

Список литературы

- 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, Leptocorionidae) 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-

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

менно вносили на планшет, сенсibiliзований антирабическим глобулином.

Вычисляли коэффициент ингибирования ($K_{инг.}$) связывания конъюгата сывороточными антителами по формуле:

$$K_{инг.} = \frac{A_{492} K^- - A_{492} ОП}{A_{492} K^- - A_{492} K^+} \times 100 \%$$

где: $A_{492} K^-$ – оптическая плотность контрольной отрицательной сыворотки;

$A_{492} K^+$ – оптическая плотность контрольной положительной сыворотки;

$A_{492} ОП$ – оптическая плотность исследуемой сыворотки.

Пробу считали положительной при $K_{инг.}$ более 50% и отрицательной, если величина $K_{инг.}$ менее 50 %.

Кроме того, при титровании сыворотки $K_{инг.}$ вычисляли по формуле:

$$K_{инг.} = \frac{A_{492} K^-}{A_{492} ОП}$$

За титр сыворотки принимали максимальное ее разведение, при котором $K_{инг.}$ равен или более 2,0. Пробу считали положительной, если $K_{инг.}$ равен или более 2,0.

Результаты исследований. С целью частичной очистки и концентрирования, антиген подвергали ультрацентрифугированию при 25 т.об./мин. на ультрацентрифуге Beckman с ротором Тi-60. Осадок ресуспендировали в NTE-буфере, pH 7,5. Вирус очищали в линейном градиенте плотности сахарозы (15-50 %) в течение 120 мин. при 50000 g и 4 °C.

Наличие антигена вируса бешенства контролировали в сэндвич-варианте метода ИФА. Фракция, содержащая гликопротеин, располагалась в зоне 15-20 % плотности сахарозы. Методом электрофореза в 12,5 %-ном ПААГе установлена мол. масса этой фракции, соответствующая 67 кД.

Специфичность гликопротеина была подтверждена методом иммуоблотинга. В результате исследований получен специфический антиген на основе гликопротеина вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, активность которого в ИФА составила 1:2560 ($K_{сн.} = 2,1$), концентрация белка – 338 мкл/мл.

Необходимо отметить, что применение гликопротеина вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ или стандартного вируса бешенства, штамм CVS, в рабочих разведениях не изменял чувствительность иммуоферментного анализа.

Результаты исследований показали, что антирабический пероксидазный конъюгат не реагирует с антителами сывороток крови животных, не вакцинированных против бешенства, иммобилизованными на полистироловом планшете, что свидетельствует о его специфичности. Кроме того, антирабический глобулин также не реагирует с сыворотками различных видов животных, так как после внесения соответствующих к сывороткам антивидовых конъюгатов реакция была отрицательной. В результате исследований разработана блок-иммуоферментная тест-система, включающая следующие компоненты: антирабический глобулин, специфический антиген вируса бешенства; контрольные положительную и отрицательную сыворотки; антирабический пероксидазный конъюгат; концентрат фосфатно-буферного раствора с твином (pH 7,4); карбонатно-бикарбонатный буфер (pH 9,6); фосфатно-цитратный буферный раствор (pH 4,9); орто-фенилендиамин.

В результате исследований установлена возможность определения уровня антител в сыворотках крови собак, кошек, лисиц, крупного рогатого скота, вакцинированных против бешенства в блок-ИФА с применением разработанной тест-системы.

Титры антител в исследуемых сыворотках крови животных варьировали в ИФА от 1:20 до 1:6400 ($K_{инг.} \geq 2,1$). При этом была установлена прямая корреляция результатов блок-ИФА и РН на белых мышах ($r=0,9$; $P<0,05$). Вместе с тем, по чувствительности и скорости получения результатов ИФА (7-8 ч) превосходит РН на мышах (14 сут).

Из результатов титрования сывороток крови плотоядных, вакцинированных против бешенства в блок - ИФА при одновременном внесении и инкубации антигена вируса бешенства, штамм CVS и исследуемых сывороток, предварительно оттитрованных в РН в культуре клеток следует прямая корреляция результатов исследований в блок-ИФА с таковыми в РН в культуре клеток по 22 сывороткам из 25 исследованных. По 3-м сывороткам - слабоположительных в РН установлен отрицательный результат в блок-ИФА, что составило 12,0 % от 25 исследованных сывороток. Коэффициент соответствия результатов в блок-ИФА с таковой в РН в культуре клеток составил 88,0 %.

В результате проведенных исследований разработана Инструкция по применению иммуоферментной тест-системы для определения уровня антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных методом блок-иммуоферментного анализа (блок-ИФА), утвержденная директором ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 21 июля 2010 г.

