

ПОШИРЕННЯ ТА МОЛЕКУЛЯРНА-ГЕНЕТИЧНА ДІАГНОСТИКА ЧУМИ М'ЯСОЇДНИХ У СОБАК

Головко О.А., аспірантка*

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів

В статті наведена клініко-епізоотична характеристика чуми м'ясоїдних у м. Києві. Підібрано олігонуклеотидну послідовність пари праймерів CDV_F5 AGGAGCAAGTTTGGATTCTGAGG та CDV_R6 GACACTAGCTGAGCCTCTTCC, що лягли в основу створення діагностичної системи ПЛР. Вивчено її чутливість та специфічність, а також одночасно проведено дослідження із іншими комерційними тест-системами.

Ключові слова: чума м'ясоїдних, полімеразна ланцюгова реакція, чутливість, специфічність.

Відомо, що одну з ведучих ролей в інфекційній патології м'ясоїдних, зокрема у собак, займає чума м'ясоїдних. У природних умовах до чуми найбільш сприйнятливі собаки, лисиці, норки, єноти, стійкіші - песці, вовки, шакали, койоти, леопарди, рисі, леви, гієни, ведмеді, борсуки, ласки, видри, куниці, тхори. Захворювання можливе в будь-якому віці, однак частіше хворіють молоді тварини - собаки віком від 2 міс до 1 року, хутрові звірі - до 5-місячного віку. Резервуаром вірусу чуми м'ясоїдних у природі є дикі м'ясоїдні тварини та бродячі собаки. Джерелом збудника інфекції є хворі на чуму тварини, що виділяють вірус з витіканнями з очей і носа, слиною, калом, сечею, а також перехворілі тварини-вірусоносії впродовж 3 міс після одужання. Зараження відбувається при прямому контакті здорових тварин з хворими, через контаміновані вірусом корми, воду, повітря, підстилку, предмети догляду, годівниці, одяг та взуття обслуговуючого персоналу.

¹ Науковий керівник доктор ветеринарних наук, член-кореспондент НААН Ушкалов В.О.

Цьому захворюванню притаманний гострий перебіг, висока контагіозність та різноманітність клінічних ознак, але, найчастіше - гарячка, гостре запалення слизових оболонок, пневмонії, шкірна екзантема та ураження нервової системи. В популяції не імунних собак і хутрових звірів смертність може досягати до 40 % серед дорослих собак, і 80 – 100 % серед молодняку. Патогенез захворювання починається після проникнення і реплікації в альвеолярних макрофагах вірусу, який потрапляє у регіонарні лімфовузли, а з лімфою далі заноситься до всіх паренхіматозних органів і внаслідок порушення клітин в організмі виникають запальні процеси й ураження органів і тканин. Однак широке застосування живих вакцин з атенуйованих штамів вірусу чуми спричинило зміну епізоотичної ситуації з цієї інфекції і зробило рідкістю класичні клінічні ознаки та патологоанатомічні зміни. У зв'язку з цим зростає роль лабораторних методів дослідження, особливо на ранніх стадіях хвороби.

Постановка діагнозу на це захворювання пов'язане з великими труднощами. Оскільки цієї хвороби властиві винятковий поліморфізм клінічного та патологоанатомічного синдромів, відсутність чітко виражених патогномонічних ознак. Вкрай складні особливості у стосунках специфічного збудника, вторинної мікрофлори і макроорганізму. Для клінічного прояву чуми собак в сучасних умовах найхарактернішим стало саме відсутність яких-небудь характерних ознак.

Діагноз на чуму м'ясоїдних ставлять з урахуванням епізоотологічних, клінічних і патолого-анатомічних даних, проте вирішальне значення мають лабораторні дослідження. Для індикації вірусу в патологічному матеріалі використовують ПЛР, РІФ, РНГА. З метою ретроспективної діагностики застосовують РН, РЗК, РДП, РЗГА, ІФА [2 – 4, 6]. Чуму м'ясоїдних диференціюють від сказу, бабезіозу, хвороби Ауескі, парвовірусного ентериту, аденовірозу, лептоспірозу, вірусного гепатиту.

