

УДК 619:616.98:578.842.1:616-036.22

НАУКОВИЙ СУПРОВІД МОНІТОРИНГУ АФРИКАНСЬКОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ, ЯК ТРАНСМІСИВНОГО ЗООНОЗУ

Бузун А.І., Стегній Б.Т., Кольчик О.В., Прохорятова О.В., Заремба О.В., Вовк С.І.

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

Онїщенко Н.Г.

Кримська дослідна станція ННЦ «ІЕКВМ», м. Сімферополь

Богач М.В., Гнєсєк О.М.

Одеська дослідна станція ННЦ «ІЕКВМ», м. Одеса

У 2011 році епізоотична ситуація у Східноєвропейському нозоареалі африканської чуми свиней (АЧС) ще більше загострилась. Відбулося його значне розростання через епізоотичне поширення хвороби у північно-західному напрямку від стаціонарно неблагополучних територій Кавказу та Кубані до Ленінградської, Мурманської, Архангельської Нижегородської, Тверської, Курської, Воронізької та Саратовської областей Російської Федерації. Періодично реєструються вторинні епізоотичні спалахи АЧС у стаціонарних осередках хвороби на території країн Кавказу та Кубані. Про винос збудника до дикої природи у новоутворених епізоотичних вогнищах АЧС у Російській Федерації (РФ) свідчить виділення збудника від загиблого дикого кабана з Тверської області (дані МЄБ, 2012). Отже, прогнози щодо високої вірогідності поширення АЧС з країн Кавказу через Південний федеральний округ зі швидкістю 80-100 км на рік на Захід (у бік України) та на Північ від Кавказу, на жаль, поволі справджуються [1, 2]. Епізоотична ситуація розвивається за сценарієм утворення поблизу кордонів України стійкого осередку АЧС на території південних областей і республік РФ та країн Кавказу. Теоретичною засадою протиєпізоотичних заходів у Східноєвропейському нозоареалі АЧС є класичний принцип «виявив – знищив» у сполученні з гіпотезою відсутності загрози утворення стаціонарних природних вогнищ поза межами її африканського нозоареалу [3, 4]. Ця гіпотеза стала «офіційною» ще за радянських часів і укладована ветеринарними службами більшості країн колишнього СРСР [5].

Проте, іспанський досвід ліквідації АЧС на Європейському континенті свідчить про важливу роль заходів проти переносників збудника в оздоровленні свинарства на Іберійському півострові, яке до їх впровадження потерпало від АЧС впродовж півстоліття [6]. На сьогодні взірцем вдалої взаємодії науки, влади й практики стали наполегливі зусилля наукових груп J.Sanchez-Vizcaino, R. Perez-Sanchez, A. Oleaga-Pérez щодо створення та впровадження систем серологічно-акарологічного моніторингу [7, 8] і проти-кліщової вакцинопрофілактики свиней [9]. У комплексі з традиційними заходами щодо ліквідації АЧС ці зусилля дозволили у термін 4-5 років набути для Іспанії статусу вільної від збудника хвороби країни. Переломним у викоріненні АЧС був період 1994 – 1996 років, коли в рамках національної програми з бюджетом € 7,2 млн., за фінансової підтримки ЄЕС (50%), було проведено моніторингові дослідження закліщованого свинопоголів'я та диких кабанів, серологічне виявлення – знищення свиней-вірусоносіїв, що супроводжувалося забомом контактного свинопоголів'я, в комплексі з дезакаризацією-дезінфекцією заражених та закліщованих об'єктів і територій. У грудні 1995 року Іспанія вже офіційно задекларувала оздоровлення свинарства країни від АЧС, а в кінці 1990-х стала другим за потужністю виробником свинини у Єврозоні, з загальним поголів'ям біля 22,5 млн. свиней, з яких 2,5 млн. свиней – племінного спрямування.

Отже моніторинг АЧС обов'язково має засновуватися на засадах арбовірусології – тобто, враховувати трансмісивність цієї хвороби. Тому метою нашої роботи було проведення аналізу ситуації у Східноєвропейському нозоареалі АЧС з огляду трансмісивності цієї хвороби та обґрунтування шляхів створення бюджетозберігаючої схеми її моніторингу у комплексі з небезпечними хворобами свиней, на фоні яких може циркулювати її збудник (схеми комплексного моніторингу).

