanyanont, Po-Liang Lu, Yen-Hsu Chen, and Sheng-Fan Wang. 2019. "Detection of African swine fever virus in pork products brought to Taiwan by travellers." *Emerging Microbes & Infections* 8, no. 1: 1000–1002. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1636615>.

65. Kim, Hyun-Joo, Min-Jung Lee, Soo-Kyoung Lee, Da-young Kim, Sang-Ji Seo, Hae-Eun Kang, and Hyang-Mi Nam. 2019. "African Swine Fever Virus in Pork Brought into South Korea by Travelers from China, August 2018." *Emerging Infectious Diseases* 25, no. 6: 1231–33. <https://doi.org/10.3201/eid2506.181684>.

66. Jurado, Cristina, Lina Mur, María Sol Pérez Aguirreburualde, Estefanía Cadenas-Fernández, Beatriz Martínez-López, José Manuel Sánchez-Vizcaíno, and Andrés Perez. 2019. "Risk of African swine fever virus introduction into the United States through smuggling of pork in air passenger luggage." *Scientific Reports* 9, no. 1: 14423. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50403-w>.

67. Sugiura, Katsuaki, Zhihao Lei, Caitlin Holley, and Takeshi Haga. 2020. "Assessing the risk of ASFV entry into Japan through pork products illegally brought in by air passengers from China and fed to pigs in Japan." *PLOS ONE* 15, no. 5: e0232132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232132>.

68. Mebus, C. A., C. House, F. Ruiz Gonzalvo, J. M. Pineda, J. Tapiador, J. J. Pire, J. Bergada et al. 1993. "Survival of foot-and-mouth disease, African

swine fever, and hog cholera viruses in Spanish serrano cured hams and Iberian cured hams, shoulders and loins.” *Food Microbiology* 10, no. 2: 133–43. <https://doi.org/10.1006/fmic.1993.1014>.

69. Mebus, C., M. Arias, J. M. Pineda, J. Tapiador, C. House, and J. M. Sánchez-Vizcaíno. 1997. “Survival of several porcine viruses in different Spanish dry-cured meat products.” *Food Chemistry* 59, no. 4: 555–59. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(97\)00006-x](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(97)00006-x).

70. Petrini, Stefano, Francesco Feliziani, Cristina Casciari, Monica Giammarioli, Claudia Torresi, and Gian Mario De Mia. 2019. “Survival of African swine fever virus (ASFV) in various traditional Italian dry-cured meat products.” *Preventive Veterinary Medicine* 162: 126–30. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.11.013>.

71. Sindryakova, I. P., Yu P. Morgunov, A. Yu Chichikin, I. Kh Gazaev, D. A. Kudryashov, and S. Zh Tsybanov. 2016. “The Influence of Temperature on the Russian Isolate of African Swine Fever Virus in Pork Products and Feed With Extrapolation to Natural Conditions.” *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* 51, no. 4: 467–74. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.4.467eng>.

72. Prodelalova, Jana, Lenka Kavanova, Jiri Salat, Romana Moutelikova, Sarka Kobzova, Magdalena Krasna, Petra Vasickova, Bronislav Simek, and Petr Vaclavek. 2022. “Experimental Evidence of the Long-Term Survival of Infective African Swine Fever Virus Strain Ba71V in Soil under Different Conditions.” *Pathogens* 11, no. 6: 648. <https://doi.org/10.3390/pathogens11060648>.

73. Stoian, Ana M. M., Jeff Zimmerman, Ju Ji, Trevor J. Hefley, Scott Dee, Diego G. Diel, Raymond R. R. Rowland, and Megan C. Niederwerder. 2019. “Half-Life of African Swine Fever Virus in Shipped Feed.” *Emerging Infectious Diseases* 25, no. 12: 2261–63. <https://doi.org/10.3201/eid2512.191002>.

74. Cwynar, Przemyslaw, Jane Stojkov, and Klaudia Wlazlak. 2019. “African Swine Fever Status in Europe.” *Viruses* 11, no. 4: 310. <https://doi.org/10.3390/v11040310>.

75. Costard, Solenne, Barbara Wieland, William de Glanville, Ferran Jori, Rebecca Rowlands, Wilna Vosloo, Francois Roger, Dirk U. Pfeiffer, and Linda K. Dixon. 2009. "African swine fever: how can global spread be prevented?" *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, no. 1530: 2683–96. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0098>.

76. Rowlands, Rebecca J., Vincent Michaud, Livio Heath, Geoff Hutchings, Chris Oura, Wilna Vosloo, Rahana Dwarka, Tinatin Onashvili, Emmanuel Albina, and Linda K. Dixon. 2008. "African Swine Fever Virus Isolate, Georgia, 2007." *Emerging Infectious Diseases* 14, no. 12: 1870–74. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080591>.

77. Beltrán-Alcrudo, D., J. Lubroth, K. Depner, and S. De La Rocque. 2008. "African swine fever in the Caucasus." *FAO. Empres Watch* 1. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/155da05d-9c7b-4b5b-8428-3fd782dbdfa2/content>.

78. Netherton, Christopher L., Samuel Connell, Camilla T. O. Benfield, and Linda K. Dixon. 2019. "The Genetics of Life and Death: Virus-Host Interactions Underpinning Resistance to African Swine Fever, a Viral Hemorrhagic Disease." *Frontiers in Genetics* 10: 402. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00402>.

79. Desmecht, Daniel, Guillaume Gerbier, Christian Gortázar Schmidt, Vilija Grigaliuniene, Georgina Helyes, Maria Kantere, Daniela Korytarova et al. 2021. "Epidemiological analysis of African swine fever in the European Union (September 2019 to August 2020)." *EFSA Journal* 19, no. 5: e06572. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6572>.

80. Beek, Vincent ter. 2024. "ASF Italy: Almost 100,000 Pigs Culled in 2024." *Pig Progress*. November 4, 2024. <https://www.pigprogress.net/health-nutrition/health/asf-italy-number-of-2024-pig-culls-almost-at-100000/>.

81. Juskiewicz, Małgorzata, Marek Walczak, Grzegorz Woźniakowski, and Katarzyna Podgórska. 2023. "African Swine Fever: Transmission, Spread, and Control through Biosecurity and Disinfection, Including Polish Trends." *Viruses* 15, no. 11: 2275. <https://doi.org/10.3390/v15112275>.

82. Beek, Vincent ter. 2025. "ASF Sweden: A Look Back at a Successful Eradication." *Pig Progress*. January 29, 2025. <https://www.pigprogress.net/health-nutrition/health/asf-sweden-a-look-back-at-a-successful-eradication/>.

83. "ASF Situation in Asia & Pacific Update." 2025. AnimalHealth. Accessed April 30, 2025. <https://www.fao.org/animal-health/situation-updates/asf-in-asia-pacific/en>.

84. "Situational Updates of ASF in Asia and the Pacific." 2019. OIE. October 29, 2019. <https://rr-asia.oie.int/en/projects/asf/situational-updates-of-asf>.

85. Freitas, Tânia Rosária Pereira, and Tânia Maria de Paula Lyra. 2018. "Molecular studies on African swine fever virus from Brazilian isolates." *Arquivos do Instituto Biológico* 85: e0712016. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000712016>.

