

РОЛЬ І МІСЦЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ПРИ ДІАГНОСТИЦІ СКАЗУ

Головко М.А.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,
м. Київ

Значне розповсюдження сказу та його особлива небезпека для людини диктує необхідність удосконалення заходів, які спрямовані на своєчасну діагностики та ефективну специфічну профілактику захворювання. Перспективним є розробка та впровадження тест-системи ПЛР для діагностики сказу та вивчення генетичної спорідненості штамів вірусу.

Сказ – особливо небезпечна гостра вірусна хвороба тварин і людини, яка характеризується ознаками поліенцефаломієліту, паралічами і абсолютною смертністю. У відповідності до оцінки ВООЗ, вона входить у п'ятірку найбільш небезпечних зооантропонозів, що завдають величезні соціально-економічні збитки.

Незважаючи на значний світовий досвід і прогрес у вивченні цієї інфекції, на сьогодні сказ зареєстровано в 113 країнах світу, з причини якого гине понад 50 тисяч людей і більше 1 млн. тварин.

Основним джерелом епізоотії сказу є дикі м'ясоїдні тварини, але в Європі, головним чином, лисиці. В 70-80-х роках нозоареал сказу займав територію близько 28 країн Європи, з його епіцентрами були – Німеччина, Австрія, Франція, у яких щорічно діагностували хворобу від 780 до 9 тисяч випадків. Кардинальні зміни в епізоотичну карту Європи щодо сказу ввнесло впровадження у комплекс проти епізоотичних заходів, починаючи з 1983 року, пероральної антирабічної імунізації лисиць. Так, у 2000 році в Німеччині було виявлено всього 192 випадки захворювання, Франції – 5, Австрії – тільки 2, тоді як у Польщі – 2211, Україні – 1502, Російській Федерації – 1239, Хорватії – 917. Науково обґрунтована організація та чітке виконання програм з іррадіації сказу в країнах Європейського Союзу, які базувалися на застосуванні сучасних засобів діагностики та профілактики, дало змогу 15 країнам набуди статусу вільних від сказу.

В наступні роки комплексні заходи боротьби зі сказом природного типу на території Польщі та країн Прибалтики, які включали систематичну пероральну імунізацію диких тварин, зумовили зменшення в цьому регіоні кількості випадків захворювання в 2-4 рази. При цьому в 2007 році територія України стала епіцентром епізоотії сказу.

За останні 10 років в Україні щорічно реєструвалося зростання епізоотії сказу: 1995 р. – 351 випадок, 1998 р. – 766, 2000 р. – 1580, 2003 р. – 2009, 2006 р. – 2039 та у 2007 році – 2929 випадків. Незважаючи на зменшення кількості випадків сказу в I кварталі 2008 року у Київській, Житомирській, та Кіровоградській областях, у цілому в Україні порівняно з 2007 роком вона збільшилась майже на 50 % (в I кв. 2008 р. діагностовано 862 випадки проти 586 за I кв. 2007 р.). Особливо напруженою епізоотична ситуація залишається в Донецькій, Полтавській, Сумській, Запорізькій, Херсонській і Хмельницькій областях.

Не менш складною є епідемічна ситуація зі сказу. Так, якщо в 1994-1997 рр. не було зареєстровано жодного випадку, то тільки в 2007 році – 7 випадків гибелі людей від сказу. Напружена епізоотична ситуація щодо сказу серед диких, сільськогосподарських та, особливо, домашніх тварин (собак і кішок) є реальною загрозою виникнення гідрофобії (сказу) серед людей. Щорічно в Україні в середньому 100 - 108 тисяч осіб звертаються за медичною допомогою в лікувально-профілактичні заклади з приводу укусів дикими і домашніми тваринами. При цьому більше 23 тисяч осіб отримують направлення на проведення антирабічних щеплень, а з них - понад 60 % за безумовними показниками.

