

УДК 619:616-076:578.842.1

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Родригез-Маллон А.А., руководитель проекта²
Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Згировская А.А., кандидат биологических наук¹
Герасименко В.И., младший научный сотрудник¹

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск, Республика Беларусь

²Центр генетической инженерии и биотехнологий, г. Гавана, Республика Куба

РАЗРАБОТКА ИФА-ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Резюме

Разработаны рекомбинантные антигены вируса африканской чумы свиней (АЧС) путем клонирования и экспрессии белков, кодируемых двумя генами данного вируса – p72 (B646L) и p30 (CP204L). Отработаны параметры адсорбции рекомбинантных белков вируса африканской чумы свиней и определены оптимальные концентрации компонентов ИФА-диагностикума для выявления антител к антигенам вируса АЧС. Разработан ИФА-диагностикум для выявления специфических антител к вирусу африканской чумы свиней. Проведена иммунизация кроликов и получены специфические сыворотки к вирусу АЧС. Проведен подбор оптимальных концентраций компонентов диагностикума для выявления антител к антигену вируса АЧС. Проведена проверка разработанного ИФА-диагностикума по показателю специфичности и чувствительности.

Ключевые слова: африканская чума свиней, рекомбинантные антигены, ИФА-диагностикум, специфичность, чувствительность.

Summary

Recombinant antigens of the African swine fever virus (ASF) have been developed by cloning and expressing proteins encoded by two genes of this virus: p72 (B646L) and p30 (CP204L). The parameters of adsorption of recombinant proteins of the African swine fever virus have been worked out and optimal concentrations of ELISA diagnostic components have been determined for the detection of antibodies to antigens of the African swine fever virus. An ELISA diagnosticum has been developed to detect specific antibodies to the African swine fever virus. Rabbits were immunized and specific serums for the African swine fever virus were obtained. The selection of optimal concentrations of diagnostic components for the detection of antibodies to the ASF virus antigen was carried out. The developed ELISA diagnostic was tested in terms of specificity and sensitivity.

Keywords: African swine fever virus, Recombinant antigens, ELISA diagnostic, specificity, sensitivity.

Поступила в редакцию 28.11.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) – вирусная болезнь, характеризующаяся высокой контагиозностью. Возбудителем заболевания является ДНК-содержащий вирус семейства *Asfarviridae* с размером вириона 175–215 нм [1]. В естественных условиях к АЧС восприимчивы домашние и дикие свиньи всех возрастов. Скорость распространения и степень патогенности вируса АЧС таковы, что эта инфекция способна в короткие сроки (3–5 месяцев) привести к огромным экономическим потерям или даже полной утрате поголовья свиней [2, 3].

Эпизоотологическая особенность АЧС заключается в чрезвычайно быстром

изменении форм течения инфекции среди домашних свиней – от острого со 100%-ной летальностью до хронического и бессимптомного носительства и непредсказуемого распространения.

Для эффективного использования различных методов диагностики АЧС, направленных на выявление возбудителя или специфических антител, следует учитывать особенности протекания болезни и ее формы. При сверхострой и острой формах выявление вирусспецифических антител возможно только в пробах селезенки, так как специфические антителопродуцирующие клетки и, следовательно, антитела появляются там на 2-3-и сутки после инфицирования, в то время как животные

гибнут уже на 3–7-е сутки [4]. При подостром и хроническом течении болезни вирусспецифические антитела в крови появляются на 7–10-е сутки, до этого времени целесообразно проводить выявление вирусного антигена или генома в крови, так как данный период течения АЧС характеризуется вирусемией [5].

Одним из перспективных методов определения вирусных антигенов и антител к ним является иммуноферментный анализ (ИФА). Его преимущества заключаются в высокой специфичности, скорости и простоте постановки реакции, сравнительно невысокой стоимости и универсальности применяемого оборудования, возможности автоматизации процедуры анализа. За последнее десятилетие произошли значительные изменения в технологии производства ИФА-наборов, обусловленные результатами научно-практических разработок, связанных с применением моноклональных антител (МкА), которые практически полностью вытеснили поликлональные не только в «сэндвич»-вариантах ИФА, предназначенных для обнаружения антигена, но и в большинстве тест-систем, направленных на выявление антител, где они используются в качестве конъюгатов или для адсорбции антигена [6, 7]. Помимо этого, в качестве компонентов ИФА эффективно используются рекомбинантные антигены, обладающие иммунохимическими свойствами нативных белков и представляющие собой хорошо охарактеризованные и стандартизированные препараты [8, 9, 10].

