

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 полілікерну 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.

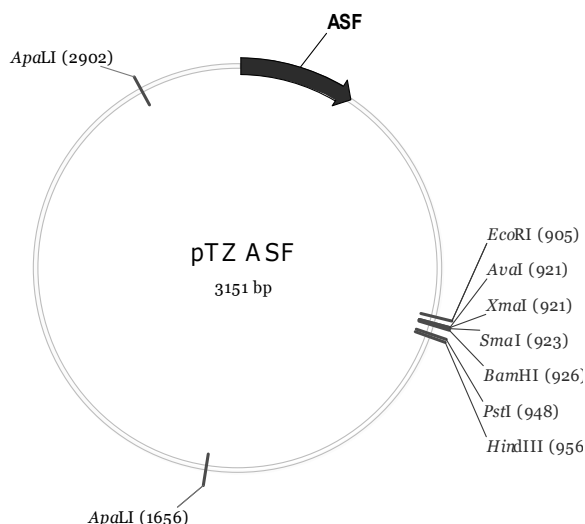


Рис. 1 Схема плазмідного вектору pTZ_ASF.

На наступному етапі досліджень отриманою біомасою плазмиди pTZ_ASF були трансформовані клітини *E. coli* штаму HB10В. При цьому встановлено, що з-поміж клітин, оброблених методом електропорації ампіцилін-резистентних клонів отримано не було та ріст на середовищі з додаванням ампіциліну був відсутній.

У той же час, в умовах хіміопорації з використанням хлориду кальцію було отримано 12 колоній з ознаками набутої резистентності до ампіциліну. У контрольних висівах росту бактерій не спостерігали.

Скринінг колоній, що зросли на селективному середовищі був проведений за touch-down з поступовим зниженням температури відпалу з 52 до 50 °С. Він показав наявність специфічної вставки у трьох клонах. При перевірці правильності напряму вбудовування із залученням праймерів m13 F/R та ASF 1-2 встановлено утворення фрагментів довжинами 287 та ~ 400 п.н. (рис. 2).

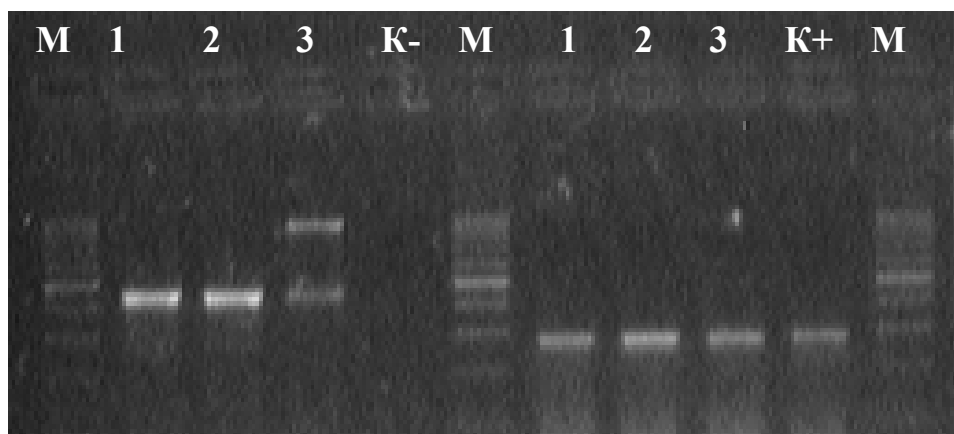


Рис. 2 Результати скринінгу позитивних клонів pTZ_ASF (1-3 – позитивні клони, K – негативний контроль, K+ – позитивний контроль, M – маркер молекулярної маси ДНК 100-1000 п.н., ліворуч – амплікони m13 F/R, праворуч – ASF 1-2).

Висновки: 1. Доведена 25 % ефективність отримання рекомбінантних клонів-носіїв фрагменту VP73-гена, довжиною 278 п.н. за методом ТА-клонування та ампіцилінової селекції.

2. Розроблений рекомбінантний контрольний зразок ДНК вірусу АЧС, придатний до використання з метою детекції генетичного матеріалу збудника за класичною ПЛР touch-down з поступовим зниженням температури відпалу з 52 до 50 °С.

