

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).

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

Таблиця – Результати досліджень сироваток крові від ВРХ на наявність антитіл до вірусу блютангу в ІФА

Область	Кількість досліджених проб	Позитивних до вірусу
Харківська	100	-
Київська	112	24
Запорізька	88	-
Луганська	25	-
Львівська	25	-
Волинська	25	-
Херсонська	25	-
Донецька	25	-
Білгородська	25	-
Всього	450 (100 %)	24 (5,3 %)

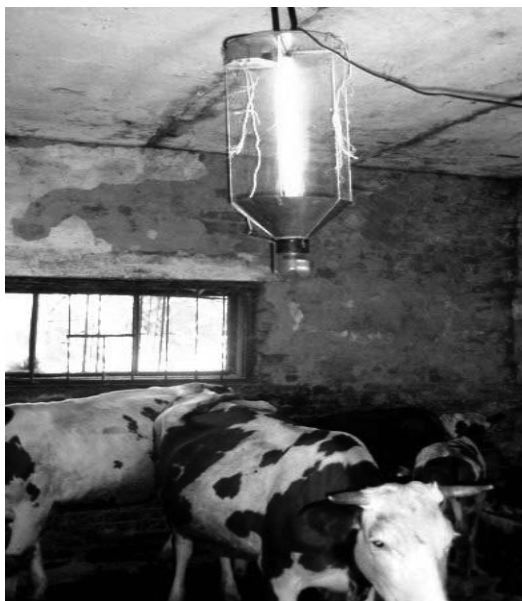


Фото 1 Світлопастка типу «Пенсільванія».



Фото 2 Самиця *C. punctatus*



Фото 3 Діагностичні ознаки *C. punctatus*



Фото 4 Самиця *C. obsoletus sensu lato*

Відповідно до літературних даних та результатів власних досліджень, можна зробити **висновки**:

1. У зв'язку з встановленою активною торгівлею між країнами ЄС і Україною повинен бути продовжений моніторинг фактичного стану катаральної лихоманки овець в Україні.

2. Значна кількість видів та розповсюдженість мокреців становить реальну небезпеку укорінення збудника блютангу у разі його занесення на територію України.

У ініціативному плані, в подальшому співробітниками лабораторії планується розширити моніторингові дослідження в інших регіонах України з особливою увагою на територіях прикордонних до Росії та Румунії.

Список літератури

- World Animal Health Information Database [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://web.oie.int/wahis/public.php?page=home>.
- Bluetongue Preventative Vaccine Cleared [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.mrcvs.co.uk/en/news-story.php?id=6469>.
- Council Directive 2000/75/EC // Official Journal of the European Union.
- Hofmann, MA, Renzullo, S, Mader, M, Chagnat V, Worwa G, Thuer B. Genetic characterization of Toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus from goats Switzerland. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1855–61. doi:10.3201/eid1412.080818.
- Maan, S, Maan, NS, Nomikou, K, Batten, C, Antony, F, Belaganahalli, MN, et al. Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. 2011 May [date cited]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1705.101742>.
- Maan, S, Maan, NS, van Rijn PA, van Gennip RGP, Sanders A, et al. (2010) Full Genome Characterisation of Bluetongue Virus Serotype 6 from the Netherlands 2008 and Comparison to Other Field and Vaccine Strains. *PLoS ONE* 5(4): e10323. doi:10.1371/journal.pone.0010323.
- G.J. Venter, G.H. Gerdes, P.S. Mellor & J.T. Paweska Transmission potential of South African *Culicoides* species for live-attenuated bluetongue virus // *Veterinaria Italiana* – 2004.. – 40(3) – p. 198-203.
- SCFCAH - Animal Health & Animal Welfare [Электронный ресурс] Режим доступа: http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/presentations_en.htm#1213042010.
- Roselkhoznadzor/News For the attention of cattle and beef products importers [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://fsvps.ru/fsvps/news/3810.html?language=en>.
- Прудкина, Н.С., Мищенко, А.А., Машке, А.Н., Солодянкин А.С. Формирование фауны мокрецов в водоемах различного типа Харьковской области // *Annals of Mechnikov Institute*, 2006, №3, стор. 70-73.
- Глухова, В.М. Кровососущие мокрецы родов *Culicoides* и *Forcipomya* (Ceratopogonidae) [Текст]. / В.М. Глухова – Л.: Наука, 1989. – 408 с.
- Определитель насекомых европейской части СССР в пяти томах [Текст]. Т. 5, Ч. 1 / под. ред. Г.Я. Бей-Биенко. – Москва: Наука, 1969. – 826 с.
- Прудкина, Н.С. Кровососущие двукрылые насекомые. Фауна, биология, экология, медико-ветеринарное значение [Учебное пособие] / Прудкина Н.С. – Харьков: Коллегиум, 2011. – 288 с.
- Гуцевич, А.В. Кровососущие мокрецы (Diptera, Heleidae) фауны СССР [Текст]. / А.В. Гуцевич - М.-Л.: Наука, 1960. - 131 с.
- Lassen, SB, Nielsen, SA, Skovgerd, H, Kristensen, M. Molecular identification of bloodmeals from biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in Denmark. *Parasitol Res*. 2011 Apr;108(4):823-9. Epub 2010 Oct 27.
- Информационная система КРОНАРОС (Кровососущие насекомые России) [Электронный ресурс] / Зоологический институт РАН, С-Петербург Режим доступа: <http://www.zin.ru/projects/kronaros/index.html>.
- Шевченко, А.К. Кровососущие мокрецы (Diptera, Ceratopogonidae, Leptocnopyidae) Украины [Текст]: автореф. дис. д-ра биол. наук: 29.06.1971 / А.К. Шевченко; [Ин-т зоологии АН УССР]. – К., 1971. – 57 с.
- Прудкина, Н.С. Видовой состав кровососущих двукрылых (Diptera: *Culicidae*, *Ceratopogonidae*, *Simuliidae*, *Tabaniidae*) Харьковской области [Текст] / Н.С. Прудкина, С.Б. Павлов // *Известия Харьков. Энтомол. Общ-ва* 2001. – Т. IX. Вып. 1-2. – С.158-160.
- World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) by Art Borkent [Электронный ресурс] // 243 с. – Режим доступа: www.inhs.uiuc.edu/research/FLYTREE/CeratopogonidaeCatalog.pdf.
- Глухова, В.М. Кровососущие мокрецы родов *Culicoides* и *Forcipomya* (Ceratopogonidae) // Л.: Наука, 1989. – 408 с.

