

УДК 619:616.98:578.842:636.4

МАНДИГРА С.С. *, e-mail: mandygra@ukr.net,

МУЗИКІНА Л.М., e-mail: loramuzykina@i.ua,

ЩЕНКО Л.М., канд. вет. наук, e-mail: ischenko_lm@ukr.net,

КОВАЛЕНКО Г.А., канд. вет. наук, e-mail: anna.kovalenko31@mail.ru,

ГАЛКА І.В., канд. вет. наук, e-mail: ptica2005@ukr.net,

СИТЮК М.П., д-р вет. наук, e-mail: snp1978@ukr.net,

НИЧИК С.А., д-р вет. наук, проф., член-кор. НААН, e-mail: ivm_naан@ukr.net

СПИРИДОНОВ В.Г., д-р с-г. наук, проф., e-mail: snp1978@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

РОЗРОБКА ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ АФРИКАНСЬКОЇ ТА КЛАСИЧНОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ЗТ-ПЛР У РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ

У статті представлені результати розробки способу диференційної діагностики африканської та класичної чуми свиней методом дуплексної зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) у режимі реального часу. У процесі роботи підібрано три пари специфічних олігонуклеотидних праймерів до цільових ділянок гену B646L вірусу АЧС, нетрансльованої ділянки 5' UTR вірусу КЧС та гену PRP (внутрішній контроль). Обрано оптимальний режим ампліфікації та визначено критерії оцінки результатів ПЛР. Розроблений діагностичний комплекс дозволяє одночасно виявляти обидва збудники (вірус АЧС та КЧС) у досліджуваній пробі, сприяючи цим економії часу, трудових ресурсів та коштів, які витрачаються на дослідження.

Ключові слова: африканська чума свиней (АЧС), класична чума свиней (КЧС), ЗТ-ПЛР у режимі реального часу, праймери.

Вступ. Африканська чума свиней (АЧС) та класична чума свиней (КЧС) – два окремих висококонтагіозних вірусних захворювання свійських і диких свиней усіх порід та статево-вікових груп. У зв'язку із відсутністю засобів лікування, високим показником смертності та здатністю до швидкого поширення, АЧС та КЧС спричиняють величезні економічні збитки свиноводству та становлять загрозу експортному потенціалу агропромислового комплексу країни. Міжнародне епізоотичне бюро (МЄБ) віднесло ці захворювання до списку транскордонних хвороб, тож вони є предметом контролю служб державної ветеринарної медицини в усіх країнах світу [1–6].

Відрізнити африканську чуму від класичної на основі клінічних ознак та патологоанатомічних змін часто дуже важко, проте, у разі підозри на спалах, диференційна діагностика є обов'язковою. Кінцевий діагноз ставлять на підставі результатів лабораторних досліджень, і в наш час все частіше для цього використовують метод ПЛР, що характеризується високою чутливістю і специфічністю [7–10].

* Аспірант, наук. керівник – д-р вет. наук, проф., член-кор. **Ничик С.А.**

В Україні користуються переважно діагностикумами закордонного виробництва. Проте, у зв'язку з епізоотією АЧС в Україні (з 2012 року виявлено 264 випадків АЧС у всіх областях України), очевидною стала необхідність розробки і вдосконалення вітчизняних тест-систем для діагностики АЧС [11–13].

В Інституті ветеринарної медицини НААН розпочато роботу над розробкою тест-системи для диференційної діагностики АЧС та КЧС методом дуплексної ЗТ-ПЛР у режимі реального часу, що сприятиме економії часу, трудових ресурсів та коштів.

Мета роботи – підбір специфічних олігонуклеотидних праймерів та флуоресцентних зондів, визначення оптимальних умов проведення ампліфікації.

Матеріали і методи досліджень. В експерименті використовували патологічний матеріал свиней, що містив вірусу АЧС, кров свиней з вірусом КЧС – штам «Вашингтон», а також вірусомісні суспензії культур клітин із збудником репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (PPCS) – штам «Lelystad», цирковірусом свиней 2-го типу (ЦВС-2) – штам «Stoon 1010» і вірусом хвороби Ауескі – штам «Петрівський-2006».

В якості позитивного контролю ПЛР-РЧ використовували плазмідну ДНК з вбудованими фрагментами геномів вірусів АЧС та КЧС.

