

П.А. Красочко, доктор ветеринарных наук, профессор;
А.М. Аксенов, начальник ГУВ Минсельхозпрода РБ;
Н.Н. Полещук, доктор медицинских наук;
Л.П. Титов, доктор медицинских наук, профессор;
С.П. Капитулец; Н.Н. Капитулец, канд-ты биол. наук

ПУТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИОНОВЫХ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛО- ВЕКА И ЖИВОТНЫХ И ПРОБЛЕМА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПРОДУКТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХО- ЖДЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота (ГЭ КРС), скрепи овец (СО), болезнь Крейтцфельдта-Якоба (БКЯ) и амиотрофический лейкоспонгиоз (АЛ) - фатальные заболевания человека и животных прионовой природы с преимущественным поражением центральной нервной системы (ЦНС), представляют значительную угрозу их здоровью. Актуальность данных инфекций для медицины и ветеринарии республики значительно возросла в связи с широкомасштабной эпизоотией в Западной Европе губкообразной бычьей энцефалопатии (ГЭ КРС) или спонгиоформной энцефалопатии (БСЭ), заболевания прионовой природы, поражающего, как ранее считали, только крупный рогатый скот, и участвовавших случаев выявления атипичной нейродегенеративной инфекции у людей, названной в литературе «новый вариант БКЯ» (нвБКЯ). Нейропатологическая картина ГЭ КРС, СО, БКЯ, нвБКЯ, АЛ характеризуется рядом схожих 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 появляются обычно 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 отмечают симптомы общего и неврологического характера. Неврологические симптомы бывают трех типов:

1. 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 ногой, 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. 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 регистрируются 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, в первую очередь – гистологическим методом.

Этиология и молекулярная биология. Природа возбудителя прионовых инфекций до конца не изучена. Доминирует точка зрения, что инфекция вызывается уникальным по своим свойствам патологически измененным клеточным белком, названным прионовым белком (PrP). Предшественник этого белка в норме (PrP 33-35^C) кодируется генетическим аппаратом хозяина (у человека - хромосома 20). Функции его в организме пока точно не определены. При невыясненных условиях (и в первую очередь, при различного рода генных мутациях), PrP 33-35^C в результате последующего посттрансляционного протеолиза трансформируется в аномальный по своим свойствам белок PrP 33-35^{Sc}, устойчивый к различного рода физико-химическим воздействиям и обладающий тенденцией к полимеризации. Установлено, что именно PrP 33-35^{Sc}, а также его протеазо-устойчивая форма PrP 27-30, образуют вне клетки конгломераты различного рода патологических структур в виде глобул, палочек, трубочек, скрепи-ассоциированных фибрилл (САФ), которые, накапливаясь в определенных участках организма (чаще в коре больших полушарий головного мозга, продолговатом мозге, мозжечке, спинном мозге, селезенке и т.д.), образуют характерные амилоидные бляшки, нарушающие нормальное функционирование ЦНС, и ведут к деструкции и гибели нервных клеток.

Проблема заражения животных и человека возбудителями прионовых инфекций. Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота была впервые обнаружена в

Англии в ноябре 1986 г, но на основании информации, собранной позже, установлено, что первый клинический случай появился в апреле 1985 г. Результаты исследований позволили сделать вывод, что причиной эпизоотии явилась мясокостная мука, содержащая белки жвачных животных. Другие возможные способы заражения, вероятно, не являются важными факторами распространения болезни. Результаты эпизоотологических исследований губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота в Англии подтвердили предварительные данные о том, что начало заболевания крупного рогатого скота скрепи-подобной болезнью имели место в 1981–1982 гг. Была отмечена корреляция между использованием мясокостной муки, приготовленной из пораженных скрепи овец и случаями возникновения губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота. В экспериментах было показано, что скармливание крупному рогатому скоту корма, содержание инфекционный агент, в 100% случаев приводило к заболеванию губкообразной энцефалопатией. Значительное увеличение случаев заболевания произошло позже в результате скармливания в 1984–1985 гг. мясокостной муки, полученной от крупного рогатого скота, пораженного губкообразной энцефалопатией. Количество случаев заболевания уменьшилось после запрещения скармливания крупному рогатому скоту мясо-костной муки, полученной из тканей животных, контаминированных прионовым белком. Имеется статистически достоверный риск для телят, родившихся от больных коров в течение 3 лет после прекращения скармливания мясокостной муки.