86. Schambow, Rachel A., Nianet Carrasquillo, Silvia Kreindel, and Andres M. Perez. 2025. "An update on active and passive surveillance for African swine fever in the Dominican Republic." *Scientific Reports*, 15, no. 1: 2244. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-86690-9>.

87. Стегній, Б. Т., О. С. Солодянкін, А. П. Герілович, О. В. Піщанський, А. О. Меженський, М. А. Сапачова, Н. Г. Рудова, М. Ю. Кіт, та А. В. Кузьмінов. 2019. Тест-система для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції «Sui-DNA-test-ASF virus». Патент України на корисну модель 133163, поданий 22 жовтня 2018 р., та опублікований 25 березня 2019 р.. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1340792>.

88. Nevolko, Oleg Mychailovich, Mykola Petrovich Sytiuk, Serhiy Anatolievich Nychyk, and Nataliia Viktorivna Hudz. 2015. "Results of Serological and Molecular Analysis of African and Classical Swine Fever in the Population of Wild Boars in Ukraine." *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 59, no. 1: 9–17. <https://doi.org/10.1515/bvip-2015-0002>.

89. OIE (World Organisation for Animal Health). 2012. "Immediate Notification Report. African Swine Fever. Ukraine." https://web.oie.int/wahis/reports/en_imm_0000012168_20120731_134719.pdf.

90. “Scientific Opinion on African swine fever.” 2014. *EFSA Journal* 12, no. 4: 3628. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3628>.

91. Хоменко, С., А. Розстальний, В. Поліщук, О. Неволько, та В. Дробчак. 2016. “Африканська чума свиней в Україні та прогнозування її розповсюдження.” *Біологія тварин* 18, № 2: 133–44. <https://doi.org/10.15407/animbiol18.02.133>.

92. Корнієнко, Л. М. 2018. “Африканська чума свиней: епізоотологічний моніторинг і реалії сьогодення в Україні та основні чинники, що впливають на ситуацію”. *Науковий вісник ветеринарної медицини* 1: 94–102. http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvvm_2018_1_16.

93. Filatov, S., A. Gerilovych, B. Stegnyy, and A. Pérez de León. 2018. “African Swine Fever Research in Ukraine: Spatio-temporal Epidemiological Analysis and Outbreak Risk Mapping.” *4th Annual GARA Scientific Workshop, Sardinia*.

94. Omelchenko, Hanna, Natalia O. Avramenko, Maksym O. Petrenko, Jarosław Wojciechowski, Zygmunt Pejsak, and Grzegorz Woźniakowski. 2022. “Ten Years of African Swine Fever in Ukraine: An Endemic Form of the Disease in the Wild Boar Population as a Threat to Domestic Pig Production.” *Pathogens* 11, no. 12: 1459. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121459>.

95. Хоєцький, П. Б., О. М. Похалюк, та А. В. Шелепило. 2017. “Африканська чума свиней в Україні”. *Науковий вісник ЛНУВМБ ім. С. З. Гжицького* 19, № 78: 141–45.

96. Bezymennyi, Maksym, Oleksandr Tarasov, Ganna V. Kyivska, Nataliia A. Mezhenka, Svitlana Mandyhra, Ganna Kovalenko, Mykola Sushko et al. 2023. “Epidemiological Characterization of African Swine Fever Dynamics in Ukraine, 2012–2023.” *Vaccines* 11, no. 7: 1145. <https://doi.org/10.3390/vaccines11071145>.

97. “3 2012 року в Україні зафіксовано 600 випадків АЧС, із яких — 428 сільськогосподарські свині, 129 — дикі та 43 інфіковані об’єкти.” n.d. Pigua.info. Accessed April 30, 2025. <https://pigua.info/uk/site/disease>.

98. Шерстюк, Л. 2020. “Галузь свинарства в Україні: особливості й використання.” *Міжнародна науково-практична інтернет-конференція “Тенденції та перспективи розвитку науки і освіти в умовах глобалізації”*, Переяслав, 31 березня.

99. Лисенко, В. І., та Ю. Ю. Недовізії. 2020. “Динаміка чисельності дикого кабана в Україні та фактори, що її обумовлюють”. *The 2nd International Scientific and Practical Conference 'The world of science and innovation', London, September 16-18*.

100. Lvov, Dimitry Konstantinovich, Mikhail Yurievich Shchelkanov, Sergey Vladimirovich Alkhovsky, and Petr Grigorievich Deryabin. 2015. “Double-Stranded DNA Viruses.” In *Zoonotic Viruses in Northern Eurasia*, 393–406. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801742-5.00009-x>.

101. Gallardo, C., P. Sastre, P. Rueda, A. P. Gerilovych, M. Kit, I. Nurmoja, and M. F. Le Potier. 2021. “5. Methods for African swine fever diagnosis in clinical and environmental samples.” in *Understanding and Combatting African Swine Fever*, 141–60. Wageningen, the Netherlands: Wageningen Academic Publishers. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-910-7_5.

102. Lee, Kyung-Lak, Yongjun Choi, Jongchan Yoo, Jusun Hwang, Hyun-Gi Jeong, Weon-Hwa Jheong, and Seon-Hee Kim. 2021. “Identification of African swine fever virus genomic DNAs in wild boar habitats within outbreak regions in South Korea.” *Journal of Veterinary Science* 22, no. 2: e28. <https://doi.org/10.4142/jvs.2021.22.e28>.

103. Deutschmann, Paul, Jutta Pikalo, Martin Beer and Sandra Blome. 2022. “Lateral Flow Assays for the Detection of African Swine Fever Virus Antigen Are Not Fit for Field Diagnosis of Wild Boar Carcasses.” *Transboundary and Emerging Diseases* 69, no. 4: 2344–48. <https://doi.org/10.1111/tbed.14248>.

104. Basto, A. P., R. S. Portugal, R. J. Nix, C. Cartaxeiro, F. Boinas, L. K. Dixon, A. Leitão, and C. Martins. 2005. “Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus

(ASFV) in *Ornithodoros erraticus*.” *Archives of Virology* 151, no. 4: 819–26. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0654-2>.

105. Aguero, M., J. Fernandez, L. Romero, C. Sanchez Mascaraque, M. Arias, and J. M. Sanchez-Vizcaino. 2003. “Highly Sensitive PCR Assay for Routine Diagnosis of African Swine Fever Virus in Clinical Samples.” *Journal of Clinical Microbiology* 41, no. 9: 4431–34. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4431-4434.2003>.

106. Fernández-Pinero, J., C. Gallardo, M. Elizalde, A. Robles, C. Gómez, R. Bishop, L. Heath et al. 2012. “Molecular Diagnosis of African Swine Fever by a New Real-Time PCR Using Universal Probe Library.” *Transboundary and Emerging Diseases* 60, no. 1: 48–58. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01317.x>.

107. King, Donald P., Scott M. Reid, Geoffrey H. Hutchings, Sylvia S. Grierson, Philip J. Wilkinson, Linda K. Dixon, Armanda D. S. Bastos, and Trevor W. Drew. 2003. “Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus.” *Journal of Virological Methods* 107, no. 1: 53–61. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(02\)00189-1](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00189-1).

108. James, Heather E., K. Ebert, R. McGonigle, Scott M. Reid, Neil Boonham, Jennifer A. Tomlinson, Geoffrey H. Hutchings et al. 2010. “Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification.” *Journal of Virological Methods* 164, no. 1–2: 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.11.034>.

