

УДК 636.09:616.98:[579.83+502.5]

## СТАН БІОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ ЩОДО СИБІРКИ В УКРАЇНІ

Скрипник В.Г.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Безименний М.В.

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

Скрипник А.В.

Блек енд Вітч Спеціал Проджектс Корп, м. Київ

Сибірка – гостре інфекційне захворювання з групи зоонозів для якого характерними є лихоманка, ураження лімфатичної системи, інтоксикація організму та має клінічні ознаки ураження шкіри, кишківника, легенів та загального сепсису [1]. Сибірка під різними назвами відома з глибокої давнини. Перший науковий опис цього захворювання було зроблено російськими лікарями А. Ешке та Н. Ножевниковим у середині XVIII ст. у Сибірі. Пізніше в 1786-1789 рр. С.С. Андрієвський більш детально вивчив питання епізоотології сибірки та через самозараження довів спільність етіології у людей і тварин, чим остаточно підтвердив її нозологічну самостійність [2].

Джерелом збудника сибірки є хворі тварини, які з випорожненнями та слиною виділяють його в навколишнє середовище, інфікуючи його. В агональному стані та в перші години після загибелі з природних отворів трупа витікає велика кількість кров'янистої рідини, що містить велику кількість бацилл сибірки, які за межами організму утворюють спори. При попаданні останніх у ґрунт і утворюються стаціонарні джерела інфекції. Тому основним фактором передачі збудника хвороби є труп тварини. Часто ґрунт інфікується при попаданні в нього крові під час вимушеного забою хворих тварин. З м'ясом, шкірами, шерстю та іншими продуктами забою хворих тварин збудник може бути занесеним в інші регіони. У поширенні збудника певну роль відіграють дикі м'ясоїдні та хижі птахи, які розносять частини трупів або поїдаючи їх довгий час виділяють збудника з фекаліями. [3].

У минулому сибірка наносила величезні збитки тваринництву й нерідко спричиняла масові захворювання людей [4]. З появою ефективних засобів специфічної профілактики з'явилась можливість попереджувати масові захворювання тварин та людей. Організація планових державних заходів з вакцинації худоби проти сибірки сприяла тому, що вже у 1924-1925 рр. в Україні було вакциновано 2 млн 448 тис. 600 голів. [5].

Однак низка дослідників вважають, що одна масова вакцинація не забезпечує повної ліквідації хвороби, так як постійно існує загроза виникнення сибірки серед не вакцинованих тварин [4, 5, 6]. Це пов'язано з біологічними властивостями збудника *Bacillus anthracis*, спори якого можуть тривалий час зберігатись у ґрунті [6], а при відповідних умовах й розмножуватись [7, 8]. Враховуючи те, що за різними літературними джерелами в Україні знаходиться від 9 до 11 тисяч стаціонарно неблагополучних пунктів, прогнозування ризиків спалахів сибірки є актуальним та може мати значний економічний ефект.

**Метою** даного дослідження було визначення біологічної загрози для тваринництва України з боку збудника сибірки, циркулюючого у природі.

**Матеріали і методи.** У своїй роботі ми використовували матеріали «Каталогу стаціонарно неблагополучних на сибірку пунктів на території Української РСР 1920-1978 рр.», «Каталогу місць поховань трупів тварин, які загинули від сибірки на території Української РСР 1920-1970 рр.» під ред. В.Я. Шаблія, каталог, але за період 1918-2008 рр., отриманий із Санітарно-епідеміологічної служби України, статистичні дані Державної ветеринарної та фітосанітарної служби.

**Результати роботи.** Встановлено, що на території України інфікування неімунного поголів'я відбувається, здебільшого, на пасовищах. Згідно «Каталогу стаціонарно неблагополучних на сибірку пунктів на території Української РСР 1920-1978 рр.» з 1920 по 1978 рр. зареєстровано 24502 спалахи сибірки в 9632 населених пунктах Української РСР. У каталозі Санітарно-епідеміологічної служби України міститься 9108 записів стаціонарно неблагополучних на сибірку пунктів. З 1978 р по 1999 р. кількість спалахів сибірки склала 400 випадків у 348 населених пунктах України. У період з 2000 по 2012 рр. на території держави зареєстровано 64 неблагополучні пункти.

За період з 1920 по 1978 рр. в Україні спалахи сибірки реєстрували у різних видів тварин, але найчастіше у великої рогатої худоби (ВРХ), дрібної рогатої худоби (ДРХ), свиней та коней (табл. 1).