Чувствительность к заражению животных губкообразной энцефалопатией в значительной степени зависит от индивидуальной предрасположенности к возбудителю. Вероятность заболевания теленка, родившегося от пораженной коровы, намного выше, чем у теленка, родившегося от здоровой коровы. Из-за длительного инкубационного периода сложилась такая ситуация, при которой находившийся в кормах возбудитель мог в течение 3–8 лет инфицировать восприимчивую

субпопуляцию крупного рогатого скота, вызывая губкообразную энцефалопатию без проявления клинических признаков.

Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота в последние годы подтверждена в различных странах мира – Англии, Франции, Дании, Германии, Канаде, Омане, Португалии, Швейцарии, Польше и других странах мира. В Республике Беларусь данное заболевание не зарегистрировано. Однако опасность его заноса имеется.

Существует принципиальная возможность инфицирования человека возбудителем ГЭ КРС через продукты питания животного происхождения (передача возбудителя БСЭ от больного животного человеку пока не подтверждена). К настоящему времени известно уже о 40 официально зарегистрированных в Западной Европе случаях заболевания лиц относительно молодого возраста (до 40 лет) с атипичной патоморфологической и клинической картиной БКЯ (нвБКЯ), связанных, как предполагают, с передачей возбудителя людям через продукты, приготовленные из больных БСЭ животных. Истинная картина инфицированности населения западноевропейских стран прионовыми инфекциями пока неясна вследствие длительного (в некоторых случаях до 20 лет) продромального периода развития заболевания.

В настоящий момент началась работа по проведению плановых исследований по выявлению ГЭ КРС в Беларуси. С этой целью подготовлены и утверждены «Методические указания по лабораторной диагностике губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота». В Белорусском НИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского организована научно-исследовательская лаборатория по изучению прионных инфекций животных. При проведении плановых исследований будет изучаться биологический материал (головной мозг) от 0,01% клинически здоровых коров из мясокомбинатов Республики Беларусь, а также материал от заболевшего крупного рогатого скота с поражением центральной нервной системы после неподтверждения диагноза на бешенство, злокачественную катаральную горячку, болезнь Ауески,

листериоз, отравления мочевиной, ртуторганическими соединениями, хлор- и фосфорорганическими соединениями. В дальнейшем будет проводиться работа по определению качества мяса и других пищевых продуктов животноводства в республике.

Лабораторная диагностика. Успехи в процедуре выделения и очистки из ткани мозга патологических структур, ассоциированных с инфекционностью, интенсивные иммунобиологические и электронно-микроскопические исследования, проводимые нами в конце 80-х начале 90-х гг., обеспечили определенный прогресс в развитии лабораторной диагностики заболеваний прионовой природы в республике.

Лабораторная диагностика ГЭ КРС, БКЯ и АЛ проводится комплексно и основана на:

- изучении клинических признаков заболевания;
- изучении эпизоотологической ситуации;
- проведении биопробы;
- проведении иммунохимических исследований (иммуноблоттинг);
- выявлении специфических пролиферативно-деструктивных изменений в чувствительных культурах клеток (Нер-2, HeLa, астроциты, нейроны), инфицированных клиническим материалом от больных;
- гистопатологическом выявлении спонгиозных повреждений мозга;
- электронно-микроскопическом обнаружении специфических САФ подобных структур в ЦНС;
- выделении прионного белка из клинического материала. При этом протеазо-устойчивая форма PrP 27-30 является основным диагностическим маркером заболевания.

Способы выявления инфекционного белка PrP. Используемые нами способы обнаружения протеазо-резистентного инфекционного PrP 27-30 в клиническом материале отличались по степени сложности и времени проведения анализа.

