

АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В ИСКУССТВЕННЫХ И ЕСТЕСТВЕННЫХ СМЕШАННЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ

А.Д. СЕРЕДА, В.М. БАЛЫШЕВ, Ю.П. МОРГУНОВ, Д.В. КОЛБАСОВ

Гетерогенность вируса африканской чумы свиней (АЧС) проявляется в различиях по физико-химическим, генетическим, вирулентным, гемадсорбирующим, антигенным свойствам. Представлены результаты исследований экспериментальных смесей и природных изолятов вируса АЧС по гемадсорбирующей активности и антигенной специфичности, которые определяли по результатам реакции задержки гемадсорбции (РЗГАд) и иммунологической пробы. Для исследований было приготовлено три смеси вирулентных изолятов вируса АЧС: 1 — II и IV сероиммунотипов (Кикасса 74 + Бразилия 80); 2 — III и IV сероиммунотипов (Мозамбик 78 + Сан Томе и Принсипи); 3 — I и IV сероиммунотипов (Диаманг + Днопа-Луанда). Изучение смешанной инфекции *in vivo* проводили в искусственно созданном микроэпизоотическом очаге. Установлено, что при инфицировании животных смесями изолятов вируса АЧС двух сероиммунотипов наблюдается стойкое доминирование по гемадсорбции одного изолята над другим, вследствие чего результаты типизации проб крови свиней контактно инфицированных смесями изолятов в РЗГАд не соответствуют данным иммунологической пробы. Подобный факт, по-видимому, объясняется тем, что в исследуемых биологических материалах имеются варианты вируса АЧС сероиммунотипов, присутствующих в исходных смесях, которые в процессе смешанного инфицирования животных утратили гемадсорбирующие свойства. Показана принципиальная возможность восстановления *in vitro* гемадсорбирующих свойств присутствующих в смесях негемадсорбирующих вариантов в гемадсорбирующую форму методом пассирования в культуре клеток костного мозга свиньи (КМС) в присутствии специфических задерживающих гемадсорбцию сывороток к изолятам, которые доминировали в смесях по признаку гемадсорбции. В то же время второй подход — использование перемежающихся пассажей в нечувствительной клеточной системе (культура почки сибирского горного козерога) и в клетках КМС результатов не дал. Установлено, что в природе вирус АЧС может встречаться в виде гетерогенной в сероиммунотипном отношении популяции. Проведенные исследования также продемонстрировали принципиальную возможность создания защиты к изоляту Т-67 при иммунизации животных аттенуированными вариантами, полученными из входящих в его состав вирулентных вариантов четырех сероиммунотипов.

Ключевые слова: вирус африканской чумы свиней, изоляты, гемадсорбция, сероиммуно-типы, антигенная гетерогенность.

Гетерогенность вируса африканской чумы свиней (АЧС) выражается в различиях по физико-химическим, генетическим, вирулентным, гемадсорбирующим, антигенным свойствам (1). При анализе препаратов вируса АЧС в линейном градиенте концентрации сахарозы выявлена фракция с плавающей плотностью 1,20-1,21 г/см³ (плотность стандартного вируса АЧС — 1,17-1,18 г/см³), проявляющая интерферирующие свойства после инактивации ее инфекционности γ -облучением (2). Широко известна генетическая гетерогенность вируса АЧС (3). В результате филогенетического анализа по последовательности гена консервативного структурного белка р72 выявлено 22 генотипа изолятов вируса АЧС (4). В основу изучения гетерогенности популяции вируса АЧС по признаку гемадсорбции было положено доказательство генетической природы последнего. Об этом свидетельствовало постоянное соотношение числа клеток, фенотипически отражающих оба контрастных типа гемадсорбции («рыхлую» и «плотную»), при размножении вируса (5). Эти различия выражаются в форме его экспрессии на мембране таким образом, что визуально эритроциты располагаются либо в один слой, либо многослойно, и их число на одну гемадсорбирующую клетку варьирует от единиц до 80 и более. Площадь контакта эритроцита с мембраной, неодинаковая для разных вариантов вируса

АЧС, свидетельствовала о том, что наиболее прочно ассоциирован с клеткой гемадсорбирующий антиген у авирулентного аттенуированного штамма ФК-135, индуцирующего визуально однослойную («рыхлую») гемадсорбцию. По данным иммунологических проб на свиньях и реакции задержки гемадсорбции (РЗГАд), известные штаммы и изоляты разделены на 11 групп, из которых 8 охарактеризованы как сероиммуногруппы со своими референс-штаммами (6).

Цель настоящей работы заключалась в изучении антигенных свойств в экспериментально сформированных и природных смешанных популяций вируса африканской чумы свиней.