Список літератури

- Gallardo, C. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells [Text] / Blanco E., Rodriguez M.J., Carrascosa A. & Sanchez-Vizcaino J.M. // J. Clin Microbiol., 2004 - 44 (3). - P. 1489-1495.
- Office international epizootical Terrestrial Code [El. source] // 18th Edition, 2009, Спосіб доступу URL: http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_sommaire.htm – Title from the screen.
- Office International des Epizooties. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) [Text] / Paris: The Office, 2004. – 1178 p.
- Basto, A.P., Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*. [Text] / Portugal R.S., Nix R.J., Cartaxeiro C., Boinas F., Dixon L.K., Leitao A. & Martins C. // Arch.Virol., 2006. - 151 (4). – P.: 819-826.
- Агьєро, М., A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever. [Text] / Fern6ndez J., Romero L., Zamora M.J., Sanchez C., Bel6k S., Arias M. & S6nchez-Vizcaino J.M. // Vet. Res., - 2004. - 35, 1 – P.: 13.
- Агьєро, М., Highly sensitive PCR assay for the routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples [Text] / Fern6ndez J., Romero L., Sanchez C., Arias M. & S6nchez-Vizcaino J.M. // , J. Clin. Microbiol., 2003. - 41 (9), – P.:4431-4434.
- King, D.P., Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. [Text] / Reid S.M., Hutchings G.H., Grierson S.S., Wilkinson P.J., Dixon L.K., Bastos A.D.S. & Drew T.W. // J. Virol. Methods. - 2003. - N107. – P.: 53-61.

DEVELOPMENT OF REGULATIONS FOR PRODUCTION OF POSITIVE DNA CONTROL FOR THE PCR DIAGNOSIS OF ASF

Stegniy B.T., Gerilovych A.P., Goraychuk I.V., Solodyankin O.S., Bolotin V.I., Vovk S.I.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkov, Ukraine

The paper is dedicated to the development of recombinant positive control for the detection of DNA of African swine fever virus (ASF), based on the method of TA-cloning into plasmid vector pTZ57R / T. VP73-gene in the region of 278 bp, was amplified using PCR, and cloned within the recombinant vector into cells of *E. coli* strain HB10B. The ability to produce three clones of recombinant DNA that can be used as a positive control for PCR detection of ASFV was proved. The research results will be applied in the system of monitoring the disease in the study of clinical material by PCR.

УДК 616.98:578.823.1

СЕРОЛОГІЧНИЙ ТА ЕНТОМОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ БЛЮТАНГУ В УКРАЇНІ

Стегній Б.Т., Кучерявенко Р.О., Кучерявенко В.В., Філатов С.В.

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

Блютанг (bluetongue, «синій язик») – особливо небезпечна вірусна хвороба жуйних тварин, основним шляхом передачі якої є біологічна трансмісія певними видами мокреців роду *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Це вірусне захворювання вражає таких жуйних тварин, як: вівці, рідше велика рогата худоба, кози, буйволи, олені, верблюди та антилопи. Викликається РНК-вірусом, родини *Reoviridae*, роду *Orbivirus*, що має антигенну варіабельність. Уперше захворювання було зареєстровано та описано в кінці XIX сторіччя в Південній Африці та довгий час вважалося суто тропічним захворюванням. Але починаючи з середини XX сторіччя блютанг потрапив до Австралії, Північної та Південної Америки, Південно-Східної Азії, причому для кожного з цих регіонів характерні свої види переносників. З кінця 90-х років минулого сторіччя захворювання проникло на територію Південної Європи, що пов'язується із розширенням ареалу основного переносника блютангу в Старому Світі – *C. imicola*. Окрім того, починаючи з 2006 року захворювання вкоренилося на території північно-західної Європи, що пов'язується із залученням до трансмісії нових видів переносників – *C. obsoletus*, *C. dewulfi*, *C. scoticus*, *C. pulicaris*, *C. punctatus*. Під час спалаху цього захворювання смертність тварин, в деяких випадках, сягає 70 %.

Напружена поточна епізоотична ситуація з блютангу в сусідніх державах (високий рівень серопозитивності худоби в окремих регіонах Росії, Польщі та Румунії, спорадичні випадки захворювання дрібних жуйних у Росії та Румунії) становить загрозу заносу в Україну збудника блютангу. В Україні існує багато факторів ризику виникнення блютангу: 1- наявність великих популяцій сприйнятливих видів тварин як свійських, так і диких; 2- розмаїття природнокліматичних умов, що зумовлює значне видове розмаїття фауни мокреців роду *Culicoides*; 3- встановлена активна торгівля тваринами між країнами ЄС і Україною, що загрожує завезенням інфікованих тварин з неблагополучних до цього захворювання держав.