Матеріали та методи. Використовували діагностичними африканської чуми свиней («цитоплазматичний» антиген вірусу АЧС, референтні сироватки АЧС, позитивна і негативна, для ELISA, референтні тест-смужки для імуноблотингу при АЧС) виробництва Референс-центру МЄБ по АЧС при Інституті захисту тварин (CISA-INIA, Іспанія) з протоколами стандартних процедур їх використання. Референтні антигени вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (PPCC) та хвороби Ауескі (ХА), референтні сироватки проти вірусу класичної чуми свиней (КЧС), позитивна і негативна, референтні сироватки ХА, позитивна і негативна, були люб'язно надані Референс-центром МЄБ-ФАО з КЧС, PPCC та ХА при Національному центрі Польщі з ветеринарних досліджень (PiWet, м. Пулаві). Комерційні набори діагностиків для реакції пасивної гемаглютинації та імуноферментного аналізу при ХА та PPCC виробництва НВО «Нарвак» (Російська Федерація) та «IDEXX» (США) було придбано у комерційній мережі і застосовано відповідно до настанов щодо їх використання. Для отримання попередніх результатів використовували експериментальні еритроцитарні діагностичні набори PPCC та ХА власного виготовлення (1% фіксовані еритроцити 1-добових курчат, сенсibiliзовані відповідними антигенами). Комерційний імунопероксидазний кон'югат «протеїн А – пероксидаза» виробництва Інституту мікробіології та епідеміології ім. М.Ф. Гамалія (Російська Федерація) використовували у робочому розведенні 1:20, а також Національного наукового центру Іспанії з захисту тварин (CISA-INIA, м. Мадрид) – у робочому розведенні 1:30, згідно з настановами щодо їх використання.

Результати досліджень та їх обговорення. 1. Особливості розвитку епізоотичної ситуації у Східноєвропейському нозоареалі АЧС з огляду її моніторингу, як трансмісивної інфекції. Літературні джерела з епізоотичної ситуації щодо АЧС у її Східноєвропейському нозоареалі свідчать, що попри жорсткі умови карантинування неблагополучних свиногосподарств у відповідності з чинними інструктивними вимогами (знищення заражених свиней; спалювання їх трупів разом з будівлями, де утримувалися свині, з наступним експонуванням впродовж не менше 80 діб), спостерігалися ознаки вносу збудника АЧС у місцеві популяції дикого кабана на території країн Кавказу і в Російській Федерації [10]. Отже, навіть жорсткі протиєпізоотичні заходи, передбачені чинними на території країн колишнього СРСР інструкціями, не зупиняють обігу збудника між популяціями свійських свиней та диких кабанів у місці спалаху АЧС.

У той же час у доступних нам джерелах ми не знайшли посилення на проведенні у вогнищах АЧС на території РФ спеціальних заходів щодо знищення членистоногих – кровосисних комах, які, як відомо, здатні забезпечити винос збудника з ураженої популяції свійських свиней в абригенну популяцію диких кабанів (і навпаки) [11]. На противагу, у Вірменії, за даними МЄБ, ліквідацію вогнищ АЧС проводять із застосуванням дезакаризаційних заходів: більше того, у звідних даних WAHID вони позиціоновані як найголовніші протиєпізоотичні заходи – на першому місці [12]. Тож порівняльні дані щодо динаміки епізоотичної ситуації у цих двох регіонах Східноєвропейського нозоареалу становлять особливий інтерес у контексті наших досліджень.

У таблиці 1 зіставлені статистичні дані щодо сезонної динаміки спалахів АЧС у Краснодарському краї РФ у 2009-2011 рр., узяті з офіційного джерела «Россельхознадзора» [13], та у 4-х марзах (регіонах) Республіки Вірменія (РА), взятих з журналу реєстрації облікових хвороб МЕБ через інтерфейс WANID [14]. Розрахунок вірогідності впливу активності членистоногих на епізоотичну ситуацію з АЧС проводили за статистичними даними спалахів АЧС на Кубані у період з березня по жовтень включно, а спалахів АЧС в регіонах Вірменії – у період з лютого по листопад включно, які співпадають з періодом високої активності в цих регіонах Східноєвропейського нозоареалу кліщів та кровосисних комах. Обчислення проводили мультиваріаційним статистичним методом (пакет програм EpiInfo-2000), приймаючи за (Д+Е+) місяці теплої пори року, коли спалахи відбувалися, а за (Д-Е+) – місяці теплої пори року, коли спалахів не було, за (Д+Е-) – місяці холодної пори року, коли спалахи відбувалися, а за (Д-Е-) – місяці холодної пори року, коли спалахів не було.

Таблиця 1 – Розрахунок вірогідності впливу чинника, пов'язаного з трансмісивністю АЧС (період активності кровосисних членистоногих), на епізоотичний процес у двох регіонах Східноєвропейського нозоареалу хвороби

№ з/п	Регіон Східноєвропейського нозоареалу АЧС	Рік	Захворюваність на АЧС за місяцями												Вірогідність впливу трансмісії (OR _{TP})
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	
1	Краснодарський край РФ ¹⁾	2009	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	75,0	0,00 (P≤0,02)
2		2010	5,3	21,1	10,5	0,0	0,0	15,8	0,0	10,5	5,3	5,3	10,5	15,8	0,00 (P≤0,16)
3		2011	6,7	0,0	13,3	0,0	6,7	6,7	13,3	6,7	13,3	33,3	0,0	0,0	21,00 (P≤0,03)
4	Тавушський, Лорійський, Вайоц Дзорський та Сюникський марзи РА ²⁾	2007	0	0	0	0	0	0	0	5	9	8	14	4	0,67 (P≤0,79)
5		2008	4	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,43 (P≤0,58)
6		2009	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–
7		2010	0	7	5	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0,67 (P≤0,79)
8		2011	5	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25 (P≤0,37)