Методика. Исследования проводили на подсвинках (30-40 кг) породы крупная белая. Для изучения приготовили три искусственные смеси вирулентных изолятов вируса АЧС: 1 — II и IV сероиммунотипов (Кикасса 74 + Бразилия 80); 2 — III и IV сероиммунотипов (Мозамбик 78 + Сан Томе и Принсипи); 3 — I и IV сероиммунотипов (Диаманг + Днопа-Луанда). Каждую смесь составляли близкие по инфекционности исходные изоляты, взятые в равных объемах. Опыты со смешанной инфекцией *in vivo* проводили в искусственно созданном микроэпизоотическом очаге. С этой целью полученными смесями в дозе $10^{6,5}$ - $10^{7,5}$ ГАЕ₅₀ внутримышечно заражали двух особей. Вместе с ними размещали четырех интактных подсвинков (1-й контактный пассаж). При ярко выраженных клинических признаках болезни у животных 1-го контактного пассажа к ним помещали следующую группу интактных подсвинков (2-й контактный пассаж). С каждой испытуемой смесью проводили 3-5 пассажей. Антигенные свойства изолятов и штаммов определяли в РЗГАд и на иммунизированных животных (иммунотипозная специфичность) (7). Для выявления АЧС тех сероиммунотипов, которые не обнаруживались в РЗГАд, вирусосодержащим материалом (первая и вторая смеси), полученными от павших животных в 3-м контактном пассаже, внутримышечно заражали по два подсвинка, предварительно иммунизированных аттенуированным штаммом ФК-135 (IV сероиммунотип) вируса АЧС.

В опытах *in vitro* для восстановления гемадсорбирующих свойств у потерявших способность к гемадсорбции изолятов, присутствующих в исходных смесях, использовали две схемы культивирования испытуемых проб крови от свиней 3-го контактного пассажа: пассирование в культуре клеток костного мозга свиньи (КМС) в присутствии специфической задерживающей гемадсорбцию сыворотки против того типа, который вызывал в смеси гемадсорбцию; использование перемежающихся пассажей в нечувствительной клеточной системе (7).

При изучении природной антигенной гетерогенности использовали изолят Киравира 67 (Танзания 67, Т-67). На основе выделенных из Т-67 вирулентных вариантов с разной сероиммунотипозной специфичностью получили аттенуированные варианты, которыми иммунизировали животных с последующим определением их устойчивости к исходному изоляту Т-67 (8).

Для концентрирования вирусных препаратов использовали полиэтиленгликоль (м.м. 6000 Да, «Serva», ФРГ).

За иммунизированными животными вели клиническое наблюдение с ежедневным измерением температуры тела. Накануне гибели отбирали пробы крови для сероиммунотипизации вируса, от павших животных — образцы тканей и органов и также проводили сероиммунотипизацию вирусов.

Результаты. При планировании экспериментов исходили из предположения, что смешанные вирусные популяции имеют селективные преимущества по сравнению с монотипными, поскольку они легче преодолели

вают барьер популяционного иммунитета у хозяина (9).

Наиболее важными свойствами вирусов и особенностями их экологической ниши, обеспечивающими возникновение смешанных популяций, представлялись следующие. Должны существовать изолированные локальные популяции вирусов и происходить изменения в среде обитания этих популяций (условия, которые требуются для дивергенции признака). Необходимо наличие путей заноса вирусов из одной локальной популяции в другую (переносчики, миграция хозяина, деятельность человека). Вирусы должны вызывать хотя бы у части зараженных хозяев нелетальную форму болезни с последующим длительным вирусоносительством. Изменения структуры протективного антигена, распознаваемого иммунной системой в качестве маркера серотипа, не должны вызывать некомпенсируемые нарушения его функций. Антигенно различные варианты вирусов должны быть способны к длительному сосуществованию в организме хозяина, причем какой-либо из существующих вариантов может стать (и, как правило, обязательно становится) доминантным, но не приобретает способность окончательно вытеснить все остальные. Все необходимые и достаточные условия существования таких популяций вируса АЧС в природе имеются.

Экспериментальные смешанные популяции. Представлялось важным исследовать особенности функционирования экспериментальных смешанных популяций вируса АЧС, которые можно рассматривать как модель для сходных популяций, формируемых в природных условиях естественным образом.