Епізоотична ситуація щодо сказу в Україні має ряд особливостей. Зокрема, це еволюція епізоотії як природно-вогнищевого, так і антропоургічного (міського)

типу. В першому випадку резервуаром і джерелом збудника інфекції є дикі хижаки – лисиця (89,3 % випадків діагностованих серед диких тварин), єнотовидна собака, куниця і вовк. При чому останній вид, на відміну від епізоотичних ситуацій у європейських країнах, на території України став досить активним учасником епізоотичного процесу. Так, у 2007 році зареєстровано 27 випадків сказу вовків проти 40 за період 1998 - 2005 рр. При цьому за останнє десятиріччя постійне збільшення щільності популяції лисиці та вовка залишається в Україні неконтрольованим, що, зважаючи на їх високу чутливість до вірусу сказу, швидко змінює покоління та тривалий інкубаційний період, зумовлює непереривність епізоотичного процесу.

Крім того, на території України поряд із класичними штамми вірусу сказу в південно-східному регіоні має місце циркуляція європейських лісавірусів летючих мишей (генотип 5). Останні 10 років (1998-2007 р.) випадки сказу у кажанів виявляються майже щорічно.

Антропоургічний (міський) тип сказу в Україні еволюціонує за рахунок неконтрольованого збільшення чисельності бродячих і безпритульних собак, частка яких у загальній кількості випадків сказу в 2007 році становила 40 % при 40,8 % випадків спричинених лисицями. Це зумовлено відсутністю чіткої нормативно-правової бази щодо розведення і утримання собак і кішок, адміністративної та юридичної відповідальності їх власників, особливо у приміських зонах та сільських місцевостях. Внаслідок цього знижується ефективність антирабічних щеплень популяції собак і кішок у цілому. Поряд з цим проблемним є процес синантропізації лисиці, тобто наближення її популяції до населених пунктів, що сприяє контакту з безпритульними та бродячими собаками і кішками. Неконтрольоване розмноження цих тварин, відсутність для них системи притулків та утилізації трупів загиблих тварин ускладнюють епізоотичну ситуацію щодо сказу.

Отже, напружена епізоотична ситуація в Україні стосовно сказу зумовлена різноманітним резервуаром та джерелом збудника інфекції. Якщо раніше всі штамми вірусу сказу розглядалися в єдиному антигенному відношенні, то нині класифіковано його 4 серотипи та 7 генотипів. До того ж за даними комітету експертів ВООЗ, імунізація антирабічними вакцинами не захищає від зараження вірусами сказу 2-7 генотипів. Тобто тенденція розвитку епізоотії в Україні у відповідності з особливостями епізоотичного процесу і регіональними його характеристиками, широким антигенним і генетичним спектром лісавірусів вимагає проведення моніторингу сказу з виділенням вірусних ізолятів циркулюючих штамів збудника, їх ідентифікації, типізації та філогенетичного аналізу для встановлення відповідності вакцинним штаммам.

Ключове значення в боротьбі зі сказом має своєчасна і якісна діагностика, яка повинна базуватися на сучасних методах, і дозволяти не тільки швидко здійснювати індикацію збудника, але й проводити диференціацію виділених ізолятів, що має суттєвий вплив на ефективність специфічної профілактики сказу.

У лабораторній діагностиці інфекційних хвороб існують два основних методичних підходи. Перший підхід спрямований на виділення збудника або його компонентів (антигенів, геному) від хворих або загиблих тварин; другий - передбачає виявлення антитіл до збудника в крові тварин. Ці два підходи є доповненням один до одного, так як вони виконують різні функції та тим самим дозволяють вирішувати різні завдання.

Існують багато методів індикації та ідентифікації збудників, і всі вони відрізняються своїми принципами та характеристиками. Кожен метод має свої особливості: свій спектр дії, чутливість, специфічність, час та кошти для постановки реакції.

Але, в останній час все більшого значення у діагностиці інфекційних хвороб сільськогосподарських тварин набуває метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Це зумовлено його високою специфічністю, оскільки в основу методу покладено аналіз геному збудника, а не його білків, а також високою чутливістю, яка вища за чутливість методу імуноферментного аналізу (ІФА), імуноблотінгу (ІБ), та значно вища за чутливість інших традиційних методів діагностики. Усе це дозволяє іден-

тифікувати збудників на будь-якій стадії захворювання. Крім того, визначення наявності конкретного збудника методом ПЛР займає небагато часу.

