

БЛУТАНГ: ДІАГНОСТИКА І ПРОФІЛАКТИКА

Білокінь В.С., Стегній Б.Т., Стеценко В.І., Пилипенко А.В.

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

У статті наведено дані щодо характеристики біологічних властивостей збудника блутангу, лабораторної діагностики та специфічних засобів профілактики цієї інфекції, з урахуванням фірм-виробників діагностичних тест-систем і вакцин.

Блутанг, більш відомий у спеціальній літературі як катаральна лихоманка овець, останнім часом набув значного поширення, особливо в країнах Європи. Україна є благополучною з цієї хвороби. Разом з тим, виявлення інфекції в суміжних з нею країнах, з якими налагоджені тісні міжнародні зв'язки, викликає значне занепокоєння. В Україні є безпосередні умови для виникнення захворювання: сприйнятливих неімунних поголів'я жуйних тварин, різновидові популяції комах-переносників інфекції, дикі парнокопитні, котрі не контролюються на вірусосойство. Є наявні передумови для виникнення природних вогнищ, що являє найбільшу небезпеку, оскільки хворобу не можна буде викоренити. В овець захворювання на блутанг проявляється лихоманкою з віремією, набряком тканин межщелепної ділянки та грудей, запально-некротичними ураженнями ротової порожнини, особливо язика (він синіє та збільшується у розмірі), травного тракту, епітелію вінця та основи шкіри копит, а також дегенеративними змінами скелетних м'язів. Сприйнятливими до блутангу є також велика рогата худоба, олені, верблюди, буйволи, кози та деякі види диких жуйних. У цих видів хвороба проявляється, як правило, спорадично, іноді – ензоотично. Серологічна реакція на вірус блутангу з'являється на 7–14 добу. Перехворілі тварини набувають стійкий імунітет до того серотипу вірусу, яким відбулося зараження, та незначний до гетерологічного. Післявакцинальний імунітет триває близько року. У людини хвороба проявляється спорадично ознаками головного болю, запалення суглобів (артралгія) та окремих груп м'язів (міальгія), нерідко з летальним наслідком [1, 12].

Летальність серед овець у первинних вогнищах блутангу може доходити до 80–90 %, в ензоотичних вогнищах вона не перевищує 30 % і лише проміж ягнят. Летальність інших видів тварин у випадку захворювання на блутанг не перевищує 30 % і проявляється переважно серед молодих і виснажених тварин. Економічні збитки від блутангу у первинному вогнищі складаються з прямих втрат (загибель та вимушений забій тварин) і затрат на проведення протиепізоотичних заходів; у стаціонарних вогнищах – прямі втрати, різке падіння продуктивності жуйних, порушення відтворення стада, обмеження на експорт сільськогосподарської продукції (торгівля худобою, м'ясом, вовною, тощо).

Діагностика. Своєчасно встановлений точний діагноз дозволяє локалізувати інфекцію, провести карантинно-оздоровчі заходи та запобігти великих фінансових втрат. Діагностику блутангу проводять комплексно на підставі клініко-епізоотологічних показників та лабораторних досліджень. Лабораторні дослідження в країнах Європи проводять згідно з методиками, затвердженими у «OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Section 2.1., Chapter 2.1.9.». Матеріалом для лабораторних досліджень є сироватка або плазма крові, молоко, ушкоджені тканини. Для лабораторної діагностики блутангу запропоновано імунологічні та серологічні реакції (імунодифузія в агаровому гелі, конкурентний ELISA тест, реакція нейтралізації, реакція імунофлуоресценції) та імуноелектронна мікроскопія. Ізоляцію вірусу з клінічного матеріалу проводять у культурах клітин ВНК-21, Vero та курячих ембріонах. Широкого впровадження набула полімеразна ланцюгова реакція [1, 3, 7].

Серотести ІФА виробництва фірми INGENASA (Іспанія) випускаються у різноманітних модифікаціях і призначені для визначення як антигену, так і спе-

цифічних до вірусу блутангу антитіл у сироватці крові, у плазмі крові та в мочі хворих, підозрілих на захворювання, експериментально інфікованих або щеплених тварин. Тест-система здатна уловлювати антигени в дуже низьких титрах. Постановку тесту здійснюють згідно з методикою, що надається виробником, і є типовою для усіх наборів.