109. Miao, Faming, Jingyuan Zhang, Nan Li, Teng Chen, Lidong Wang, Fei Zhang, Lijuan Mi et al. 2019. “Rapid and Sensitive Recombinase Polymerase Amplification Combined With Lateral Flow Strip for Detecting African Swine Fever Virus.” *Frontiers in Microbiology* 10: 1004. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01004>.

110. Woźniakowski, Grzegorz, Magdalena Frączyk, Andrzej Kowalczyk, Małgorzata Pomorska-Mól, Krzysztof Niemczuk, and Zygmunt Pejsak. 2017. “Polymerase cross-linking spiral reaction (PCLSR) for detection of African swine fever virus (ASFV) in pigs and wild boars.” *Scientific Reports* 7, no. 1: 42903. <https://doi.org/10.1038/srep42903>.

111. Cruz, Coelho, B. Toussaint, B. Munoz Pineiro, A. Mèhn, D. Denin, N. Ruiz Moreno, and A. Van Den Eede. 2023. *African Swine Fever (ASF) Vaccine Development: Progress and Challenges*. Luxembourg: Publications Office of the European Union. <https://dx.doi.org/10.2760/209152>.
112. Bosch-Camós, Laia, Elisabeth López, and Fernando Rodriguez. 2020. “African swine fever vaccines: a promising work still in progress.” *Porcine Health Management* 6, no. 1: 17. <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00154-2>.
113. Van den Born, Erwin, Ferenc Olasz, István Mészáros, Eszter Göttl, Barbara Oláh, Jui Joshi, Emma van Kilsdonk, Ruud Segers, and Zoltán Zádori. 2025. “African swine fever virus vaccine strain Asfv-G-ΔI1771 reverts to virulence and negatively affects reproductive performance.” *Vaccines* 10, no. 1: 46. <https://doi.org/10.1038/s41541-025-01099-9>.
114. Deutschmann, Paul, Jan-Hendrik Forth, Julia Sehl-Ewert, Tessa Carrau, Elisenda Viaplana, Jose Carlos Mancera, Alicia Urniza, Martin Beer, and Sandra Blome. 2023. “Assessment of African swine fever vaccine candidate ASFV-G-ΔMGF in a reversion to virulence study.” *Vaccines* 8, no. 1: 78. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00669-z>.
115. Mouchantat, Susan, Bernd Haas, Wolfgang Böhle, Anja Globig, Elke Lange, Thomas C. Mettenleiter, and Klaus Depner. 2014. “Proof of principle: Non-invasive sampling for early detection of foot-and-mouth disease virus infection in wild boar using a rope-in-a-bait sampling technique.” *Veterinary Microbiology* 172, no. 1–2: 329–33. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.021>.
116. Kusnadi, Joni, Noval Audi Ashari, and Estri Laras Arumingtyas. 2020. “Specificity of Various Mitochondrial DNA (MtDNA), ND5, D-Loop, and Cytb DNA Primers in Detecting Pig (*Sus scrofa*) DNA Fragments.” *American Journal of Molecular Biology* 10, no. 03: 141–47. <https://doi.org/10.4236/ajmb.2020.103010>.
117. “LAMP Primer Designing Software PrimerExplorer.” n.d. Primerexplorer.Jp. Accessed December 6, 2021. <https://primerexplorer.jp/e/index.html>.
118. “Phobius.” n.d. Sbc.Su.Se. Accessed December 6, 2021. <https://phobius.sbc.su.se/>.

119. Chang, Angela Y., Vivian W. Y. Chau, Julius A. Landas, and Yvonne Pang. 2017. "Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation." *JEMI Methods* 1: 22–25. <https://ujemi.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/Chang%20et%20al%20JEMI-methods%20Vol%201%20pg%2022-25.pdf>.
120. Kollnberger, S. D., B. Gutierrez-Castañeda, M. Foster-Cuevas, A. Corteyn, and R. M. E. Parkhouse. 2002. "Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody." *Journal of General Virology* 83, no. 6: 1331–42. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-6-1331>.
121. Mruk, Dolores D., and C. Yan Cheng. 2011. "Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting." *Spermatogenesis* 1, no. 2: 121–22. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16606>.
122. Heimerman, Mallory E., Maria V. Murgia, Ping Wu, Andre D. Lowe, Wei Jia, and Raymond R. Rowland. 2018. "Linear epitopes in African swine fever virus p72 recognized by monoclonal antibodies prepared against baculovirus-expressed antigen." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 30, no. 3: 406–12. <https://doi.org/10.1177/1040638717753966>.
123. Стегній, Б. Т., О. С. Солодянкін, О. Ю. Лиманська, М. Ю. Кіт, А. І. Бузун, та В. Л. Ареф'єв. 2018. "Вивчення специфічності та чутливості тест-системи для детекції вірусу африканської чуми свиней методом ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus»". *Ветеринарна медицина* 104: 359–62. https://jvm.kharkov.ua/sbornik/104/VetMed_104.pdf.
124. Kit, M., O. Zlenko, O. Solodiankin, V. Bolotin, and A. Gerilovych. 2020. "Development of recombinant positive control for African swine fever virus PCR detection." *Biotechnologia Acta* 13, no. 6: 58–63. <https://doi.org/10.15407/biotech13.06.058>.
125. Kit, M., J. Schwarz, and A. Gerilovych. 2021. "Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on the C962R gene for African swine fever virus detection". *Agricultural Science and Practice* 8, no. 3: 3–12. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.03.003>.

126. Oura, C. A. L., L. Edwards, and C. A. Batten. 2013. “Virological diagnosis of African swine fever—Comparative study of available tests.” *Virus Research* 173, no. 1: 150–58. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.022>.

127. Sakamoto, Kenichi, Makoto Yamakawa, Tomoyuki Tsuda, and Yosuke Murakami. 2006. “Detection of African Swine Fever Virus-Specific Antibodies Using the Recombinant Viral Proteins P32 and P54 Expressed in Insect Cells.” *Japan Agricultural Research Quarterly* 40 no. 3: 271–76. <https://doi.org/10.6090/jarq.40.271>.

128. Gallardo, Carmina, Ana Luísa Reis, Gladys Kalema-Zikusoka, Joana Malta, Alejandro Soler, Esther Blanco, R. M. E. Parkhouse, and Alexandre Leitão. 2009. “Recombinant Antigen Targets for Serodiagnosis of African Swine Fever.” *Clinical and Vaccine Immunology* 16, no. 7: 1012–20. <https://doi.org/10.1128/cvi.00408-08>.

129. Petrovan, Vlad, Fangfeng Yuan, Yanhua Li, Pengcheng Shang, Maria V. Murgia, Saurav Misra, Raymond R. R. Rowland, and Ying Fang. 2019. “Development and characterization of monoclonal antibodies against p30 protein of African swine fever virus.” *Virus Research*, 269: 197632. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.05.010>.

130. Giménez-Lirola, Luis G., Lina Mur, Belen Rivera, Mark Mogler, Yaxuan Sun, Sergio Lizano, Christa Goodell et al. 2016. “Detection of African Swine Fever Virus Antibodies in Serum and Oral Fluid Specimens Using a Recombinant Protein 30 (p30) Dual Matrix Indirect ELISA.” *PLOS ONE* 11, no. 9: e0161230. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161230>.