Пояснення ¹⁾- індекси захворюваності; ²⁾- кількість спалахів; - сезон активності кровосисних членистоногих

З обчислень видно, що у 2011 році вірогідність впливу трансмісивності збудника на спалахи АЧС серед свійських свиней на Кубані, де ліквідація вогнищ хвороби проводилася без спеціальних дезакризаційних та дезінсекційних заходів, у 21 раз перевищувала цей показник у 2009 (період первинного заносу) та у 2010 роках (рік виносу та укорінення збудника в популяціях диких кабанів). Іншими словами, існує дуже щільна залежність між формуванням на Кубані стаціонарних вогнищ АЧС на 3-й рік після її заносу й активністю кровосисних членистоногих. У той же час у Вірменії, де контролювання членистоногих задекларовано в якості провідного протиепізоотичного заходу, епізоотична ситуація розвивається за дещо іншим сценарієм: можливо на її розвиток значно більше, ніж на Кубані, впливає інтенсивність контактів свійських та диких свиней, як побічний ефект своєрідної системи свинарства у цьому регіоні [15].

Дані таблиці 1 можна трактувати як тенденцію розвитку епізоотичного процесу АЧС у напрямку утворення стаціонарних епізоотичних осередків за вірогідної участі членистоногих – біологічних та механічних переносників збудника хвороби. Отже, роль механічної та біологічної трансмісії збудника АЧС в Східноєвропейському нозоареалі хвороби, на нашу думку, явно недооцінюється при проведенні протиепізоотичних заходів. Це дає підстави включати кровосисних членистоногих, принаймні на прикордонних територіях України, у перелік об'єктів моніторингу АЧС, як мінімум на період карантинування свиного господарств близького зарубіжжя.

На нашу думку, періодичність активізації епізоотичного процесу АЧС на стаціонарно неблагополучних територіях Східноєвропейського нозоареалу, який зараз бурхливо розвивається, може бути пов'язана не лише з біологією членистоногих переносників збудника цієї хвороби. Нещодавно отримано дані щодо несподівано близької генетичної спорідненості її збудника з новим різновидом вірусів – гірусами амєб [16]. З часів І.І. Мечникова амєби та деякі інші *Protozoa* вважаються еволюційними попередниками макрофагів ссавців, а тому можуть виконувати роль не лише природного резервуара, але й біологічного господаря збудників, що «тренує» їх долати бар'єрну функцію макрофагів, зокрема у свиней. Проте найпростіші ще ніколи не вивчалися на предмет взаємодії зі збудником АЧС, який є класичним інфекційним агентом з надзвичайною руйнівною активністю щодо системи клітинного імунітету та макрофагів свині [17]. Філогенетична близькість збудника АЧС з гірусами амєб та наведені зауваження становлять певне наукове підґрунтя й надають актуальності моніторинговим дослідженням участі найпростіших у формуванні Східноєвропейського нозоареалу АЧС.

2. Методичні засади моніторингу АЧС, як трансмісивної інфекції. В іспанському (CISA-INIA) практикумі з сучасних методів ідентифікації збудника АЧС не було жодної проби об'єктів ветнагляду, крім проб від свиней – зразків польових та лабораторних матеріалів з Іспанії, країн Африки та Вірменії. Але їхня характеристика і отримані результати досліджень можуть мати певну користь для удосконалення моніторингу АЧС, як трансмісивної інфекції. З таблиці 2 видно, що молекулярно-біологічними методами («класичним», «мультиплексним» та «real-time» методами ПЛР) збудника не виявлено у пробах з гемадсорбуючою активністю вірусу АЧС 3,0 IgGAdO₅₀ ³⁾ (проби сироваток крові свиней № 2 і 4). Генетичний матеріал збудника впевнено виявлявся лише у зразках з гемадсорбуючою активністю не менше 4,0 IgGAdO. За літературними даними у 4,0 Ig гемадсорбуючих доз – не менше 6,0 Ig летальних (для свині) доз. Природним шляхом такі концентрації збудника накопичуються лише у тканинах-мішенях свійських свиней (коса, лімфовузли, легені, кістковий мозок), що загинули від, переважно, гострої форми хвороби. У зразках від свійських свиней з підгострою чи хронічною формою хвороби, від дикої фауни (кабани, кліщі) та з харчових відходів концентрації вірусу є на 2-4 порядки нижче. Крім того, одна з 14 досліджених проб містила негемадсорбуючий вірус, що за літературними даними є типовим для кліщових ізолятів збудника. Це свідчить про користь ПЛР для моніторингу АЧС, як трансмісивної хвороби, що викликається як гемадсорбуючими, так

Таблиця 2 – Результати випробувань референтних зразків клінічного та патологічного матеріалів при АЧС та КЧС, проведених фахівцями ННЦ «ІЕКВМ» під час тренінгу у Науковому Центрі Євросоюзу з АЧС (Іспанія)

