

Раннее предупреждение

Сандор Белак

Птичий грипп охватил 51 страну — 36 стран только в этом году, при этом многие из них — это густонаселенные и бедные страны.

Можно ли с помощью ядерных технологий выявлять подобные инфекционные заболевания?

Высокоинфекционные болезни животных – это трансграничные угрозы, которые являются источником растущего беспокойства.

В число таких болезней входят ящур, чума свиней, чума крупного рогатого скота и высокопатогенный птичий грипп, сообщениями о котором пестрят многие заголовки средств массовой информации. Болезни, которые эксперты называют ТБЖ (трансграничными болезнями животных), регулярно появляются и рецидивируют во всем мире. Они приводят к убыткам, составляющим миллиарды долларов, и угрожают здоровью, жизни и средствам к существованию миллионов бедных семей и их соседей в сельских районах.

В течение только последних 18 месяцев Международное бюро по борьбе с эпизоотиями (МББЭ, Всемирная организация ветеринарии) сообщало о большом числе вспышек ТБЖ на нескольких континентах – ящуре в Африке, Азии и Южной Америке, классической чумы свиней в Африке, Азии и Европе и чумы крупного рогатого скота в Африке и Азии. Совсем недавно средства массовой информации активно освещали тему высокопатогенного вируса птичьего гриппа (H5N1), который вызвал интенсивные вспышки заболевания в Азии, Африке и Европе. Большое количество птиц, животных и людей было инфицировано, и миллионы погибли.

Экономические потери, связанные со вспышками ТБЖ, следует оценивать как в плане усилий, направленных на то, чтобы поставить заболевание под контроль, так и последующей утраты средств к существованию. В качестве примера можно привести вспышку ящуре в Соединенном Королевстве в 2001 году, когда потери государственного сектора, согласно оценкам, составили свыше 4,5 миллиарда евро, а потери частного сектора – более 7,5 миллиарда евро. Этическая проблема, возникающая при применении стратегии уничтожения животных, и социальные последствия забоя огромного числа животных – это только некоторые из скрытых потерь, которые необходимо учитывать при оценке воздействия этих опасных болезней.

Сегодня все больше и больше организаций и экспертов объединяют свои усилия с целью предупреждения ТБЖ и борьбы с ними. В их число входят ветеринарные службы, научно-исследовательские институты и международные организации, включая МАГАТЭ и Продовольственную и сельскохозяйственную организацию, имеющие объединенный отдел в Вене, Австрия. В рамках совместной программы ФАО/МАГАТЭ осуществляются работы по выявлению новых болезней экспресс-методами, включая птичий грипп, и по использованию ядерных и связанных с излучениями методов в этом процессе.

Это – серьезные и трудные задачи, однако применение ядерных технологий может обеспечить их решение.

Для большинства развивающихся стран выявление ТБЖ является жизненно важным. Проблема заключается в том, что они не способны быстро выявлять вирус и достаточно рано определять, является ли он H5N1 или другим подтипом, с тем чтобы надлежащие органы могли принять соответствующие меры контроля. Серьезные усилия сосредоточиваются на раннем обнаружении инфекционных агентов. Своевременное распознавание таких вирусных инфекций позволит предотвращать распространение болезней в больших популяциях животных на обширных территориях. Таким образом, разработка новых, мощных диагностических средств анализа, основанных на применении ядерных методов, является сегодня чрезвычайно важным вопросом в ветеринарных исследованиях и ветеринарии.

Молекулярная вирусология предлагает целый ряд новых методов, которые могут ускорить и улучшить диагностику инфекционных болезней животных и человека. Молекулярные методы обнаружения, такие, как технологии, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), обеспечивают очень эффективную экспресс-диагностику. Работа по обнаружению вирусов может быть выполнена в течение нескольких часов или в лучшем случае даже в течение нескольких минут с уровнем чувствительности меньше чем один патогенный организм.

Молекулярные подходы внесли значительный вклад в экспресс-обнаружение хорошо известных, а также недавно появившихся инфекционных агентов, таких, как вирусы Nipah и Hendra, или корона-вирусы в случае тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС), а также в обнаружение и определение молекулярных характеристик высокопатогенного птичьего гриппа – подтипа H5N1, который угрожает миру сегодня. Метод амплификационного тестирования нуклеиновых кислот, хотя и был вначале дорогостоящим и трудоемким, теперь стал относительно недорогим и удобным в использовании инструментом в арсенале диагностических лабораторий.

В Швеции диагностический ПЦР-анализ был впервые введен в практику еще в 1987 году, спустя два года после первого описания принципа ПЦР. За последние два десятилетия в стране было разработано и сертифицировано, а также применяется на регулярной основе в диагностических лабораториях свыше 50 различных видов ПЦР-анализа.

В исследованиях генетического родства различных вирусов цель состоит не в том, чтобы добиться широкодиапазонного обнаружения, а чтобы получить высокое филогенетическое разрешение или фингерпринт конкретного вируса или

изолята. Для этого исследуются вариabильные геномные области вирусов, и они позволяют определить направление вирусной эволюции, часто указывающей на происхождение первоначальной инфекции. Такие филогенетические ПЦР-анализы используются для группирования пестивирусов, включая вирус классической чумы свиней и вирус диареи крупного рогатого скота и для классификации патогенных изолятов (в данном случае H5N1).