Выводы. 1. Установлена высокая специфичность иммуоферментной тест-системы с использованием в качестве специфического антигена гликопротеина вируса бешенства и стандартного вируса бешенства, штамм CVS, для определения уровня антител к вирусу бешенства в сыворотках крови вакцинированных против бешенства крупного рогатого скота, собак, кошек и лисиц методом блок-ИФА.

2. Антирабический глобулин и антирабический пероксидазный конъюгат реагируют со специфическими антигенами вируса бешенства и не реагируют с контрольными положительными и отрицательными сыворотками различных видов животных, что свидетельствует об их высокой специфичности.

3. Разработанная иммуоферментная тест-система является универсальной для определения специфических антител в сыворотках крови различных видов животных в блок-ИФА с помощью антирабического глобулина и антирабического пероксидазного конъюгата, так как не требуется наличия антивидовых пероксидазных конъюгатов к каждому виду животного.

Список литературы

1. Авиллов, В.М. Необходим учет новых особенностей эпизоотологии бешенства / В.М.Авиллов, В.А.Седов, С.А.Коломыцев, В.А.Ведерников, П.Н.Пыталев, А.М.Гулюкин, Г.В.Хакин // Ветеринария. – 1998. – № 6. – С. 3-6.
2. Бардина, Н.С. Бешенство в России. Оценка риска. Информационно-аналитический обзор / Н.С. Бардина, М.А.Титов, А.К.Караулов // [и др.]-Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ», 2008. – С.12-28.
3. Ботвинкин, А.Д. Антигенная характеристика полевых штаммов вируса бешенства из различных районов СССР с помощью антинуклеокапсидных моноклональных антител / А.Д.Ботвинкин, М.А.Селимов, Е.В.Клюева, Л.Я.Грибанова, Н.А. Хисматуллина // ЖМЭИ. – 1990. – № 1. – С. 50-54.
4. Гулюкин, М.И. Ситуация уже кризисная / М.И.Гулюкин, В.А.Ведерников // Ветеринарная жизнь. – 2008. – №12. – С. 6-8.
5. Гулюкин, М.И. Оценка эффективности вакцинопрофилактики бешенства с помощью иммуоферментной тест-системы / А.М.Гулюкин, Н.А.Хисма-туллина, А.Н.Чернов и др. //

Биотехнология: экология крупных городов. - Матер. Московской межд. науч.- практич. конф. 15-17 марта. – 2010. – С. 465-466. 6. Иванов, А.В. Эпизоотологический и иммунологический надзор за бешенством /А.В.Иванов, Н.А.Хисматуллина, А.М.Гулюкин // Ветеринарный врач. – Казань, 2010. – № 4 (17). – С. 3-6. 7. Иванов, А.В. Бешенство: этиология, эпизоотология, диагностика / А.В.Иванов, Н.А.Хисматуллина, А.Н.Чернов, А.М.Гулюкин // Учебно-методическое пособие в иллюстрациях. – М.: Колос, 2010. – 54 с. 8. Клюкина, В.И. Иммуноферментная тест-система для определения уровня иммунитета у вакцинированных против бешенства кошек и собак / В.И.Клюкина, П.В.Рахманин, А.В.Проничев // Ветеринария и кормление. – 2008. – № 3. – С. 12-14. 9. Полещук, Е.М. Бешенство в Российской Федерации. Информационно-аналитический бюллетень/ Е.М.Полещук, Г.Н.Сидоров, Д.Г.Сидорова, Н.М. Колычев – Омск, 2009. – 46 с. 10. Хадарцев, О.С. Информационный бюллетень «Бешенство в Российской Федерации в 2000 – 2005 гг.» / О.С.Хадарцев, Ю.М.Федоров, Н.Я.Жилина, Б.Л.Черкасский, А.А.Мовсесянц, Е.А.Котова, А.А.Ясинский, О.Б.Литвинов, Н.А.Яременко, С.С.Яковлев, В.А.Ведерников, И.В.Балдина, А.М.Гулюкин и др. М.: Роспотребнадзор – 2006. – 38 с. 11. Atanasiu, P. Epreuve immunoenzymatique pour la detection rapide des anticorpus antirabiques /P.Atanasiu, V.Savy, P.Perrin// Ann. Microbiol. Inst. Pasteur. – 1977. – V. 128A. – P. 489-498. 12. Nicholson, K.G. Enzyme-linked immunosorbent Assay: A Reaped Reproducible. Test for the Measurement of Rabies Antibody /K.G.Nicholson, H.Prestage// J. Med. Virol. – 1982. – P. 43-49.

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A NOVEL ELISA- BLOCK TEST-SYSTEM TO IMPROVE RABIES VACCINE PREVENTION

Khismatullina N.A., Gulyukin A.M., Sabirova V.V., Gafarova A.Z.