Відомо, що серед поголів'я м'ясоїдних циркулює значна різноманітність штамів збудника, які відрізняються високою антигенною варіабельністю, в

зв'язку з чим засоби специфічної профілактики не завжди дають позитивний результаті [1].

З метою специфічної профілактики використовують вакцини з атенуйованих штамів вірусу чуми м'ясоїдних (моновалентні або полівалентні). Першу вакцинацію проводять у 8-тижневому віці, другу — через 2—3 тижні. Рекомендується ревакцинувати тварину —у 7—8-місячному віці, а потім — раз на рік. Але, важливим моментом у правильному виборі вакцини для щеплення є визначення гомологічності антигенних і генетичних детермінант епізоотичного та вакцинного штаму збудника, а при розробці оптимальної схеми вакцинації вирішальним моментом є визначення термінів елімінації вакцинного вірусу з організму тварини.

Розробка ефективних атенуйованих вакцин проти чуми м'ясоїдних і охоплення імунізацією значної частини популяції собак призвело до того, що інцидентність захворювання значно скоротилось. Однак повністю його викоринити не вдається. Більш того, останніми роками відмічається нова хвиля розповсюдження захворювання, що пояснюють здатністю збудника до генетичної мінливості і персистенції. Епізоотичні та вакцинні штами вірусу чуми м'ясоїдних відносять до одного серотипу, тому їх неможливо розрізнити в імунологічних тестах, які проводяться з поліклональними сироватками. Крім того, вірус має географічну мінливість, що обумовлює неоднакову тривалість інкубаційного періоду інфекції та гостроту перебігу захворювання. У собак цитолітичні штами вірусу викликають більш гострий перебіг захворювання, але вони швидко елімінуються з організму, або під пресингом специфічних антитіл переходять до слабоцитолітичної форми інфекції [7].

Вірус може викликати не тільки гостру форму інфекції, але і персистентні форми. Вони ще не досить вивчені, але можуть мати досить значне епізоотологічне значення, оскільки забезпечують збереження збудника в організмі тварин на фоні вираженої імунної відповіді протягом значного періоду часу, не виключено, що в ряді випадків пожиттєво. Антигенна

мінливість вірусу і його здатність персистувати в організмі тварин слугують основними перепонами на шляху повного викорінення цієї інфекції.

Мета досліджень. Вивчити епізоотичні та клінічні особливості чуми м'ясоїдних в умовах м. Києва, розробити діагностичну тест-систему ПЛР для індикації геному вірусу чуми м'ясоїдних в біологічному матеріалі різного походження, вивчити її чутливість і специфічність та здатність виявляти геном збудника чуми в патологічному матеріалі від хворих собак з підозрою на чуму м'ясоїдних.

Матеріали і методи досліджень. Для аналізу епізоотичної ситуації та клінічних особливостей чуми м'ясоїдних нами було використано первинну документацію амбулаторних журналів прийому тварин в клініках ветеринарної медицини м. Києва.

ПЛР проводили на чотирьох канальному ампліфікаторі "Терцик" виробництва НВФ "ДНК-технології" (Росія, м. Москва). Реакційна суміш 25 мкл вміщувала: 67 ммоль трис-НСІ (рН 8,8), 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0 ммоль MgCl_2 , 0.01% твін-20, по 100 мкмоль дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, 50 пмоль кожного із специфічних праймерів, 2 од. Таq-полімерази, 5 мкл зразків виділеної кДНК.

Для попередження випаровування у кожний зразок поверх реакційної суміші нашаровували по 30 мкл мінеральної олії.

Ампліфікація складалась з 35 циклів. Кожний цикл ампліфікації включав данатурацію кДНК при 95 °С - 45 секунд, відпал праймерів при 58 °С, - 30 секунд, синтез комплементарних ланцюгів при 74° С - 40 секунд (в останньому циклі цю стадію було подовжено до 5 хвилин).

Детекцію продуктів реакції проводили за допомогою електрофорезу у 1,5% агарозному гелі (забарвленому бромідом етидію) з використанням трис-боратного буфера при градієнті напруги 10 В/см.

Результати оцінювали при перегляду гелю після електрофорезу на транслюмінаторі під УФ-світлом по наявності (чи відсутності) червоно-

помаранчевих фрагментів нуклеїнової кислоти певного розміру.

