

5. Товстыга В. П. Гипомикроэлементозы / В. П. Товстыга // Животноводство Украины. – 1987. – № 12. – С. 35.
6. Самохин В.Т. Проблемы гипомикроэлементозов в животноводстве / В. Т. Самохин // Ветеринария. – 1992. – № 1. – С. 48–50.
7. Ковалский В.В. Микроэлементы в почвах СССР / В. В. Ковалский, Г. А. Андрианова. – М.: Наука, 1970. – 180 с.
8. Мікроелементози сільськогосподарських тварин / М. О. Судаков, В. І. Береза, І. Г. Погурський та ін.: За ред. М.О. Судакова. – К., 1991. – С. 3.
9. Середні показники поживності і мікроелементного складу кормів Львівської області / Р. Й. Кравців, Р. С. Осередчук, М. В. Ключковська [та ін.] // Сільський господар. – 2001. – № 7–8. – С. 20–22.
10. Прайс В. Аналитическая атомно-абсорбционная спектрофотометрия. – М.: Мир, 1976. – 141 с.

*Стаття надійшла до редакції 14.05.2015*

УДК 616. 3:612.66+612.017

**Маслянко Р. П.**, д.б.н., професор, **Божик Л. Я.**, к.вет.н., доцент,  
**Пукало П. Я.**, к.вет.н., доцент, **Романович М. С.**, к.вет.н., доцент<sup>©</sup>

*Львівський національний університет ветеринарної медицини  
та біотехнологій імені С. З. Гжиського, Львів, Україна*

## **МОЛЕКУЛЯРНА І БІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА В ІНФЕКЦІЙНІЙ ПАТОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ**

*Для об'єктивного вирішення питання про причетність певного збудника до розвитку інфекційної патології, треба про етіологію захворювання тварин, потрібно більш досконало вивчити специфічний характер взаємодії мікро- та макроорганізму, користуючись по можливості більшою кількістю об'єктивних показників (клінічних, біохімічних, імунологічних тощо). Виділення із організму тварини збудника хвороби, чи його антигену за допомогою високочутливих молекулярно-генетичних методів, таких як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) не повинна бути головним аргументом для постановки діагнозу інфекційної хвороби. Без характерних для певної інфекції клінічних проявів, результатами аналізів по виявленню збудника чи антигелів до нього в організмі тварини можуть свідчити тільки про розповсюдженість конкретного збудника та інфікованість певної групи тварин.*

**Ключові слова:** біотехнологія, імунологія, молекулярна і біологічна діагностика.

УДК 616. 3:612.66+612.017

**Маслянко Р. П., Божик Л. Я., Пукало П. Я., Романович Н. С.**  
*Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий  
имени С.З. Гжиського*

## **МОЛЕКУЛЯРНА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА В ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ БИОТЕХНОЛОГИИ**

*Для объективного решения вопроса о причастности определенного возбудителя к развитию инфекционной патологии, то есть об этиологии заболевания животных, нужно более досконально изучить специфический*

<sup>©</sup> Маслянко Р. П., Божик Л. Я., Пукало П. Я., Романович М. С., 2015

характер взаимодействия микро- и макроорганизма, пользуясь по возможности большим количеством объективных показателей (клинических, биохимических, иммунологических и т.д.). Выделения из организма животного возбудителя болезни, или его антигена с помощью высокочувствительных молекулярно-генетических методов, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) не должна быть главным аргументом для постановки диагноза инфекционной болезни. Без характерных для определенной инфекции клинических проявлений, результаты анализов по выявлению возбудителя или антител к нему в организме животного могут свидетельствовать только о распространенности конкретного возбудителя и инфицированность определенной группы животных.