ДНК/РНК з досліджуваного матеріалу виділяли методом сорбції на силікагелі з використанням комерційного набору «РИБО-сорб» (AmpliSens, Росія), згідно інструкцій виробника.

Дизайн специфічних олігонуклеотидних праймерів та флуоресцентних зондів проводили за допомогою програми Primer Express (Applied Biosystem) та бази даних GenBank. Аналіз і множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили з використанням комплекту програми BLAST.

Ампліфікацію здійснювали в режимі реального часу за допомогою приладу «Rotor-Gene 6000», виробник «QIAGEN Hilden» (Німеччина).

Результати досліджень та їх обговорення. Для розробки дуплексної ЗТ-ПЛР у режимі реального часу було обрано системи праймерів для детекції вірусів АЧС та КЧС. При цьому звертали увагу на те, щоб температура відпаалу праймерів були однаковими, а також досліджували праймери на предмет відсутності димерів та шпильок при сумісному їх використанні в одній реакції.

Для детекції ДНК вірусу АЧС було вирішено використати рекомендовані Міжнародним епізоотичним бюро (МЄБ) праймери до цільової консервативної ділянки гену B646L, розміром 250 пар нуклеотидів (п. н.), що кодує білок P72 [1, 14]. *TaqMan* зонд, рекомендований МЄБ для детекції цільового фрагменту ДНК вірусу АЧС, було удосконалено шляхом заміни гасника *TAMRA* (6-карбокситетраметил-родамін) на RTQ1, що в порівнянні з іншими молекулами гасника забезпечує у 1,5–2 рази вище поглинання флуоресценції барвників FAM і ROX, сприяючи цим підвищенню специфічності діагностикума.

На основі проведеного аналізу нуклеотидної послідовності вірусу КЧС, знайденої у базі даних GenBank, обрано фрагмент, що вміщував цільову

висококонсервативну ділянку 5' UTR (нетрансльована ділянка). За допомогою програми Primer Express була підбрана пара праймерів до обраного фрагменту гена розміром 72 п. н. Перевірка послідовності праймерів на специфічність, здійснена за допомогою програми BLAST, підтвердила їх 100% гомологію до 5' UTR.

З метою контролю якості екстракції ДНК та виключення наявності інгібіторів у досліджуваному матеріалі, було розроблено також праймери до гену PRP (внутрішній контроль). В таблиці 1 представлена нуклеотидна послідовність та характеристика праймерів і флуоресцентних зондів.

Таблиця 1

Характеристика олігонуклеотидних праймерів та флуоресцентних зондів

| Назва праймеру | Послідовність олігонуклеотидів праймеру (5' - 3') | Довжина амплікону (п. н.) | Послідовність флуоресцентного зонду (5' - 3') |
|----------------|---|---------------------------|---|
| ASF F | CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA | 250 | FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-RTQ1 |
| ASF R | GATACCACAAGATCAGCCGT | | |
| CSF5uf | TGAGTACAGGACAGTCGTCAGTAGTTC | 72 | ROX-ACGTGAGCAGAAGCCACCTCGA-BHQ1 |
| CSF5ur | TGCCCTCGTCCACATAGCA | | |
| PRF | ACGTGGGCCTCTGCAAGA | 81 | R6G-CGACCAAAACCTGGAGGAGGATGGA-BHQ2 |
| PRR | GACTGCCCTGTCCTGGGTATC | | |

Зазначені пари олігонуклеотидних праймерів і TaqMan зондів були синтезовані за нашим замовленням у компанії Синтол (Росія).

У процесі розробки мультиплексної ПЛР необхідно було підібрати такі параметри ампліфікації, які б забезпечували оптимальну роботу всіх пар праймерів та зондів. З цією метою, нами була проведена серія ампліфікацій з різними градаціями температури відпалу (55°C, 58°C, 60°C, 63°C) і кількістю циклів (35, 40 та 45), а також з різними концентраціями праймерів (5, 10 та 15 пМ).

На підставі підібраних, в процесі оптимізації, параметрів часу і температур, було обрано режим проведення ЗТ-ПЛР у реальному часі, що представлений у таблиці 2.

