

2. Разработка экологически безопасных антгельминтиков, инсекто-акарицидов, противопротозойных средств, моллюскоцидов; контроль содержания остаточных количеств препаратов в продуктах животного происхождения;

3. Теоретическое обоснование и конструирование принципиально новых моделей биолого-химиотерапевтических препаратов с минимальным уровнем введения в организм животных химических веществ;

4. Разработка комплексных препаратов, препятствующих быстрому привыканию к ним паразитических организмов.

5. Разработка комплексных препаратов одновременно с этиотропным и патогенетическим действием.

6. Теоретическое обоснование и создание новых лекарственных форм противопаразитарных средств.

Литература

1. Бессонов А.С. Проблемы и перспективы развития ветеринарной паразитологии. – Ветеринария. 2002. № 5. С. 27–29.

2. Гельминтозы, протозоозы, трансмиссивные зоонозные, заразные кожные заболевания и инфекции, передаваемые преимущественно половым путем в Республике Беларусь. Мн. 2004. 42 с.

3. Якубовский М.В., Мясцова Т.Я., Лавор С.И. Криптоспоридиоз животных в Белоруссии. – Тез. докл. на конф. Молдавского НИИЖВ. 1990. С. 41.

4. Якубовский М.В., Карасев Н.Ф. Диагностика, терапия и профилактика паразитарных болезней животных. – Мн. Изд. «Хата». 2001 г. 384 с.

УДК 619:616.8-07

П.А. Красочко, доктор ветеринарных наук, профессор

Н.Н. Полещук, доктор медицинских наук

С.В. Бойчук, младший научный сотрудник

РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии

им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

МЗ Республики Беларусь», г. Минск, Республика Беларусь

СОСТОЯНИЕ ДИАГНОСТИКИ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Приведены данные о методах диагностики губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота (ГЭ КРС) в современных условиях. Показано, что наиболее совершенными являются иммунологические методы – Prionics Check Western, Prionics Check LIA, Bio-Rad Platelia, Enfer-test, InPro CDI. Подтверждением при постановке диагноза на ГЭ КРС специфичности служат патогистологические, иммуногистохимические, электронно-микроскопические и биопроба на животных.

The data on diagnostical methods of bovine spongyform encephalopathy (BSE) in present conditions are provided. The evidence is given, that the most perfect are immunological methods – Prionics Check Western, Prionics Check LIA, Bio-Rad Platelia, Enfer-test, InPro CDI. As a confirmation of test's specificity in BSE diagnostic serve the data of histological, immunohistochemical, electron microscopical tests and biological assay on animals

Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота (ГЭ КРС) фатальное заболевание животных прионовой природы с преимущественным поражением центральной нервной системы (ЦНС), представляющее значительную угрозу их здоровью. Актуальность данных инфекций для ветеринарии республики значительно возросла в связи с широкомасштабной

эпизоотией в Западной Европе губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота (ГЭ КРС) или спонгиозной энцефалопатии крупного рогатого скота (БСЭ), заболевания природной природы, поражающего только крупный рогатый скот. Нейропатологическая картина ГЭ КРС характеризуется рядом следующих патогенетических черт:

- дегенерацией нейронов головного, реже спинного, мозга;
- спонгиозом серого и белого вещества мозга;
- астроглиозом – гипертрофией астроцитов и их пролиферацией;
- амилоидозом – отложением амилоидных бляшек в стенках сосудов и паренхиме мозга.

Для крупного рогатого скота губкообразная энцефалопатия характеризуется следующими клиническими признаками:

Инкубационный период при губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота составляет от 3 до 8 лет. Первые симптомы обычно появляются в возрасте от 4 до 5 лет, постепенно усиливаясь в течение 1–4 месяцев. Продолжительность заболевания варьирует от 2 недель до 1 года и более. У животных, пораженных этим заболеванием отмечают симптомы общего и неврологического характера. Неврологические симптомы бывают трех типов:

1) У животных наблюдаются изменения в поведении, чаще всего сходные со страхом, нервозностью, особенно при входе в помещение и выходе из него, агрессивность (попытки к нападению или появление свирепости), скрежет зубами, беспокойство, боязливость, стремление отделиться от стада, возбудимость, дрожание отдельных участков тела (мышц нижнего отдела шеи и плечевой области, губ, зеркальца, век, ушей) или всего тела, нераспознавание препятствий, пугливость при загоне через узкие проходы, лягание при нормальном обращении (молочный скот), частые движения ушами, облизывание носа, почесывание головы ногами, но без выраженного зуда, как при скрепи овец. В некоторых случаях при пальпировании пояснично-крестцового отдела наблюдается “эффект хруста”, движение губ и вытягивание шеи. Подобные симптомы отмечаются примерно у 98% заболевших животных.