Целью настоящей работы явилась разработка иммуноферментного диагностического теста для выявления антител к вирусу африканской чумы свиней.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований совместно с организацией-партнером – Центром инженерии и биотехнологий (Куба).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в отделе вирусных инфекций, отделе молекулярно-генетической диагностики и геномной инженерии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и в

Центре инженерии и биотехнологий (Куба).

Получение рекомбинантных антигенов. Рекомбинантные белки вируса АЧС были предоставлены Центром инженерии и биотехнологий (Куба). Получение рекомбинантных антигенов вируса АЧС осуществлялось путем клонирования и экспрессии белков, кодируемых двумя генами данного вируса: р72 (B646L) и р30 (CP204L). Ген р72 отвечает за синтез капсидного белка, который играет ключевую роль в формировании структуры вириона, ген р30 кодирует также белок оболочки вириона, который участвует в процессах взаимодействия вируса с клетками-хозяевами и обеспечения его инфекционных свойств. Организация-партнер предоставила краткую информацию о методах контролирования полученных генов и клонирования векторов.

Оптимизацию генов проводили с помощью онлайн программных инструментов (CodonOptimizationTool). Необходимые фрагменты нуклеотидных последовательностей для получения генов были синтезированы искусственно. Последовательность оптимизированного гена разбивали на несколько перекрывающихся фрагментов (250–300 п.н. каждый). Эти фрагменты затем подверглись гибридизации, после чего проводилась ПЦР-амплификация с использованием праймеров, комплементарных крайним 5'- и 3'-концам целевого гена. Полученные гены были клонированы в векторы рЕТ24а и рЕТ-24b. Данные конструкции трансформировали в компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3). Культивирование проводили на среде LB. Полученную биомассу клеток после верификации лизировали ультразвуком и очищали с использованием метода аффинной хроматографии на основе 6xHis-тега (6xHis-тег – это последовательность из шести гистидиновых аминокислотных остатков (His-His-His-His-His-His), которая добавляется к N-концу (иногда к C-концу) целевого белка. Гистидин обладает высокой аффинностью (сродством) к ионам никеля (Ni^{2+}) и кобальта (Co^{2+}). Это свойство используется для очистки рекомбинантного белка с помощью аффинной хроматографии (колонки для хроматографии Econo-Pac® Chromatography Columns,

Pkgof 50 #7321010 с сорбентом, сорбент Nuvia™ IMACResin, 25 ml #7800800). Очищенные рекомбинантные белки были количественно определены с использованием метода Брэдфорда [11].

Адсорбция рекомбинантных белков. В исследовании использовались полистироловые иммунные планшеты ОАО «Фирма Медполимер» и «Sarstedt» (Германия). Реактивы для постановки ИФА-анализа приобретены в фирме «Sigma» (США).

При отработке параметров адсорбции полученных рекомбинантных белков вируса АЧС на полистироловых планшетах использовали различные концентрации белка – 2,0 мкг/мл, 3,0 мкг/мл, 3,5 мкг/мл. Объем внесенного белка в лунку составлял 100,0 мкл (эта величина была постоянной). Время адсорбции было разным – 16 ч и 24 ч. Адсорбцию белка проводили при температуре плюс 4 °С и при комнатной температуре. Для адсорбции рекомбинантных белков на поверхности полистиролового планшета использовали три различных адсорбирующих буфера: 0,05 М Na-гидрокарбонатный буфер, pH 9,5; 0,025 М Na-фосфатный буфер, pH 7,5; 0,1 М глицин-HCl буфер, pH 2,8.

В качестве промывочного раствора использовали 0,05 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,2 М CaCl₂ (ФСБ) и 0,05%-ный раствор твина-20 (ФСБТ) с добавлением 1%-ного раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФСБ.