UDC 616. 3:612.66+612.017

**Maslianko R. P., Bozhyk L. Ya., Pukalo P. Ya., Romanovsky M. S.***Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies  
named after S. Z. Gzhitskyj*

## **MOLECULAR AND BIOLOGICAL DIAGNOSTICS IN INFECTIOUS DISEASES AND BIOTECHNOLOGY**

*For objective decision on the involvement of a particular pathogen to the development of infectious diseases, the etiology of the disease that animals need to examine more thoroughly the specific nature of the interaction of micro- and macro-organisms, possibly using more objective indicators (clinical, biochemical, immunological etc.). Bold with an animal pathogens, or antigen using highly sensitive molecular genetic techniques such as polymerase chain reaction (PCR) should not be the main argument for the diagnosis of infectious diseases. No specific to certain clinical manifestations of infection, test results to identify the pathogen or antibodies to it in the animal may indicate only the particular pathogen spread and infection of a group of animals.*

Інфекційні хвороби суттєво відрізняються від іншої патології людини і тварин чітко визначенім етіологічним агентом-патогенним мікроорганізмом. Особливості природи паразитичного пристосування, своєрідний тропізм мікроорганізму до певних тканин господаря зумовлює патологоанатомічну клінічну картину. Ще до відкриття збудників інфекцій чи впровадження бактеріологічної діагностики лікарів не важко було відріznити кір від дифтерії або правецеv від скazu, вони ґрунтувались тільки на клінічних спостереженнях. Видатні бактеріологічні відкриття XIX століття не тільки визначали етіологічну роль мікроорганізмів у розвитку інфекційних хвороб, але й поклали початок бактеріологічній діагностиці. Стало також можливим визначити джерело інфекції та простежити шляхи передачі, знаходячи збудника в організмі безсимптомних носіїв або в об'єктах зовнішнього середовища. Бактеріологічне дослідження стало невід'ємною частиною клінічного та епізоотологічного аналізу. Подальший розвиток мірок біологічної діагностики дещо випередив клінічну діагностику. В теперішніх умовах, коли лікарі очікують відповідь з лабораторії, з метою корекції лікування, при деяких інфекціях, для яких існує етіотропне, специфічне лікування. Наприклад, сибірка, бактеріологічна діагностика загальноприйнятими схемами дуже неоперативна і дає відповідь в середньому на третю добу. Тому, за діючими інструкціями протисибіркову сироватку треба вводити хворому негайно, за клінічною підозрою на сибірку, не очікуючи відповідь бактеріолога. Нерідко, коли нарешті приходить відповідь лабораторії з негативним результатом посіву на

Bac.anthracis, у хвого, якому ввели специфічну гіперімунну сироватку за клінічною підоозрою, вже немає виражених ознак сибірки, не виключено, що саме завдяки дії цього ефективного лікувального засобу. І тоді лікар скасовує попередній діагноз сибірки, замінюючи його на отруєння або загострення зложісного набряку, тощо. Навпаки, якщо хворий кінь виявляється з досить тяжким вираженням колік, але без типових ознак сибірки, у випадку, якщо лабораторія: виділяє у нього та ідентифікує характерні для сибірки велики палички оточені капсулами, діагноз відповідно змінюється на локалізовану форму сибірки. При цьому проти сибіркову сироватку звичайно не вводять.

Проте якщо звернутися до принципів причинності в інфекційній патології, то треба визначити різномірним поряд з екзогенным етіологічним фактором інфекційної хвороби, яким є мікроорганізм, ендогенний етіологічний чинник – реактивність макроорганізму.

Треба переглянути ототожнення патогенного збудника, з причиною заразної хвороби. Реакція мікроорганізму, що індукується патогенним мікроорганізмом, у подальшому схильна до саморозвитку і призводить до специфічного впливу на організм, іноді навіть незалежно від присутності екзогенного чинника. Навпаки, уражена імунологічна толерантність до деяких збудників, нездатність до відповідної захисної реакції не дає можливості розвинутись специфічній імунній реакції за наявності збудника в організмі. Навіть специфічність дії мікроорганізму часто визначається реактивністю макроорганізму. Так, один і той же збудник (наприклад стрептокок) може викликати у різних тварин якісно відмінні інфекційні стани (бешиха, сепсис), залежно від умов взаємодії певного збудника з макроорганізмом. Навпаки, різні зовнішні причинні фактори (стафілококи, стрептококи, пневмококи, віруси) можуть викликати подібні за клінікою та патоморфологією інфекційні стани (сепсис, пневмонія), якщо умови їх взаємодії із внутрішніми факторами організму будуть рівнозначними. Причиною інфекційної патології є саме взаємодія зовнішнього та внутрішнього факторів, а не лише наявність патогенного мікроорганізму в організмі тварин. Це потрібно завжди пам'ятати лікарю, який ставить діагноз інфекційної хвороби.