2) Двигательные расстройства: нарушение координации движений, внезапные быстрые сокращения отдельных мышц или их групп, избыточная подвижность, утрата нормальной походки, рысистые движения, скольжение, загребание передними ногами, подкашивание задних ног при быстром повороте, поднятый хвост и падения, спина дугообразно изогнута, при движении, наоборот, позвоночник вогнут, хвост поднят. Нарушения становятся заметнее при напряжении или быстрой ходьбе и, наконец могут привести к тому, что животное постоянно лежит и не может встать. Эти признаки встречаются у 93% больных животных.

3) Изменение чувствительности, которая проявляется в различных видах, но чаще всего речь идет о гиперчувствительности при прикосновении, действии шума и света. Такие признаки встречаются у 95% пораженных животных.

Кроме этих признаков изменяется общее состояние животных, они худеют, снижаются удои, аппетит сохраняется, но животные с трудом поедают корм. Эти изменения – у 87% животных.

Указанные выше симптомы могут наблюдаться в разных сочетаниях с различной степенью выраженности. Повышения температуры не отмечают. Болезнь всегда прогрессирует и заканчивается летально. Клинические признаки могут вызвать подозрение на болезнь, но для постановки окончательного диагноза на губкообразную энцефалопатию необходимо подтверждение предварительного диагноза другими методами – иммунологическими, гистологическими и биологическими методами.

Диагноз на ГЭКРС устанавливается на основании анализа комплекса результатов эпизоотологических, клинко-анатомических, патогистологических, иммунологических и биологических исследований.

Окончательным подтверждением диагноза на ГЭКРС является заключение региональной референтной лаборатории Международного эпизоотического бюро.

В настоящее время для лабораторной диагностики губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота применяется 4 основных метода исследований: гистологический, электронно-микроскопический, иммунологический и биологический.

В диагностических лабораториях различных стран мира на первом этапе используются иммунологические методы диагностики ГЭ КРС.

Иммунологические методы.

Иммунологические методы основаны на выявлении PrP^{Sc} с помощью антител. Применение быстрых иммунологических методов является перспективным направлением, поскольку их применение позволяет поставить диагноз со 100%-ной достоверностью за 2–3 месяца до появления характерных гистологических изменений.

Используются различные иммунологические методы: иммуноблотинг, ИФА, РИФ, иммуноэлектрофорез. Однако использование иммунологических методов для диагностики ГЭ КРС имеет некоторые особенности. Так, большинство диагностических антител связываются как с PrP^{Sc} так и с PrP^C. Фактором, позволяющим их дифференцировать, является их устойчивость к протеиназе К, разрушающей PrP^C, но не разрушающей PrP^{Sc}, поэтому большинство используемых иммунологических методов включают этап обработки пробы протеиназой К. Часто вводится дополнительный этап концентрирования пробы в связи с низким содержанием PrP^{Sc} в тканях. Концентрирование пробы производится путём ультрацентрифугирования. Поскольку в клетке PrP^{Sc} находится в виде скрепи-ассоциированных фибрилл, вторичная и третичная структуры отдельных молекул PrP^{Sc} таковы, что доступ антител к ним затруднён. В связи с этим при диагностике ГЭ КРС методами ИФА, ИЭФ и иммуноблотинга подготовка пробы к исследованию включает в себя этап денатурации PrP^{Sc} с целью разрушения скрепи-ассоциированных фибрилл (САФ) и “развёртывания” отдельных молекул PrP^{Sc} для оптимизации доступа антител к антигенным детерминантам. Как правило, в качестве денатурирующего фактора применяют нагревание до 96 – 150 °С или обработку пробы гуанидина гидрохлоридом. В остальном же, применяемые иммунологические методы не отличаются от общепринятых.