Схема постановки ИФА: адсорбция рекомбинантных белков, которые в данном случае будут выступать как антиген, отмывка несвязавшихся белков промывочным буфером, внесение антисывороток к вирусу АЧС, инкубация с антигеном в течение 1,5 ч. Планшет промывали три раза промывочным раствором. Для выявления комплекса антиген+антитело в лунки вносили конъюгат и инкубировали в течение 60 мин, после чего содержимое из лунок удаляли, трижды промывали промывочным раствором, вносили хромоген-субстрат, содержащий 0,1%-ный раствор ортофенилендиамина, 0,05%-ную концентрацию H₂O₂ и 0,1%-ный раствор цитрата натрия, и останавливали реакцию внесением стоп-раствора (10%-ный раствор серной

кислоты). Учет результатов ИФА проводили, измеряя оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Реакцию учитывали, если отношение между показателями оптической плотности положительного и отрицательного контролей K⁺/K⁻ составляло ≥1,5 (коэффициент повышения оптической плотности).

Для получения антисывороток к рекомбинантным белкам вируса иммунизировали лабораторных животных – клинически здоровых кроликов живой массой 2,5–3,0 кг. В качестве адъюванта использовали минеральное масло Montanide ISA 70. Иммунизацию проводили по схеме: антиген АЧС (образцы рекомбинантных белков № 1, № 2, № 3) вводили внутримышечно в область поясницы по 0,5 мг белка в две точки с 0,5 мл Montanide ISA 70 (1:1). Через 7, 14 и 21 день и в дальнейшем – через 3 недели в течение 3 месяцев вводили рекомбинантные белки внутримышечно в возрастающих дозах: 0,75; 1,0; 1,2 и 1,5 мг. Через 10 суток после заключительной инъекции брали кровь для контроля накопления антител. Продолжительность цикла иммунизации составила 3 месяца. К образцам рекомбинантных белков № 1, № 2, № 3 получены антисыворотки № 1, № 2, № 3, которые проверяли на наличие белка методом Брэдфорда. Титр антител проверяли в реакции ИФА в тест-системе INGEZIM PPA DAS («Ingenasa», Испания).

Для разрабатываемого ИФА-диагностикума использовали рекомбинантные белки вируса АЧС, которые вносили по 100,0 мкл в лунки панели с концентрацией антигена 3,0 мкг/мл по методике, описанной выше.

Антисыворотки крови разводили 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 в pH 7,4 (0,02 М фосфатно-солевой буфер) и вносили по 100,0 мкл в соответствующие лунки иммунологической панели. Панели закрывали крышкой и инкубировали при температуре 37 °С в течение 60 мин.

Рабочий раствор антикроличьего конъюгата с пероксидазой хрена («Sigma») вносили во все лунки панели по 100,0 мкл. Панель закрывали крышкой и переносили в термостат, выдерживали при температуре 37 °С в течение 1 ч. Затем лунки освобождали от содержимого путем стряхивания и 3-кратно промывали, внося по

0,25 мл 0,02 М фосфатно-солевого буфера pH 7,4 в каждую лунку.

Затем во все лунки панели вносили по 100,0 мкл субстратного буферного раствора (ТМБ). После внесения субстратной смеси панели помещали в темное место, через 15–20 мин реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 100,0 мкл раствора серной кислоты с массовой долей 10 %.

Сравнение сконструированного диагностикума по параметрам чувствительности и специфичности провели с использованием тест-системы INGEZIM PPA DAS («Ingenasa», Испания). Для проведения исследований по определению чувствительности и специфичности использовали референсные свиные сыворотки (3 положительных сыворотки и 1 отрицательная), предоставленные Центром генетической инженерии и биотехнологий (Куба).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Важнейшей задачей создания качественных наборов является стандартизация технологических операций процесса изготовления изделия, в первую очередь стандартизация нанесения на поверхность лунок полимерных планшетов рекомбинант-

ных белков. Известно, что при адсорбции белков на поверхность пластиковых планшетов большинство молекул теряет свою активность. Это было подробно изучено в работах группы J.K. Jancovich [3]. Было обнаружено, что около 75 % антигенов и более 90 % антител утрачивают свою биологическую активность после того, как их подвергали обычной для ИФА процедуре – пассивной адсорбции на поверхность пластиковых планшетов в карбонатном буфере (pH 9,6).

Для адсорбции рекомбинантных белков нами был использован метод пассивной адсорбции.

Вариабельность таких параметров, как состав буфера для покрытия планшета, условия адсорбции антигенов, температурно-временные режимы инкубации напрямую влияют на воспроизводимость и сопоставимость полученных результатов. Перечисленные параметры существенно влияют на плотность и однородность адсорбции антигена, уровень неспецифического фона, долговременную стабильность покрытия.