Таблиця 2

Умови ампліфікації нуклеїнових кислот вірусів АЧС та КЧС

| № з/п | Етапи | Температура, °C | Час | Кількість циклів |
|-------|---------------------------|-----------------|-------|------------------|
| 1 | Зворотна транскрипція | 50 | 30 хв | 1 |
| 2 | Початкова денатурація ДНК | 95 | 10 хв | 1 |
| 3 | Денатурація ДНК | 95 | 20 с | 45 |
| | Відпалювання праймерів | 58 * | 20 с | |
| | Елонгація | 72 | 30 с | |

* Флуоресценцію вимірюють при 58 °C на каналах FAM (ДНК АЧС), ROX (РНК КЧС) та JOE (ВК).

Для проведення ампліфікації використовували комерційний мастер-мікс qScript™ XLT One-Step-RT-qPCR ToughMix®, (виробник Quanta biosciences, США). Оптимальні концентрації праймерів та зондів з розрахунку на одну реакцію склали: по 10 пМ праймерів для детекції АЧС і КЧС, по 5 пМ для детекції внутрішнього контролю та по 2,5 пМ кожного із флуоресцентних зондів.

В ході роботи над розробкою цього діагностичного комплексу були також визначені критерії оцінки отриманих результатів ПЛР. Так результати аналізу вважаються достовірними, якщо значення Ct по каналам FAM та ROX позитивного контролю менше або дорівнює 35 ($Ct \leq 35$), значення Ct негативного контролю відсутнє, значення Ct по каналу JOE всіх досліджуваних зразків (ампліфікація ВКЗ) менше або дорівнює 35 ($Ct \leq 35$). При цьому досліджуваний зразок вважається позитивним щодо АЧС, якщо значення Ct по каналу FAM менше або дорівнює 40 ($Ct \leq 40$), позитивним щодо КЧС – якщо Ct по каналу ROX менше або дорівнює 40 ($Ct \leq 40$).

Підібрані пари праймерів були перевірені на специфічність щодо детекції ДНК вірусу АЧС, РНК вірусу КЧС та внутрішнього контролю, відповідно.

Специфічність праймерів визначали шляхом проведення ампліфікації виділеної з патологічного матеріалу ДНК вірусу АЧС, РНК вірусу КЧС, а також нуклеїнових кислот вірусів, що викликають подібні з АЧС та КЧС симптоми: РРСС, ЦВС2, хвороби Ауескі. Результати даних досліджень представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Результати дослідження по вивченню специфічності праймерів

| № | Назва досліджуваного матеріалу | Ct по FAM | Ct по ROX | Ct по JOE |
|----|--|-----------|-----------|-----------|
| 1. | К+ | 13,92 | 15,25 | - |
| 2. | К- | - | - | - |
| 3. | В- (негативний контроль виділення) | - | - | 23,68 |
| 4. | виділена ДНК вірусу АЧС з патматеріалу свині | 17,33 | - | 25,06 |
| 5. | виділена РНК вірус КЧС (штам "Вашингтон") із крові свині | - | 28,76 | 25,66 |
| 6. | виділена РНК вірус РРСС (штам "Lelystad") з культури клітин | - | - | 24,52 |
| 7. | виділена ДНК ЦВС-2 (штам "Stoon 1010") з культури клітин | - | - | 24,58 |
| 8. | виділена ДНК вірусу хв. Ауескі (штам "Петріківський-2006") з культури клітин | - | - | 25,08 |

При аналізі отриманих результатів виявлено, що криві ампліфікації та значенням Ct по каналу FAM/Green реєструвались лише у позитивному контрольному зразку (К+) і пат. матеріалі, що завідомо містив вірус АЧС, із Ct 13,92 і 17,33, відповідно, що підтверджує наявність у них ДНК вірусу АЧС (рис. 1).