В связи с необходимостью определения “быстрых” тестов, пригодных для диагностики ГЭ КРС, в 1999г была проведена их независимая оценка. С этой целью было подготовлено 1400 проб мозга, из них 336 положительных и 1064 отрицательных. Компаниям, занимающимся производством наборов для диагностики ГЭКРС, было предложено провести исследование этих проб. В результате проведённых исследований 3 компании (Prionics, Enfer, Bio-Rad) правильно определили все пробы, не дав ни одного ложноположительно-го или ложноотрицательного результата.

В основе теста *Prionics Check Western* лежит процедура вестерн-блотинга для выявления протеазоустойчивой части PrP^{Sc}. PrP^{Sc} выявляется после обработки пробы протеиназой К с учётом трёх характеристик: устойчивости к протеиназе К, определённого размера молекул при электрофорезе (27 – 30 kDa) и связывания со специфическим антителом (моноклональные антитела 6Н4). Процедура исследования заключается в следующем: кусочек мозга (около 0,5г) гомогенизируется, разрушается протеиназой К, не разрушенная часть (если она есть) денатурируется нагреванием, подвергается электрофорезу в полиакриламидном геле, переносится на мембрану, обрабатывается антителами (вначале мышинными моноклональными, затем – антимышиными, мечеными щелочной фосфатазой), после чего производится учёт результатов. Всё исследование занимает 7 – 8 часов.

Prionics Check LIA – это хемилюминисцентный ИФА. После гомогенизации и обработки протеиназой К исследуемые пробы инкубируются сначала с антителами, мечеными ферментом. На этом этапе ни антитела ни антиген не адсорбированы на твёрдой фазе. После инкубации смесь вносится в чёрные планшеты с иммобилизованными на них моноклональными антителами 6Н4, специфичными к PrP^{Sc}. Если исследуемая проба содержит PrP^{Sc}, комплекс PrP^{Sc}-конъюгат связывается с иммобилизованными на планшете антителами. Если исследуемая проба не содержит PrP^{Sc}, то фиксации конъюгата на планшете не происходит, и он удаляется при промывке. После промывки в планшет вносится хемилюминисцирующая субстратная смесь. В случае положительной пробы, при

разложении ферментом субстрата наблюдается свечение, регистрируемое при помощи специального прибора. Весь тест может быть выполнен за 4 часа, почти все этапы теста могут быть автоматизированы, поэтому данный тест идеально подходит для лабораторий, проводящих большое количество исследований на ГЭКРС.

В основе *Enfer*-теста лежит ИФА с использованием поликлональных первичных антител и меченых пероксидазой хрена вторичных антител. Методика подготовки пробы к исследованию включает в себя обработку протеиназой К и химическую денатурацию при помощи специального денатурирующего буфера. К преимуществам теста относится простота постановки реакции. Всё исследование может быть выполнено за 4 часа.

Bio-Rad Platelia тест – это “сэндвич”-ИФА с использованием двух моноклональных антител. Подготовка пробы к исследованию включает в себя обработку протеиназой К, денатурацию и концентрацию центрифугированием. Всё исследование проводится менее чем за 24 часа. *Bio-Rad* тест признан наиболее чувствительным, с его помощью можно выявить животное в инкубационном периоде за 3 мес. до начала клинического проявления болезни.

На основании решения специальной комиссии Европейского союза с 1-го июля 2001г весь крупный рогатый скот старше 30 мес., убиваемый для употребления в пищу, должен быть исследован на ГЭКРС одним из «быстрых» методов. Лаборатории, производящие исследования на ГЭКРС, должны использовать диагностические наборы вышеуказанных компаний. Проведение исследований на ГЭКРС разрешено лишь в специально аттестованных для этой цели лабораториях. В случае положительного результата «быстрого» теста проба подвергается дальнейшим исследованиям. Диагноз считается установленным, если результат «быстрого» теста положителен или сомнителен и получен положительный результат при дополнительном исследовании пробы одним из следующих методов: гистологическим, иммуногистохимическим, электронно-микроскопическим.

Гистологический метод.