SEROLOGICAL AND ENTOMOLOGICAL MONITORING OF BLUETONGUE IN UKRAINE

Stegniy B.T., Kucheryavenko R.O., Kucheryavenko V.V., Filatov S.V.

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

The article contains data about the results of serological and entomological research on bluetongue virus spread. As a result of entomological studies there has been found a significant number of species and distribution of biting midges, which is a real danger of rooting of the bluetongue agent in the case of its entry into Ukraine. These serological studies show that there is possible circulation of the bluetongue pathogen with imported cattle, particularly from the countries of Central Europe.

УДК 616.616.988.21

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ БЛОК-ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ БЕШЕНСТВА

Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Сабирова В.В., Гафарова А.З.

ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» («ФЦТРБ-ВНИВИ»), г. Казань

Елаков А.Л.

ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, г. Москва

В большинстве регионов России эпизоотическая ситуация по бешенству чрезвычайно сложна – резко активизировались природные очаги этой инфекции, увеличилось число случаев заболеваний среди диких плотоядных, домашних и сельскохозяйственных животных, ежегодно регистрируются случаи заболеваний людей с летальным исходом [2, 4, 9, 11].

Одной из причин распространения бешенства является отсутствие массовой вакцинации диких и сельскохозяйственных животных, а также контроля эффективности вакцинопрофилактики [1, 6, 7]. Традиционный метод определения вируснейтрализующих антител – реакция нейтрализации на белых мышах или в культуре клеток являются трудоемкими. В литературе показана перспективность использования непрямого варианта иммуноферментного анализа (ИФА) для определения специфических к вирусу бешенства антител в сыворотках крови вакцинированных против бешенства животных непрямым методом иммуноферментного анализа (ИФА) [3, 5, 8, 12]. Однако для проведения непрямого варианта ИФА требуется наличие антивидовых пероксидазных конъюгатов к каждому виду животного.

В связи с этим, целью нашей работы была разработка и апробация блок-иммуноферментной тест-системы для контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства.

Материалы и методы. В качестве специфического антигена применяли гликопротеин вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, а также стандартный штамм CVS вируса бешенства с титром 4,0 Ig LD₅₀. В качестве исследуемого материала использовали 38 проб сывороток крови собак, кошек, лисиц и сельскохозяйственных животных (с.-х.), вакцинированных против бешенства, а также 34 пробы сывороток крови плотоядных, оттитрованных в РН и в культуре клеток в условиях ФГУ «ВГНКИ» согласно методике, рекомендованной МЭБ. Результаты ИФА были сопоставлены с результатами полученными в реакциях нейтрализации (РН) на белых мышах и в культуре клеток. РН проводили с использованием вируса бешенства, штамм CVS, взятого в дозах от 30 до 300 LD₅₀/0,03 мл. В качестве контрольной положительной сыворотки применяли отраслевой стандартный образец антирабической сыворотки – референс-сыворотку ВГНКИ, серии NCA с активностью 20 МЕ/мл, а также антирабические сыворотки животных, оттитрованных в РН. В качестве отрицательных контролей использовали сыворотки крови собак, кошек, лисиц, КРС и овец невакцинированных против бешенства.

ИФА проводили в прямом сэндвич-варианте на 96-луночных микротитрационных планшетах для иммунологических реакций из полистирола «Пл-Б-М», ТУ 9393-009-16548645-2005. При постановке блок – ИФА использовали антирабический глобулин и антирабический пероксидазный конъюгат, входящих в «Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа (ИФА)», нормативная документация к которому утверждена Россельхознадзором в 2008 г. Специфический антиген и исследуемые сыворотки одновре-