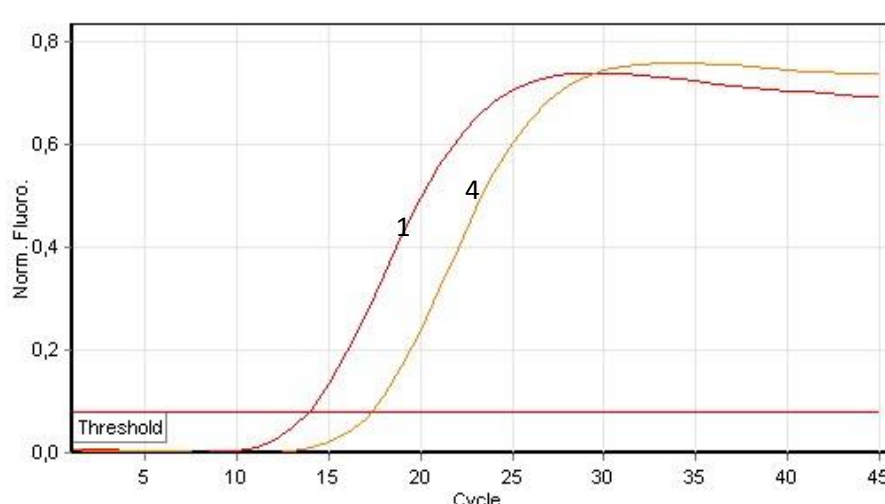


Рис. 1. Криві ампліфікації цільової послідовності вірусу АЧС за FAM: 1 – К+; 4 – пат. матеріал, що містить вірус АЧС.

По каналу ROX/Orange реєстрували криві ампліфікації у позитивному контрольному зразку (К+) і в пробі крові з референтним штамом вірусу КЧС «Вашингтон» (значення C_t 15,25 і 28,76, відповідно), що підтверджує наявність у них РНК вірусу КЧС (рис. 2).

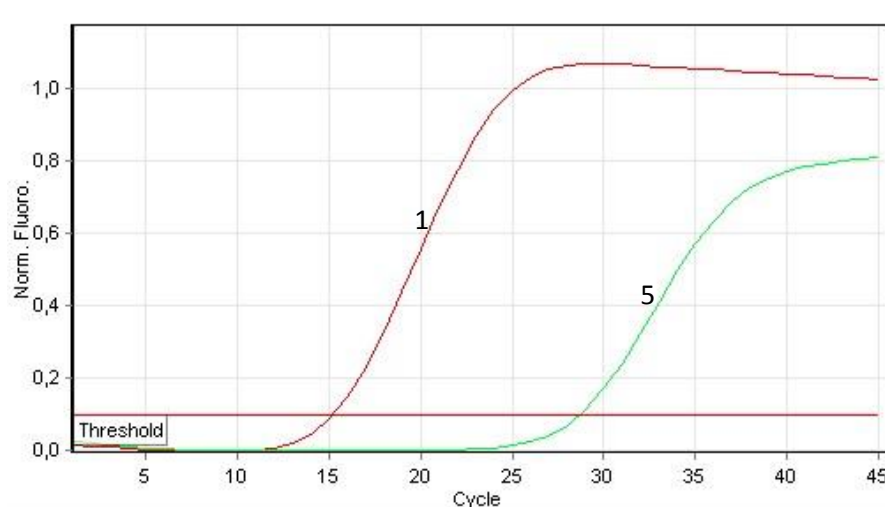


Рис. 2. Криві ампліфікації цільової послідовності вірусу КЧС за ROX: 1 – К+; 5 – кров свині, що містить вірус КЧС (штам «Вашингтон»)

На рис. 3 показано, що по каналу JOE/Yellow криві ампліфікації внутрішнього контролю реєстрували у всіх досліджуваних зразках, при цьому значення C_t відповідало встановленим нормам ($C_t \leq 35$), що свідчить про якість проведеного виділення ДНК/РНК.

