

Діагностика АЧС методом полімеразної ланцюгової реакції

Анотація. Серед методів лабораторної діагностики африканської чуми свиней полімеразна ланцюгова реакція (PCR) має переваги перед іншими лабораторними тестами рекомендованими Міжнародної організацією з питань здоров'я тварин (WOAH/OIE). Керівництво з діагностики (Manual of Diagnostic Tests) містить інформацію щодо застосування різних методів при діагностиці АЧС, але лабораторні тести мають використовуватися відповідно до національних нормативно-правових актів, регламентуючих лабораторну діагностику вказаної хвороби. Інструкція щодо профілактики та боротьби з африканською чумою свиней, затверджена наказом Мінагропроду України від 05.03.2014 № 81 потребує змін в питаннях уточнення конкретних лабораторних тестів, за якими діагноз вважається встановленим.

Ключові слова: африканська чума свиней, полімеразна ланцюгова реакція.

POLYMERASE CHAIN REACTION AMONG THE METHODS OF LABORATORY DIAGNOSTICS AFRICAN SWINE TSCHUMI / ABRAMOV AV /

Abstract. Among the methods of laboratory diagnosis of African swine fever polymerase chain reaction (PCR) has advantages compared to other laboratory tests recommended by the International Organization for Animal Health (WOAH / OIE). Guidelines for diagnostic tests (Manual of Diagnostic Tests)) includes information on the use of various methods of diagnosis of ASF, but laboratory diagnosis should be carried out in accordance with national regulations – regulations that govern the procedures of laboratory diagnosis of said disease. Instructions for the prevention and control of African swine fever, approved by the Ministry of Agrarian Policy of Ukraine from 05.03.2014 № 81 requires changes to clarify issues specific laboratory studies, the results of which the diagnosis is established.

Key words: African swine fever, the polymerase chain reaction.



Рецензент: канд. вет. наук М. В. Бабкін (ДНКІБШМ)

А. АБРАМОВ, канд. вет. наук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

Протягом 2015 року ситуація щодо африканської чуми свиней в Україні залишається напруженою, як і в інших країнах, що межують з нашою державою. Причин поширення інфекції багато, кожна країна має свої особливості перебігу хвороби. Проте заходи, направлені на боротьбу із вказаною хворобою, також діагностика африканської чуми свиней у країнах Європи в основному відповідають тим загальним принципам, які викладені у рекомендаціях Міжнародної організації з питань здоров'я тварин (WOAH/OIE). Це пов'язано, в першу чергу, з особливостями поширення збудника, вибору клітини-мішені та синтезу клітинних білків у процесі реплікації ДНК.

Відомо, що вірус АЧС в організмі свиней формує патогенетичну модель із системою мононуклеарних

Таблиця № 1.
Діагностичні тести, рекомендовані WOAH/OIE
(Manual of Diagnostic Tests)

Назва тесту	Позначка укр./англ.
Реакція гемадсорбції	РГАД/HAD
Реакція імунофлуоресценції	РІФ/FAT
Полімеразна ланцюгова реакція	ПЛР/PCR
Реакція непрямой імунофлуоресценції	РНІФ/IFA
Імуноферментний аналіз	ІФА/ELISA
Імуноблотинг	ІБ/Immunoblotting

фагоцитів. Крім того, науці відомі антитіла білкового походження, які синтезуються в клітині під впливом вірусної програми, що міститься у геномі. Саме ці дані покладені в основу розробки діагностичних тестів.

У роботі використані нормативні матеріали Міжнародної організації з питань здоров'я тварин (WOAH/OIE), які стосуються діагностики африканської чуми свиней, а саме Керівництво з діагностики Наземних тварин (Manual of Diagnostic Tests OIE) і Кодекс Наземних тварин (Code OIE). Проведений порівняльний аналіз міжнародного регламенту щодо діагностики АЧС з національною нормативно-правовою базою відповідно до характеристики вірусу АЧС, що циркулює в Україні.

Результати досліджень

Методи лабораторної діагностики при постановці діагнозу на африканську чуму свиней вважають найефективнішими серед загальноприйнятих: вірусологічних (виявлення вірусу і вірусних протеїнів), молекулярно-генетичних (встановлення геномної ДНК) і серологічних (виявлення антитіл).