Суть ПЛР полягає у збільшенні кількості генетичного матеріалу вірусу, який треба ідентифікувати в досліджуваних пробах. В основу ПЛР покладені видатні досягнення молекулярної біології: відкриття ферменту ДНК - полімерази, розробка методу секвенування молекули ДНК, а також синтез олігонуклеотидів різної довжини і специфічності (праймерів

Причин, за яких полімеразная ланцюгова реакція знайшла таке широке застосування, декілька. Цей метод не тільки відрізняється високою чутливістю, специфічністю та швидкістю аналізу, але й дозволяє вирішувати найрізноманітніші завдання, деякі з яких іншими методами вирішити неможливо. Так, використовуючи в ПЦР родо-, видо-, тип- або штаммспецифічні праймери, можна виявляти в одній реакції близькородинні патогени, наприклад, всі серотипи вірусу ящура або вірусу блутанга, всі види пестивірусів або всі види мікоплазм, або, навпаки, диференціювати в межах кожного виду генотипи, генетичні групи й навіть окремі штами.

За допомогою ПЛР можна диференціювати близькородинні види вірусів, які не розрізняються іншими методами.

Завдання штаммової диференціації вірусів особливо актуальні в умовах застосування аттенуованих вакцин. Живі вакцини застосовуються в цей час для профілактики КЧС і віспи овець, а в недавньому минулому - і для чуми ВРХ.

Для диференціації вакцинних і епізоотичних штамів застосовуються різні підходи: використовуються штаммспецифічні праймери, проводиться рестрикційний аналіз продуктів ПЛР і т.д. Надзвичайно інформативним є поєднання ПЛР і секвенування. Виявивши за допомогою ПЛР в органах або тканинах хворої тварини вірус і визначивши первинну структуру амплікона, дослідник одержує можливість зрівняти її з банком нуклеотидних послідовностей і в такий спосіб установити походження виявленого збудника.

Методи лабораторної діагностики сказу, які сьогодні широко використовуються у практиці мають цілу недоліків, основними з яких є можливість постмортального проведення досліджень та необхідність значного часу для проведення досліджень. Крім того, жодний з них не дозволяє вивчити генетичну структуру вірусу, що в свою чергу не дає змоги визначити її відповідність до штамів вірусу, які входять до складу вакцин.

В зв'язку з цим є актуальним розробка та впровадження тест-системи для діагностики сказу в ПЛР.

В даний час нами проводяться відповідні роботи щодо конструювання такої тест-системи, яка дозволить проводити прижиттєву діагностику сказу. Так, нами були розроблені та синтезовані дві пари праймерів специфічних до N-гену (нуклеопротеїну) вірусу сказу. В даний час проводиться оптимізація роботи цих праймерів та перевірка їх активності та специфічності, та відпрацювання системи виділення РНК вірусу зі слини хворих тварин.

Таким чином, ефективність заходів, які спрямовані на ліквідації сказу напряму залежить від своєчасної та достовірної діагностики та використання ефективних засобів специфічної профілактики. Тому, розробка тест-системи ПЛР для індикації та ідентифікації вірусу сказу дасть можливість не тільки проводити прижиттєву лабораторну діагностику сказу, але й вивчати генетичну спорідненість вакцинних та польових штамів вірусу з метою підбору ефективних засобів специфічної профілактики.

Список літератури

1. Груздев К.Н., Недосеков В.В. Бешенство животных. – М.: «АКВАРИУМ», 2001. – 304 с. 2. Ведерников, Седов, Ивановский. Бешенство животных. – М., 1974. 3. Непоклонов Е.А., Власов Н.А., Дрыгин В.В. Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц с использованием полимеразной цепной реакции. – Владимир: 2008. – 278с. 4. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. – М., 1998. 5. Хисматуллина Н.А., Юсупов Р.Х., Селимов М.А., Янбасарова С.Р. Разработка экспресс-методов иммунологического мониторинга при бешенстве. – 2001. 6. Шестопапов А.М., Кисурина М.И., Груздев К.Н. Бешенство и его распространение в мире. – 2001. 7. Nadin-Davis S.A., Huang W., Armstrong J. et al. Antigenic and genetic divergence of rabies viruses from bat species indigenous to Canada. – 2001. 8. Fu Z.F. Rabies and rabies research: past, present and future // Vaccine. – 1997.