131. Nah, Jin-Ju, Oh-Gyu Kwon, Ji-Da Choi, Sang-Ho Jang, Hyeon Jeong Lee, Dong-Gyu Ahn, Kayeon Lee, BoKyu Kang, Kang Hae-Eun, and Yeun-Kyung Shin. 2022. “Development of an indirect ELISA against African swine fever virus using two recombinant antigens, partial p22 and p30.” *Journal of Virological Methods* 309: 114611. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114611>.

132. Chen, Huahan, Junhai Zhu, Xuefeng Niu, Yuanyi Cheng, Weijun Jian, Fei Gao, Yongjie Sunkang, Wenbao Qi, and Lihong Huang. 2024. “Development of a

P30 Protein-Based Indirect ELISA for Detecting African Swine Fever Antibodies Utilizing the HEK293F Expression System.” *Veterinary Journal* 306: 106186. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2024.106186>.

133. Zhao, Xinyu, Guoshun Li, and Shufang Liang. 2013. “Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification.” *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2013: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/581093>.

134. Ma, Yunqi, Chang-Joo Lee, and Jang-Su Park. 2020. “Strategies for Optimizing the Production of Proteins and Peptides with Multiple Disulfide Bonds.” *Antibiotics* 9, no. 9: 541. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090541>.

135. IBA Lifesciences. 2017. “Strep-Tactin®XT:Twin-Strep-tag® Advantages Compared to the His-Tag Purification System.” https://www.chemie-brunschwig.ch/documents/suppliers-information/699_Strep-Tactin-XT_Twin-Strep-tag-Application_Note.pdf

136. Wang, Guoguo, Mengjia Xie, Wei Wu, and Zhongzhou Chen. 2021. “Structures and Functional Diversities of ASFV Proteins.” *Viruses* 13, no. 11: 2124. <https://doi.org/10.3390/v13112124>.

137. Chen, Yiqing, Hehua Liu, Chun Yang, Yanqing Gao, Xiang Yu, Xi Chen, Ruixue Cui et al. 2019. “Structure of the error-prone DNA ligase of African swine fever virus identifies critical active site residues.” *Nature Communications* 10, no. 1: 387. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08296-w>.

138. Singh, Anupam, Vaibhav Upadhyay, Arun Kumar Upadhyay, Surinder Mohan Singh, and Amulya Kumar Panda. 2015. “Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process.” *Microbial Cell Factories*, 14, no. 1: 41. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>.

139. Yang, Zhong, Linlin Zhang, Yan Zhang, Ting Zhang, Yanye Feng, Xiuxiu Lu, Wenxian Lan et al. 2011. “Highly Efficient Production of Soluble Proteins from Insoluble Inclusion Bodies by a Two-Step-Denaturing and Refolding Method.” *PLoS ONE* 6, no. 7: e22981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022981>.

140. Palmer, Ira, and Paul T. Wingfield. 1995. "Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from *Escherichia coli*." *Current Protocols in Protein Science* 6: 6.3.1–6.3.20. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0603s00>.
141. Wingfield, Paul T. 2015. "Overview of the Purification of Recombinant Proteins." *Current Protocols in Protein Science* 80: 6.1.1–6.1.35. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80>.
142. Tao, Hu, Wenjun Liu, Brandi Simmons, Helen Harris, Timothy Cox, and Michael Massiah. 2010. "Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS." *BioTechniques* 48, no. 1: 61–64. <https://doi.org/10.2144/000113304>.
143. Burgess, Richard R. 1996. "[12] Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase σ factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from Sarkosyl." In *Methods in Enzymology*, 145–49. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)73014-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(96)73014-8).
144. Lau, Benjamin Yii Chung, and Abrizah Othman. 2019. "Evaluation of sodium deoxycholate as solubilization buffer for oil palm proteomics analysis." *PLOS ONE* 14, no. 8: e0221052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221052>.
145. Johnson, Mary. 2013. "Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More." *Materials and Methods* 3: 163. <https://doi.org/10.13070/mm.en.3.163>.
146. Coligan, John E. 2001. "Commonly Used Detergents." *Current Protocols in Protein Science*, Appendix 1 (1): Appendix 1B. <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa01bs11>.
147. Chisnall, Ben, Courtney Johnson, Yavuz Kulaberoglu, and Yu Wai Chen. 2013. "Insoluble Protein Purification with Sarkosyl: Facts and Precautions." In *Methods in Molecular Biology*, 179–86. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-691-7_12.
148. Bhatwa, Arshpreet, Weijun Wang, Yousef I. Hassan, Nadine Abraham, Xiu-Zhen Li, and Ting Zhou. 2021. "Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address

Them for Industrial Applications.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9: 630551. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551>.

149. Agilent Technologies. 2015. “ArcticExpress Competent Cells and ArcticExpress (DE3) Competent Cells.” <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/230191.pdf>.

150. Thomas, Philip, and Trevor G. Smart. 2005. “HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins.” *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51, no. 3: 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>.

151. Ikonomidou, L., Y. J. Schneider, and S. N. Agathos. 2003. “Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 62, no. 1: 1–20. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1223-9>.

152. Basile, Giancarlo, and Manuela Peticca. 2009. “Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*.” *Molecular Biotechnology* 43, no. 3: 273–78. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9213-5>.

153. Pierce Biotechnology. 2009. *Protein Stability and Storage*. TECH TIP # 43. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0043-Protein-storage.pdf>.

154. Simpson, R. J. 2010. “Stabilization of Proteins for Storage.” *Cold Spring Harbor Protocols* 2010, no. 5: pdb.top79. <https://doi.org/10.1101/pdb.top79>.

155. Pierce Biotechnology. 2010. *Remove Detergent from Protein Samples*. TECH TIP # 19. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/TR0019-Remove-detergent.pdf>.

156. Pierce Biotechnology. 2010. *ELISA Technical Guide and Protocols*. TECH TIP # 65. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf>

157. Salimetrics. 2017. “Calculating Inter- and Intra-Assay Coefficients of Variability –.” Salimetrics. June 2, 2017. <https://salimetrics.com/calculating-inter-and-intra-assay-coefficients-of-variability/>.

158. Perez-Filgueira, D. M., F. Gonzalez-Camacho, C. Gallardo, P. Resino-Talavan, E. Blanco, E. Gomez-Casado, C. Alonso, and J. M. Escribano. 2006. “Optimization and Validation of Recombinant Serological Tests for African

Swine Fever Diagnosis Based on Detection of the p30 Protein Produced in *Trichoplusia ni* Larvae.” *Journal of Clinical Microbiology* 44, no. 9: 3114–21. <https://doi.org/10.1128/jcm.00406-06>.

159. Mandygra, S. S., L. M. Muzykina, L. M. Ishchenko, G. A. Kovalenko, I. V. Halka, V. G. Spyrydonov, M. P. Sytiuk, S. A. Nychyk, and S. D. Melnychuk. 2017. “Validation of a RT-qPCR assay for differential diagnosis of African and classical swine fever.” *Naukovì dopovidì Nacìonal'nogo unìversitetu bìoresursiv ì prirodokoristuvannâ Ukraïni*, no. 6(70). <https://doi.org/10.31548/dopovidi2017.06.014>.