За класифікацією МEB лабораторну діагностику африканської чуми свиней (ASF) можна поділити на дві групи: перша містить тести для ідентифікації вірусу, які включають виявлення антигенів вірусу та геномної ДНК, а друга включає тести для виявлення антитіл. Вибір тестів залежить від ситуації щодо розповсюдження хвороби і лабораторно-діагностичного потенціалу країни.

Гемадсорбція (РГАД)

Вірус АЧС виділяють на первинних культурах макрофагів свиней. Вірус АЧС здатний до реплікації природним шляхом у культурах лейкоцитів периферійної крові свиней, де він спричиняє не лише цитопатичний ефект на заражених макрофагах, але й характер-

ний ефект гемадсорбції (РГАД) до клітинного лізису. Під мікроскопом вірус має вигляд розеток червоних кров'яних тілець, що фіксуються на лейкоцитах. Техніка гемадсорбції залишається найбільш специфічним і високочутливим методом ідентифікації вірусу АЧС, тому що інші віруси, що зумовлюють хвороби свиней, такого ефекту не дають. Проведення гемадсорбції потребує часу і чималих витрат порівняно з іншими методами діагностики. Проте він залишається кращою технікою за іншими, більш швидкими методами. Важливо відзначити, що деякі штами вірусу не дають ефекту гемадсорбції. У цьому випадку для підтвердження присутності вірусу звертаються до додаткових

методів лабораторної діагностики щодо аналізу клітинного осадкового залишку за допомогою ПЛР або імунофлуоресценції.

Останнім часом, у зв'язку із наявністю інших методів, зокрема ПЛР, вказаний метод застосовують в окремих референтних центрах світу.

Імунофлуоресценція (РІФ)

Техніка імунофлуоресценції ґрунтується на виявленні вірусних антигенів після фарбування зразків, виготовлених у кріостаті, або з додаванням флуоресцентного ізотіоціанату (FITC). Це дуже простий, швидкий і чутливий метод, який також може застосовуватися у випадку з клітинними культурами, зараженими пульпою з органів і тканин від підозрілих на хворобу свиней. Мікроскопія зараженої клітини дає картину цитоплазматичних включень із помітним свіченням. При інфекції на подальшій стадії специфічне свічення може прийняти зернистий вигляд. Якщо інфекція реєструється більше 10 діб, коли з'являються антитіла, вони можуть заблокувати взаємодію з кон'югатом, що дасть хибно негативний результат. Саме з цієї причини, РІФ використовують паралельно з іншими реакціями, за допомогою яких виявляють антитіла (непряма імунофлуоресценція, ІФА, імуноблотинг). Безумовно, тест дуже швидкий (75 хвилин), але треба пам'ятати, що кожний негативний результат має бути підтвердженим.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Зазначений метод дає змогу підтвердити присутність вірусу шляхом ампліфікації вірусної ДНК, що міститься в пробі. У процесі постановки ПЛР використовують праймери, які відповідають збереженій ділянці геному, що допомагає виявляти більшу частину відомих штамів вірусу АЧС, як гемадсорбуючих, так

і навпаки. Ця техніка в даний час використовується референтними лабораторіями для постановки вірусологічного діагнозу і підтвердження присутності АЧС. Техніка постановки ПЛР дає змогу проводити дослідження проб тканини, також проб крові та сироватки, відібраних у тварин з клінічними ознаками хвороби. Отже, техніка постановки ПЛР може використовуватися для виявлення присутності вірусу в крові з другого дня інфекції до кількох тижнів.

Серологічні тести: У свиней, що залишаються живими після природної інфекції, зазвичай, розвиваються антитіла проти АЧС з 7-10 доби після зараження, які зберігаються протягом тривалого періоду часу. Якщо хвороба ендемічна або спалах спричинений низько вірулентним штамом, дослідження нових спалахів повинні включати в себе виявлення специфічних антитіл в сироватці крові. Для цього застосовують методи непрямой флуоресценції (РНІФ), фермент-зв'язаного аналізу (ІФА), і тест імуноблотинг, також доступний для виявлення антитіл. Вони використовуються не так часто порівняно з ПЛР, тому що підвищена чутливість на ранніх стадіях інфекції сильно спадає через 9-10 днів після початку інфекції. Це пояснюється тим, що відбувається блокування антитілами, як то було зазначено у випадках з РІФ.