Референтні зразки наукового центру Євросоюзу з АЧС	Методи випробувань (див. пояснення)						Лабораторний діагноз ¹⁾
	К-ПЛР на АЧС	М-ПЛР на АЧС \ КЧС	Р-ПЛР на АЧС \ КЧС	МЕБ-ELISA на АЧС	Ingelasa-ELISA на АЧС	ІБ на АЧС	
С-ки 1, 3 (АЧС-КЧС негативні)	0	0\0	0\0	0	0	0	Зразки є негативними на АЧС
С-ка 2 (гостра форма АЧС, ~3 Іg ГАДО, Африка-2004))	+	0\0	0\0	0	0	0	Зразок є позитивним на АЧС
С-ка 4 (підгостра форма АЧС, ~3 Іg ГАДО, Африка-2004)	0	0\0	0\0	+	+	+	Зразок є позитивним на АЧС
С-ка 5 (підгостра форма АЧС, ~5 Іg ГАДО, Армения-2008)	+	0\0	0\0	+	0	+	Зразок є позитивним на АЧС
С-ки 6, 7 (підгостра форма АЧС, ~12 та 7 Іg ГАДО, відповідно)	+	+10	22.98; 23.95\0	+	+	+	Зразки є позитивними на АЧС
С-ка 8, 12 (підгостра форма КЧС)	0	0\+	0 \ 25.90; 28.03	0	0	0	Зразок є позитивним на КЧС
С-ка 17 (суміш с-ток від свиней, хворих на підгострі форми АЧС та КЧС)	+	+1+	25.77\31.62	+	+	+	Зразок є позитивним на АЧС та КЧС
Тканини здорової свині 1	0	0\0	0\0	0	0	0	Зразок є негативним на АЧС
Тканини хворої на АЧС свині 2 (гостра форма АЧС, ~8 Іg ГАДО)	+	+10	21.29\0	0	0	0	Зразок є позитивним на АЧС
Тканини хворої на АЧС свині 3 (підгостра форма АЧС, ~6 Іg ГАДО)	+	+10	17.10\0	+	0	+	Зразок є позитивним на АЧС, вірус гемадсорбуючий
Тканини хворої на АЧС свині 4 (гостра форма АЧС, 0 Іg ГАДО)	+	+10	23.02\0	0	0	0	Зразок є позитивним на АЧС, вірус не гемадсорбуючий

Пояснення: К-ПЛР, конвенційний варіант полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на АЧС; М-ПЛР, мультиплексний варіант ПЛР на АЧС та КЧС; Р-ПЛР – мультиплексний варіант ПЛР на АЧС та КЧС з обліком у реальному часі; МЕБ-ELISA, варіант ELISA з використанням «ін-хауз» набору Наукового Центру Євросоюзу з АЧС; Ingelasa -ELISA, варіант ELISA з використанням комерційного набору фірми Ingelasa (Іспанія), який широко застосовується у Євросоюзі та у Африці для серомоніторингу АЧС.

¹⁾ – для випадків з позитивним заключним діагнозом у осередку АЧС, для постановки заключного діагнозу у первинному осередку АЧС обов'язковим є підручування вірусу у біологічних системах.

і негемадсорбуючими варіантами збудника. Проте практичну значимість цього методичного підходу зменшує замалий поріг його чутливості – не менше 5,0 Іg летальних (для свині) доз. За даними літератури у пробах кліщів такі концентрації вірусу можуть накопичуватися лише за умови дуже активної репродукції в них збудника, тобто у їх поодиноких екземплярах [18]. Отже, отримані результати тренінгу засвідчують необхідність використання методу «підрошування вірусу» у чутливих біологічних системах для забезпечення моніторингу АЧС, як трансмісивної хвороби.

Це узгоджується з рекомендаціями РАСХН (Москва, 2000) щодо індикації збудника АЧС в об'єктах довкілля. Тому для забезпечення цієї технічної вимоги в лабораторії вивчення хвороб свиней ННЦ «ІЕКВМ» відпрацьовано методику вирощування первинної культури клітин лейкоцитів свині та постановки реакції гемадсорбції з 0,5-0,7 % еритроцитами свині. Цим методом досліджено 5 проб паренхіматозних органів підсвинків з приватного сектору Сумської та Харківської областей, які загинули з ознаками геморагічної гарячки. Вірусу АЧС не виявлено (встановлено присутність в них патогенних пастерел та сальмонел, відповідно).

З результатів тренінгу, узагальнених у таблиці 2, можна зроби ще кілька висновків, обов'язкових для врахування у моніторингу АЧС. По-перше, необхідно взяти до уваги, що проби сироваток крові хворих на АЧС свиней містять інфекційно активний вірус (сироватки №№ 2, 4-7, 17). Це є прямою вказівкою на необхідність дотримання відповідних вимог біобезпеки при пробовідборі та проведенні серологічних досліджень на АЧС. З цього приводу ми у подальшій роботі наслідували принцип щонайскорішої після взяття чи отримання термоінактивації проб сироваток крові (у водяній бані за температури 60 °С впродовж не менше 30 хвилин).