160. Tignon, Marylène, Carmina Gallardo, Carmen Iscaro, Evelyne Hutet, Yves Van der Stede, Denis Kolbasov, Gian Mario De Mia, et al. 2011. “Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus.” *Journal of Virological Methods* 178, no. 1–2: 161–70. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.09.007>.

161. Moine, Sandrine, Elodie Coulon, and Immanuel Leifer. n.d. “Development and Validation of African Swine Fever Real-Time PCR Kit.” <https://assets.thermo-fisher.com/TFS-Assets/GSD/posters/development-ASFV-real-time-kit-poster.pdf>.

162. Velazquez-Salinas, Lauro, Elizabeth Ramirez-Medina, Ayushi Rai, Sarah Pruitt, Elizabeth A. Vuono, Nallely Espinoza, Douglas P. Gladue, and Manuel V. Borca. 2021. “Development Real-Time PCR Assays to Genetically Differentiate Vaccinated Pigs From Infected Pigs With the Eurasian Strain of African Swine Fever Virus.” *Frontiers in Veterinary Science* 8: 768869. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.768869>.

163. Moldovan Elena, Valeriu Moldovan. 2020. “Controls in Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Techniques”. *Acta Marisiensis - Seria Medica* 66, no. 3: 79–82. <https://doi.org/10.2478/amma-2020-0025>.

164. Chan, Maurice, Boran Jiang, and Thean-Yen Tan. 2016. “Using pooled recombinant plasmids as control materials for diagnostic real-time PCR.” *Clinical Laboratory* 62, no. 10: 160114. <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2016.160114>.

165. World Organization for Animal Health. 2018. "Chapter 2.2.3 Development and Optimisation of Nucleic Acid Detection Assays." In *Manual Of Diagnostic Tests And Vaccines For Terrestrial Animals, 8th Edition*. OIE.

166. Qiagen. 2010. "Critical factors for successful real-time PCR." *Real-Time PCR Brochure* 7: 1–63. <https://www.gene-quantification.de/qiagen-qpcr-sample-assay-tech-guide-2010.pdf>.

167. Wang, Aiping, Rui Jia, Yunchao Liu, Jingming Zhou, Yuanming Qi, Yumei Chen, Dongmin Liu, et al. 2019. "Development of a novel quantitative real-time PCR assay with lyophilized powder reagent to detect African swine fever virus in blood samples of domestic pigs in China." *Transboundary and Emerging Diseases* 67, no. 1: 284–97. <https://doi.org/10.1111/tbed.13350>.

168. Стегній, Б. Т., А. П. Герілович, І. В. Горайчук, О. С. Солодянкін, В. І. Болотін, С. І. Вовк. 2012. "Розробка регламенту виготовлення позитивного ДНК-контролю для ПЛР-діагностики АЧС." *Ветеринарна медицина*, 96: 60–62

169. Zhou, M. Y., and C. E. Gomez-Sanchez. 2000. "Universal TA Cloning." *Current Issues in Molecular Biology* 2, no. 1: 1–7. <https://doi.org/10.21775/cimb.002.001>.

170. Baek, Yun Hee, Jihye Um, Khristine Joy C. Antigua, Ji-Hyun Park, Yeonjae Kim, Sol Oh, Young-il Kim, et al. 2020. "Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2." *Emerging Microbes & Infections* 9, no. 1: 998–1007. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1756698>.

171. Kashir, Junaid, and Ahmed Yaqinuddin. 2020. "Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays as a Rapid Diagnostic for COVID-19." *Medical Hypotheses* 141: 109786. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109786>.

172. Park, Gun-Soo, Keunbon Ku, Seung-Hwa Baek, Seong-Jun Kim, Seung Il Kim, Bum-Tae Kim, and Jin-Soo Maeng. 2020. "Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)." *Journal of Molecular Diagnostics* 22, no. 6: 729–35. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.03.006>.

173. Mansour, Shima M. G., Haytham Ali, Christopher C. L. Chase, and Arnost Cepica. 2015. "Loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of 18 World Organization for Animal Health (OIE) notifiable viral diseases of ruminants, swine and poultry." *Animal Health Research Reviews* 16, no. 2: 89–106. <https://doi.org/10.1017/s1466252315000018>.

174. Dokphut, Arphaphorn, Prakrit Boonpornprasert, Tapanut Songkasupa, and Supansa Tangdee. 2020. "Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of African swine fever." *Veterinary Integrative Sciences* 19, no. 1: 87–100. <https://doi.org/10.12982/vis.2021.008>.

175. Tran, Diem Hong, Hau Thi Tran, Uyen Phuong Le, Xuan Dang Vu, Thi Bich Ngoc Trinh, Hoang Dang Khoa Do, Van Thai Than, et al. 2020. "Direct colorimetric LAMP assay for rapid detection of African swine fever virus: A validation study during an outbreak in Vietnam." *Transboundary and Emerging Diseases* 68 (4): 2595–2602. <https://doi.org/10.1111/tbed.13879>.

176. Wu, Xulong, Lu Xiao, Yin Wang, Zexiao Yang, Xueping Yao, and Bin Peng. 2016. "Development of a Rapid and Sensitive Method for Detection of African Swine Fever Virus Using Loop-Mediated Isothermal Amplification." *Brazilian Archives of Biology and Technology* 59: e2016160500. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016160500>.

177. Wang, Deguo, Jiangnan Yu, Yongzhen Wang, Meng Zhang, Peng Li, Meng Liu, and Yanhong Liu. 2020. "Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and visual LAMP assay for detection of African swine fever virus (ASFV)." *Journal of Virological Methods* 276: 113775. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113775>.

178. Chapman, David A. G., Alistair C. Darby, Melissa Da Silva, Chris Upton, Alan D. Radford, and Linda K. Dixon. 2011. "Genomic Analysis of Highly Virulent Georgia 2007/1 Isolate of African Swine Fever Virus." *Emerging Infectious Diseases* 17, no. 4: 599–605. <https://doi.org/10.3201/eid1704.101283>.

179. Bao, Jingyue, Qinghua Wang, Peng Lin, Chunju Liu, Lin Li, Xiaodong Wu, Tianying Chi, et al. 2019. "Genome comparison of African swine fever

virus China/2018/Anhui XCGQ strain and related European p72 Genotype II strains.” *Transboundary and Emerging Diseases* 66, no. 3: 1167–76. <https://doi.org/10.1111/tbed.13124>.

180. Ramirez-Medina, Elizabeth, Elizabeth A. Vuono, Ayushi Rai, Sarah Pruitt, Ediane Silva, Lauro Velazquez-Salinas, James Zhu, Manuel V. Borca, and Douglas P. Gladue. 2020. “The C962R ORF of African Swine Fever Strain Georgia Is Non-Essential and Not Required for Virulence in Swine.” *Viruses* 12, no. 6: 676. <https://doi.org/10.3390/v12060676>.

181. Rockweiler, Tony. 2018. “Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Primer Design and Assay Optimization.” Youtube. https://www.youtube.com/watch?v=GJkvQqDufh0&ab_channel=LucigenVideo.

182. Francois, Patrice, Manuela Tangomo, Jonathan Hibbs, Eve-Julie Bonetti, Catharina C. Boehme, Tsugunori Notomi, Mark D. Perkins, and Jacques Schrenzel. 2011. “Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications.” *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 62, no. 1: 41–48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2011.00785.x>.