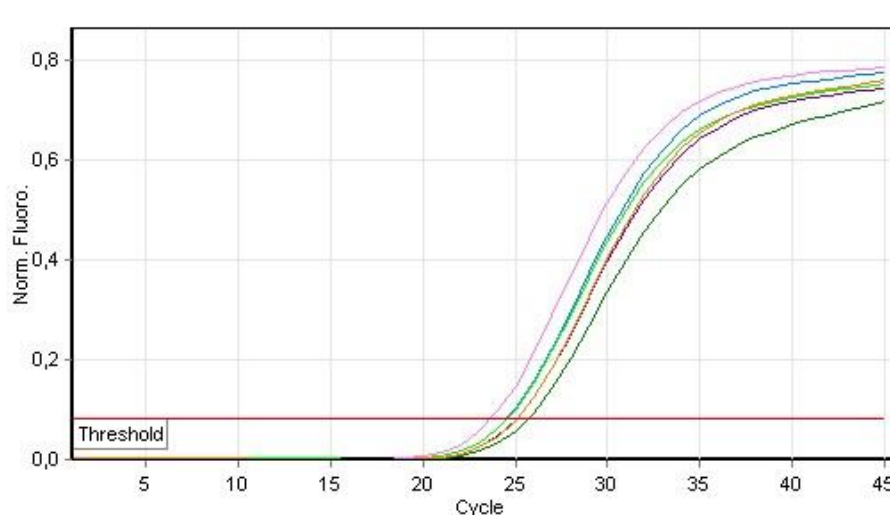


Рис. 3. Криві ампліфікації цільової послідовності гену PRP (внутрішній контроль) за JOE: відповідають зразкам під номерами 3–8.

Згідно отриманих результатів, підібрані олігонуклеотидні праймери ASF F і ASF R показали строгу специфічність тільки до АЧС, праймери CSF5uf і CSF5ur – до КЧС, а PRF і PRR – до гену PRP, відповідно, так як не давали перехресних реакцій з ДНК і РНК інших збудників.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Підібрано специфічні праймери та флуоресцентні зонди до цільових нуклеотидних послідовностей геному вірусів АЧС та КЧС. Оптимізовано параметри проведення дуплексної ЗТ-ПЛР у режимі реального часу, призначеної для диференційної діагностики АЧС та КЧС.

У подальшому буде проведено валідацію розробленого діагностичума, за результатами якої матимемо підстави рекомендувати нашу розробку для подальшого впровадження в лабораторіях ветеринарної медицини з метою діагностики АЧС та КЧС.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. African swine fever. OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.8.1. – 2008. – P.1069–1082 – Retrieved from: http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.08.01_ASF.pdf.
2. Інструкція щодо профілактики та боротьби з африканською чумою свиней, затверджена Міністерством аграрної політики та продовольства України 05.03.2014 № 81 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/z0363-14>.
3. Ситюк М. П. Історичні та епізоотологічні аспекти африканської чуми свиней / М. П. Ситюк, А. Ф. Ображей // Ветеринарна медицина України. – 2012. – 1 (191). – С. 9–12.
4. Корнієнко Л.Є. Африканська чума свиней: історичні аспекти, сучасна епізоотична ситуація в світі й в Україні, імунітет та перспективи вакцинопрофілактики / Л.Є. Корнієнко // Науковий вісник ветеринарної медицини. – Вип.14 (114). – 2014. – С. 5–12.
5. Корнієнко Л.Є. Класична чума свиней: історичні аспекти, сучасна епізоотична ситуація в світі та Україні, імунітет і вакцинопрофілактика / Л. Є. Корнієнко // Науковий вісник ветеринарної медицини. – № 2. – 2015. – С. 5–13.
6. African swine fever: a global view of the current challenge / С. Gallardo, А.Т. Reoyo, J. Fernández-Pinero, et all // Porcine Health Management. – 2015. – 14 p.
7. Максимович В. В. Дифференціальна діагностика африканської чуми свиней / В.В. Максимович, С. В. Семенов // Ученые записки УО ВГАВМ. – Т. 52. – Вып. 1. – 2016. – С. 60–67.

8. Диагностика африканской чумы свиней в Российской Федерации / Т. В. Гребенникова, А. Д. Забережный, Т.И. Алипер и др. // Вопросы вирусологии. – № 51. – 2013. – С. 64–79.
9. Діагностичні схеми використання лабораторних методів при африканській чумі свиней / О. М. Неволько, М. І. Сушко, М. А. Сапачова та ін. // Ветеринарна біотехнологія. – № 25. – 2014. – С. 67-70.
10. Principles of environmental biosafety: detection and death from ASF and CSF / I. Halka, S. Nychyk, M. Sytiuk, M. Peknii et al. // 5th Annual Conference of the Biosafety Assotiation for Central Asia & the Caucasus. – March 26-28, 2014. – P. 13.
11. Аналіз епізоотичної ситуації з африканської чуми свиней в Україні за 2012–2016 рр. / М. П. Ситюк, Г. А. Коваленко, І. В. Галка, та ін. // Ветеринарна біотехнологія. – Вип. 29. – 2016. – С. 241–248.
12. Випадки АЧС в Україні з 2012 року. [Електронний ресурс] / <http://www.asf.vet.ua/index.php/purpose-project/about-asf/198-vypadky-achs-v-ukraini-z-2012-roku>.
13. Підбір праймерів та оптимізація методу ПЛР для детекції ДНК вірусу АЧС / С. С. Мандигра, Л. М. Музикіна, Л. М. Іщенко та ін. // Ветеринарна медицина. – № 103. – 2017. – С. 304–306.
14. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus / D.P. King, S.M. Reid, G.H. Hutchings, et all // Journal of Virological Methods. 2003 – Vol. 107(1). – P. 53-61.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ АФРИКАНСКОЙ И КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ / Мандыгра С.С., Музыкина Л.М., Ищенко Л.М., Коваленко А.А., Галка И.В., Сытюк Н.П., Нычик С.А., Спиридонов В.Г.