Крім того, дані тренінгу показали присутність у пробах паренхіматозних органів хворих свиней та свиней, що загинули, вірусоспецифічних антитіл (проба тканин хворої свині № 3). Ця обставина має націлювати нас на використання в арсеналі методів дослідження патологічного матеріалу не лише вірусологічних, але й серологічних тестів. Більше того, це вказує на перспективність використання для серологічного моніторингу АЧС не лише проб крові, але й проб так званого «м'ясного соку», які прийнято виготовляти з м'язів діафрагми і які можна відібрати значно легше від диких кабанів та туш свиней, ніж проби крові.

Результати тренінгу також показали необхідність включення в арсенал моніторингових методів як *скринінгових* тест-систем, так і обов'язкового використання *підтверджуючого* тесту. Фахівцями CISA-INIA розроблено і на рівні МЕБ впроваджено низку таких тест-систем на основі методу ELISA, а також підтверджуючий тест на основі імуноблотингу. Останній розроблено з використанням електрофоретичних реплік цитоплазматичних (але не структурних!) вірусних антигенів, антитіла проти яких виробляються лише у відповідь на збудник, що розмножується в організмі тварини (VIA-технологія). Це дуже обміркований і виважений методичний підхід, який, на нашу думку, необхідно наслідувати у вітчизняних схемах та тест-системах моніторингу АЧС.

Насамкінець, покажемо і важливим для врахування у будь-яких системах моніторингу АЧС було використання у рамках тренінгу біологічного матеріалу від свиней, хворих на мікст-інфекцію АЧС та класичної чуми (сироватка №17). У перебігу тренінгу з'ясовано, що іспанські фахівці важливе значення приділяють дослідженню мікст-інфекцій АЧС. Не диференціацію від інших хвороб, а саме діагностику змішаних вірусних та вірусно-бактеріальних інфекцій АЧС, з огляду на високий рівень поширення у ензоотичних осередках та на перших фазах епізоотичного спалаху цієї хвороби різноманітних за клінічною картиною та етіологією інфекцій свиней, серед збудників яких виявляється і вірус АЧС. Отже методологія моніторингу АЧС має націлювати фахівців на виявлення ознак присутності вірусу в об'єктах ветнагляду, запідозрених у зараженні чи забрудненні вірусом, за генетичними, інфекційними чи антигенними маркерами збудника, зокрема і за присутністю в пробах вірусспецифічних антитіл. Для отримання вірогідних результатів моніторингу АЧС її необхідно виключати незалежно від результатів лабораторної діагностики інших інфекційних хвороб свиней. Безумовно, що такий підхід у разі збільшує необхідність дослідження різноманітних проб – тому і виникла потреба у розробці скринінгових та підтверджуючого тестів.

З цієї причини ми провели низку досліджень щодо створення універсальної методичної бази моніторингу особливо небезпечних хвороб свиней, яка б максимально враховувала висвітлені вище вимоги і мала б матеріально-технічні характеристики, адекватні поточним економічним реаліям.

3. Розроблення універсальної методичної бази моніторингу особливо небезпечних інфекцій свиней. За результатами експертних досліджень, у підшефних свиногосподарствах визначено, що зі збудників найбільш небезпечних захворювань у вітчизняному свинарстві поширені віруси репродуктивно-респіраторного синдрому (PPCC), цирковірусної інфекції (ЦВІС) та хвороби Ауескі (ХА), а також бактерії клостридіозу, пастерельозу і бешихи, на фоні циркуляції яких з найбільшою вірогідністю може проявитися АЧС у випадку первинного заносу її збудника на територію України. За даними доступних публікацій, з інфекційної захворюваності на території Східноєвропейського нозоареалу АЧС нозологічний профіль свинарства дещо відрізняється – там більш поширені збудники класичної чуми (КЧС), лептоспірозу і сальмонельозу, у суміші з якими може циркулювати вірус АЧС. Виходячи з цього, на першому етапі універсальну импорт-заміщуючу та бюджетозберігаючу методичну базу моніторингу розробляли на моделях збудників PPCC та ХА.