ПЦР-анализы с высоким филогенетическим разрешением – это полезные инструменты экспресс-идентификации различных вирусных вариантов. Генетическая идентификация представляет собой высокоточный и экспрессный метод (время выполнения варьируется от нескольких суток до нескольких часов). Распространение вирусных вариантов может быть оперативно отслежено и остановлено в целях предотвращения поражения вирусом обширных территорий.

Филогенетическая экспресс-идентификация и отслеживание вирусов называются “молекулярной эпизоотологией”. Например, подобные исследования проводились, когда в нескольких странах Центральной Европы были идентифицированы генетические варианты вируса классической чумы свиней и когда была высказана гипотеза, что имеющиеся в ЕС и США генотипы вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней происходят от общего «предка», обнаруженного в Восточной Европе.

ПЦР-анализ в реальном времени обеспечивает новые экспресс-средства обнаружения вирусов. Диагностические работы могут быть далее автоматизированы при использовании робототехники для экстракции и пипетирования нуклеиновых кислот. По сравнению с прежними амплификационными тестами ПЦР-анализ в реальном времени имеет еще одно преимущество: он позволяет проводить количественный ПЦР, обеспечивая оценку вирусной нагрузки (количества вируса в крови). Количественный аспект чрезвычайно важен, когда вирус, обычно обнаруживаемый у животных, возможно, вызывает симптомы, связанные с вирусной нагрузкой, например, в случае кошачьих корона-вирусов или цирковируса свиней типа 2. Измерение вирусной нагрузки также важно при оценке эффективности противовирусного лечения, особенно в вирусологии человека.

Для обеспечения надежности диагностического ПЦР-анализа важно применять систему внутреннего контроля. Благодаря включению такого интегрированного контроля с его специфическим флюорофором-репортером мы получаем информацию о качестве проб и о погрешностях пипетирования. Одновременно система показывает амплификацию целевых нуклеотидных последовательностей и обеспечивает безопасность диагностики.

Сегодня как национальные, так и международные органы требуют строгого подтверждения того, что диагностические анализы являются настолько надежными, насколько это возможно. Международные учреждения, такие, как МББЭ, ФАО/МАГАТЭ, национальные исследовательские учреждения и коммерческие компании прилагают большие усилия, направленные на согласование международной стандартизации.

С учетом этих требований диагностические лаборатории начали аттестацию и стандартизацию рутинных диагностических ПЦР-анализов. Например, европейский стандарт EN ISO/IEC 17025:2000 содержит директивы для аккредитованных лабораторий и указывает многие важные

параметры. МББЭ также опубликовало в 2000 году стандарт для аттестации диагностических анализов в ветеринарии.

Как быстро можно осуществлять идентификацию и характеристику патогенного вируса в качестве птичьего гриппа?

При использовании молекулярных методов для этого требуется один или два дня — гораздо меньше, чем в случае традиционных методов. В Швеции был разработан одношаговый ПЦР-анализ в реальном времени для экспрессного и одновременного обнаружения широкого спектра вирусов гриппа, включая вирусы, связанные с высокопатогенным птичьим гриппом.

Экспресс-идентификация и обнаружение могут служить в качестве инструмента раннего предупреждения, крайне необходимого особенно для развивающихся стран. Одновременное обнаружение различных подтипов птичьего гриппа позволяет соответствующим органам контролировать возникновение штаммов вируса гриппа у диких птиц, домашних птиц и млекопитающих. Данный подход обеспечивает высокоэкспрессный и высоконадежный молекулярный метод для диагностики одной из самых пагубных трансграничных болезней животных в мире.

Сандор Белак - сотрудник Объединенного научно-исследовательского отдела факультета вирусологии Шведского университета сельскохозяйственных наук (SLU) и Национального ветеринарного института (SVA) в Упсале, Швеция.

Адрес электронной почты: sandor.belak@sva.se.

Справка о птичьем гриппе

Специалисты для обозначения птичьего гриппа используют числа и буквы – он известен как HPAI, подтип H5N1.

Сегодняшняя вспышка птичьего гриппа началась в Азии в 2004 году и вызвана вирусом подтипа H5. Этот вирус был охарактеризован также как вирус подтипа N1 — важный элемент, который говорит о том, что грипп может быть смертельным для людей.

HPAI вызывается инфекцией животных, имеющей некоторые штаммы вируса гриппа А. Штаммы классифицируются по подтипам на основе имеющихся у них двух белков внешней оболочки, а именно гемагглютинина (H) и нейраминидазы (N).

Как идентифицируется и обнаруживается вирус? Обычно из патологической пробы сначала получают изолят вируса, присутствующего в эмбрионах яиц цыпленка. На это уходит от четырех до семи дней. Подтип изолированного вируса затем должен быть идентифицирован посредством целого ряда специфических антител к различным белкам H и N.

Идентификация может проводиться только в специальных лабораториях. Для подтверждения патогенности подтипа изолированный вирус (изолят) должен быть далее инокулирован цыплятам, возраст которых составляет четыре-восемь недель и которые являются восприимчивыми к данному вирусу. Штаммы считаются высокопатогенными, если они в течение десяти дней приводят к более чем 75%-ной смертности инокулированных цыплят.

Большая проблема состоит в том, что существующие процедуры обнаружения требуют больших затрат времени. К счастью, при поддержке МАГАТЭ, ФАО и других учреждений и организаций разрабатываются и внедряются более экспрессные методы.