Специфічність ампліфікованого фрагмента нуклеїнової кислоти визначали його положенням (розміром) по відношенню до фрагментів стандартних маркерів.

Для виявлення збудника у хворих тварин використовували патологічний матеріал, який нам люб'язно надавався діагностичною лабораторією ветеринарної медицини «Бальд» (м. Київ). Для досліджень відбиралися проби крові, змиви з кон'юнктиви очей, носу, ротових порожнин та фекалії.

Патологічний матеріал для досліджень був отриманий від собак віком від 6 місяців до 7 років з міст Києва, Одеси, Львова та Харкова. Патологічний матеріал паралельно досліджувався на наявність антигенів вірусу чуми м'ясоїдних в лабораторії «Бальд» з використанням методу ІФА. Для проведення досліджень відбирався патологічний матеріал від хворих не вакцинованих тварин та хворих тварин, які були щеплені вакцинами проти чуми м'ясоїдних різних виробників (MSD, Zoetis, Merial, Bioveta). В дослідженнях був використаний патологічний матеріал від 41 тварини, з яких 25 були не щеплені, а 16 - вакциновані різними препаратами протягом 2011-2013 рр. Дослідження патологічного матеріалу в ІФА проводили в лабораторії «Бальд» із використанням комерційного набору для визначення антигену чуми м'ясоїдних (фірми «Нарвак», Росія). Облік результатів в ІФА проводили візуально та оцінювали в «хрестах» (від одного до чотирьох).

Для досліджень вакцин та патологічного/біологічного матеріалу в ПЛР використовували тест-систему власної розробки «CDV-test» згідно листівки-вкладки.

Результати власних досліджень. Протягом 2014 року діагноз чума м'ясоїдних у державних клініках ветеринарної медицини був поставлений 86 собакам віком 3-6 місяців (табл. 1).

Таблиця 1.

Дані про тварин, хворих на чуму м'ясоїдних, по м. Києву у 2014 р.

| ПОКАЗНИК | Район | | | | | | |
|---|------------|-------------|---------------|---------------|--------------|-------------|---------------|
| | Печерський | Оболонський | Святошинський | Солом'янський | Дніпровський | Деснянський | Голосіївський |
| Кількість захворівших | 9 | 15 | 7 | 15 | 13 | 16 | 11 |
| Вік, міс | 3-6 | 3-6 | 3-6 | 3-6 | 3-6 | 3-6 | 3-6 |
| Мали контакт з безпритульними тваринами | 5 | 9 | 3 | 8 | 8 | 9 | 6 |
| Були щеплені на момент захворювання | 3 | 7 | 5 | 8 | 7 | 10 | 8 |
| Метод діагностики | Кл. | Кл. | Кл., Лаб. | Кл. | Кл. | Кл. | Кл. |

Примітка: Кл. – клінічний, Лаб. – лабораторний.

Захворювання відмічалось у собак різних порід, з яких більше половини були попередньо щеплені проти чуми м'ясоїдних. З форм захворювання переважала атипова (рис.1)

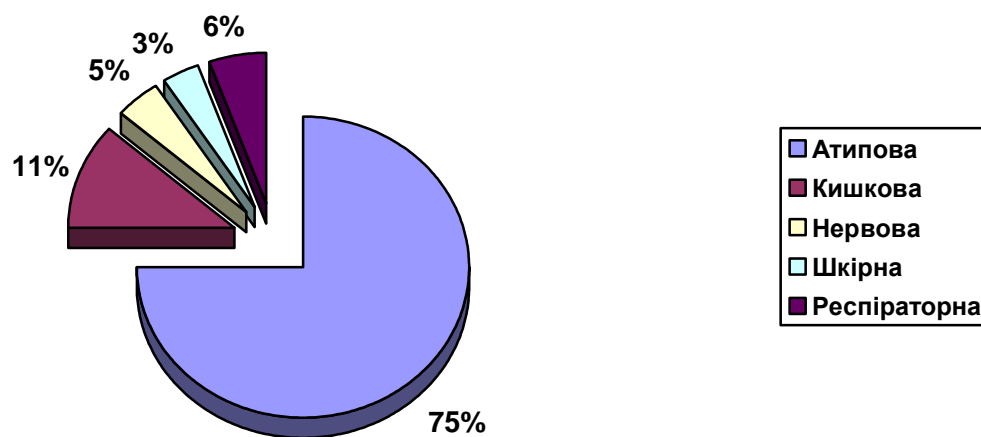


Рис. 1. Клінічні форми чуми м'ясоїдних у 2014 році за даними державних клініках ветеринарної медицини м. Києва.