Таблиця 1 – Реєстрація спалахів сибірки у сільськогосподарських тварин України за 1920-1978 рр.

№ п/п	Області	Зареєстровано спалахів хвороби	Захворіло голів			
			ВРХ	ДРХ	свині	коні
1	2	3	4	5	6	7
1	Вінницька	1899	1899	139	110	58
2	Волинська	167	213	14	5	1
3	Дніпропетровська	688	745	152	123	64
4	Донецька	714	530	282	157	56
5	Житомирська	499	484	31	13	22
6	Закарпатська	514	957	43	51	8
7	Запорізька	1054	1305	124	122	55
8	Івано-Франківська	234	228	8	3	5
9	Луганська	1312	1075	356	303	39
10	Львівська	499	565	13	5	17
11	Кіровоградська	1063	829	217	242	20
12	АР Крим	890	609	430	112	41
13	Київська	1198	1301	98	70	84

**Розділ 1. Біобезпека та біозахист у ветеринарній медицині, емерджентні трансмісивні та транскордонні хвороби тварин**

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
14	Миколаївська	651	809	717	127	30
15	Одеська	1182	976	668	186	48
16	Полтавська	1910	1524	314	156	86
17	Рівенська	350	323	16	6	17
18	Сумська	1761	1435	446	123	98
19	Тернопільська	613	720	53	13	54
20	Харківська	1645	1371	441	273	91
21	Херсонська	711	1205	389	89	83
22	Хмельницька	1321	1305	124	122	55
23	Черкаська	1448	1345	232	87	48
24	Чернівецька	740	662	54	90	16
25	Чернігівська	1489	1470	96	30	255
<b>Всього</b>		<b>24502</b>	<b>23885</b>	<b>5457</b>	<b>2618</b>	<b>1351</b>
<b>%</b>			<b>71,7</b>	<b>16,4</b>	<b>7,8</b>	<b>4,1</b>

Таким чином, з 1920 по 1978 роки було зареєстровано 24502 спалахи сибірки. Усього уражених сільськогосподарських тварин було 33311 голів. Найбільше випадків захворювання реєстрували у ВРХ – 23885 (71,7 %), а у ДРХ 5457 (16,4 %), свиней – 2618 (7,8 %), коней – 1351 (4,1 %).

Сьогодні для профілактики сибірки в Україні використовують 2 живі спорові вакцини. У результаті поголового щеплення худоби захворюваність на сибірку зведена до спорадичних випадків. Але про повну ліквідацію захворювання мова ще не йде. В останнє десятиріччя спостерігається стійка тенденція до зменшення випадків захворювання серед тварин. За останні 10 років в Україні було зареєстровано 64 неблагополучних пункти. А з 2007 року зареєстровано лише 1 спалах сибірки.

Враховуючи потенційну небезпеку цього захворювання та біологічні особливості збудника в усіх областях України були створені каталоги сибіркових захоронень (табл. 2). Місць захоронень загиблених тварин згідно «Каталогу місць поховань трупів тварин, які загинули від сибірки на території Української РСР 1920-1970 рр.» нараховується 4630.

**Таблиця 2 – Реєстрація кількості сибіркових захоронень на території України за період 1920 по 1970 рр.**

№ п/п	Області	Кількість захоронень	№ п/п	Області	Кількість захоронень
1	Вінницька	396	14	Миколаївська	193
2	Волинська	16	15	Одеська	170
3	Дніпропетровська	146	16	Полтавська	274
4	Донецька	80	17	Рівенська	22
5	Житомирська	117	18	Сумська	251
6	Закарпатська	83	19	Тернопільська	332
7	Запорізька	108	20	Харківська	338
8	Івано-Франківська	82	21	Херсонська	16і
9	Луганська	275	22	Хмельницька	243
10	Львівська	229	23	Черкаська	189
11	Кіровоградська	267	24	Чернівецька	71
12	АР Крим	69	25	Чернігівська	336
13	Київська	182	<b>Всього</b>		<b>4630</b>

З даних, наведених у таблиці видно, що найбільше сибіркових захоронень реєструється у Вінницькій, Харківській, Чернігівській, Тернопільській, Луганській, Кіровоградській областях.