183. Mee, Peter T., Shani Wong, Kim J. O’Riley, Felisiano da Conceição, Joanita Bendita da Costa Jong, Dianne E. Phillips, Brendan C. Rodoni, Grant T. Rawlin, and Stacey E. Lynch. 2020. “Field Verification of an African Swine Fever Virus Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay during an Outbreak in Timor-Leste.” *Viruses* 12, no. 12: 1444. <https://doi.org/10.3390/v12121444>.

184. Phillips, Dianne E., Peter T. Mee, Stacey E. Lynch, Felisiano da Conceição, Joanita Bendita da Costa Jong, and Grant T. Rawlin. 2021. “Use of Field Based Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Technology for a Prevalence Survey and Proof of Freedom Survey for African Swine Fever in Timor-Leste in 2019.” *Frontiers in Veterinary Science* 8: 672048. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.672048>.

185. Wong, Y. P., S. Othman, Y. L. Lau, S. Radu, and H. Y. Chee. 2018. “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for

detection of micro-organisms.” *Journal of Applied Microbiology* 124, no. 3: 626–43. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>.

186. Goto, Motoki, Eiichi Honda, Atsuo Ogura, Akio Nomoto, and Ken-Ichi Hanaki. 2009. “Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue.” *BioTechniques* 46, no. 3: 167–72. <https://doi.org/10.2144/000113072>.

187. Khomenko, S., T. Alexandrov, and K. Sumption. 2013. “Options for non-invasive collection of saliva from wild ungulates for disease surveillance”. *FAO EMPRES-Animal Health* 360 42: 15–17.

188. Prickett, John R., and Jeffrey J. Zimmerman. 2010. “The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine.” *Animal Health Research Reviews* 11, no. 2: 207–16. <https://doi.org/10.1017/s1466252310000010>.

189. Mur, Lina, Carmina Gallardo, Alejandro Soler, Jeffrey Zimmermman, Virginia Pelayo, Raquel Nieto, José Manuel Sánchez-Vizcaíno, and Marisa Arias. 2013. “Potential use of oral fluid samples for serological diagnosis of African swine fever.” *Veterinary Microbiology* 165, no. 1–2: 135–39. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.034>.

190. Grau, Frederic R., Megan E. Schroeder, Erin L. Mulhern, Michael T. McIntosh, and Mangkey A. Bounpheng. 2015. “Detection of African swine fever, classical swine fever, and foot-and-mouth disease viruses in swine oral fluids by multiplex reverse transcription real-time polymerase chain reaction.” *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 27, no. 2: 140–49. <https://doi.org/10.1177/1040638715574768>.

191. Dietze, Klaas, Anna Tucakov, Tatjana Engel, Sabine Wirtz, Klaus Depner, Anja Globig, Robert Kammerer, and Susan Mouchantat. 2017. “Rope-based oral fluid sampling for early detection of classical swine fever in domestic pigs at group level.” *BMC Veterinary Research* 13, no. 1: 5. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0930-2>.

192. Petrini, Stefano, Ilaria Pierini, Monica Giammarioli, Francesco Feliziani, and Gian Mario De Mia. 2017. “Detection of Classical swine fever virus infection by

individual oral fluid of pigs following experimental inoculation.” *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 29, no. 2: 254–57. <https://doi.org/10.1177/1040638716686393>.

193. Bjuström-Kraft, Jordan, Jane Christopher-Hennings, Russ Daly, Rodger Main, Jerry Torrison, Mary Thurn, and Jeffrey Zimmerman. 2018. “The use of oral fluid diagnostics in swine medicine.” *Journal of Swine Health and Production* 26, no. 5: 262–69. <https://doi.org/10.54846/jshap/1091>.

194. Kosowska, Aleksandra, Estefanía Cadenas-Fernández, Sandra Barroso, Jose M. Sánchez-Vizcaíno, and Jose A. Barasona. 2020. “Distinct African Swine Fever Virus Shedding in Wild Boar Infected with Virulent and Attenuated Isolates.” *Vaccines* 8, no. 4: 767. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040767>.

195. Männistö, Hanna Eveliina. 2018. *Collection of Oral Fluid Samples from Wild Boar in the Field Conditions to Detect African Swine Fever Virus (ASFV)*. Tartu: Estonian University of Life Sciences. <http://hdl.handle.net/10492/4270>.

196. Rossi, Sophie, Christoph Staubach, Sandra Blome, Vittorio Guberti, Hans-Hermann Thulke, Ad Vos, Frank Koenen, and Marie-Frédérique Le Potier. 2015. “Controlling of CSFV in European wild boar using oral vaccination: a review.” *Frontiers in Microbiology* 6: 1141. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01141>.

197. “1,4 млн Грн Були Спрямовані На Компенсацію Власникам Худоби, Яку Знищили Через АЧС у Регіоні.” n.d. Gov.Ua. Дата звернення січень 4, 2022. <https://kharkivoda.gov.ua/news/85575?sv>.

198. Служба новин. 2017. “Дикі Кабани Загинули Через АЧС у Двох областях України.” Agropolit.Com. November 30, 2017. <https://agropolit.com/news/6656-diki-kabani-zaginuli-cherez-achs-v-dvoh-oblastyah-ukrayini>.

199. “На території Національного природного парку “Гомільшанські ліси” зафіксовано випадок африканської чуми свиней – Головне Управління Держпродспоживслужби у Харківській області”. n.d. Gov.ua. Accessed April 30, 2025. <https://surl.li/opnrwj>.

200. Герілович, А. П., та М. Ю. Кіт. 2021. *Детекція ДНК вірусу африканської чуми свиней методом петльової ізотермічної ампліфікації*

(методичні рекомендації) [затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 3 від 3.11.2021 р.]. Харків: ННЦ «ІЕКВМ».

201. Кіт, М. Ю., О. Б. Зленко, та Т. Б. Дідик. 2024. *Методичні рекомендації «Отримання рекомбінантного антигену р32 для ІФА-діагностики АЧС»* [затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 8 від 23.10.2024 р.]. Харків: ННЦ «ІЕКВМ».

202. Kit, M., O. Solodyankin, V. Arefiev, V. Bolotin, and A. Gerilovych. 2018. “Development of universal positive DNA-control of ASF virus and validation of real-time PCR with its use.” in *3rd Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Kyiv, Ukraine, April, 16–20, 2018*, 118.

203. Kit, M., and A. Gerilovych. 2021. “Development of DNA detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification.” in *2021 International BioThreat Reduction Symposium, Kyiv, Ukraine, 29 June, 29–July, 2*, 64.

204. Kit, M., C. Popp, H. von Buttlar, A. Gerilovych, and J. Schwarz. 2021. “Oral fluid-based surveillance study of African swine fever among wild boars in Ukraine.” in *17th Medical Biodefence Conference, Munich, Germany, September, 28–October, 1*, 54.

205. Buzun, A.-I., M. Kit, M. Stegnyy, and I. Bobrovickaya. 2022. “Vers l’farm initiative: Comment un antigène artificiel de la peste porcine africaine peut aider l’exportation agricole de l’Ukraine”. *ΛΟΓΟΣ*, no. July 8, 2022 [3rd International Scientific and Practical Conference “Débats Scientifiques et Orientations Prospectives du Développement Scientifique”, Paris, France, July 8, 2022]: 138–42. <https://doi.org/10.36074/logos-08.07.2022.037>.