В статье представлены результаты разработки способа дифференциальной диагностики африканской и классической чумы свиней методом дуплексной обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. В процессе работы подобрано три пары специфических олигонуклеотидных праймеров к целевым участкам гена B646L вируса АЧС, нетранслируемому участку 5'UTR вируса КЧС и гену PRP (внутренний контроль). Выбран оптимальный режим амплификации и определены критерии оценки результатов ПЦР. Разработанный диагностикум позволяет одновременно идентифицировать оба возбудителя (вирус АЧС и КЧС) в исследуемой пробе, способствуя тем самым экономии времени, трудовых ресурсов и средств, которые тратятся на исследования.

Ключевые слова: африканская чума свиней (АЧС), классическая чума свиней (КЧС), ОТ-ПЦР в режиме реального времени, праймеры.

DEVELOPMENT OF THE TEST KIT FOR THE DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF AFRICAN AND CLASSICAL SWINE FEVER BY RT-PCR IN REAL TIME / Mandygra S.S., Muzykina L.M., Ishchenko L.M., Kovalenko G.A., Halka I.V., Sytjuk M.P., Nychyk S.A., Spirydonov V.G.

Introduction. African swine fever (ASF) and Classical swine fever (CSF) are two transboundary contagious viral swine diseases with high mortality rates and huge economic impacts. ASF cannot be differentiated from CSF by either clinical presentation or post mortem examination, therefore in the event of a suspected outbreak, differential diagnosis of the two diseases is essential.

The goal of the work is to develop specific primers to the target DNA and RNA fragments of ASFV and CSFV respectively and to determine the optimal conditions of the amplification.

Materials and methods. Pathological and biological materials with ASFV and CSFV, cell cultures containing closely related viruses were used in the study. «RIBO-Sorb» (AmpliSens) was used for DNA extraction. Amplification was performed using Rotor-Gene 6000 («QIAGEN Hilden»). The nucleotide sequence of primers were designed through Primer Express software (Applied Biosystems).

Results of research and discussion. The OIE primers for real-time PCR were used for detection of ASF DNA. The primers to the target 72 bp fragment of CSFV 5' UTR region for detection of CSF RNA were selected using Primer Express. With the purpose to control DNA/RNA extraction and exclude the presence of PCR inhibitors, an internal control (IC) was constructed and specific primers with fluorogenic probe were also designed.

Primer annealing temperatures and optimal protocol of PCR were optimized.

The specificities of the primer pairs were determined with pathogens of PCV2, PRRS and Aujeszky's disease. The cross-reactions with closely related DNA and RNA viruses were not observed.

Conclusions and prospects for further research. Specific primer pairs and TaqMan probes for the conserved regions of ASFV DNA, CSFV RNA and IC were selected. The conditions of amplification were determined for the duplex real-time RT-PCR for the differential diagnosis of ASF and CSF. In further investigations the validation of the developed test kit will be carried out.

Keywords: African swine fever (ASF), Classical swine fever (CSF), real-time RT-PCR, primers.

