

ВИВЧЕННЯ ЦИРКУЛЯЦІЇ ЗБУДНИКА ЧУМИ М'ЯСОЇДНИХ СЕРЕД ХВОРИХ СОБАК ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛР

О. А. Головка

Державний науково-контрольний інститут біотехнології та штамів мікроорганізмів

Проведені дослідження з визначення циркуляції збудника чуми м'ясоїдних серед хворих собак за допомогою ПЛР та показане діагностичне значення розробленої тест-системи «CDV-test». Крім того, визначена необхідність розробки методів диференціації польових та вакцинних штамів збудника і термінів елімінації вакцинного вірусу з організму щеплених тварин.

Відомо, що одну з ведучих ролей в інфекційній патології м'ясоїдних, зокрема у собак, займає чума м'ясоїдних. Для цього захворювання притаманний гострий перебіг, висока контагіозність, воно вражає багато тварин із різних родин собачих (Canidae), куниць (Mustelidae), таких як єнотовидні собаки, тхорі, вовки, лисиці, шакали, собаки, норки та інших м'ясоїдних, яке характеризується різноманітністю клінічних ознак, але, найчастіше — гарячкою, гострим запаленням слизових оболонок, пневмоніями, шкірною екзантемою та ураженням нервової системи. У популяції неімунних собак і хутрових звірів смертність може досягати до 40 % серед дорослих собак, і серед 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.

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 результат [1]. Тому, необхідність проведення аналізу епізоотичної ситуації, розробка швидких і надійних методів діагностики, які б давали змогу швидко виявляти збудника є актуальним питанням.

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 [2,3,4]. Чуму м'ясоїдних диференціюють від сказу, бабезіозу, хвороби Ауескі, парвовірусного ентериту, аденовірозу, лептоспірозу, вірусного гепатиту.

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 визначенні 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 [8]. 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 позитивно. Антигенна мінливість вірусу і його здатність персистувати в організмі тварин слугують основними перепонами на шляху повного викорінення цієї інфекції.

При епізоотологічному моніторингу, підтвердженню діагнозу та визначенні ефективності вакцин широко використовуються різноманітні методи лабораторних досліджень. Але, найбільш перспективним методом, як для індикації збудника, так й для визначення генетичної гомологічності епізоотичних і вакцинних штамів збудника чуми м'ясоїдних є молекулярно-генетичні методи, зокрема ПЛР [5–7].

Метою наших досліджень було визначення здатності розробленої тест-системи «CDV-test» виявляти геном збудника чуми в патологічному матеріалі від хворих собак з підозрою на чуму та визначення ступеня його циркуляції.

Матеріали і методи. 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). У дослідженнях був використаний патологічний матеріал від 41 тварини, з яких — 25 були не щеплені, а 16 — вакциновані різними препаратами протягом 2011–2013 років. 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 матеріалу в ПЛР використовували тест-систему власної розробки «CDV-test» згідно з настановою по застосуванню.

ПЛР проводили на чотирьох каналному ампліфікаторі "Терцик" виробництва НВФ "ДНК-технології" (Росія, м. Москва). Реакційна суміш 25 мкл вміщувала: 67 ммоль трис-НСІ (рН 8,8), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,0 ммоль MgCl₂, 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 денатурацію 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 перегляді гелю після електрофорезу на трансільюмінаторі 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.

Результати й обговорення. При дослідженні патологічного матеріалу від хворих не вакцинованих та вакцинованих тварин нами біло встановлено, що вірус чуми м'ясоїдних виявляється за допомогою обох методів. При цьому необхідно зазначити, що частота індикації вірусу в ІФА та ПЛР є практично однаковою, що може свідчити про достовірність отриманих результатів та діагностичне значення розробленого нами тест-набору «CDV-test» (табл. 1). Крім того, звертає на себе увагу той факт, що в патологічному матеріалі від хворих тварин, які були щеплені різними вакцинами проти чуми м'ясоїдних, вірус виявляється за допомогою ІФА в 87,5 % випадків, а в ПЛР — 81,25 % досліджених тварин. Такий високий рівень виявлення вірусу чуми м'ясоїдних у вакцинованих тварин може свідчити про довготривалу персистенцію вакцинного вірусу або про можливість зараження щепленої тварини польовим штамом збудника.