На відміну від INGENASA тест-системи VBRD, Inc., Pullman (США) та IZS A&M (Італія) виявляють вірус блутангу (BTV) у досліджуваній сироватці за допомогою мічених пероксидазою хрому вірусспецифічних моноклональних антитіл. Перевага конкурентного ІФА на основі моноклональних антитіл полягає у можливості диференційної діагностики блутангу при моно- і змішаних орбівірусних інфекціях, викликаних спорідненими вірусами групи епізоотичної геморагічної хвороби оленів (ЕГХО). Відомо, що BTV та віруси хвороби Ібаракі (VIB) й ензоотичної геморагічної хвороби оленів дають перехресні серологічні реакції, які не відрізняються у реакції імунодифузії в агаровому гелі. Розпізнати, відбулося зараження ЕГХО чи VIB, можливо за дослідження проб сироваток крові в реакції нейтралізації або конкурентному ELISA [1, 6, 7, 9].

Російськими вченими розроблено схеми отримання моноклональних антитіл до типоспецифічних антигенів різних серотипів вірусу блутангу й на їх основі розроблено сандвіч-метод ТФ ІФА для типування ізолятів вірусу блутангу, що не потребує попереднього вірусовиділення [4, 5].

За допомогою ELISA – тестів VBRD, Inc., Pullman, ABD можливо також визначення антитіл до BTV-4. Доведено, що ELISA тест є більш чутливим, він дозволяє знаходити антитіла, починаючи з 7 доби після інфікування тварини, тоді як виявлення віруснейтралізуючих антитіл у реакції нейтралізації можливо з 14 доби після інфікування [3, 8].

На сьогодні запропоновано цілий ряд діагностичних наборів ІФА, що виготовляються в Великобританії, Іспанії, Швейцарії, Німеччині, Сполучених Штатах Америки, а також компонуються в Росії [2, 7, 11].

Реакція нейтралізації здійснюється мікрометодом у 96-луночних пластикових планшетах з використанням культури клітин ембріона африканської зеленої макаки (Vero). На 3 добу інкубації оцінюють цитопатичний ефект або визначають найбільше розведення антисироватки, що викликало інгібування репродукції вірусу.

Ізоляцію вірусу проводять в 6–12-добових курячих ембріонах, організмі новонароджених мишей. Курячі ембріони заражають шляхом інтравенозної інюляції, інюляції на ХАО або у жовчний міхур підготованої проби плазми крові. Далі здійснюють пасажі в культурі клітин Vero, ВНК-21 або Aedes albopictus клон С6/36 (AA). При появі цитопатичної дії вірус ідентифікують у реакції імунофлуоресценції. До вірусу також чутливі культури клітин нирок ягнят, ембріонів ВРХ. У позитивних зразках виявляють флуоресціюючі цитоплазматичні включення. Наявність вірусу в культурі може бути також підтверджена у ПЛР у реальному часі, реакції нейтралізації та інших [1, 3, 7, 8, 10].

Відтворення хвороби та ізоляцію вірусу на вівцях здійснюють інтраназальним, внутрішньовенним, внутрішньочеревним, підшкірним, внутрішньошкірним, внутрішньом'язовим, інтрацеребральним або per os введенням інфікованого матеріалу (0,01 см³ інфікованої крові, 10 см³ суспензії відмитих клітин із 500 см³ крові, 10–50 см³ тканинної суспензії). Наглядають за зараженими тваринами 28 діб, упродовж яких контролюють рівень антитіл у конкурентному ІФА або реакції імунодифузії в агаровому гелі. Зразки крові, відібраної від овець у період від 7 діб після вакцинації, як правило, містять ізольований вірус, який можливо зберігати за температури 4 °С або мінус 70 °С.

Серологічне типування здійснюють додаванням до розведеного 1:10 досліджуваного матеріалу кожної з 24 сероспецифічних антисироваток у розведенні 1:20 за методикою, викладеною у «OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals». У реакції використовують стандартизовані специфічні антисироватки

морської свинки. Серотип вірусу визначають на підставі нейтралізації специфічною антисироваткою репродукції вірусу в моношарі клітин [1, 3, 7, 9].

Для вивчення імуногенних властивостей вірусу, його антигенної мінливості, спорідненості з іншими орбівірусами, використовують групоспецифічні тести, такі як реакція дифузної преципітації (РДП), реакція зв'язування комплементу, непрямий варіант твердофазного ІФА та типоспецифічні – реакцію нейтралізації (РН) та реакцію затримки гемаглютинації (РЗГА).