Для постановки диагноза на ГЭКРС гистологическим методом проба мозга должна быть доставлена в лабораторию в течение 12 – 36 часов, поскольку вследствие размножения микроорганизмов в тканях мозга или автолиза мозг становится непригодным для гистологического исследования. Замороженный мозг также непригоден для проведения анализа, так как в результате замораживания возникают артефакты, мешающие диагностике. При проведении гистологического исследования следует сравнивать исследуемые гистопрепараты с гистопрепаратами головного мозга, полученными от заведомо здоровых животных и от животных с различными поражениями центральной нервной системы.

Для фиксации головного мозга рекомендуется использовать 15 – 20-процентный раствор формалина. При этом мозг должен быть нарезан на кусочки толщиной не более 8 мм, поскольку формалин плохо проникает в ткани на большую глубину. Срок фиксации – 3 – 4 суток. Уплотнение материала производят в основном путём заливки в прозрачные среды (парафин, целлоидин), после чего готовят гистосрезы и окрашивают их гематоксилин-эозином.

При микроскопии окрашенных гистосрезов обнаруживают следующие характерные для ГЭКРС признаки:

- диффузная вакуолизация и расплавление нейроглии;
- коагуляция цитоплазмы в нейронах, проявляющаяся в виде плотного сгустка с повышенной оксифильностью;
- наличие пикноза, рексиса и частичного лизиса ядер нейронов, иногда криброза цитоплазмы (множественные мелкие вакуоли);
- гипертрофия эпителия кровеносных сосудов с явлениями кариопикноза и рексиса;
- наличие периваскулярных круглоклеточных астроцитных и макрофагальных элементов типа негнойного энцефалита;
- наличие вокруг нейронов отёка и вакуолизации.

Электронная микроскопия.

Исследование методом электронной микроскопии проводится следующим образом. В исследуемой ткани мозга делают срез длиной не менее 1 см. Электронно-микроскопические сеточки, покрытые фармвар-углеродной подложкой, предварительно смоченные в бидистиллированной воде и/или 2-процентном растворе додецилсульфата натрия (ДСН) в течение 1 минуты, помещаются на свежий срез мозга на 1 минуту.

В 3 чашки Петри вносят по 200 мкл растворов ДСН, трипсина и протеиназы К соответственно. Полученные на сеточках мазки-отпечатки накладывают отпечатком вниз в капли растворов, накрывают крышкой, помещают в термостат и инкубируют в течение 30 минут при 37°C. После обработки сеточки промывают дистиллированной водой, обрабатывают раствором уранил ацетата для контрастирования, ещё раз промывают, высушивают на фильтровальной бумаге. Исследование мазков-отпечатков проводят на электронном микроскопе при ускоряющем напряжении 80 кВ и инструментальном увеличении 15000 – 60000.

После описанной обработки в мазках-отпечатках сохраняются только аномальные структуры – САФ, устойчивые к воздействиям, модифицирующим белковые молекулы. Обычно САФ представлены относительно однородной по морфологии популяцией: имеют диаметр 10 – 20 нм, и состоят из нескольких (2 – 4) спирально закрученных протофиламентов, перекрещивающихся друг с другом через одинаковые интервалы 50 – 150 нм. Длина САФ может варьировать в зависимости от ‘жесткости’ ферментативной обработки в пределах от 100 – 200 нм до 1,5 – 2 мкм. Обнаружение протеазо-устойчивых структур свидетельствует о наличии прионовой инфекции в ЦНС.

Биопроба.

Важное место отводится методу биопробы, однако его применение ограничено чрезвычайно длительным инкубационным периодом ГЭКРС. Биопроба ставится на трансгенных мышцах, экспрессирующих PrP крупного рогатого скота. Возможна постановка биопробы и на генетически не модифицированных мышцах или хомячках, однако в этом случае снижается чувствительность метода и увеличивается инкубационный период.

Краткий обзор альтернативных методов диагностики ГЭКРС.

Имеются некоторые оригинальные методы диагностики. Были предприняты попытки прижизненно диагностировать ГЭ КРС на основании обнаружения в биологических жидкостях не самих прионов, а веществ, сопутствующих прионовой инфекции, называемых «маркерами». Два белка, обозначенные как белок-130 и белок-131, обнаруживаются при ГЭ КРС в цереброспинальной жидкости. Было установлено, что белки 130 и 131 принадлежат к ранее известному роду белков – 14-3-3.