Результаты отработки параметров постановки ИФА с рекомбинантными белками представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Оработка параметров адсорбции полученных рекомбинантных белков вируса АЧС на полистироловых планшетах

Используемые буферы	Показатель ΔОП К+/К-						
	концентрация белка, мкг/мл			время адсорбции, ч		температура адсорбции	
	2,0	3,0	3,5	16	24	комнатная	4 °С
0,05 М Na-гидрокарбонатный буфер, pH 9,5	1,5±0,05	2,4±0,07	2,35±0,03	2,1±0,07	1,9±0,01	1,9±0,02	2,5±0,01
0,025 М Na-фосфатный буфер, pH 7,5	1,6±0,03	2,0±0,08	2,0±0,01	2,1±0,09	2,0±0,03	1,98±0,05	2,0±0,03
0,1 М глицин-HCl буфер, pH 2,8.	1,4±0,02	1,5±0,05	1,5±0,04	1,6±0,03	1,63±0,05	1,87±0,03	1,9±0,03
Контроль с 0,1 М КББ с pH 9,4 (коммерческая тест-система)	1,5±0,05	2,4±0,07	2,35±0,05	2,1±0,04	1,9±0,01	2,0±0,01	2,5±0,09

Как видно из таблицы 1, наиболее оптимальными параметрами постановки ИФА с рекомбинантными белками являются использование 0,05 М Na-гидрокарбонатного буфера с pH 9,5, концентрация белка для адсорбции на планшеты 3,0 мкг/мл (меньшая концентрация белка

приводит к уменьшению показателя ΔОП К+/К- по сравнению с контролем, а увеличение концентрации не приводит к большей плотности адсорбции белка на поверхности планшета). По времени адсорбции белка на поверхности планшета достаточно 16 ч, при такой длительности ад-

сорбции величина показателя $\Delta\text{ОП К+К-}$ составляет 2,1, как и в контроле. Установлено, что адсорбцию лучше всего проводить при температуре плюс 4 °С.

После иммунизации рекомбинантными антигенами № 1, № 2, № 3 у всех кроликов в сыворотке крови выработались

антитела, т.е. на данные белки у животных наблюдается иммунный ответ. В таблице 2 представлены результаты проверки сывороток крови иммунизированных кроликов на наличие антител к вирусу АЧС методом ИФА.

Таблица 2 – Результаты изучения иммунологических свойств рекомбинантных антигенов при внутримышечном введении

Показатели	Титры антител				
	400	800	1600	3200	6400
№ 1 $\Delta\text{ОП К+К-}$	4,3±0,6	3,0±0,03	1,9±0,03	1,2±0,02	1,0±0,02
№ 2 $\Delta\text{ОП К+К-}$	4,3±0,04	3,1±0,04	1,8±0,01	1,1±0,03	0,9±0,01
№ 3 $\Delta\text{ОП К+К-}$	4,0±0,01	2,8±0,08	1,7±0,04	1,1±0,06	0,8±0,02

Как видно из таблицы 2, во всех полученных сыворотках уровень антител достаточно высокий даже при большом разведении (1:1600). Значения показателя $\Delta\text{ОП К+К-}$ составляли 1,9 (образец № 1), 1,8 (образец № 2) и 1,7 (образец № 3). Наилучшими иммуногенными свойствами обладают рекомбинантные белки № 1 и № 2: показатель $\Delta\text{ОП К+К-}$ составил 4,3 при разведении сыворотки № 1 1:400 и 3,0 – при разведении 1:800. ИФА считается положительной при величине показателя $\Delta\text{ОП К+К-}$ больше 1,5. Для образца № 2 эти показатели составили 4,3 при разведении 1:400, 3,1 – при разведении 1:800 и 1,8 – при разведении 1:1600.

В дальнейшей работе использовали антисыворотки, полученные при иммуниза-

ции антигеном вируса АЧС № 1 (значение показателя $\Delta\text{ОП К+К-}$ 1,9 при разведении сыворотки 1:1600).

Успех разработки ИФА-диагностикума зависит от правильного подбора концентрации и вида белковых блокаторов. Для этого могут быть использованы бычий сывороточный альбумин, обезжиренное молоко, альбумин, эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота. Стабильные и воспроизводимые результаты при разработке ИФА были получены при сорбции антигена в 0,05 М Na-гидрокарбонатном буфере с pH 9,5 и блокировании панелей 0,4%-ным сухим обезжиренным молоком – значение $\Delta\text{ОП К+К-}$ составило 2,4 (таблица 3).