ПЛР у реальному часі дозволяє швидко визначення послідовності нуклеотидів ВТВ у крові або інших інфікованих тканинах. Отримані праймери РНК-7 (VP7 гена), РНК-6 (ns1 гена), РНК 3 (VP3 гена), РНК-10 (NS3 гена) и РНК-2 (VP2 гена). Праймери генів VP3, VP7 і ns1 можуть бути використані для серотипування. Виявлені особливості у послідовності РНК штамів ВТВ у різних географічних регіонах, що дає можливість визначення походження вірусу. Однак виявлення нуклеїнових кислот вірусу блутангу не завжди означає наявність інфекційного вірусу. Було відмічено, що виявлення генетичного матеріалу ВТВ у крові інфікованих телят та овець за ПЛР імовірно навіть через 30–60 діб після можливості ізоляції вірусу. Запропоновані комерційні набори та реагенти для полімеразної ланцюгової реакції таких компаній, як IsoQuick (Orca Research, Bothell, Вашингтон, США), TRIZOL (Life Technologies, Grand Island, Нью-Йорк, США), Superscript™ Preamplification System (Life Technologies), Perkin-Elmer. Вченими ведеться подальше удосконалення цього перспективного методу діагностики [3, 8].

Профілактика. Лікування хворих на блутанг тварин заборонено, тому майже єдиним засобом боротьби з цією хворобою є щеплення тварин. В Євросоюзі прийнято рішення проводити вакцинацію сприйнятливою до блутангу поголів'я, для чого обрані вакцини Zulvac 8 (Fort Dodge), ВТВPUR-8 (Merial), BLUEVAC-8 (CZ Veterinaria S.A., Іспанія). Найбільша потреба у вакцинах проти 8-го серотипу вірусу, який найчастіше викликає спалахи інфекції. Також на ринку є бівалентні вакцини проти 1 та 8, 1 та 4 серотипів (виробництво CZ Veterinaria). На Американському континенті застосовують живі вакцини проти 10, 11, 17 серотипів вірусу блутангу виробництва Colorado Serum Company та Poultry Health Laboratories. Тривалий час на Африканському континенті також використовували живі атенуєвані вакцини, які отримували шляхом пасажування польових штамів вірусу в культурі клітин або курячих ембріонах. Такі вакцини мають ряд недоліків, а саме тератогенні властивості, внаслідок чого їх застосування неможливе вагітним через вірогідність загибелі плоду. Також є повідомлення про можливість реверсії вірулентності атенуєваних штамів в організмі переносників та появи рекомбінантних штамів (рестрикція генів). Окрім того, вони не задовольняють вимогам унаслідок одночасної активної циркуляції в ензоотичних регіонах декількох імунологічно різних Аг-типів вірусу. Більш безпечними та нешкідливими є інактивовані вакцини. Імунізацію інактивованими вакцинами рогатої худоби проводять у Франції, Іспанії, Англії та інших країнах Європи. У зв'язку з тим, що, за даними Нідерландських вчених, вірус передається вертикально (трансплацентарним) і колостральним шляхом, пропонується вакцинація проти блутангу за 60 діб до запліднення. Незважаючи на напружений післявакцинальний імунітет, не виключається приховане носійство вірусу в тварин, що були інфіковані в неблагополучних осередках. При виробництві сучасних вакцин використовують рекомбінантні білки зовнішнього капсиду VP2 і VP5 та внутрішні протеїни VP3, VP7. Більшість вакцин застосовують дворазово з інтервалом 2 тижні. Схеми щеплень у вогнищах, благополучних, загрозливих та зонах нагляду наведені у настановах із застосування кожної вакцини. Щеплення тварин дає стійкий імунітет проти гомологічного серотипу вірусу протягом року. Фірмою Intervet уперше розроблено вакцину Bovilis® ВТВ8 з подвійною ад'ювантною системою, яка забезпечує одночасне вироблення клітинного та гуморального імунітету.