Крім того, хочеться зазначити, що чума м'ясоїдних супроводжувалась іншими захворюваннями вірусної, бактеріальної етіології та гельмінтною інвазією.

Як видно з таблиці 1 основним методом діагностики цього небезпечного захворювання залишається клінічний, а основною формою є атипова, перед нами була поставлена задача розробити новий засіб для експрес-діагностики чуми м'ясоїдних.

При розробці специфічних праймерів для виявлення вірусу чуми м'ясоїдних на основі ПЛР використовували бази даних GenBank, EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека), DDBJ (Японська база даних нуклеотидних послідовностей), PDB sequences.

За літературними даними було визначено декілька маркерних послідовностей: «highly conserved region of the NP gene of the Ond-CDV strain» та «consensus sequence of 55 gene N», що придатні для розробки специфічних праймерів, з яких для подальшої роботи було обрано ділянку «highly conserved region of the NP gene» РНК вірусу CDV [7].

Потім ми провели пошук нуклеотидних послідовностей «conserved region of the nucleocapsid protein N gene» РНК вірусу CDV за для наступного аналізу їх варіабельності та пошуку консервативних ділянок, необхідних для

визначення праймерів. Використовуючи комп'ютерну програму "Vector NTI" та "PerlPrimer" було розроблено декілька пар праймерів, з яких було обрано одну пару CDV F5 (прямий праймер) та CDV R6 (зворотний праймер) і за допомогою Інтернету (програма BLAST) перевірено їх специфічність. Критичної гомології з нуклеотидними послідовностями інших груп бактерій, вірусів або еукаріот виявлено не було.

Було синтезовано 3 пари олігонуклеотидних праймерів, серед яких (для контролю праймерів власної розробки) статейні - CDV F1 і CDV R2; CDV F3 і CDV R4 та власної розробки - CDV F5 і CDV R6 (табл. 2). Синтез праймерів на наше замовлення виконано НВФ "Літех" (Росія, м. Москва).

Таблиця 2.

Олігонуклеотидні праймери до N гену вірусу чуми м'ясоїдних

| № п/п | Назва | Послідовність (5' → 3') | К-сть кроків | Р-р фрагменту |
|-------|---------------|--------------------------------|--------------|---------------|
| 1 | CDVF1 | ACAGGATTGCTGAGGACCTAT | 21 | 287 |
| 2 | CDV R2 | CAAGATAACCATGTACGGTGC | 21 | |
| 3 | CDV F3 | TTCTG AGGCA GATGA GTTCT TC | 22 | 829 |
| 4 | CDV R4 | CTTGG ATGCT ATTTCTGACA CT | 22 | |
| 5 | CDV_F5 | AGGAGCAAGTTTGGATTCTGAGG | 23 | 827 |
| 6 | CDV_R6 | GACACTAGCTGAGCCTCTTCC | 21 | |

Перевірку робочої пари праймерів спершу проводили за температурою відпалу - 55⁰С і 60⁰С. За результатами проведених досліджень встановлено задовільні властивості синтезованої пари праймерів власної розробки - CDV F5 і CDV R6 (рис. 2).