Federal State Non-Profit Organization « Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety » («FCTRBS-ARRVI»), Kazan

Elakov A.L.

Federal State Non-Profit Organization Virology Research Institute named after Ivanovsky D.I., Moscow

To determine specific antibodies in sera taken from various animal species that were previously vaccinated against rabies a novel ELISA- block test-system was developed and evaluated. The test system is based on anti-rabies globuline and anti-rabies peroxidize conjugate and specific antigen titers are suppressed by sera antibodies. The developed ELISA-test-system is universal as it does not require definite peroxidize conjugates specific to each animal species.

УДК 616.98:578.881.1(470.41)

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ И МЕРЫ БОРЬБЫ С ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ И ЛИХОРАДКОЙ ЗАПАДНОГО НИЛА В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН

Хисматуллина Н.А., Каримов М.М., Савицкая Т.А.

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

Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан, г. Казань

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – острая вирусная природно-очаговая болезнь, характеризующаяся лихорадкой, общей интоксикацией, поражением почек и развитием тромбгеморрагического синдрома. В Российской Федерации (РФ) ГЛПС регистрируется более чем в 60 административных территориях. Наибольшее распространение ГЛПС получила в Европейской части России, на Дальнем Востоке, Забайкалье, Восточной Сибири, на Кавказе. В Европейской зоне активные очаги ГЛПС имеются в Республике Башкортостан, Удмуртии, Татарстане, Кировской, Тульской, Самарской и Ульяновской областях. Ежегодно в РФ регистрируется от 4,5 до 10 тысяч случаев заболеваний этой инфекцией [1, 2, 7-9].

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) – острое трансмиссивное вирусное заболевание, характеризующееся лихорадкой, серозным воспалением мозговых оболочек, системным поражением слизистых оболочек, лимфаденопатией и, реже, сыпью. Заболевание широко распространено в Африке и Азии, странах Средиземноморья. Описаны случаи болезни во Франции, Индии и Индонезии. Доказано существование природных очагов заболевания в Армении, Туркмении, Таджикистане, Азербайджане, Казахстане, Молдавии, в областях Украины, а также в Астраханской и Омской областях Российской Федерации. [3-5, 6]. В РФ в 2010 г. заболевание ЛЗН среди населения зарегистрировано в 527 случаях. Переносчиками вируса являются комары, иксодовые и аргасовые клещи, а резервуаром инфекции – птицы и грызуны.

При разработке мер борьбы с ГЛПС и ЛЗН важное значение имеет учет региональных особенностей течения этих заболеваний.

Цель настоящей работы – изучение эпидемиологической ситуации и мер борьбы с ГЛПС и ЛЗН в Республике Татарстан (РТ).

Материалы и методы. Изучение эпизоотологических, эпидемиологических и статистических данных по РТ проводилось с использованием отчетных данных Управления Роспотребнадзора по РТ. Кроме того, изучали специальную доступную и регламентирующую документацию, методические указания, инструкции, рекомендации, а также имеющиеся программные документы по борьбе и ликвидации ГЛПС.

Отлов грызунов в различных географических ландшафтах РТ, определение их видовой принадлежности проводили согласно «Методическим указаниям по отлову, учету и прогнозу численности мелких млекопитающих и птиц в природных очагах зоонозов» (МУ 3.1.1029-01, утв. Минздравом РФ в 2001 г.).

Выявление инфицированных хантавирусами зверьков проводили согласно Методическим рекомендациям «Методы лабораторной диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом» (утвержденным Минздравом РФ 9.07.1982 г.) с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и непрямого метода иммунофлуоресценции, используя коммерческую систему «Хантагност» для определения антигена непрямым методом флуоресцирующих антител (МФА)» (ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН), а также люминесцирующую сыворотку против глобулинов мыши (ЦНИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН).

Результаты исследований. За 1997-2011 гг. эпидемиологическая обстановка по ГЛПС в РТ оценивается как крайне напряженная. За исследуемый период зарегистрировано 21440 случаев ГЛПС. Ежегодно в республике регистрируются летальные исходы от ГЛПС (в среднем летальность составляет 0,8 % от числа заболевших). Смертельные исходы за последние 8 лет произошли в 9 районах и городах Казань и Набережные Челны. Следует отметить, что в целом по РТ отмечается тенденция к росту заболеваемости ГЛПС. Интенсивные показатели по РТ выше, чем в целом по РФ в 2,5-5 раз.

Среди заболевших ГЛПС преобладают городские жители – 62,4 %. Инфицирование городского населения происходит в пригородных зонах, т. е. там, где созданы благоприятные условия для жизнедеятельности грызунов.

Среди больных преобладают мужчины (85 %) трудоспособного возраста (20-49 лет). Экономический ущерб от одного случая заболевания составляет в среднем 3-4 тысячи рублей.