Щодо ентомологічних чинників ризику, то за даними Інституту зоології ім. Шмальгаузена (1977) в Україні було зареєстровано 61 вид мокреців цього роду, зокрема види *C. obsoletus*, *C. dewulfi*, *C. scoticus*, *C. pulicaris*, *C. punctatus*. У Західній Європі їх зареєстровано, як переносників збудника блютангу. На сьогодні фауна *Culicoides* в Україні залишається маловивченою через відсутність цільового фінансування таких досліджень.

Мета досліджень: зважаючи на велике епізоотологічне значення цієї групи кровосисів науковцями ННЦ «ІЕКВМ» (єдиної в Україні лабораторії ветеринарної арахноентомології) проводилися ініціативні дослідження еколого-фауністичних комплексів мокреців на території Харківської області у 2003-2006 рр. За результатами цих досліджень на території області виявлено 29 видів мокреців роду *Culicoides*, зокрема види *C. obsoletus*, *C. pulicaris* та *C. punctatus* [10], які вважаються сучасними біологічними господарями збудника блютангу.

Матеріали та методи. У зв'язку з загостренням світової епізоотичної ситуації щодо блютангу, з 2010 року науковцями лабораторії вірусології та ветеринарної арахноентомології ННЦ «ІЕКВМ» сумісно розпочато систематичні моніторингові дослідження серопозитивності ВРХ до блютангу та видового складу мокреців на території Лісостепової зони України.

Для вивчення серопозитивності ВРХ були відібрані в польових умовах зразки сироваток крові з 25-ти господарств Харківської, Київської, Запорізької, Луганської, Львівської, Волинської, Херсонської та Донецької областей, а також 2-х господарств Російської Федерації розташованих в Білгородській області.

В лабораторії вірусології проведено серологічні дослідження 450 сироваток крові на наявність антитіл до збудника блютангу в ІФА. З цієї метою використані діагностичні набори «Блютанг-серотест», (НИИ ДГБ, РФ), С-ELISA kit (VMRD, США) та sandwich-ELISA, (Ingensa, Іспанія).

Для вивчення видового складу мокреців трофічно пов'язаних з худобою були опрацьовані класичні методики ентомологічних досліджень. Збори комах проводили в природних стаціях та у трьох тваринницьких господарствах з утриманням ВРХ (два у Полтавській та одне у Харківській областях). Враховуючи суттєву активність комах, збори проводили у вечірній (до настання суцільної темряви) та ранковий часи. При цьому враховували деякі метеорологічні фактори (температура, відносна вологість повітря, швидкість вітру), наявність водоймищ, рослинний покрив тощо [20]. Для зборів у природних стаціях використовували метод косіння ентомологічним сачком (діаметр 30 см) по рослинності. В умовах тваринницьких господарств і на пасовищі обловлювали тварин за допомогою сачка діаметром 20 см. Також проводили збори комах безпосередньо з тварин (за допомогою екстаустеру) та на вікнах приміщень де утримувалась худоба. Зібраних комах заморювали хлороформом і доставляли до лабораторії арахноентомології ННЦ «ІЕКВМ» для подальшого визначення видової належності. Крім того, враховуючи позитивний фототаксис мокреців, на території експериментальної бази ННЦ «ІЕКВМ» проводили збори за допомогою світлопастки типу «Пенсільванія» у модифікації ННЦ «ІЕКВМ» для якісного моніторингу ентомофауни ветеринарного значення. Пастка, устаткована люмінесцентною лампою, була підвішена на висоті 2 м в приміщенні для утримання ВРХ і вмикалася в нічний час (фото 1).

Результати досліджень. Згідно отриманим результатам щодо наявності антитіл до збудника блютангу, то в 24 пробах (5,3 %), як в подальшому було встановлено, від вакцинованої ВРХ, у двох досліджених господарствах було виявлено антитіла до цього збудника (таблиця).

У лабораторії молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ» проведена діагностика позитивно реагуючих у реакції ІФА тварин на наявність генетичного матеріалу. Виявлення генетичного матеріалу вірусу блютангу здійснювали за допомогою гніздової ПЛР.

В 24 генетичних зразках від дослідженої в ІФА ВРХ генетичного матеріалу збудника не виявлено.

Згідно отриманих результатів за ентомологічними дослідженнями в тваринницьких господарствах Харківської та Полтавської областей встановлено, що масовим видом в досліджених умовах є *C. punctatus* (99,2 %: n = 710 з 716 зібраних особин). Також одиничними екземплярами траплялися *C. obsoletus sensu lato*, *C. simulator* (фото 2-4).