ROLE AND PLACE OF MOLECULAR-AND-BIOLOGICAL METHODS AT RABIES DIAGNOSTICS

Golovko M.A.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and strains of Microorganisms, Kyiv.

Wide spread of rabies and its especially danger for humans demands perfection of the methods, which are directed to the timely diagnostics and effective specific prophylaxis of the disease. Development and introduction of the PCR test-system for diagnostics of rabies and study of genetic relationship of virus strains is very promising.

УДК. 619:616.98:578.828.11-616-084

ПОСТЕПІЗООТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ БЛАГОПОЛУЧЧЯ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЩОДО ЛЕЙКОЗУ

Горбатенко С.К.

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

Проведено аналіз причин рецидивів епізоотії лейкозу великої рогатої худоби в оздоровлених господарствах упродовж 1-2 років спостережень після завершення протилейкозних заходів. Доведено необхідність корекції планів діагностичних досліджень на лейкоз та забезпечення відповідними діагностикумами регіональних діагностичних підрозділів раніше неблагополучних зон у бік значного підвищення.

Особливістю патогенезу лейкозу великої рогатої худоби є значна тривалість у розвитку окремих стадій інфекційного процесу – інкубаційного періоду, стадії серопозитивності без прояву клінічних ознак, періоду клінічного перебігу захворювання. У більшості випадків інкубаційний період в інфікованих вірусом лейкозу тварин, а це термін появи противірусних антитіл після зараження, триває від 3-5 тижнів до 90 днів. У обмеженої кількості тварин ця стадія інфекційного процесу може тривати довше, це може обумовлюватись багатьма причинами. З одного боку – шляхи інфікування, кількість та вірулентність вірусу при зараженні, а з іншого – вік, стать та рівень резистентності ураженої тварини [1,2]. Слід зважати на можливість внутрішньоутробного інфікування частини тварин, особливо у випадках клінічного перебігу захворювання серед тільних корів. Такий спосіб інфікування хоч і займає незначне місце у поширенні вірусу лейкозу ВРХ, проте зумовлює довготривалу підтримку напруженості епізоотичного процесу в конкретному стаді, сприяє постійній циркуляції вірусу лейкозу серед сприйнятливих тварин [3]. Чинним законодавством (Інструкція з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу, затверджена наказом Державного комітету ветеринарної медицини в грудні 2007 року) передбачається упродовж 24 місяців після остаточного оздоровлення стада великої рогатої худоби від лейкозу контролювати епізоотичний стан поголів'я серологічним обстеженням на лейкоз. Якщо в процесі оздоровлення для досліджень проб крові використовували реакцію імунодифузії в агаровому гелі (РІД), контроль проводиться щоквартально. У випадках, коли в системі оздоровлення використовували метод імуноферментного аналізу (ІФА), стадо піддається контролю з шести-місячним інтервалом. Ця вимога діючої настанови обумовлюється не лише небезпекою появи в стаді вірусососіїв з інших господарств при комплектації здорового поголів'я, але й можливістю саме прояву уповільненого розвитку інкубаційного періоду у власних тварин, що інфіковані в період реалізації програми протилейкозних оздоровчих заходів.

Метою повідомлення є аналіз причин рецидивів лейкозу великої рогатої худоби у зонах та господарствах, де обмеження у зв'язку з завершенням оздоровчих заходів скасовані один-два роки тому, а також рекомендації щодо уникнення рецидивів епізоотії.

Матеріал і методи. Проведено аналіз постепізоотичного стану щодо лейкозу великої рогатої худоби у тваринництві 32 оздоровлених від лейкозу колективних гос-