Таблиця 1

Результати досліджень патологічного матеріалу в ІФА та ПЛР щодо вірусу чуми м'ясоїдних

Групи тварин	Досліджено тварин	ІФА, позитивні	ПЛР, позитивні
Вакциновані	16	14 (87,5 %)	13 (81,25 %)
Не вакциновані	25	19 (76,0 %)	24 (96,0 %)

Важливим етапом наших досліджень було визначення найбільш придатного патологічного матеріалу для індикації в ньому геному вірусу чуми м'ясоїдних за допомогою ПЛР (табл. 2). Отримані результати досліджень свідчать, що найбільш часто (75,6 % зразків) вірус чуми виявлявся в об'єднаннях проб змивів з кон'юнктиви очей, носових та ротових порожнин, при цьому кількість негативних та сумнівних результатів була найменшою. Цей факт може свідчити про максимальну концентрацію вірусу під час інфекції саме в даних секретах, а також мінімальної кількості баластних речовин, які впливають на специфічність проведення реакції. Найменшу кількість позитивних результатів в ПЛР ми отримали при дослідженні в якості патологічного матеріалу фекалій від хворих тварин, що може бути обумовлено тим, що шлунково-кишковий тракт не є основним шляхом для елімінації вірусу.

Таблиця 2

Результати ПЛР, отримані з різного виду патологічного матеріалу собак, щодо наявності антигену чуми м'ясоїдних

Вид патологічного матеріалу	Кількість зразків	Позитивні	Негативні	Сумнівні
Кров	37	26 (70,2%)	9 (24,3 %)	2 (5,4%)
Змиви*	41	31 (75,6 %)	9 (21,9 %)	1 (2,4 %)
Фекалії	33	15 (45,4 %)	17 (51,5 %)	1 (3,0 %)

Примітка: *змиви з кон'юнктиви очей, носових та ротових порожнин при дослідженні об'єднували в одну пробу

Крім того, як свідчать результати обліку ПЛР (рис.) на чіткість електрофорезу не впливає від патологічного матеріалу з якого було проведено виділення генетичного матеріалу збудника. Також необхідно констатувати, що індикація вірусу чуми м'ясоїдних спостерігалася у хворих з підозрою на чуму тварин, незалежно від їх породної належності.

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що розроблена нами тест-система ПЛР «CDV-test» дозволяє виявляти геном вірус чуми м'ясоїдних як у всіх досліджуваних комерційних вакцинах, так й в патологічному матеріалі від хворих собак. При цьому результати отримані в ПЛР та ІФА в переважній більшості співпадають, що є підставою для використання розробленого набору для ПЛР в лабораторній практиці.