Особливого значення цей принцип набуває на фоні визначного прогресу та неймовірних можливостей лабораторних методів діагностики. Завдяки ним розширився список збудників інфекцій. Причому «нові» інфекції, що їх відкрито в останні десятиліття, при детальному ретроспективному аналізі виявляються зовсім: не новими.

Крім пошуку «нових» збудників, мікробіологічна діагностика, завдяки застосуванню досягнень молекулярної біології підвищила чутливість своїх методів, які нині можуть виявити з будь-якому субстраті навіть сліди мікробного генетичного матеріалу. Вражуючі успіхи, досягнуті в останні роки сучасною молекулярною біологією та генетикою, привели до створення нового напрямку в діагностиці інфекційних захворювань у людини та тварин. Виділяються дві основні групи таких підходів: гібридизаційний аналіз нуклеїнових кислот (іх здатність в певних умовах утворювати специфічні комплекси з нуклеїновими кислотами, що мають комплементарні до них послідовності) та діагностика з використанням полімеразної ланцюгової реакції – ПЛР (збільшення кількості копій детектуючої ділянки генома в мільйони разів з використанням ферменту ДНК-полімерази). Метод ПЛР, за відкриття якого з 1993 р. американському досліднику Кері Мулісу була присуджена Нобелівська премія по хімії, еволюціонував молекулярну генетику. Цей метод застосовується в криміналістиці для ідентифікації особистості,

при аналізі якості води, продуктів харчування тощо. Відкриття реакції викликало справжню революцію в біологічній науці: дослідники отримали могутній інструмент для розуміння механізмів диференціації клітин, вияснення, які гени працюють на різних стадіях розвитку організму в нормі та при патології, питань еволюції. Методи ДНК діагностики незамінні в пренатальній діагностіці спадкових захворювань, встановленні статі плода та батьківства. Необхідно умовою проведення ДНК-діагностики є знання гена, що відповідає за хворобу, чи його приблизне розташування відносно відомих ДНК-маркерів. Важливою перевагою ДНК-діагностики є можливість визначити носійства ушкодженого гена для матерів у випадках Х-сцеплених захворювань, таких як гемофілія, міодистрофія: і ін..

**Характеристика методів.** Пошук відповідних нуклеїнових кислот і визначення їх кількості за зв'язуванням з ДНК- чи РНК-зондами отримав назву гібридизаційного аналізу (ГА). Метод ГА полягає у зміні одно ланцюгового фрагменту нуклеїнової кислоти на комплементарну йому ділянку другої молекули аналізуючої нуклеїнової кислоти з утворенням дволанцюгової гібридної молекули. Зонд можна отримати хімічним синтезом олігонуклеотидів, або за допомогою синтезу ДНК на одній із ниток детектуючих ДНК за допомогою ферменту ДНК-полімерази (для РНК-залежної ДНК-полімерази). Отримана копія може бути вмонтована в плазмід з подальшим розмноженням в складі будь-яких бактерій.

ПЛР – це метод ампліфікації, за допомогою якого протягом декількох годин можна виділити і розмножити певну послідовність ДНК в кількості, що перевищує вихідну в 100 млн. разів.

Перш за все аналіз виявився надійним – захищеним від артефактів. Для забезпечення надійності та високої інформативної просторової площині діагностичної лабораторії розділяють на 3 блоки: в одному з них проводять підготовку ДНК взірця, в другому – постановку ампліфікації, в третьому – електрофорез і індикацію. Перенесення реактивів і обладнання між блоками не допускається. Для уникнення артефактів в кожній серії аналізів присутній позитивний контроль-взірець з відомою наявністю матриці для даного праймера, наприклад, хромосомна ДНК шуканого збудника інфекції.

Важливим параметром є вибірковість аналізу – здатність діагностикуму виявляти збудників інфекції конкретного виду на фоні будь-яких інших мікроорганізмів, вірусів або клітин власного організму. З цієї точки зору можливості ПЛР-діагностикумів унікальні: відповідним чином вибрана послідовність ДНК мішені (вибір праймерів) дозволяє залежно від цілей діагностикуму виявляти: вид і окремі штами мікроорганізмів.