206. Кіт, М. Ю., та О. Б. Зленко. 2024. “Скринінгове дослідження вірусу африканської чуми свиней у популяції диких кабанів на території Харківської області”. у *Онлайн-конференція аспірантів і молодих вчених у сфері Єдиного здоров’я та біотехнології «VetBioConnect», м. Харків, 3–4 червня 2024 р.*, 29–31. https://www.iekvm.kharkov.ua/documents/VetBioConnect_2024_theses.pdf.

207. Кіт, М. Ю. 2024. “Розробка способу детекції ДНК свині (*Sus scrofa*) за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації”. у *Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції: II міжнародна науково-практична конференція науково-педагогічних працівників та молодих науковців, м. Одеса, 17–18 жовтня 2024 р.*, 113–5. https://osau.edu.ua/wp-content/uploads/2024/11/2024_ZBIRNYK_FVM.pdf.

ДОДАТОК А





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **133163** (13) **U**
 (51) МПК (2019.01)
C12N 7/00
C12N 7/01 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
 ЕКОНОМІЧНОГО
 РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
 УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2018 10410 (22) Дата подання заявки: 22.10.2018 (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.03.2019 (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2019, Бюл.№ 6	(72) Винахідник(и): Стегній Борис Тимофійович (UA), Солодянкін Олексій Сергійович (UA), Герілович Антон Павлович (UA), Піщанський Олександр Вікторович (UA), Меженський Андрій Олександрович (UA), Сапачова Марина Артурівна (UA), Рудова Наталія Генадіївна (UA), Кіт Марина Юріївна (UA), Кузьмінов Андрій Вікторович (UA) (73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA), ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ І ВЕТЕРИНАРНО- САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)
---	--

(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ДНК ВІРУСУ АФРИКАНСЬКОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ "Sui-DNA-test-ASF virus"

(57) Реферат:

Тест-система для виявлення ДНК вірусу АЧС за допомогою полімеразної ланцюгової реакції "Sui-DNA-тест-ASF virus" складається з "RT-PCR MasterMix", розчину зонда ASFV probe, розчинів праймерів ASFV-1 та ASFV-2, води деіонізованої, позитивного контрольного зразка. Містить суміші розчинів праймерів та розчин зонда для детекції внутрішнього позитивного контролю IC-mix, стандартизований внутрішній позитивний контроль.

UA 133163 U

ДОДАТОК Б

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В. о. директора Інституту ветеринарної
медицини НААН України,

кандидат ветеринарних наук, доцент

Сергій БОРОВКОВ

_____ 2025 р.



КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Викладені в інформаційному листі матеріали дисертаційної роботи аспірантки лабораторії молекулярної діагностики Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» КІТ Марини Юріївни «Удосконалення експрес-діагностики африканської чуми свиней за допомогою молекулярно-генетичних методів» використовуються в підготовці фахівців та наукових дослідженнях у наукових підрозділах Інституту ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України.

Розглянуто і схвалено на засіданні Вченої ради Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 3 від « 27 » березня 2025 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ



Проректор з науково-педагогічної роботи

Сумського національного аграрного університету

Маргарита ЛИШЕНКО

«4» травня 2025 р.

АКТ

про впровадження/використання результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи, які висвітлюються у методичних рекомендаціях **«Детекція ДНК вірусу африканської чуми свиней методом петльової ізотермічної ампліфікації»**, що представлена на здобуття наукового ступеня доктор філософії за спеціальністю 091 **«Біологія та біохімія»** виконаної **Kim Мариною Юрійвною** впроваджено у навчальну програму при викладанні навчальної дисципліни «Ветеринарна вірусологія», а саме дані щодо біологічних особливостей вірусу африканської чуми свиней, підходи до лабораторної діагностики африканської чуми свиней, особливості розробки і проведення петльової ізотермічної ампліфікації на кафедрі ветеринарно-санітарного інспектування, мікробіології, гігієни та патологічної анатомії у підготовці здобувачів вищої освіти ступеня «Магістр», за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» у Сумському національному аграрному університеті.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри ветеринарно-санітарного інспектування, мікробіології, гігієни та патологічної анатомії (протокол № 12 від «21» квітня 2025 р.).

Завідувач кафедри
ветеринарно-санітарного
інспектування, мікробіології,
гігієни та патологічної анатомії

 Роман ПЕТРОВ



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Національного фармацевтичного університету
доктор фармацевтичних наук, професор
Інна ВЛАДИМИРОВА

квітня 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: Клонування, експресія в *E. coli* та очищення рекомбінантного антигену р32 вірусу африканської чуми свиней для ІФА-діагностики.

2. Установа, її адреса, виконавці: 61000, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 83, Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», лабораторія молекулярної діагностики, н.с. Кіт М. Ю., к.б.н., с.н.с. Зленко О.Б., к.вет.н., п.н.с Дідик Т.Б.

3. Джерела інформації:

3.1. Методичні рекомендації «ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО АНТИГЕНУ Р32 ДЛЯ ІФА-ДІАГНОСТИКИ АЧС» / М.Ю. Кіт, О.Б. Зленко, Т.Б. Дідик // ННЦ «ІЕКВМ». – Харків. – 2024. – 12 с.

3.2. Kit, M. Yu. Development of recombinant antigen expression and purification for African swine fever serological diagnostics/ *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. 2021. Vol.7, No 3. P. 24-31.

4. Впроваджено: в навчальний процес на кафедрі біотехнології НФаУ при вивченні освітніх компонентів ОП Біотехнологія – «Основи генетичної та біоінженерії», ОП «Промислова біотехнологія» – «Новітні технології виробництва біопрепаратів».

5. Термін впровадження: 2024–2026 рр.

Затверджено на засіданні кафедри, протокол № 13 від 21 квітня 2025 р.

6. Ефективність впровадження:

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелі інформації		
Результати наукових досліджень використовуються студентами на кафедрі біотехнології		

Відповідальний за впровадження:
завідувачка кафедри біотехнології,
д. фарм. н., проф.

Наталя ХОХЛЕНКОВА

ЗАТВЕРДЖУЮ



Проректор з науково-педагогічної роботи
Харківського національного
університету імені В. Н. Каразіна

Антон ПАНТЕЛЕЙМОНОВ

2025 р.

АКТ

**про впровадження/використання результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес**

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи, які висвітлюються у методичних рекомендаціях «Отримання рекомбінантного антигену р32 для ІФА-діагностики АЧС», що представлена на здобуття наукового ступеня доктор філософії за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія»

виконаної *Кім Мариною Юрївною*

впроваджено у навчальну програму при викладанні навчальних дисциплін:
Генетична та клітинна інженерія, Сучасні аспекти прикладної генетики, Генетика тварин,
Генетика об'єкту дослідження

дані щодо особливостей проведення молекулярного клонування, експресії, очищення
рекомбінантних білків та проведення ІФА для діагностики АЧС

на кафедрі генетики і цитології

у підготовці здобувачів вищої освіти за освітніми програмами «Генетика» другого (магістерського) рівня вищої освіти та «Біологія» третього (освітньо-наукового) рівня вищої освіти

за спеціальністю 091 Біологія та біохімія

у Харківському національному університеті імені В.Н. Каразіна

Заступник декана біологічного факультету
з навчальної роботи,
доцент ЗВО кафедри генетики і цитології,
к.б.н., доцент

Наталя ВОЛКОВА

ДОДАТОК В

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Розділ у колективній монографії

1. Gallardo, C., P. Sastre, P. Rueda, A. P. Gerilovych, **M. Kit**, I. Nurmoja, and M. F. Le Potier. 2021. “5. Methods for African swine fever diagnosis in clinical and environmental samples.” in *Understanding and Combatting African Swine Fever*, 141–60. Wageningen, the Netherlands: Wageningen Academic Publishers. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-910-7_5. (Дисертантка провела польові дослідження та підготувала рукопис частини розділу монографії).