При серотипировании вируса АЧС, выделенного из крови павших подсвинков, было установлено доминирование в смесях одних изолятов над другими. На примере первой смеси (Кикасса-74 + Бразилия 80, соответственно II и IV сероиммунотип) показали, что доминирование вируса АЧС IV серотипа наблюдается уже у внутримышечно зараженных животных. По результатам РЗГАд у одного из двух павших подсвинков этой группы выявляли вирус IV серотипа, у другого — смесь двух серотипов. При 1-м контактном пассаже у одного из четырех подсвинков обнаружили вирус IV серотипа, у остальных — смесь двух исходных серотипов вируса. Однако предельные разведения крови (10^{-8} - 10^{-9}), по данным РЗГАд, содержали вирус АЧС только IV серотипа. Из крови и органов павших животных 2-го и 3-го контактных пассажей в РЗГАд выявляли вирус АЧС только IV серотипа.

У особей, контактно инфицированных в экспериментальных микроэпизоотиях, необходимо было установить наличие в пробах крови вируса АЧС тех исходных сероиммунотипов, которые не выявлялись в РЗГАд. Подсвинки, внутримышечно инфицированные с этой целью (после предварительной иммунизации вирусом АЧС штамм ФК-135) материалом (первая и вторая смесь) от павших животных 3-х контактных пассажей, погибали на 5-7-е сут с признаками острой формы болезни. В эти же сроки погибали и контрольные животные, которые до заражения были интактными. Выделенный от павших животных вирус (как и исходный материал) на основании РЗГАд относился к IV серотипу. Полученные данные указывали на несоответствие результатов типизации на основании иммунологической пробы на иммунизированных животных и в РЗГАд.

Подобный факт, по-видимому, объясняется присутствием в исследуемых биологических материалах вариантов вируса АЧС других сероиммунотипов, имеющих в исходных смесях, которые в процессе смешанного инфицирования животных утратили гемадсорбирующие свойства. Внутримышечное заражение такими материалами интактных или иммун-

ных к IV сероиммунотипу животных в течение трех пассажей не привело к восстановлению гемадсорбции у вируса АЧС одного из двух исходных изолятов. В то же время, по данным РЗГАд, культивирование трех изучаемых смесей вируса АЧС в клетках КМС в течение 7-10 пассажей не вызвало утрату способности индуцировать гемадсорбцию у исходных штаммов. Следует отметить, что гибель иммунных к IV сероиммунотипу животных происходила как при заражении цельными пробами крови, так и при использовании их предельных разведений. Это косвенно указывало на наличие в испытуемой смеси исходных изолятов вируса АЧС в близких количествах. Аналогичные результаты были получены с третьей смесью, где по гемадсорбции доминировал вирус АЧС I серотипа.

Восстановление гемадсорбирующих свойств *in vitro*. Восстановление гемадсорбирующих свойств у утративших их изолятов, присутствующих в исходных смесях, проводили для первой и второй смеси вируса АЧС. При использовании первой схемы принципиально показана возможность перевода негемадсорбирующих изолятов, присутствующих в смесях, в гемадсорбирующую форму. Так, в одном из шести образцов в варианте со второй смесью на 7-м пассаже в культуре клеток КМС в присутствии специфической сыворотки IV серотипа выделяли гемадсорбирующий вирус III серотипа. Применение второй схемы в течение 8 пассажей не дало положительных результатов.

Природные смешанные изоляты. Наиболее интересным с точки зрения антигенной гетерогенности оказался изолят Киравира 67 (Танзания 67, или Т-67). При его пассировании в различных культуральных системах и/или контактными пассажами на иммунных животных были получены 2 группы вариантов: первая — соответствующие I (референс-штамм Лиссабон 57) и III (референс-штамм Мозамбик 78) сероиммунотипам, вторая — отличающиеся как друг от друга, так и от всех доступных на период проведения эксперимента природных изолятов вируса АЧС, которые были отнесены к двум новым (V и VI) сероиммунотипам (10-12).

Для окончательного доказательства антигенной гетерогенности изолята Т-67 получили аттенуированные варианты из четырех выделенных из него и различающихся по сероиммунотиповой специфичности вирулентных вариантов, которыми иммунизировали животных и затем определяли их устойчивость к исходному изоляту Т-67. Три особи из пяти были иммунизированы аттенуированным штаммом МК-200 (Мозамбик культуральный 200) III сероиммунотипа (1-я группа), две — аттенуированным вариантом вируса АЧС V сероиммунотипа (2-я группа). Эти животные оставались клинически здоровыми в течение 30-45 сут после контрольного заражения гомологичным вирулентным вариантом, выделенным из изолята Т-67 вируса АЧС. Затем животных иммунизировали концентрированными вирусными препаратами выделенных из изолята Т-67 вариантов ТС 18/22 (I сероиммунотип), ТКФ или ТПС-10 (III сероиммунотип), ТСП-278 (V сероиммунотип), Тс-7/220 (VI сероиммунотип) в дозах $10^{8,5}$ - $10^{9,0}$ ГАЕ₅₀. Иммунизацию проводили с максимальными интервалами 15 сут (в зависимости от клинической реакции на очередное введение вируса). В 1-й группе использовали варианты V, VI и I сероиммунотипов, во 2-й группе — III, VI и I сероиммунотипов. На 7-е сут после последней иммунизации подсынкам вводили смесь вирусов всех четырех сероиммунотипов (по 10^3 - 10^4 ГАЕ₅₀ каждого), при этом использовали менее аттенуированные и более реактогенные варианты от ранних пассажей. Контрольное заражение иммунизированных животных проводили на 21-е сут после окончания иммунизации, вводя внутримышечно изолят Т-67 (лиофилизированная вирус-