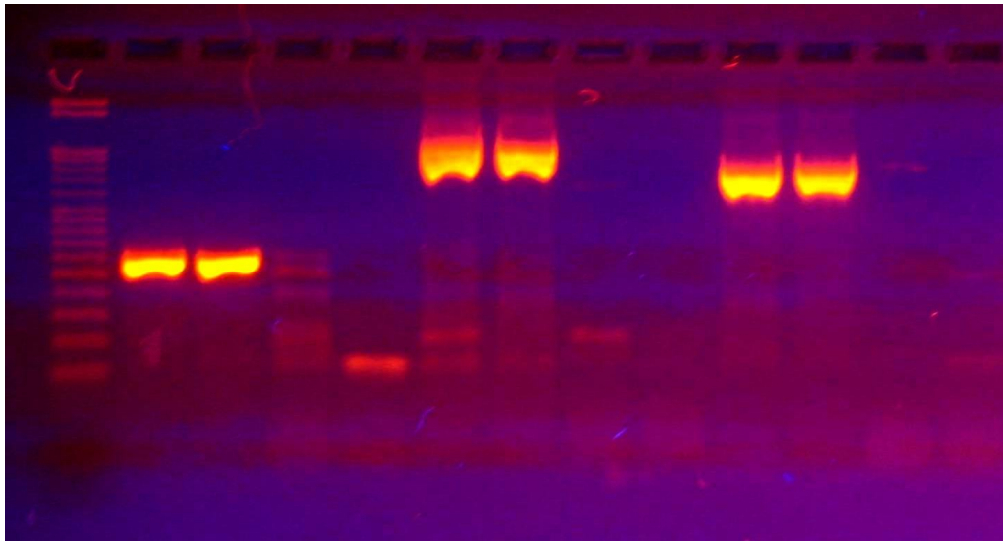


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР, візуалізованих, за допомогою етідіум броміда (1 - маркер молекулярної ваги (GeneRuler 50 bpDNALadder), 2 - 5 - праймери CDV F1 і CDV R2; 6 - 9 – праймери CDV F3 і CDV R4; 10 -13 – праймери CDV F5 і CDV R6; 2, 6, 10 - ПКЗ (Т 55 °С) - штам CDVU 39; 3, 7, 11 - ПКЗ (Т 60 °С) - штам CDVU 39; 4, 8, 12 – сироватка крові; 5, 9, 13 – фіброзчин)

Діагностичну чутливість розробленої тест-системи визначали шляхом ПЛР послідовних десятиразових розведень вакцинного штаму CDVU 39 (Рис. 3.).

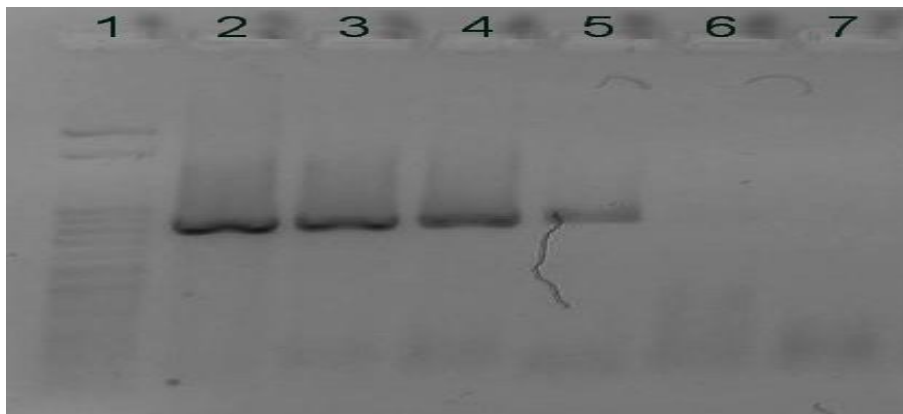


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР, візуалізовані за допомогою етідіум броміда (1 – маркер молекулярної ваги (GeneRuler 50 bp DNA Ladder); 2 - штам CDVU 39 - $10^{4,7}$ TCID₅₀; 3 - штам CDVU 39 - $10^{3,7}$ TCID₅₀ ; 4 - штам CDVU 39 - $10^{2,7}$ TCID₅₀ ; 5 - штам CDVU 39 - $10^{1,7}$ TCID₅₀; 6 - штам CDVU 39 - $10^{0,7}$ TCID₅₀; 7 – негативний контроль).

Як видно з рисунку розроблена нами ПЛР тест-система дозволяє виявити щонайменше 50 віріонів у пробі.