REFERENCES

1. African swine fever (2008). OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.8.1., 1069-1082. *web.oie.int*. Retrieved from: http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.08.01_ASF.pdf.
2. Instrukciya shhodo profilaktyky ta borotby z afrykanskoyu chumoyu svynej, zatverdzhena Ministerstvom agrarnoyi polityky ta prodovolstva Ukrayiny [Prevention and recovery of african swine fever, approved by Ministry of Agrarian Policy and Food of Ukraine]. *Regulations*. 05.03.2014 № 81. Retrieved from: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/z0363-14> [in Ukrainian].
3. Sytiuk, M.P. & Obrazhei, A.F. (2012). Istorychni ta epizootolohichni aspekty afrykanskoi chumy svynei [Historical and epizootological aspects of African swine fever]. *Veterynarna medytsyna Ukrainy – Veterinary medicine of Ukraine*, 1 (191), 9-12 [in Ukrainian].
4. Korniienko, L.Ie. (2014). Afrykanska chuma svynei: istorychni aspekty, suchasna epizootychna sytuatsiia v sviti y v Ukraini, imunitet ta perspektyvy vaksynoprofilaktyky [African swine fever: historical aspects, current epizootic situation in the world and in Ukraine and prospects for vaccine immunity]. *Naukovyi visnyk veterynarnoi medytsyny – Scientific Journal of Veterinary Medicine*, Vol. 14 (114), 5-12 [Ukrainian].
5. Korniienko, L.Ie. (2015). Clasicna chuma sviney: istorichni aspekti, suchasna epizootichna situatsiia v sviti ta ukrayini, imunitet i vaksynoprofilaktika [A historical perspective, modern epizootic situation in the world and in Ukraine, immunity and the vaccine of classical swine feve]. *Naukovyi visnyk veterynarnoi medytsyny – Scientific Journal of Veterinary Medicine*, Vol. 2, 5-12 [Ukrainian].
6. Gallardo, C., Reoyo, A.T., Fernández-Pinero, J., Iglesias, I., Muñoz, J., & Arias, L. (2015). African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Management*, 1, 14.
7. Maksimovich, V.V., & Semenov, S.V. (2016). Differentsialnaya diagnostika afrikanskoy chumy sviney [Differential diagnosis o African swine fever]. *Uchenye zapiski UO VGAVM – Scientific notes UO VSAVM*, Vol. 52 (1), 60-67 [in Russian].
8. Grebennikova, T.V., Zaberezhny, A.D., Aliper, T.I., Verkhovsky, O.A. & Nepoklonov, E.A. (2013). Diagnostika afrikanskoj chumy svinej v Rossijskoj Federacii

[Diagnostics of African swine fever in Russian Federation]. *Voprosy virusologii – Virology issues*, 51, 64-79 [in Russian].

9. Nevolko, O.M., Sushko, M.I., Sapachova, M.A., Marushchak, L.V. & Pyatenko, S.O. (2014). Diagnostychni sxemy vykorystannya laboratornyx metodiv pry afrykanskij chumi svynej [Diagnostics schemes of using laboratory methods for African swine fever]. *Veterynarna biotehnologia – Veterinary biotechnology*, Vol. 25, 67-70 [in Ukrainian].

10. Halka, I., Nychyk, S., Sytiuk, M., Peknii, M., Mandygra, M., & Tarasov O. (2014). Principles of environmental biosafety: detection and death from ASF and CSF. *5th Annual Conference of the Biosafety Assotiation for Central Asia & the Caucasus*, 13.

11. Sytjuk, M.P., Kovalenko, G.A., Halka, I.V., Mandygra, S.S., Nychyk, S.A., Mandygra, M.S., et all (2016). Analiz epizootychnoyi sytuaciyi z afrykanskoyi chumy svynej v Ukrayini za 2012–2016 rr. [Epizootic analysis of African swine fever in Ukraine in 2012–2016]. *Veterynarna biotehnologia – Veterinary biotechnology*, Vol. 29, 241-248 [in Ukrainian].

12. Gallardo, C., Reoyo, A. T., Fernández-Pinero, J., Iglesias, I., Muñoz, J., & Arias, L. (2015). African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Management*, 1, 14.

13. Mandygra, S.S., Muzykina, L.M., Ishchenko, L.M., Halka, I.V., Spirydonov, V.G., Sytjuk, M.P., et all (2017) Pidbir prajmeriv ta optymizaciya metodu PLR dlya detekciji DNK virusu AChS. [Selection of primers and optimization of PCR conditions for ASFV DNA detection]. *Veterynarna medycna – Veterinary medicine*, Vol. 103, 304-306 [in Ukrainian].

14. King D.P., Reid S.M., Hutchings G.H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., et all (2003). Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *Journal of Virological Methods*, Vol. 107(1), 53-61.