Але проведена в кінці 20 сторіччя колективом учених і фахівців державної ветеринарної служби робота по складанню кадастрів неблагополучних на сибірку пунктів на території України показала, що принцип складання кадастрів, заснований на описі населеного пункту, де сибірка тварин була зареєстрована хоча б один раз, зараз не завжди відображає дійсний стан речей. Перш за все, багато населених пунктів «зникло» з даної місцевості та обліку в місцевих радах. Це пов'язано з багаторазовою зміною територіальних кордонів областей, районів, селищних рад. У багатьох населених пунктах майже не залишилося місцевих жителів, які можуть практично установити місця сибіркових захоронень. Велика кількість захоронень немає чітко визначених границь, огорожі. Частина з них зайнята під сільськогосподарське виробництво, частина затоплена штучними водоймами тощо. Про такі ж проблеми з сибірковими захороненнями в РФ повідомляють В.А. Гаврилов і співаєт [9].

Отже, можна стверджувати, що проблема біологічної загрози сибірки для тваринництва ще існує. Необхідно підтримувати здобуті раніше успіхи по реєстрації та визначенню місць сибіркових захоронень, продовжувати роботи по визначенню потенційної небезпеки сибірки в кожному окремому регіоні з використанням сучасних методів і засобів досліджень.

*Список літератури*

1. Ахремков, И.П. Сибирская язва/ И.П. Ахремков // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2006. – №4. – С. 18-22. 2. Бусол, В.О. Епізоотологічний моніторинг/ В. Бусол, В. Постой, А.Блажко // Ветеринарна медицина України. – 2002. – №3. – С.12-14. 3. Ипатенко, Н.Г. Эпизоотология

сибирской язвы/ Н.Г.Ипатенко, Н.Т.Татаринцев, В.А.Седов, В.Н. Гушин // Ветеринария, 1987. – № 9. – С. 35-37. 4. Сибирская язва / Под ред. С. Г. Колесова. М., 1976. – 339 с. 5. Седінкін, В. В., Вишневецький О. Г. Вакцинація – надійний засіб профілактики сибірки/ В. В. Седінкін, О. Г. Вишневецький // Ветеринарна медицина України. – № 2. – 2009. – С. 32-33. 6. Черкасский, Б.Л. Сибирская язва / Б.Л. Черкасский, С.П. Бургасов // Руководство по зоонозам. – М.: Медицина, 1983. 7. Чуйская, Г.А. Почва как среда сохранения и размножения возбудителя сибирской язвы./ Чуйская Г.А// Актуальные вопросы профилактики сибирской язвы в СССР. – М. – 1971. – С. 72. 8. Ипатенко, Н.Г. Сибирская язва / Н. Г. Ипатенко, В. А. Гаврилов, В. С. Залепухин и др... под ред.Н. Г. Ипатенко – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1996. – 335 с. 9. Гаврилов, В.А.. Проблемы ликвидации скотомогильников / В.А. Гаврилов, В.А. Вевдерников, И.В. Балдина., В.В. Селиверстов// Ветеринарная медицина, № 4, декабрь 2006, С. 21-22.

## STATE OF BIOLOGICAL SAFETY CONCERNING ANTHRAX IN UKRAINE

**Skrypnyk V.G.**

*State Scientific Control Institute of Biotechnology and of Strains of Microorganisms, Kyiv*

**Bezymennyi M.V.**

*Institute of Veterinary Medicine NAAS, Kyiv*

**Skrypnyk A.V.**

*Black & Veatch Special Projects Corp., Kyiv*

*Situation with anthrax in Ukraine since 1920 until today is shown in the paper. It has been found that the most of cases of disease in Ukraine was in cattle – 71.7% of all cases. It is indicated the strong tendency to reduce outbreaks of anthrax, and to reduce the number of permanently trouble concerning anthrax areas and places of animals burial.*

УДК 619:616.98:578.842.1.

## РОЗРОБКА РЕГЛАМЕНТУ ВИГОТОВЛЕННЯ ПОЗИТИВНОГО ДНК-КОНТРОЛЮ ДЛЯ ПЛР-ДІАГНОСТИКИ АЧС

**Стегній Б.Т., Герілович А.П., Горайчук І.В., Солодянкін О.С., Болотін В.І., Вовк С.І.**

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків*

Африканська чума свиней (*African swine fever*, АЧС) – це надгостре або гостре трансмісивне вірусне захворювання домашніх та диких свиней усіх порід та статевих-вікових груп, яке супроводжується різною клінічною картиною та високою летальністю. Гостра форма інфекції характеризується високою лихоманкою, множинними крововиливами у численних органах та тканинах [1, 2].