На рис. 1 наведено попередні результати валідації реакції пасивної гемаглютинації (РПГА) на основі антигенних еритроцитарних діагностиків зазначених вірусів, яку розроблено у якості скринінгового польового тесту. Можна бачити, що коефіцієнт кореляції результатів між РПГА та ELISA при паралельному дослідженні панелей сироваток, позитивних на антитіла проти вірусу PPCC склав $R_{PPCC} = 0,69$ ($n=11$, $P \leq 0,01$), а позитивних на антитіла проти вірусу ХА – становив $R_{XA} = 0,84$; ($P \leq 0,01$; $n = 11$). За нашими підрахунками собівартість використання РПГА для моніторингу PPCC і ХА у 20 та 50 разів, відповідно, нижче у порівнянні з ELISA (за показниками комерційної вартості наборів, технологічного обладнання, оплати праці кваліфікованого персоналу тощо). При цьому чутливість, специфічність та продуктивність РПГА приблизно однакова з методом ELISA, але відтворюваність результатів РПГА у порівнянні з ELISA на 10-15% нижче (не показано). Цей недолік, на нашу думку, можна виправити за рахунок впровадження досліджуваних проб у 2-3-ьох повторях, а також шляхом перевірки підтверджуючим тестом на 15-20 % більшого, ніж при ELISA, обсягу проб після їх скринінгу в РПГА. Основним призначенням РПГА в серологічних дослідженнях при АЧС буде аналіз закліщованості свинопоглів'я на основі використання еритроцитарного діагностиків проти кліщових антитіл. Низька собівартість процедури виявлення антитіл цим методом робить його придатним для використання у малобюджетних програмах масових досліджень (скринінгу) сироваток крові свиней. Простота ж і швидкість виконання тесту віддавна зробила його привабливим для застосування для експрес-діагностики.

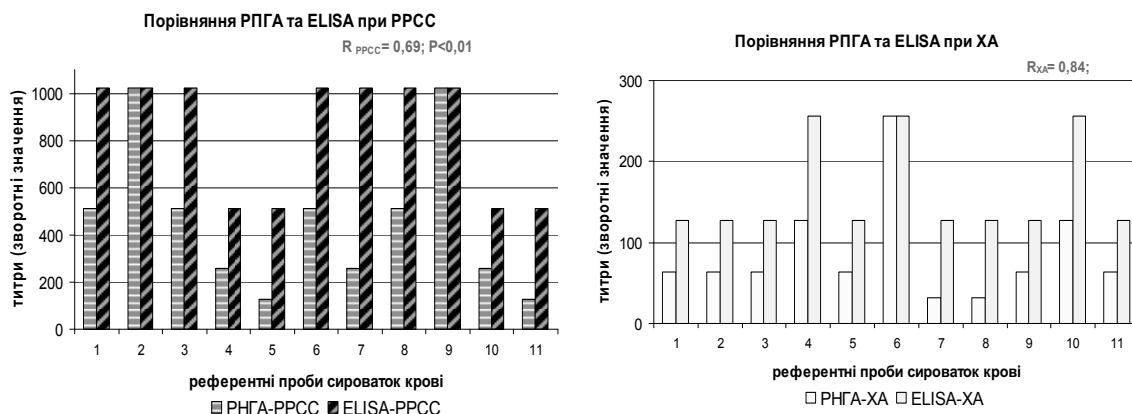


Рис. 1 Результати вивчення кореляції титрів референтних проб сироваток проти вірусів PPCC (а) і ХА (б) в реакції пасивної гемаглютинації (РПГА) та в ELISA

За основу розроблення підтверджуючого тесту було обрано імунопероксидазний метод (ІПМ) з використанням поліклональних вірусспецифічних сироваток миші (в перспективі – моноклональних антитіл) та відповідного імунопероксидазного кон'югату. Цей метод виявився придатним для виявлення віруснейтралізуючих антитіл проти збудників PPCC та ХА в культурах клітин, вирощених як на слайдах у пробірках, так і в планшетах. Отримані результати узгоджуються з даними літератури [20] і разом з даними про високий діагностичний потенціал ІПМ при АЧС [21] свідчать про відповідність цього методу вимогам до підтверджуючих тестів у контексті розроблення бюджетозберігаючої системи моніторингу.

4. Апробація окремих елементів комплексної системи моніторингу особливо небезпечних інфекцій свиней. Експертні дослідження в підшефних свиногосподарствах обов'язково супроводжувалися відпрацюванням елементів комплексної системи моніторингу – апробація методики тварин-сентинелів АЧС, виявлення антитіл проти вірусу АЧС за допомогою діагностикумів, наданих в ННЦ «ІЕКВМ» дирекцією СІСА-ІНІА, а антитіл проти вірусів PPCC та ХА за допомогою власних діагностикумів та процедур, розроблених як викладено вище (РПГА, як скринінговий тест, ІПМ, як підтверджуючий тест). Проби сироваток крові перед транспортуванням з регіональних дослідних станцій ННЦ «ІЕКВМ» з огляду біобезпеки розбавляли стерильним фізрозчином 1:5-1:10 і прогрівали при 60 °С впродовж 30 хвилин. У перебігу відпрацювання методики тварин-сентинелів розроблено перелік об'єктів пробовідбору від груп свиней, які у господарстві мають найбільший ризик зараження АЧС: 1- ремонтні тварини на карантинних майданчиках; 2- групи, що обслуговуються операторами з власним присадибним свиногосподарством; 3- групи вільного утримання свиней (на вигульних майданчиках, тощо), з доступом їх до об'єктів доквілля; 4- присадибні свині операторів товарних господарств.