Таблица 3 – Эффективность предотвращения неспецифической сорбции при постановке ИФА

Показатели	Варианты блокировки панели (0,1 М КББ с pH 9,4)			
	0,1%-ный БСА	0,4%-ное молоко	0,1%-ный альбумин	0,1%-ная эмбриональная сыворотка
$\Delta\text{ОП К+К-}$	1,9±0,04	2,4±0,01	2,1±0,01	1,9±0,04

На сенсibilизированных иммунологических панелях разных производителей с буфером КББ при блокировке молоком результаты были получены равнозначные, значение $\Delta\text{ОП К+К-}$ составило 2,4.

При оптимизации условий обнаружения антител к рекомбинантному белку сравнивали:

- иммунологические панели разных производителей (АО «Фирма Медполимер», РФ, «Sarstedt», Германия) по способности связывать рекомбинантный антиген АЧС;

- влияние условий сорбции антигена (pH 5,0 – 0,02 М ацетатного буфера (АцБ), pH 7,2 – 0,02 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ-Т); pH 8,0 – 0,02 М ФСБ-Т), pH 9,4 – 0,1 М КББ) на результаты ИФА;

- время и температуру сорбции (60 мин при 37 °С и 16 ч при 4 °С);

- влияние условий блокировки (молоко, БСА, эмбриональная сыворотка КРС) на результаты ИФА.

В таблице 4 показаны результаты ИФА на сенсibilизированных иммунологических панелях разных производителей.

Как видно, лучшие результаты были получены на панелях «Sarstedt» (Германия), на которых ΔОП К-/К+ составила 2,3, поэтому в дальнейших исследованиях мы использовали иммунологические панели данного производителя.

В таблице 5 представлены результаты изучения влияния условий сорбции антигена на результаты ИФА в зависимости от буферного раствора и его pH.

Таблица 4 – Сорбционная способность иммунологических панелей разных производителей к рекомбинантному антигену в конкурентном ИФА

Показатели	Иммунологические панели	
	АО «Фирма Медполимер», РФ	«Sarstedt», Германия
ОП 450 нм К+	0,4±0,09	0,34±0,06
ОП 450 нм К-	0,85±0,05	0,79±0,08
ΔОП К-/К+	2,1	2,3

Таблица 5 – Влияние состава буферного раствора и его pH на сорбцию рекомбинантного антигена в конкурентном ИФА

Показатели	Показатель pH при сорбции антигена			
	5,0	7,2	8,0	9,4
	АцБ	ФСБ-Т	ФСБ-Т	КББ
ОП 450 нм К+	0,34±0,07	0,36±0,07	0,38±0,05	0,38±0,012
ОП 450 нм К-	0,69±0,15	0,85±0,05	0,92±0,05	0,95±0,03
ΔОП К-/К+	2,02	2,36	2,42	2,50

Лучшие показатели были получены при сорбции антигена в 0,02 М фосфатно-солевом буфере с pH 7,2 – показатель ΔОП К-/К+ составил 2,5 (при инкубации 60 мин и температуре 37 °С). Увеличение времени контакта до 16 ч при температуре 4 °С повышало показатель ΔОП до 2,6.

Сорбционная способность антигена рекомбинантного белка при внесении на

иммунологические панели «Sarstedt» исследовалась в концентрации 10,0; 20,0; 30,0 и 40,0 мкг/мл на карбонатно-бикарбонатном буфере с pH 9,4 (таблица 6).

В таблице 7 приведены результаты тестирования референсных сывороток с помощью сконструированного диагностического по сравнению с коммерческой тест-системой.

Таблица 6 – Сорбционная способность иммунологических панелей в концентрации антигена 10,0; 20,0; 30,0 и 40,0 мкг/мл

Показатели	Концентрация антигена, мкг/мл			
	10,0	20,0	30,0	40,0
ОП 450 нм К+	0,35±0,06	0,36±0,07	0,37±0,06	0,36±0,011
ОП 450 нм К-	0,83±0,13	1,10±0,06	1,04±0,07	0,95±0,04
ΔОП К-/К+	1,9	2,4	2,49	2,64

Таблица 7 – Результаты сравнительного изучения специфичности и чувствительности разработанного ИФА-диагностического и коммерческой тест-системы