Реакція непрямой імунофлуоресценція (РНІФ)

Метод має високу чутливість та специфічність, при якій відбувається реакція специфічних антитіл, якщо вони присутні у сироватці або ексудаті, зараженому вірусом АЧС. Реакція проявляється при додаванні йодо-протеїну «А» або флуоресцентної мітки другого антитіла «Anti-IgG» свині. Якщо клітинний шар містить позитивні зразки на ділянках, близьких до ядра, спостерігається світіння, яке відповідає точкам реплікації вірусу АЧС. Останнім часом метод практично не застосовують через відсутність комерційних наборів.

Імуноферментний аналіз (ІФА)

ІФА – використовують для масових профілактичних і епізоотичних досліджень. За принципами вказаного методу в даний час використовують розчинний антиген, що містить велику частину вірусних протеїнів АЧС. ІФА – високочутливий і специфічний, швидкий, легкий і прийнятний за собівартістю метод. Нещодавно був розроблений новий метод ІФА з неінфікованими реактивами, у якому в якості вірусних антигенів застосовують рекомбінантні протеїни р32, р54 і рр62. Тестування за допомогою ІФА демонструє однакову або вищу чутливість і специфічність порівняно з РНІФ.

Імуноблотинг (ІБ)

Імуноблотинг – імуно-ензиматична техніка постановки, за якої вірусні протеїни АЧС наносять на нітроцелюлозні фільтри, що виконують функцію антигенних смуг, на яких відбувається реакція підозрілої сироватки за допомогою кон'юнктивату протеїну А/пероксидази для виявлення специфічних антитіл.

Техніка постановки імуноблотингу використовується для визначення реактивності антитіл, присутніх у сироватці при контакті з різними протеїнами, які є специфічно виробленими вірусом африканської чуми свиней. Специфічність, а також висока чутливість і об'єктивний характер імуноблотингу роблять його ідеальною технікою серологічної діагностики для підтвердження наявності АЧС. Іншою перевагою даного методу є можливість зберігання стрипів, що містять антиген, при кімнатній температурі, без втрати активності протягом більш ніж одного року, що означає безпечну можливість транспортування реагентів. Комерційних наборів у продажу немає, тому вказаний метод застосовується винятково у референтних центрах.

Усі вищезазначені методи діагностики африканської чуми свиней мають право на застосування у будь-якому випадку. Але необхідно пам'ятати, що визнання тесту позитивним за вказаними оцінками несе в собі зовсім різні критерії, відповідно до яких розроблені зазначені тестові системи. Наявність або відсутність використаних у процесі виготовлення діагностиків сигнальних елементів білкової природи мають різні механізми походження та місце їхнього розташування. Крім цього, у кожному конкретному випадку наявність або відсутність конкретних білків мусить мати конкретну інтерпретацію, яка залежить від багатьох факторів. Тому, при постановці діагнозу на африканську чуму свиней використовують комплекс даних, з урахуванням результатів кількох методів лабораторних досліджень. АЧС входить до категорії особливо небезпечних захворювань тварин, тому дуже важливим є вчасне і достовірне виявлення збудника, або отримання непрямих даних, що вказують на наявність збудника цієї хвороби.

Відповідно до Інструкції щодо профілактики та боротьби з африканською чумою свиней, затвердженої наказом Мінагропроду України від 05.03.2014 № 81 діагноз на АЧС вважається встановленим на основі позитивних результатів лабораторних досліджень проб біологічного та патологічного матеріалу з використанням реакції прямої імунофлуоресценції, полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), імуноферментного аналізу (ELISA) з визначення антигену та антитіл з наступною молекулярною характеристикою геному вірусу АЧС в Державному науково – дослідному інституті з лабораторної діагностики.

Останнім часом за класифікацією МЕБ (OIE) методи діагностики АЧС поділені на дві групи: ідентифікація агента і серологічні тести. Тести з виявлення геномної ДНК (ПЛР – діагностика) віднесено до групи ідентифікації вірусу. Основною реакцією з підтвердження АЧС (гемадсорбція), починаючи з 1960 року залишається тест Малквіста. Позитивний тест в реакції гемадсорбції (HAD) є заключним у постановці діагнозу на АЧС. Принцип реакції гемадсорбції ґрунтується на спроможності еритроцитів свиней адсорбуватися

на поверхні моноцитів та макрофагів крові свиней, інфікованих вказаним вірусом. Однак, відомо, що в природі існують «негемадсорбуючі» штами вірусу, для діагностики яких доводиться додатково застосовувати метод ПЛР.