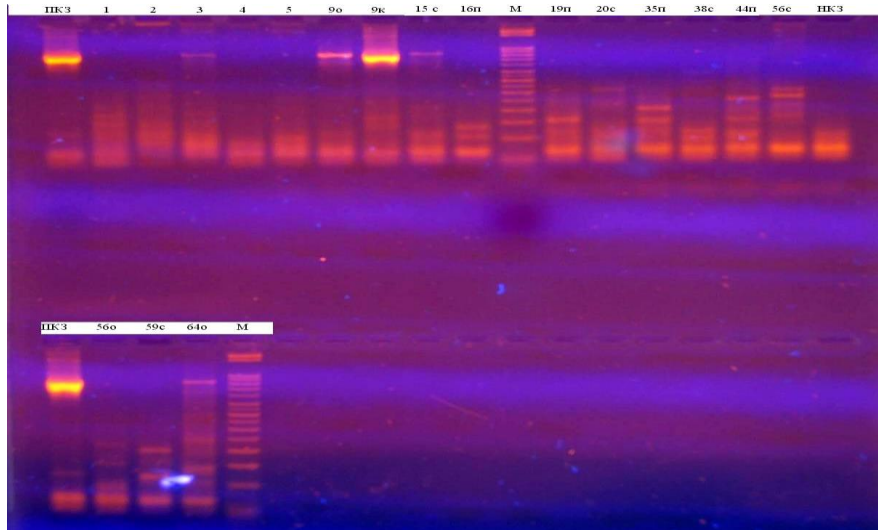


Рис. Результати ПЛР з різними видами патологічного матеріалу

Праймери – CDV F5 і CDV R6; Tm= 58 C⁰; ПКЗ – позитивний контрольний зразок, НКЗ – негативний контрольний зразок, М – маркер молекулярної ваги, 1 – собака «Іржан», нім.вівчарка, (змиви); 2 – собака «Рекс»,лабрадор (кров), Київ; 3 – собака «Марс», дворняга (змиви); 4 – собака «Чіта», дворняга, (кров); 5 – собака «Гіта»,колі (змиви); 9о собака «Дегстер», німецька вівчарка, (фекалії).; 9к –собака «Дегстер», німецька вівчарка, (кров).; 15с – собака «Барбос», спаніель, (змиви); 16п – собака «Бося», лабрадор, (змиви), 19п – собака, німецька вівчарка «Рижий», (сироватка крові) 35п – собака «Перси», англ. Бульдог, (фекалії); 38с – собака «Ден», алабай,(кров); 44п – собака «Сармат»,бігль (фекалії); 56 с – собака «Лексус», ротвейлер(змиви); 56о – собака «Лексус», пітбультер'ер, (фекалії); 59 с – собака «Маша», шпіц (змиви); 64о – собака «Зефір», ретривер, (змиви)

Проведені дослідження також дають підставу для вивчення тривалості елімінації вакцинного вірусу з організму тварини після щеплення та його персистенції після захворювання. Також важливим моментом в діагностиці захворювання залишається питання диференціації епізоотичних та вакцинних штамів, що може бути реалізовано за допомогою молекулярно-генетичних методів.

ВИСНОВКИ

1. Вірус чуми м'ясоїдних виявляється у більшості зразків (до 96 %) патологічного матеріалу, який відібраних від хворих собак з підозрою на чуму, що може свідчити про його участь в етіопатогенетичному процесі або персистенцію в організмі.

2. У не вакцинованих собак вірус чуми м'ясоїдних найбільш часто виявляється за допомогою ПЛР, що свідчить про її більш високу чутливість ніж ІФА.

3. Виявлення вірусу чуми у вакцинованих собак може свідчити про довготривалу персистенцію вакцинного штаму в організмі тварини або про відсутність формування надійного імунітету після щеплення.

4. Найбільш ефективним матеріалом для виявлення вірусу чуми м'ясоїдних в ПЛР є змиви з очей, носових та ротових порожнин.

Перспективи подальших досліджень. Необхідно розробити методи диференціації польових та вакцинних штамів збудника і термінів елімінації вакцинного вірусу з організму щеплених тварин.

CIRCULATION OF DISTEMPER PATHOGEN IN DOGS IN UKRAINE

O. A. Golovko

State Scientific-Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms

S U M M A R Y

Conducted the studies on the detection of distemper pathogen circulation in dogs by PCR and shown diagnostic value obtained by us test system «CDV-test». In addition, identified the need to develop of methods for the differentiation of field and vaccine strains, pathogen date elimination and of vaccine virus from the body of animals.

ЦИРКУЛЯЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ СРЕДИ СОБАК В УКРАИНЕ

О. А. Головки

Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов
микроорганизмов

А Н Н О Т А Ц И Я

Проведены исследования по обнаружению циркуляции возбудителя чумы плотоядных среди собак методом ПЦР и показано диагностическое значение разработанной тест-системы «CDV-test». Кроме этого, определена необходимость разработки методов дифференциации полевых и вакцинных штаммов возбудителя и сроков элиминации вакцинного вируса из организма животных.

Л І Т Е Р А Т У Р А

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. *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.

3. *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.

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. 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.

7. 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.

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