Среди них можно отметить:

- выявление инфекционного начала на модельных системах *in vivo* и *in vitro*;

- гистологическое окрашивание срезов мозга Конго красным на предмет обнаружения специфических амилоидных бляшек;

- получение мазков-«отпечатков» на электронно-микроскопические сеточки со срезов мозга, обработанных соответствующими детергентами и ферментами [9];

- проведение электронно-микроскопических исследований негативно-окрашенных препаратов гомогенатов мозга (биопсийного и аутопсийного), очищенных методами скоростного ультрацентрифугирования с применением различных детергентов и обработкой нуклеазами и протеиназой К [10];

-модифицированный нами способ Hilmert и Diringer [6], заключающийся в выделении белка PrP 27-30 из зараженной ткани мозга двумя последовательными этапами дифференциального ультрацентрифугирования и детергентной экстракцией с последующим анализом препаратов очищенного прионового белка электрофорезом в полиакриламидном геле, детекцией и элюированием белкового материала из области геля, соответствующей по молекулярному весу PrP 27-30 кД;

- дополнительно предпринимались исследования по модификации способов фракционирования мозговой ткани и обогащению препаратов прионовым белком с последующим выявлением его в иммунном блоттинге и иммунодетекцией. Использование для этих целей специфической антисыворотки к белку PrP 27-30 позволяет улучшить лабораторную диагностику прионовых инфекций как у человека, так и у животных.

Контроль качества животного сырья и полуфабрикатов. По рекомендации ВОЗ [11] продовольственное сырье и полуфабрикаты животного происхождения, из которых производятся продукты питания, классифицированы в соответствии с риском заражения человека БСЭ на 4 группы опасности (табл. 1). Основанием для такого разделения послужили экспериментальные данные по выявлению инфицированности

тканей и биологических жидкостей овец и коз с клинической картиной заболевания скрепи.

Таблица 1. Зараженность тканей и биологических жидкостей крупного рогатого скота возбудителем ГЭ КРС

Группы риска	Зараженность	Ткани и биологические жидкости
Категория I	Высокая инфекционность	Головной мозг, спинной мозг, (глаз)*
Категория II	Средняя инфекционность	Селезенка, миндалины, лимфатические узлы, проксимальный отдел толстой кишки, спинномозговая жидкость, надпочечники (плацента, дистальный отдел толстой кишки)
Категория III	Низкая инфекционность	Периферические нервы, отделяемое носа, вилочковая железа, костный мозг, печень, легкие, поджелудочная железа
Категория IV	Инфекционность обычными методами не выявляется	Скелетные мышцы, сердце, молочная железа, молоко, свернувшаяся кровь, сыворотка, почки, щитовидная железа, слюнные железы, слюна, яичники, семенники, эмбриональная ткань (желчь, кость, хрящевая ткань, соединительная ткань, волосы, кожа, моча)

* – ткани в скобках не были титрованы стандартными методами (7,8), но на их инфекционность указывают другие экспериментальные данные при изучении спонгиозоформных энцефалопатий

Ситуация по прионовым инфекциям в Беларуси.

Следует отметить, что, начиная с 1990 г., исследования по проблеме прионовых инфекций в республике не финансируются и соответственно не проводятся. Необходимость осуществления эффективного эпидемиологического надзора за этими заболеваниями определяет необходимость включения

данной проблемы в рамки научно-исследовательских и государственных программ. Повышение эффективности диагностических исследований позволит не только прояснить эпидемиологическую ситуацию по прионовым инфекциям в целом по республике, но и осуществить мероприятия по созданию национальной системы контроля качества продовольственного сырья и пищевых продуктов.

До настоящего времени среди крупного рогатого скота не зарегистрировано случаев выявления губкообразной энцефалопатии. Однако риск ее возникновения имеется, т.к. до 1994 г. в республику в больших количествах завозились суперконцентраты, в том числе и для крупного рогатого скота, в которых белковым компонентом была мясокостная мука от животных из стран, неблагополучных по данной инфекции. С 2001 г. в Республике Беларусь начала проводиться работа по проведению плановых лабораторных диагностических исследований на ГЭ КРС с использованием биологического материала от клинически здоровых и подозрительных в заражении животных.

Внедрение в практику здравоохранения и ветеринарии процедуры лабораторно-диагностических испытаний животного сырья (и придание ей статуса обязательной на государственном уровне) обеспечит гарантированное производство и потребление продукции, свободной от контаминации патологическими прионовыми белками. С другой стороны, будут созданы предпосылки для ограничения распространения прионовых инфекций на территории Беларуси, что благоприятно скажется на эпидемиологической и эпизоотической обстановке в республике в целом.