У 2011 році досліджено 338 зразків сироваток крові свиней (n= 322) та диких кабанів (n= 16) на присутність антитіл проти збудників PPCC, АЧС та ХА (таблиця 3). Позитивними на PPCC виявилось 49 проб (14,5 %) з 4-х областей України (у дикого кабана не виявлено), а на ХА – 73 проб (22,7 %) з 9 областей України (з них позитивних проб дикого кабана – 7 або 43,8 %). Всі досліджені на АЧС проби сироваток крові (n= 71) з 9 областей України (100 %) були негативними на антитіла проти АЧС.

Таблиця 3 – Результати серологічного моніторингу АЧС, PPCC та ХА у 9 регіонах України

№ з/п	Області	АЧС			PPCC			ХА		
		Всього		Поз. (всього/ диких)	Всього		Поз. (всього/ диких)	Всього		Поз. (всього/ диких)
		госп.	Проб (всього/ від диких)		госп.	Проб (всього/ від диких)		госп.	Проб (всього/ від диких)	
1	Харківська	8	11(4)	0	8	34 (4)	7 (0)	8	34 (4)	9(2)
2	Сумська	4	10(1)	0	4	51 (1)	16 (0)	4	51 (1)	4(1)
3	Дніпропетров-ська	7	10(1)	0	7	22 (2)	0	7	22 (2)	10(1)
4	Донецька	4	10(2)	0	4	47 (2)	6 (0)	4	47 (2)	18(1)
5	Кіровоградська	5	6(3)	0	5	36 (3)	0	5	36 (3)	6(2)
6	Херсонська	7	5(0)	0	7	26 (0)	13 (0)	7	26 (0)	7
7	Запорізька	2	3(2)	0	2	38 (2)	13 (0)	2	38 (2)	5(0)
8	Одеська	4	6(0)	0	4	37 (0)	0	4	37 (0)	6(0)
9	АР Крим	8	10(2)	0	8	47 (2)	0	8	47 (2)	8 (0)
10	Всього	52	71 (16)	0	52	338 (16)	49 (0)	52	338 (16)	73 (7)

Отримані результати та відпрацьовані у перебігу вище зазначених досліджень технологічні параметри закладено у відповідну довідково-нормативну документацію з моніторингу.

Висновки.

1. Сучасна система моніторингу АЧС у її Східноєвропейському нозоареалі є недосконалою з огляду контролювання трансмісивності цієї особливо небезпечної хвороби.

2. Розпочаті в ННЦ «ІЕКВМ» дослідження щодо удосконалення моніторингу у напрямку його комплексності, зниження собівартості, з урахуванням трансмісивності АЧС засвідчили придатність реакції пасивної гемаглютинації (РПГА), як скринінгового, а імунопероксидазного методу, як підтверджуючого тесту комплексного серомоніторингу особливо небезпечних хвороб свиней.

3. Коефіцієнт кореляції результатів РПГА та ELISA при ХА становив $R_{XA} = 0,84$ ($P < 0,01$; $n = 11$), а при РРСС - $R_{PPCC} = 0,69$ ($P < 0,01$; $n = 11$), що дає змогу використовувати РПГА як альтернативу методу ELISA для реалізації малобюджетних програм моніторингу особливо небезпечних хвороб свиней.