Збудник африканської чуми свиней – вірус АЧС (ASFV) належить до ДНК-вміщуючих вірусів з дволанцюговим геномом, родини *Asfarviridae*, роду *Asfivirus* [1, 2, 3].

Захворювання може передаватися двома шляхами: за «домашнім» (через прямий контакт інфікованої та сприйнятливої тварини) та «сильватичним» (передача від тварини до тварини через векторів-переносників). Векторами передачі збудника АЧС є м'які кліщі роду *Ornithodoros*. Описане векторне значення видів *O. moubata* та *O. erraticus*, як резервуарів вірусу в природі [4].

Лабораторна діагностика АЧС здійснюється за двома основними напрямками: індикацією та ідентифікацією збудника, а також виявлення антитіл до нього. Однак з цим і методи діагностики АЧС розподіляються на методи прямого виявлення збудника (вірусологічні (ізолювання, виявлення антигенів вірусу), молекулярно-генетичні (ПЛР) методи) та серологічні тести (ELISA). У зв'язку з тим, що у більшості випадків інфекція перебігає у гострій чи надгострій формах, імунна відповідь дуже часто не встигає розвинути, у хворих тварин антитіла до збудника АЧС у сироватці крові відсутні. Ця особливість перебігу хвороби ставить на перше місце за пріоритетністю тести з прямого виявлення збудника. При цьому особливе значення мають тести з експрес-діагностики хвороби.

Одним з таких тестів є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Для виявлення ДНК вірусу АЧС розроблено чимало протоколів для класичної детекції та детекції у режимі реального часу [5, 6, 7]. Особливо критичним елементом постановки ПЛР є наявність специфічних контрольних зразків. У зв'язку з високим епізоотичним потенціалом збудника АЧС використання у якості контрольних зразків є досить небезпечним на фоні відсутності в Україні умов біозахисту BSL-3. Вирішення проблеми відсутності контрольних зразків можна досягти за рахунок створення і впровадження рекомбінантного контрольного зразка, виготовлення якого і було **метою** цієї роботи.

**Матеріали і методи.** Для досліджень була використана ДНК вірусу АЧС з клінічних матеріалів зібраних на території Р. Кенії співробітниками Центру контролю хвороб тварин CISA-INIA (Valdeolmos, Мадрид, Королівство Іспанія), люб'язно надана д-р К. Гальярдо.

Ампліфікацію фрагменту VP73-гена в ділянці 278 п.н. було проведено за 40-цикловою ПЛР з праймерами ASF 1 5'-ATGGA-TACCG-AGGGA-ATAGC-3' та ASF 2 5'-CTTAC-CGATG-AAAAT-GATAC-3' [6], за температури відпалу 52 °С, за тривалості кроків ампліфікаційного циклу 45 с.

Одержуваний фрагмент був вбудований до складу вектору рTZ57R/T за допомогою набору для ТА-клонування виробництва Fermentas (Латвія) InsTAclone PCR Cloning Kit #K1213. Клонування до культури *E.coli* штамів HB10В (люб'язно наданий д.б.н. Колибо Д.В., лабораторія молекулярної біології Інституту біохімії ім. Палладіна НАН України) було здійснено методами хімічної та електричної поразки, з наступним висівом на LB-середовище з додаванням 50 мкг/мл ампіциліну.

Скринінг клонів був здійснений з використанням протоколу ПЛР для накопичення фрагменту для клонування у режимі touch-down.

**Результати досліджень.** На першому етапі наших досліджень була розроблена модель векторної молекули на основі плазмідної рTZ57R/T для ТА-клонування та ДНК-вставки фрагменту VP73-гена довжиною 278 п.н. Конструювання моделі молекули було проведено за допомогою програми Vector NTI advance 11.0. Отримана молекула рTZ\_ASF мала відповідати довжині 3151 п.н. та мала вільну полілінкерну ділянку, придатну до вбудовування додаткових фрагментів (рис. 1). Окрім того у складі зазначеного вектору містився ген стійкості до ампіциліну, що при подальшому клонуванні у культурі *E. coli* штамів HB10В виступав маркером селективних ознак.

На наступному етапі нашої роботи за допомогою ПЛР було отримано амплікони фрагментів гена VP73 з трьох зразків ДНК вірусу АЧС довжиною 278 п.н. Зазначені зразки були успішно лігійовані з ДНК вектору рTZ57R/T, про що свідчила наявність фракції довжиною біля 3 тис.п.н. при електрофоретичному очищенні продуктів лігювання у 0,5 % агарозному гелі.