Ефективність розроблених італійськими вченими вакцин проти 2-го серотипу було досліджено за контрольного зараження відомо патогенними штамми, а також

за змінами таких біохімічних показників крові як лужна фосфатаза, амілаза, креатинін, сечова кислота, загальний білірубін, кальцій, креатин, гаммаглобулін трансфераза, молочна дегідрогеназа, фосфор, загальний білок, тригліцериди, сечовина, кількісного складу крові [7].

Як відомо з досвіду країн Євросоюзу, своєчасне щеплення що найменш 80 % чутливого поголів'я дає змогу значно поліпшити епізоотичну ситуацію та запобігти швидкому подальшому розповсюдженню інфекції.

Запобігання заносу збудника блутангу на територію України можна досягти за здійснення жорсткого контролю цієї інфекції, дотримуючись «Інструкції щодо профілактики та боротьби з блутангом», розробленої під егідою Державного комітету ветеринарної медицини МАП України, основними заходами якої є заборона ввезення тварин з неблагополучних щодо цієї хвороби регіонів, серологічне тестування за ІФА сприйнятливою до вірусу блутангу поголів'я жуйних, особливо ВРХ, яка вважається основним резервуаром інфекції, детекції за ПЛР вірусу в крові тварин та в організмі мокреців (комах-переносників). Тільки за виконання цієї інструкції можна запобігти заносу в Україну вірусу блутангу і можливих економічних збитків.

Список літератури

1. Инфекционная патология животных [Текст] / Под общ. ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева [и др.]. — М. : ИКЦ «Академкнига» 2006. — Т. 1. — С. 31–40.
2. OIE [Electronic resource]. — 09.02.2009. — Режим доступа: www.oie.int.
3. OIE. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals [Electronic resource]. — 24.12.2008. — Режим доступа: www.oie.int/Eng/normes/mmanual/2008/pdf/_bluetongue.pdf.
4. Стрижаков, А.А. Разработка методов ТФ ИФА на основе моноклональных антител для диагностики блутанга. [Текст] / А.А. Стрижаков // Материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 5–6 окт. 2000 г. — Минск, 2000. — С. 209–212.
5. Стрижаков, А.А. Разработка ТФ ИФА на основе вируснейтрализующих моноклональных антител для серотипирования изолятов вируса блутанга. [Текст] / А.А. Стрижаков // Материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 5–6 окт. 2000 г. — Минск, 2000. — С. 212–214.
6. Isolation of Bovine Arboviruses from Culicoides Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Southern Japan: 1985–2002 [Electronic resource]. — 27.03.2009. — Режим доступа: www.bioone.org/doi/abs/.
7. Study of the safety and efficacy of a recombinant vaccine for bluetongue virus serotype 2. [Electronic resource] // Vet. Ital. — 2007. — Vol. 43, № 4. — P. 815–820. — Режим доступа: www.izs.it/vet_italiana/pdf.
8. Bulut, Oya. Serological investigation of bluetongue virus infection by serum neutralization test and ELISA in sheep and goats [Text] / Oya Bulut, Siber Yavry // Bull. Veterinary Ins. Pulawy. — 2006. — № 3. — P. 305–307.
9. Serological cross-reactions between Ibaraki and bluetongue viruses that occurred when the agar gel immunodiffusion test was used disappeared when BT-competitive ELISA was used / Shimizu [et al.] // Vet. Ital. — 2004. — Vol. 40. — P. 583–586.
10. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of Culicoides biting midges [Electronic resource] // Vet. Ital. — 2004. — Vol. 40, № 3. — P. 260–265. — Режим доступа: www.izs.it/vet_italiana/pdf.
11. First Combination Vaccine for Bluetongue Serotypes 1 and 8 in Europe Developed by Fort Dodge [Electronic resource]. — 25.052009. — Режим доступа: www.fortdodge.eu/news/First_Combination_Vaccine.pdf.
12. Стрижаков, А.А. Эпизоотология и меры борьбы с блутангом [Текст] / Стрижаков А.А., Закутски Н.И. // Ветеринария. — 2008. — № 8. — С. 18–22.

BLUETONGUE: DIAGNOSTIC AND PROPHYLAXIS

Bilokin' V.S., Stegnyy B.T., Stetsenko V.I., Pylypenko A.V.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine»

The article introduces information on laboratory diagnostics and specific means of bluetongue prevention including indication of manufacturers of diagnostic test-systems and vaccines; it also gives characteristic features of the virus and its interaction with the organism, applied in the production of vaccines and test-systems.