Діагностика персистентних інфекцій, проведена методом ПЛР, дозволяє, подолати трудності культуральної та серологічної діагностики, проводити виявлення етіологічних агентів не тільки при активному інфекційному процесі, але й при «здоровому» вірусоносійстві.

Унікальність методу зумовлюється тим, що він відрізняється високою чутливістю та специфічністю. Враховуючи тривалість і трудомісткість процедури вирощування культури клітин (до місяця), переваги ПЛР (5–8 год.) очевидні.

Проте, чи практичний лікар готовий вірно інтерпретувати результати такої неймовірно чутливої реакції по вивчення збудника? Чи буде на користь хворому лікування потужними антибіотиками хвороби, діагноз якої встановлено лише на підставі знаходження з його організмі одного чи декількох патогенних збудників?

За даними ПЛР вдається вирішувати ці завдання, які раніше були недоступні традиційними методами діагностики. Зокрема, цим методом здається об'єктивно

проводити діагностику хронічних інфекційних патологій, зумовлених перsistуючими бактеріями та вірусами, виявляти та вивчити збудників сапронозів, які знаходяться з зовнішньому середовищі в «некультивованому» стані, здатні там зберегтися, переживаючи несприятливі умови з міжпізоотичні періоди. ПЛР дозволяє визначити антибіотикорезистентність у повільно ростучих і важко-культурюваних бактерій. Технологія ПЛР докорінно змінює способи маркування штамів збудника для епідеміологічного чи епізоотологічного аналізу, цим розширяє можливості їх застосування.

Ще один розповсюджений метод діагностики – визначення антитіл до певного збудника з організму тварини. З одного боку, наявність антитіл вказує на те, що відбулася не тільки зустріч, але й взаємодія між збудником та організмом тварини. З іншого боку, імунологічна пам'ять, зосереджена з Т- і В-лімфоцитах, зберігає сліди зустрічі із збудником багато років. При чому рівень циркулюючих імуноглобулінів класу G для кожної тварини індивідуальний, а так званий «діагностичний» титр IgG може бути тільки середньо статичним. Діагностичне значення для окремої тварини має не менш ніж 4-разове зростання рівня антитіл класу G у сироватці, взятий не раніше 7-го дня, або знаходження ранніх антитіл класу M, які свідчать про гостру інфекцію. Проте, без характерних для певної інфекції клінічних проявів результати лабораторних досліджень по виявленню збудника або антитіл до нього в організмі тварини можуть свідчити не про дійсну причетність цього збудника до виникнення хвороби, а тільки про розповсюдженість певного паразитичного виду, інфікованість популяції тварин.

#### Література

1. Van Guilder H. D. «Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis» / VanGuilder H. D., Vrana K. E., Freeman W. M. // Biotechniques. – 2008. – V. 44. – P. 619–626.
2. Sails A. D. «Applications in Clinical Microbiology». Real-Time PCR: Current Technology and Applications / Sails A. D. // Caister Academic Press. – 2009.
3. FDA Authorizes Emergency Use of Influenza Medicines, Diagnostic Test in Response to Swine Flu Outbreak in Humans. FDA News, April 27, 2009.
4. Cen P. Circulating tumor cells in the diagnosis and management of pancreatic cancer / Cen P., Ni X., Yang J. et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – V. 1826. – P. 350–356.
5. Young R. Circulating tumor cells in lung cancer / Young R., Pailler E., Billiot F. et. al. // Acta Cytol. – 2012. – V. 56. – P. 655–660.
6. U. Andergassen. Detection of Circulating Tumour Cells from Blood of Breast Cancer Patients via RT-qPCR / Ulrich Andergassen, Alexandra C. Kölbl, Stefan Hutter et al. // Cancers (Basel). – 2013. – December 5(4). – P. 1212–1220.
7. Юшков А. Г. Модификация методики ISOCODEc целью выделения больших объемов проб ДНК / А. Г. Юшков, В. Н. Афонюшкин, В. С. Городов, С. В. Леонов // Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных: материалы международной научной конференции молодых ученых. – Владимир. – 2004. – С.146–149.
8. Baldwin B. G. «Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositaogy» / Baldwin B. G. // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 1992. – V. 1(1). – P. 3–16.
9. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак // Москва: Мир, 2002. – 589 с.

Стаття надійшла до редакції 10.04.2015