Тест-системы	Референсные сыворотки, значения оптической плотности											
	№ 1			№ 2			№ 3			№ 4		
	разведения сывороток											
	1:10	1:20	1:30	1:10	1:20	1:30	1:10	1:20	1:30	1:10	1:20	1:30
INGEZIM PPA DAS	1,678	1,112	0,800	0,549	0,986	1,440	0,742	1,098	1,645	0,799	1,021	1,329
ИФА-диагностикум	1,599	1,099	0,799	0,547	1,038	1,378	0,701	1,012	1,628	0,753	1,009	1,313
Статистическая значимость	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Примечание – * $p < 0,05$

На основании проведенных сравнительных исследований (таблица 7) можно с уверенностью сказать, что разработанный ИФА-диагностикум обладает чувствительностью и специфичностью.

При исследовании 4 референсных сывороток в разведениях 1:10, 1:20, 1:30 значения оптической плотности, полученные при проверке в тест-системе INGEZIM PPA DAS и в разработанном диагностикуме, совпали.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны рекомбинантные антигены вируса АЧС путем клонирования и экспрессии белков, кодируемых двумя генами данного вируса – р72 (B646L) и р30 (CP204L).

2. Отработаны параметры адсорбции рекомбинантных белков вируса АЧС и определены оптимальные концентрации компонентов ИФА-диагностикума для выявления антител к антигенам вируса АЧС:

- использование иммунологических панелей «Sarstedt» (Германия);

- сенсibilизация иммунологических панелей в концентрации 20,0–40,0 мкг/мл рекомбинантного антигена АЧС;

- сорбирование антигена при pH 9,5 в 0,1М карбонатно-бикарбонатном буфере 60 мин при температуре плюс 37 °С;

- введение в буферный раствор для блокировки панелей 0,4%-ного обезжиренного молока.

3. Разработан ИФА-диагностикум для выявления специфических антител к АЧС свиней.

4. Проведена иммунизация кроликов и получены специфические сыворотки к вирусу АЧС.

5. Подобраны оптимальные концентрации компонентов диагностикума для выявления антител к антигену вируса АЧС, обеспечившие положительный результат в ИФА по показателю ΔОП К-/К+ со значением 3,65.

6. Проведена проверка разработанного ИФА-диагностикума по показателю специфичности и чувствительности в сравнении с коммерческой тест-системой INGEZIM PPA DAS («Ingenasa», Испания).

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Кашкин, К. П. Методические разработки по клинической иммунологии / К. П. Кашкин, Е. Н. Степанова, Л. М. Скуинь. – М. : Медицина, 1997. – 518 с.
2. Gladue, D. P. Recombinant ASF live attenuated virus strains as experimental vaccine candidates / D. P. Gladue, M. V. Borca // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 5. – P. 878.
3. Viral vector vaccines against ASF: Problems and perspectives / R. K. Ravilov [et al.] // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2022. – Vol. 9. – P. 830244.
4. Vaccination with a gamma irradiation-inactivated African swine fever virus is safe but does not protect against a challenge / J. Pikalo [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 832264.
5. Adenovirus-vectored African Swine Fever Virus antigen cocktails are immunogenic but not protective against intranasal challenge with Georgia 2007/1 isolate / S. Lokhandwala [et al.] // *Veterinary microbiology*. – 2019. – Vol. 235. – P. 10–20.
6. A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, for the detection of african swine fever virus antigens and antibodies / M. I. Vidal, M. Stiene, J. Henkel [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 1997. – 66 (2). – P. 211–218.
7. World Organization of Animal Health (OIE). African swine fever. Manual of Standards for diagnostic test and vaccines. – 2008.
8. High doses of inactivated African swine fever virus are safe, but do not confer protection against a virulent challenge / E. Cadenas-Fernández [et al.] // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9. – № 3. – P. 242.
9. Immunization of pigs by DNA prime and recombinant vaccinia virus boost to identify and rank African swine fever virus immunogenic and protective proteins / J. K. Jancovich [et al.] // *Journal of virology*. – 2018. – Vol. 92. – № 8. – P. 10.1128/jvi. 02219-17.
10. DNA-protein vaccination strategy does not protect from challenge with African swine fever virus Armenia 2007 strain / S. Y. Sunwoo [et al.] // *Vaccines*. – 2019. – Vol. 7, № 1. – P. 12.
11. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem*. – 1976. – Vol.72, № 1-2. – P. 248–254.