Литература

1. Клинико-морфологическая характеристика и лабораторная диагностика амиотрофического лейкоспонгиоза // Метод. Реком.-Мн., 1986.- 20 С.
2. Полещук Н.Н., Илькевич Ю.Г., Капитулец С.П. и др. // *Вопр. вирусол.* - 1991.- Т.37.- N1.- С. 37-40.
3. Полещук Н.Н., Капитулец С.П., Илькевич Ю.Г., Квачева З.Б. // *Лаб. дело.*-1991.- N4.- С. 42-44.

4. Полещук Н.Н., Капитулец С.П., Капитулец Н.Н. и др. // Бюл. экс-пер. биол. и мед.-1993.- N10.- С. 409-410.
5. Полещук Н.Н., Квачева З.Б., Капитулец С.П., Рытик П.Г. Способ обнаружения неклассического вируса. // Патент на изобретение № 2052193. от 10.01.1996 г. выдан Комитетом РФ по патентам и товарным знакам (РОСПАТЕНТ).
6. Hilmert H., Diringer H // Bioscience Reports.- V.4.- P. 165-170.
7. Hadlow W.J., Kennedy R.C., Race R.E. // J. Infect.Dis.- 1982.- V. 146.- P. 657-664.
8. Hadlow W.J., Kennedy R.C., Race R.E. Eklund C.M. //J. Infect.Dis.- 1982.- V.146.- P. 657-664.
9. Narang H.K., Asher D.M., Gajdusek D.C. //Proc.Natl.Acad.Sci. USA - 1988.- V. 85.- P. 3575-3579.
10. Prusiner S.B., Kingsbury D.T. //Clin.Neurobiol.- 1985.- V. 1,N3.- P. 181-200.
11. Report of a WHO Consultation on Medical and other Products in Relation to Human and Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies, (Geneva, Switzerland, 24-26 March, 1997). - 1997.- 17 P.

Резюме

Представлен материал по основным методам лабораторной диагностики губкообразных энцефалопатий человека и животных, а также контроля качества продукции животного происхождения на территории Республики Беларусь. Приведены основные клинические признаки губкообразных энцефалопатий человека и животных. Показана опасность тканей крупного рогатого скота, инфицированного прионами, используемых в пищу человека.

Summary

P.A.Krasochko, A.M.Aksenov, N.N.Poleshchuk, L.P.Titov,
S.P.Kapitulets, N.N.Kapitulets

The ways of perfection of the laboratory diagnostics of prion infections in humans and animals and a problem of control of quality of animal products in the republic of Belarus

Materials on main methods of laboratory diagnostics of sponge-form encephalopathy in human and animals and also of control of animal product quality on the territory of the Republic of

Belarus are presented. Main clinical signs of sponge-form encephalopathy in human and animals are brought. The danger of cattle tissues infected by prions and used as food for humans is shown.

УДК 619:616. 98:578. 833. 31ч

Т.В. Софийская, аспирант

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ МОЛОЗИВНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ПРОТИВ ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ

На современном этапе заболеваемость плотоядных животных чумой весьма велика. Это вирусное заболевание по-прежнему регистрируется в городской и сельской местности, всех без исключения областях Беларуси. На лечение и профилактику болезни у животных затрачиваются колоссальные средства, так как все химиотерапевтические препараты, лечебно-профилактические сыворотки и вакцины – зарубежного производства (Россия, Болгария, Чехия и др.).

В литературе описываются различные методы терапии чумы плотоядных с использованием сывороточных препаратов (К.Н.Груздев, А.В.Селиванов, 1985). При этом в качестве источника антител против возбудителя заболевания используется сыворотка крови лошадей, баранов, крупного рогатого скота или собак, из которой выделяется иммуноглобулиновая фракция.

Однако такая технология получения специфического чумного иммуноглобулина достаточно высокзатратна. Кроме того, после использования специфических сывороток крови от реконвалесцентов или гипериммунизированных животных (лошадей, баранов, крупного рогатого скота) у многих животных отмечалось появление аллергических реакций (папулезные высыпания, зуд, отечность, рвота, шоковое состояние). Но особенностью применения иммунных сывороток молозивного