Список літератури

1. Куриннов, В. В. Диагностика и мониторинг при вспышках африканской чумы свиней в Республиках Кавказа в 2007-2008 гг. [Текст] / В. В. Куриннов [и др.] // Ветеринария - 2008. - N 10. - С. 20-25. - Библиогр.: с. 25 (5 назв.).
2. Анализ риска заноса и распространения африканской чумы свиней http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/publications/iac_public1.pdf.
3. Гаврюшкин, Д.А., Макаров В.В. Африканская чума свиней в России и эпизоотологический риск для региона. Ветеринарная патология. - 2010. - № 2. - С. 88-97.
4. Макаров, В.В., Сухарев О.И., Литвинов О.Б. Система «клещи рода Ornithodoros- вирус африканской чумы свиней»: биоэкология, вирусология, эпизоотология. Ветеринарная патология, -2011.-№ 3, с. 18-29.
5. Вишняков, И.Ф. Руководство по индикации возбудителей особо опасных болезней сельскохозяйственных животных в объектах ветнадзора и окружающей среды [Текст] / Лагуткин Н.А., Смирнов В.Н., Бузун А.И. [и др.] // Российская академия сельскохозяйственных наук, Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, М.-2000.-С. 32 - 38.
6. Marisa Arias, Josй Manuel Sбnchez-Vizcaino African swine fever eradication: The Spanish model. Аналітичні матеріали Національного наукового центру Іспанії «CISA-INIA», Valdeolomros.-2010, - 13 p.
7. Canals, A, Oleaga, A, Pйrez, R, et al. 1990. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific antibodies in pigs infested with the tick Ornithodoros erraticus (Argasidae). Vet Parasit 37:145-153.
8. Baranda, JA, Pйrez-Sбnchez, R, Oleaga-Pйrez, A, Encinas-Grandes A. Antigens of interest for the diagnosis of parasitism in pigs by Ornithodoros erraticus and Ornithodoros moubata. J Parasitol. 1997 Oct;83(5):831-8.
9. Astigarraga, A, Oleaga-Pйrez, A, Pйrez-Sбnchez, R, Encinas-Grandes, A. A study of the vaccinal value of various extracts of concealed antigens and salivary gland extracts against Ornithodoros erraticus and Ornithodoros moubata. Vet Parasitol. 1995 Nov;60(1-2):133-47.
10. Саркисян, Х. В., Григорян, Г. В. Вспышка африканской чумы свиней в Республике Армении: Ретроспективный анализ причин расширения зооареала // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов. Материалы международной научно практической конференции, посвященной 40-летию института 9-10 декабря, - Щелково 2009, С. 333-343.
11. http://web.oie.int/wahis/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=11168.
12. http://web.oie.int/wahis/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=11075.
13. Власов, Н.А. Эпизоотическая ситуация по африканской чуме свиней в Российской Федерации. Россельхознадзор, официальная презентация от 27-12-2011, <http://www.fsvps.ru/fsvps/iac>, слайд №7.
14. http://web.oie.int/wahis/public.php?page=weekly_report_index&admin=0.
15. Маркосян Т. А., Саркисян Х. В., Григорян Г. В., Элбакян А. Л. Эпизоотическая ситуация по африканской чуме свиней в Армении за 2007-2010гг. // Ветеринарная медицина 95. Межведомственный тематический научный сборник. - Харьков, -2011. С. 35-37.
16. Ogata, H, Toyoda, K, Tomaru, Y, Nakayama, N, Shirai, Y, Claverie, JM, Nagasaki, K. Remarkable sequence similarity between the dinoflagellate-infecting marine girus and the terrestrial pathogen African swine fever virus. Virol J. 2009 Oct 27;6:178.
17. Dixon, LK, Abrams, CC, Bowick, G, Goatley, LC, Kay-Jackson, PC, Chapman, D, Liverani, E, Nix R, Silk R, Zhang F. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. Vet Immunol Immunopathol. 2004 Aug;100(3-4):117-34. Review.
18. Rennie, L, Wilkinson, PJ, Mellor, PS. Effects of infection of the tick Ornithodoros moubata with African swine fever virus. Med Vet Entomol. 2000 Dec;14(4):355-60.
19. Haffer, K, Gustafson, DP, Kanitz, CL. Indirect hemagglutination test for pseudorabies antibody detection in swine. J Clin Microbiol. 1980 Mar;11(3):217-9.
20. Nodelijk, G. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis. A review. Vet Q. 2002 Jun;24(2):95-100. Review.
21. Wensvoort, G, Terpstra, C, Bloemraad, M. Detection of antibodies against African swine fever virus using infected monolayers and monoclonal antibodies. Vet Rec. 1988 May 28;122(22):536-9.

SCIENTIFIC SUPPORT OF AFRICAN SWINE FEVER MONITORING AS TRANSMISSIBLE ZONOSIS

Buzun A.I., Stegnyy B.T., Kol'chik O.V., Prokhoryatova O.V., Zaremba O.V., Vovk S.I.

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

Onischenko N.G.

Crimean Research Station NSC «IECVM», Simferopol'

Bogach M.V., Gnisyuk O.M.

Odessa Research Station NSC «IECVM», Odessa

The paper analyzes the problems and initial results of the development of budget-saving system of complex monitoring of African swine fever (ASF) as a transmissible disease. On the example of Aujeszky's disease and reproductive-respiratory syndrome on a background of which the ASF virus ACHS may circulate, passive hemagglutination reaction was tested as screening test and immunoperoxidase method as a confirmatory test of complex monitoring of especially dangerous diseases of pigs.

УДК 578:636:616.9:595.771

МОНІТОРИНГ БЛУТАНГУ В СВІТІ ТА УКРАЇНІ

Влізлю В.В., Загребельний В.О., Олійник А.В., Неволько О.М.

Інститут біології тварин НААН, м. Львів

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної медицини, м. Київ

Блутанг (синій язик) – це інфекційне вірусне захворювання жуйних тварин, збудник якого проникає в організм через шкіру під час укусів комах, характеризується ураженням слизових оболонок, язика, шкіри, копит [1]. Збудник блутангу – це РНК-вірус, родини *Reoviridae*, роду *Orbivirus*, що має антигенну варіабельність. Відомо 24 штами вірусу, з них найбільш поширений у Центральній Європі – штамп 8. Крім штаму вірусу 8 з 2008 по 2011 роки в Європі зареєстровано випадки інфікування штамми 6, 1, 4 та 16 [2].

Прямого зараження між тваринами не відбувається. Переносниками вірусу є комахи роду *Culicoides*. Інфікування тварин відбувається через укуси цих комах, які присутні в смузі між 53° північної та 34° південної географічних широт. Однак лише 20 із майже 1400 видів *Culicoides* можуть виступати векторами для вірусу блутангу. У Північній та Центральній Європі основним вектором є вид *C. obsoletus*, на Близькому Сході та в Африці – *C. imicola*, у США – *C. variipennis sonorensis*, в Австралії – *C. brevitarsis* [4].