кровь) в дозе 10^3 - 10^5 ГАЕ₅₀. В ответ на введение смеси вариантов вируса АЧС у животных наблюдали реакцию в виде 1-3-суточного повышения температуры тела до 40,6-41,0 °С и некоторого угнетения, и к моменту контрольного заражения изолятом Т-67 все они были клинически здоровы. После заражения изолятом Т-67 наблюдали заболевание и гибель только одного подсвинка, тогда как у четырех остальных в течение всего срока наблюдения (25 сут) никаких признаков заболевания АЧС не отмечали.

Таким образом, последовательная иммунизация аттенуированными вариантами вируса АЧС, полученными от выделенных из изолята Т-67 четырех вирулентных вариантов, отличающихся по сероиммунотиповой специфичности, индуцировала у четырех из пяти иммунизированных животных формирование защиты к заражению исходным изолятом, что полностью подтвердило предположение о сероиммунотиповой гетерогенности изолята Т-67. Полученные результаты подтверждают наличие и циркуляцию в природе вируса АЧС в виде гетерогенной в сероиммунотиповом отношении популяции. Кроме того, проведенные исследования показали принципиальную возможность создания защиты к изоляту Т-67 при иммунизации животных аттенуированными вариантами выделенных из него вирулентных вариантов четырех сероиммунотипов.

Есть также все основания считать, что штаммы Испания 70 и Португалия 60, вызвавшие эпизоотии среди домашних свиней в Европе, гетерогенны. По результатам РЗГАд они отнесены к IV серотипу, но при постановке иммунологической пробы устойчивые к IV сероиммунотипу животные погибали от каждого из этих штаммов в отдельности (8).

Итак, при инфицировании животных смесью изолятов вируса африканской чумы свиней (АЧС) с различной сероиммунотиповой специфичностью наблюдается стойкое доминирование одних изолятов над другими по гемадсорбции. Результаты типизации вируса АЧС из проб крови свиней после контактного заражения искусственно сформированными смесями изолятов, неоднозначны: данные, полученные в иммунологической пробе, не соответствуют регистрируемому при реакции задержки гемадсорбции. У присутствующих в смесях негемадсорбирующих вариантов вируса АЧС гемадсорбция не восстанавливается после обычного пассирования в культуре клеток костного мозга свиней или через организм животного, и для идентификации таких многокомпонентных изолятов требуется разработка специальных методов. Проведенные исследования свидетельствуют о существовании природных изолятов со смешанным сероиммунотипом, что, в частности, необходимо учитывать при описании иммунобиологических свойств новых изолятов вируса АЧС и разработке специфических средств защиты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Макаров В.В. Иммунологическая концепция африканской чумы свиней (некоторые итоги исследований). Ветеринарная практика, 2013, 3(62): 5-22.
2. Середя А.Д., Власов Н.А., Макаров В.В. Физико-химический полиморфизм вирусной популяции и дефектные интерферирующие частицы вируса африканской чумы свиней. Вестник РАСХН, 1997, 5: 67-70.
3. Chapman D.A., Tcherepanov V., Upton C., Dixon L.K. Comparison of the genome sequences of nonpathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. J. Gen. Virol., 2008, 89: 397-408 (doi: 10.1099/vir.0.83343-0).
4. Bastos A.D.S., Penrith M.-L., Crucière C., Edrich J.L., Hutchings G., Roger F., Couacy-Humann E., Thomson G.R. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial *p72* gene characterization. Arch. Virol., 2003, 148: 693-706.
5. Макаров В.В., Вишняков И.Ф., Власов Н.А., Серова А.М. Популяционная структура вируса африканской чумы свиней по признаку количественной гемадсорбции. Вопросы вирусологии, 1991, 4: 321-324.