Проведено паралельне дослідження по виявленню вакцинних штамів у комерційних вакцинах розробленої пари праймерів в порівнянні з комерційною ПЛР тест-системою «Полічум» (виробник «Амплісенс», Росія) та серологічною тест-системою «СІТО TEST CDV Ag». Результати дослідження наведені в таблиці 3.

Таблиця 3.

Дослідження комерційних вакцин

| № п/п | Торгова назва вакцини | Штам | CDVF5 CDVR6 | ПОЛІЧУМ | СІТО TEST CDV Ag |
|-------|---------------------------------|---------------|----------------|---------|------------------|
| 1 | Біосан DP | CDVU 39 | + | + | + |
| 2 | Біосан Puppy | CDVU 39 | + | + | - |
| 3 | Біосан DHPPI | CDVU 39 | + | + | - |
| 4 | Мультикан-4 | Штам № 37 | + | + | + |
| 5 | Мультикан-8 | Штам № 37 | + | + | + |
| 6 | Nobivac Puppy | Onderstepoort | + | + | + |
| 7 | Nobivac DHPPI | Onderstepoort | + | + | + |
| 8 | Duramune Max 5 CvK\4L | Onderstepoort | + | + | + |
| 9 | Vanguard plus 5\L | Snyder Hill | + | - | + |
| 1 | Розчинник для вакцин «Біо-Тест- | НКЗ | - | - | - |

| | | | | | |
|---|--------------|--|--|--|--|
| 0 | Лабораторія» | | | | |
|---|--------------|--|--|--|--|

Як уже зазначалося у статті захворювання виникає у щеплених тварин, що може бути наслідком незадовільної імунної відповіді при гельмінтних інвазіях, негативному впливу колостральних антитіл або недостатньому терміну для її формування. Тому наступний етап наших досліджень був направлений на встановлення часу циркуляції вакцинних штамів в організмі собак, що може ускладнювати лабораторну діагностику захворювань.

З метою вивчення елімінації вакцинного штаму із організму щеплених тварин відбирали проби крові, змиви з кон'юнктиви очей, носу, ротової порожнини та прямої кишки за наступною схемою: 1 раз безпосередньо перед щепленням, 2 – через 2-3 дні після щеплення, 3 – через 9 днів, які в подальшому були дослідженні в ПЛР (рис. 4).

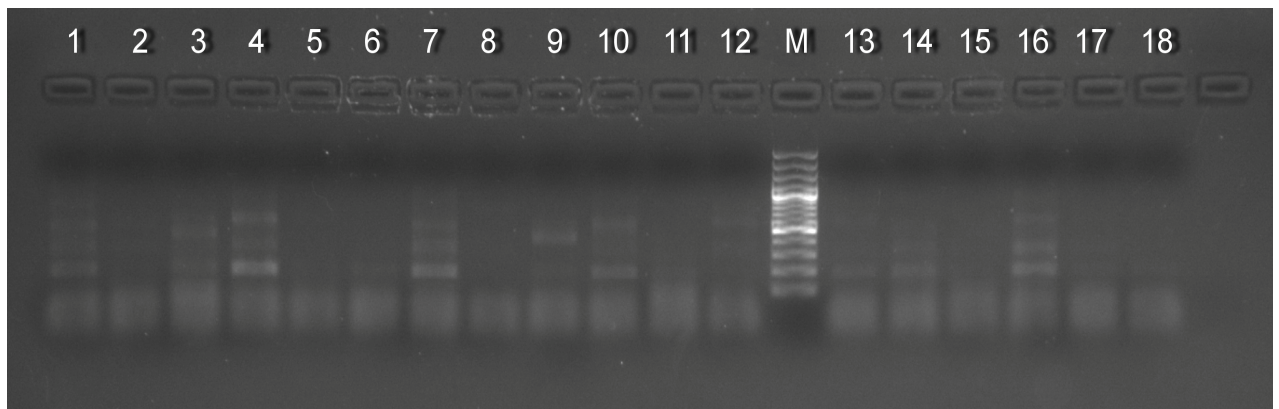


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ПЛР, візуалізовані за допомогою етідіум броміда (1-3, 7-9, 13-15 - собака №1; 4-6, 10-12, 16-18 - собака №2; 1-6 - перший відбір біологічного матеріалу; 7-12 - другий відбір біологічного матеріалу ; 13-18 - третій відбір біологічного матеріалу).