Существует способ диагностики ГЭ КРС, основанный на обнаружении маркера 14-3-3 в цереброспинальной жидкости. Данный маркер представляет собой белок, находящийся в небольших количествах во многих тканях организма в норме. Больше всего его содержится в мозге, но в цереброспинальной жидкости обнаруживаются лишь следы. Значительные количества маркера 14-3-3 в цереброспинальной жидкости с высокой долей вероятности свидетельствуют о заболевании ТГЭ. При диагностировании БКЯ у людей методом ИФА чувствительность составила >94% ($p < 0,001$), специфичность – >98% ($p < 0,001$). Ложноположительные результаты бывают при герпесвирусном и вирусном энцефалитах.

Существует метод прижизненной диагностики ГЭ КРС, основанный на обнаружении PrP^{Sc} в лимфатической ткани, полученной методом биопсии, при помощи иммуногистохимического исследования.

Ещё один метод прижизненной диагностики ГЭ КРС, основан на различной реакции зрачка в ответ на нанесение на роговицу глаза растворов миотических или мидриатических средств у здоровых и больных ГЭКРС животных. У животных, больных ГЭКРС, сужение или расширение зрачка более выражено и происходит в ответ на меньшие дозы лекарственного средства.

Brentani et. al. указывают на обнаружение белка массой 55 – 75 кДа, способного специфически связываться с прионом и предлагают использовать этот белок и антитела к нему в диагностике ГЭ КРС.

Есть данные об обнаружении прионного белка в моче. Прионный белок, обнаруживаемый в моче (UPrP^{Sc}), не является инфекционным, но может быть использован для прижизненной диагностики прионных болезней.

Таким образом, применяемые в различных странах мира методы диагностики ГЭ КРС позволяют своевременно выявлять больных животных и недопустить использование их в пищу людям.

Литература

1. Инструкция по диагностике губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота. Минск, НПООО «ПТИОН», 2001. – 75 с.
2. Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice / M. R. ^{Sc}ott, J. Safar, G. Telling e. a. // Proc. Natl. Acad. ^{Sc}i. USA. – 1997. – Vol. 94. – P. – 14279 – 14284.
3. Genetic and environmental factors modify bovine spongiform encephalopathy incubation period in mice / K. Manolakou, J. Beaton, I. McConnell e. a. // Proc. Natl. Acad. ^{Sc}i. USA. – 2001. – Vol. 98, № 13. – P. 7402 – 7407.
4. A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases / G. M. Shaked, Y. Shaked, Z. Kariv-Inbal e. a. // The Journal of Biological Chemistry. – 2001. – Vol. 276, № 34. – P. 31479 – 31472.
5. Regulation (EC) № 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies / Official Journal L 147, 31.05.2002, – P. 0001 – 0040.
6. Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice // Nature Biotechnology. 20, 1147 – 1150 (01 Nov 2002).

УДК 619:616.981.78:636.5

Р.П. Лизун, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник
РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им.С.Н.Вышелесского
Национальной академии наук Беларуси», г.Минск, Республика Беларусь.

СТРЕПТОКОККОЗЫ ПТИЦ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Среди сельскохозяйственной птицы Республики Беларусь широко распространено носительство кокковой микрофлоры (до 58% обследованных птицевхозств). При снижении естественной резистентности птиц стрептококки осложняют течение ассоциативных заболеваний, а также являются возбудителями собственно стрептококкозов птиц. Подтверждена роль больных стрептококковыми инфекциями сельскохозяйственных животных в возникновении и распространении стрептококкозов у птиц

Carrying of Streptococcus microflora is wide-spread among commercial poultry of Republic of Belarus (up to 58% inspected flocks). Streptococcus complicates base poultry diseases and causes avian streptococcosis. It is confirmed role of ill with streptococcosis domestic animals in outbreaks and spreading of avian streptococcosis.

Стрептококкозы птиц – острые и хронические болезни септического или локального характера. К ним относятся: стрептококковая септицемия взрослых птиц, стрептококкозы молодняка, а также местные стрептококковые инфекции. Впервые стрептококкоз был описан в США в 1902 г. В настоящее время эта болезнь регистрируется практически во всех странах с развитым птицеводством.