6. Середя А.Д., Балышев В.М. Антигенное разнообразие вируса африканской чумы свиней. Вопросы вирусологии, 2011, 4: 38-42.
7. Митин Н.И., Юрков С.Г., Балышев В.М., Шевченко А.А., Миколайчук С.В., Бадаев Ф.А. Взаимодействие различных сероиммунотипов вируса АЧС *in vivo* и *in vitro* и их идентификация. Мат. науч. конф. ВНИИВВиМ «Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии». Покров, 1985: 249-254.
8. Бакалдин А.В., Митин Н.И., Петров Ю.И., Саркисян Х.В. Экспериментальные исследования по разработке специфической защиты против изолята Т-67. Мат. науч. конф. ВНИИВВиМ «Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии». Покров, 1985: 41-44.
9. Власов Н.А. Антигенная гетерогенность штаммов вируса африканской чумы свиней. Мат. науч. конф. ВНИИВВиМ «Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии». Покров, 1985: 255-262.
10. Моргунов Ю.П., Петров Ю.И., Митин Н.И. Получение аттенуированного варианта вируса АЧС 5-го серотипа. Мат. науч. конф. ВНИИВВиМ «Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии». Покров, 1984: 171-173.
11. Моргунов Ю.П., Петров Ю.И., Митин Н.И. Изучение иммунологических свойств вируса АЧС 5-го типа. Мат. науч. конф. ВНИИВВиМ «Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии». Покров, 1985: 30-33.
12. Саркисян Х.В., Петров Ю.И., Бакалдин А.В. Экспериментальные исследования по аттенуации вируса АЧС 6-го типа, штамм Тс-7/150. Мат. науч. конф. ВНИИВВиМ «Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии». Покров, 1985: 35-36.

ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии,
601120 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, г. Покров,
e-mail: vniivvim@niiv.petush.elcom.ru, kolbasovdenis@gmail.com, sereda-56@mail.ru

Поступила в редакцию
18 июня 2014 года

ANTIGENIC CHARACTERISTICS OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS IN ARTIFICIAL AND NATURAL MIXED POPULATIONS

A.D. Sereda, V.M. Balyshev, Yu.P. Morgunov, D.V. Kolbasov

All-Russian Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Pskov, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601120 Russia, e-mail vniivvim@niiv.petush.elcom.ru, kolbasovdenis@gmail.com, sereda-56@mail.ru

Received June 18, 2014

doi: 10.15389/agrobiol.2014.4.64eng

Abstract

Heterogeneity of African swine fever (ASF) virus is manifested through differences in its physico-chemical, genetic, virulent, haemadsorption and/or antigenic properties. Here some results of studies of ASF virus experimental mixtures and natural isolates are represented based on their haemadsorbing activity and antigen specificity levels which were determined from the data of haemadsorption-inhibition tests (HAIT) and immunological bioassays in pigs. For the investigations, three mixtures of ASFV virulent isolates were prepared: 1) isolates of seroimmunotypes II and IV (Kikassa 74 + Brazil 80), 2) those of seroimmunotypes III and IV (Mozambique 78 + Sao Tome and Principe), and 3) of serotypes I and IV (Diamang + Dnopa Luanda). The mixed *in vivo* infections were studied in an artificially organized microepizootic outbreak. We found that at infecting animals with mixtures of ASF virus isolates of two different seroimmunotypes, one isolate steadily dominated over the other one for its haemadsorption level, so the typing data for blood samples of pigs contact-infected with mixtures of isolates in HAIT do not correspond to those observed in the immunological bioassays in pigs. The above phenomenon is apparently due to the fact that the biological materials under study contain ASF viruses of seroimmunotypes which are present in the initial mixtures but lost their haemadsorbing properties in the course of the mixed infection of the animals. A principal opportunity of an *in vitro* recovery of the haemadsorbing potentiality of the non-haemadsorbing variant of the virus present in the mixtures using a method of passage in a porcine bone marrow (PBM) cell culture supplemented with haemadsorption-inhibiting specific sera to isolates that dominated in the mixtures for haemadsorption is shown. At the same time, another approach, namely using alternating passages both in an insensitive cell system (Siberian mountain goat kidney culture) and PBM cells gave no results. Furthermore, we determined that ASF virus can be present in the environment in the form of a population heterogenous with respect to its seroimmunotype. Also, the carried out research work showed that there was a principal opportunity to provide protection against isolate T-67 when immunizing animals with attenuated virus variants prepared from its virulent variants belonging to four seroimmunotypes.

Keywords: African swine fever virus, isolates, haemadsorption, seroimmunotypes, antigenic heterogeneity.