Отримані результати вказують на відсутність геному вірусу чуми м'ясоїдних в пробах біологічного матеріалу від вакцинованих тварин.

Висновки

Основним методом діагностики чуми м'ясоїдних у клініках ветеринарної медицини залишається клінічний. Більше половини. Серед усіх форм перебігу чуми м'ясоїдних у собак переважає атипова. Підібрані пара праймерів CDV_F5

AGGAGCAAGTTTGGATTCTGAGG

та

CDV_R6

GACACTAGCTGAGCCTCTTCC, що лягли в основу «CDV-test» є високоспецифічними та дозволяють виявити щонайменше 50 віріонів вірусу чуми м'ясоїдних у пробі. Крім того, розроблена нами тест-система придатна для лабораторної діагностики незалежно від терміну вакцинації собак.

Список літератури

1. Галкина Т. С. Иммунобиологические свойства возбудителей парвовирусного энтерита и чумы плотоядных, используемых для изготовления биопрепаратов : автореф. дис. на соиск. науч. степени канд. ветеринарных наук: спец 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология» / Т. С. Галкина. – Владимир, 2008. – 25 с.
2. Применение иммуноферментного анализа для диагностики чумы плотоядных у собак / М. В. Михайлова [и др.] // Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях : тез. докладов XIII Рос. науч. конф. / ред. И. И. Долгушин. – Челябинск : [б. и.], 1997. – С. 101–102.
3. Сазонкин В. Н. Диагностика чумы у собак методом иммуноферментного анализа : автореф. дис. на соиск. науч. степени канд. ветеринарных наук : спец 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология» / В. Н. Сазонкин. – М., 1998. – 22 с.
4. Способ проведения точечного твердофазного иммуноферментного анализа антигена вируса чумы плотоядных: пат. РФ G01N33/00 / Л. Б. Логунова [и др.]. – № 2118823 ; заявл. 13.07.93; опубл. 10.09.1998.
5. Тест–система «Поличум» для обнаружения вируса чумы плотоядных: стандарт ФГУ «ВГНКИ» / С. П. Яцентюк [и др.] – 2009.

6. Яцышина С. Б. Экспресс-диагностика вирусных болезней кошек и собак / С. Б. Яцышина, В. Н. Сазонкин, И. Л. Обухов // Ветеринария. – № 5. – 2004. – С. 25–28.

7. Шуляк Б. Ф. Изменчивость и персистенция вируса чумы плотоядных / Б. Ф. Шуляк // Рос. ветеринарный журн. – 2005. – № 1. – С. 33–35.

8. RT-PCR: Diagnosis value in dogs with spontaneous acute-, subacute- and chronic-demyelinating distemper encephalitis / M. Edson [et all.] // Vet. Immunology and Immunopathology. – 2009. – Vol. 128. – P. 211–347.

Распространение и молекулярная-генетическая диагностика чумы плотоядных у собак

О. А. Головки

В статье приведена клинико-эпизоотическая характеристика чумы плотоядных в г. Киеве. Подобрано олигонуклеотидных последовательность пары праймеров CDV_F5 AGGAGCAAGTTTGGATTCTGAGG и CDV_R6 GACACTAGCTGAGCCTCTTCC, которые легли в основу создания диагностической системы ПЦР. Изучены ее чувствительность и специфичность, а также проведены параллельные исследования с другими коммерческими тест-системами.

Ключевые слова: *чума плотоядных, полимеразная цепная реакция, чувствительность, специфичность.*

Transmission and molecular genetic diagnosis of canine distemper between dogs

Golovko O.

The article describes clinical and epidemiological features of canine distemper in Kiev. Matched oligonucleotide sequence primer pairs CDV_F5 AGGAGCAAGTTTGGATTCTGAGG and CDV_R6 GACACTAGCTGAGCCTCTTCC, which inspired the creation of PCR diagnostic system. Studied its sensitivity and specificity, as well as conducted parallel studies with other commercial test systems.

Keywords: *distemper, polymerase chain reaction, sensitivity, specificity.*