Керівництво з діагностики наземних тварин в редакції 2012 року посилається на процедуру підтвердження кожного інокуляту, що не має позитивної реакції гемадсорбції, за допомогою реакції ПЛР з подальшим секвенуванням ізоляту.

Треба уточнити, що реакція гемадсорбції проводиться на культурах тканини з метою виявлення вірусу в клітинах, заражених культур тканини на ранніх стадіях розмноження вірусу, тобто до появи цитопатогенної дії (ЦПД). За своєю сутністю ця реакція ґрунтується на здатності заражених вірусом клітин культури тканини адсорбувати на собі еритроцити. Для постановки РґАД використовують заражені вірусом культури тканини в пробірках. У пробірку з культурою тканини, зараженою вірусом, не видаляючи підтримуючого середовища, вносять 0,2 мл 0,5% суспензії еритроцитів. Після цього пробірку залишають у похилому положенні під кутом в 7-10 ° на 10-15 хвилин і по закінченню цього часу переглядають під мікроскопом. При постановці реакції в другому варіанті з пробірок із зараженою культурою тканини попередньо зливають культуральну рідину, потім вносять 0,2 мл 0,5% суспензії еритроцитів, пробірки залишають у похилому положенні на 10-15 хвилин, потім культуру тканини промивають фізіологічним розчином (обережно споліскують і зливають) і переглядають під мікроскопом. При позитивній реакції еритроцити адсорбуються на заражених клітинах і добре помітні у формі розеток або безладних скупчень. Якщо клітини не інфіковані вірусом, то на них еритроцити не адсорбуються і вільно плавають у культуральній рідині, або змиваються при промиванні фізіологічним розчином.

Наведена вище техніка постановки реакції, заснована на механізмі дії адсорбції еритроцитів, ще раз підкреслює високу залежність РґАД (HAD) від багатьох факторів впливу. Досить важливим також треба визнати проведення обліку реакції, яка залежить від особистих навичок фахівця. Порівняно із полімеразної ланцюгової реакції (PCR) у режимі реального часу техніка постановки та обліку реакції HAD програє. Уважно вивчивши механізми дії, на яких ґрунтуються ті або інші ефекти, дійдемо висновку, що всі зазначені методи є непрямим доказом наявності вірусу АЧС в організмі тварини. В основі всіх вищезазначених реакцій застосовується фіксація наявності або специфічних молекул білкової природи (антиген, антитіло) або специфічних клітин (еритроцити, макрофаги).

Вірус АЧС – це ікосаедральний капсид, як сховище геному. Як відомо, геномом називають ланку ДНК, що складається з певної кількості пар нуклеотидів. Нуклеотиди, похідні пуринових і пірамідинових основ,

сформовані в нуклеотидний ланцюг таким чином, щоб можна було донести інформацію до клітини – мішені. Тобто, геном являє собою певну інформацію, характерну виключно для нього. Де інформаційною одиницею виступають пари нуклеотидів, побудовані саме у такий спосіб. Саме за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (PCR) отриману інформацію можна вважати спроможною найбільш точно довести наявність зумовленого геному, характерного для вірусу африканської чуми свиней.

ВИСНОВКИ

Лабораторні тести, рекомендовані Manual of Diagnostic Tests WOAH/OIE мають використовуватися при діагностиці АЧС відповідно до Національних нормативно-правових актів, регламентуючих лабораторну діагностику вказаної хвороби.

Інструкція щодо профілактики та боротьби з африканською чумою свиней, затверджена наказом Мінагропроду України від 05.03.2014 № 81 потребує змін в питаннях уточнення конкретних лабораторних тестів, за якими діагноз вважається встановленим.

При внесенні змін до вказаного нормативно-правового акту перевагу серед методів діагностики африканської чуми свиней треба надати методу полімеразної ланцюгової реакції (PCR).

ЛІТЕРАТУРА

1. *Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях.* – Женева: ВОЗ, 2004. – 190 с.
2. *Інструкція щодо профілактики та боротьби з африканською чумою свиней // [Електронний ресурс]: Інструкція від 03.05.2014 р. №81 – Режим доступу: <http://zakon5.rada.gov.ua/laws/show/z0363-14>.*
3. *Головко А.Н., Ушкалов В.А., Скрыпник В.Г. и др. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине. Справочное пособие.* –Х.: «НТМТ», 2007. – 512 с.
4. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter, African swine fever (NB: Version adopted in May 2012) // [Електронний ресурс]: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.01_ASF.pdf*