Стаття у науковому фаховому виданні України категорії «А»

2. **Kit, M.**, J. Schwarz, and A. Gerilovych. 2021. “Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on the C962R gene for African swine fever virus detection”. *Agricultural Science and Practice* 8, no. 3: 3–12. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.03.003>. (Дисертантка брала участь у плануванні та проведенні досліджень, оформила результати та підготувала рукопис статті).

Статті у наукових фахових виданнях України категорії «Б»

3. Стегній, Б. Т., О. С. Солодянкін, О. Ю. Лиманська, **М. Ю. Кіт**, А. І. Бузун, та В. Л. Ареф'єв. 2018. “Вивчення специфічності та чутливості тест-системи для детекції вірусу африканської чуми свиней методом ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus»”. *Ветеринарна медицина* 104: 359–62. https://jvm.kharkov.ua/sbornik/104/VetMed_104.pdf. (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень та підготовці рукопису статті).

4. **Kit, M.**, O. Zlenko, O. Solodiankin, V. Bolotin, and A. Gerilovych. 2020. “Development of recombinant positive control for African swine

fever virus PCR detection.” *Biotechnologia Acta* 13, no. 6: 58–63. <https://doi.org/10.15407/biotech13.06.058>. (Дисертантка брала участь у плануванні та проведенні досліджень, оформила результати та підготувала рукопис статті).

5. **Kit, M. Yu.** 2021. “Development of recombinant antigen expression and purification for African swine fever serological diagnostics.” *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety* 7, no. 3: 24–31. <https://doi.org/10.36016/jymbbs-2021-7-3-4>.

Праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Матеріали наукових доповідей

6. **Kit, M.**, O. Solodyankin, V. Arefiev, V. Bolotin, and A. Gerilovych. 2018. “Development of universal positive DNA-control of ASF virus and validation of real-time PCR with its use.” in *3rd Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium, Kyiv, Ukraine, April, 16–20, 2018*, 118. (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень та підготувала текст тез).

7. **Kit, M.**, and A. Gerilovych. 2021. “Development of DNA detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification.” in *2021 International BioThreat Reduction Symposium, Kyiv, Ukraine, 29 June, 29–July, 2*, 64. (Дисертантка брала участь у плануванні та проведенні досліджень, оформила результати та підготувала текст тез).

8. **Kit, M.**, C. Popp, H. von Buttlar, A. Gerilovych, and J. Schwarz. 2021. “Oral fluid-based surveillance study of African swine fever among wild boars in Ukraine.” in *17th Medical Biodefence Conference, Munich, Germany, September, 28–October, 1*, 54. (Дисертантка брала участь у плануванні та проведенні досліджень, оформила результати та підготувала текст тез).

9. Buzun, A.-I., **M. Kit**, M. Stegnyy, and I. Bobrovickaya. 2022. “Vers l’farm initiative: Comment un antigène artificiel de la peste porcine africaine peut aider l’exportation agricole de l’Ukraine”. *ΛΟΓΟΣ*, no. July 8, 2022 [3rd International Scientific and Practical Conference “Débats Scientifiques et Orientations

Prospectives du Développement Scientifique”, Paris, France, July 8, 2022]: 138–42. <https://doi.org/10.36074/logos-08.07.2022.037>. (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень).

10. Кіт, М. Ю., та О. Б. Зленко. 2024. “Скринінгове дослідження вірусу африканської чуми свиней у популяції диких кабанів на території Харківської області”. у *Онлайн-конференція аспірантів і молодих вчених у сфері Єдиного здоров'я та біотехнології «VetBioConnect», м. Харків, 3–4 червня 2024 р.*, 29–31. https://www.iekvm.kharkov.ua/documents/VetBioConnect_2024_theses.pdf. (Дисертантка брала участь у плануванні та проведенні досліджень, оформила результати та підготувала текст тез).

11. Кіт, М. Ю. 2024. “Розробка способу детекції ДНК свині (*Sus scrofa*) за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації”. у *Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції: II міжнародна науково-практична конференція науково-педагогічних працівників та молодих науковців, м. Одеса, 17–18 жовтня 2024 р.*, 113–5. https://osau.edu.ua/wp-content/uploads/2024/11/2024_ZBIRNYK_FVM.pdf.

Праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

Патент України на корисну модель

12. Стегній, Б. Т., О. С. Солодянкін, А. П. Герілович, О. В. Піщанський, А. О. Меженський, М. А. Сапачова, Н. Г. Рудова, **М. Ю. Кіт**, та А. В. Кузьмінов. 2019. Тест-система для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції «Sui-DNA-test-ASF virus». Патент України на корисну модель 133163, поданий 22 жовтня 2018 р., та опублікований 25 березня 2019 р. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1340792>. (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень та оформленні документів на патент).

Методичні рекомендації

13. Герілович, А. П., та **М. Ю. Кіт**. 2021. *Детекція ДНК вірусу африканської чуми свиней методом петльової ізотермічної ампліфікації*

(методичні рекомендації) [затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 3 від 3.11.2021 р.]. Харків: ННЦ «ІЕКВМ». (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та оформленні методичних рекомендацій).

14. **Кіт, М. Ю.,** О. Б. Зленко, та Т. Б. Дідик. 2024. *Методичні рекомендації «Отримання рекомбінантного антигену р32 для ІФА-діагностики АЧС»* [затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 8 від 23.10.2024 р.]. Харків: ННЦ «ІЕКВМ». *(Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та оформленні методичних рекомендацій).*

Апробація результатів дисертації. Основні результати були представлені, обговорені та схвалені на звітних сесіях вченої ради ННЦ «ІЕКВМ» у 2018–2021 та 2024 рр., а також на таких наукових конференціях: 3rd Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium (Київ, Україна, 2018, усна доповідь), Biosafety and Biosecurity Symposium “One Health — One Vision” (Тбілісі, Грузія, 2019, усна доповідь), 2021 International BioThreat Reduction Symposium (Київ, Україна, 2021, усна доповідь), 17th Medical Biodefence Conference (Мюнхен, Німеччина, 2021, усна доповідь), International Online Science Symposium “Know Your Pathogens — Eurasian Symposium on Biological Health Hazards” (2021, усна доповідь), онлайн-конференції аспірантів і молодих вчених у сфері Єдиного здоров’я та біотехнології “VetBioConnect” (Харків, Україна, 2024, усна доповідь), II міжнародній науково-практичній конференції науково-педагогічних працівників та молодих науковців «Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції» (Одеса, Україна, 2024, усна доповідь).