

НАЦИОНАЛЕН ДИАГНОСТИЧЕН И НАУЧНОИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ
ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ИНСТИТУТ - СОФИЯ,
СЕКЦИЯ “ЕКЗОТИЧНИ И ОСОБЕНО ОПАСНИ ИНФЕКЦИИ”,
НАЦИОНАЛНА РЕФЕРЕНТНА ЛАБОРАТОРИЯ
“КЛАСИЧЕСКА И АФРИКАНСКА ЧУМА ПО СВИНЕТЕ”

ЛАБОРАТОРНА ДИАГНОСТИКА НА АФРИКАНСКАТА ЧУМА ПО СВИНЕТЕ

Няма равновесие – кой дебалансира системата?



Лабораторната
диагностика на АЧС
днес отнема само
часове

Диагностика на терена –
дни, седмици и дори
месеци

АЧС въведение

Вирус на африканската чума по свинете (ASFV)



- Единствен член на сем. *Asfarviridae*
- Вирус с обвивка, с икосаедрична структура.
- Големина = 200 nm
- Размножаване в цитоплазмата.

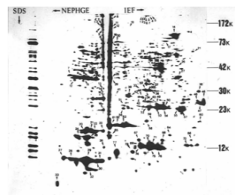
ASFV: Вирусни протеини

54 **структурни протеини** (11-243 kDa)

p72

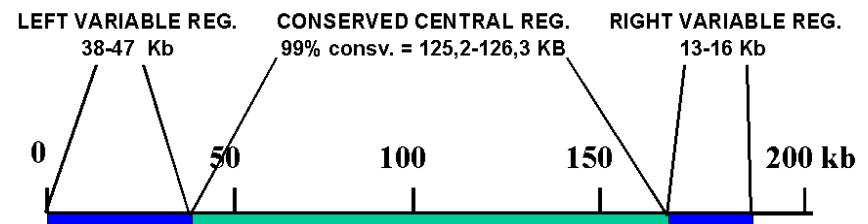
p54 и p32

pp62



100-124 **индуцирани протеини** в MAP или VERO клетъчни култури

ASFV: Геном



Линейна **ДНК** с големина между
170-200 kbp

АЧС въведение

Патогенеза и предаване на АЧС



Свинете са единствените домашни животни, които могат естествено да се заразят с вируса на АЧС.



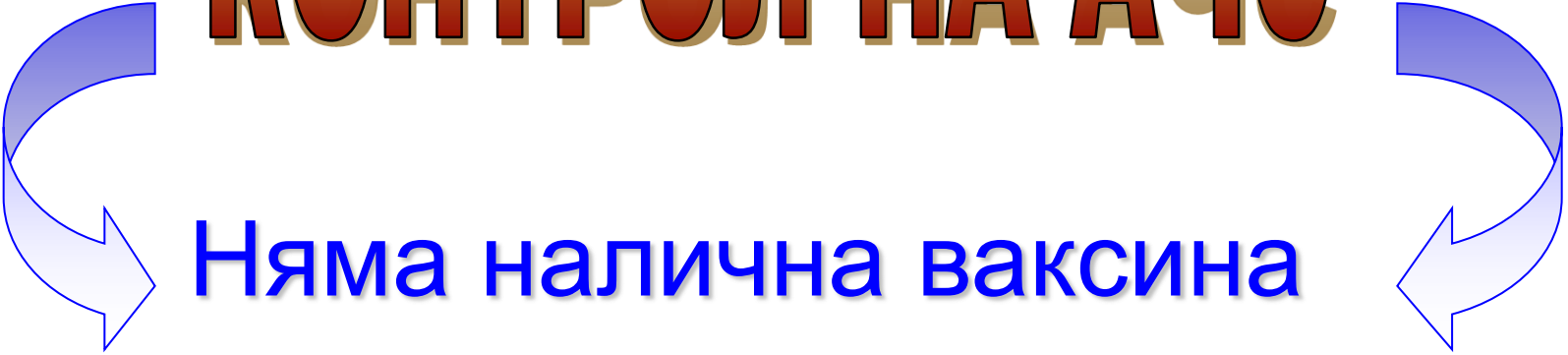
Биологични вектори

Кърлежи от род
Ornithodoros



АЧС въведение

КОНТРОЛ НА АЧС



Няма налична ваксина

Бърза клинична и лабораторна
диагноза и въвеждане на
стриктни санитарни мерки.

АЧС контрол

Основни критерии, които се вземат под внимание за **обявяването на стопанството за АЧС – съмнително стопанство.**

- (а) Клинични признаци и патологични изменения при прасетата;
- (б) Епидемиологични данни;
- (в) Лабораторни изследвания.



АЧС диагноза

ПОДОЗРЕНИЕ ЗА ХЕМОРАГИЧНО ЗАБОЛЯВАНЕ→

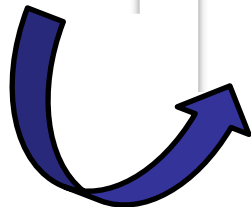
диференциална диагноза

Класическата чума по свинете (КЧС) не е възможно да се диференцира от АЧС чрез клинично или постмортално обследване.



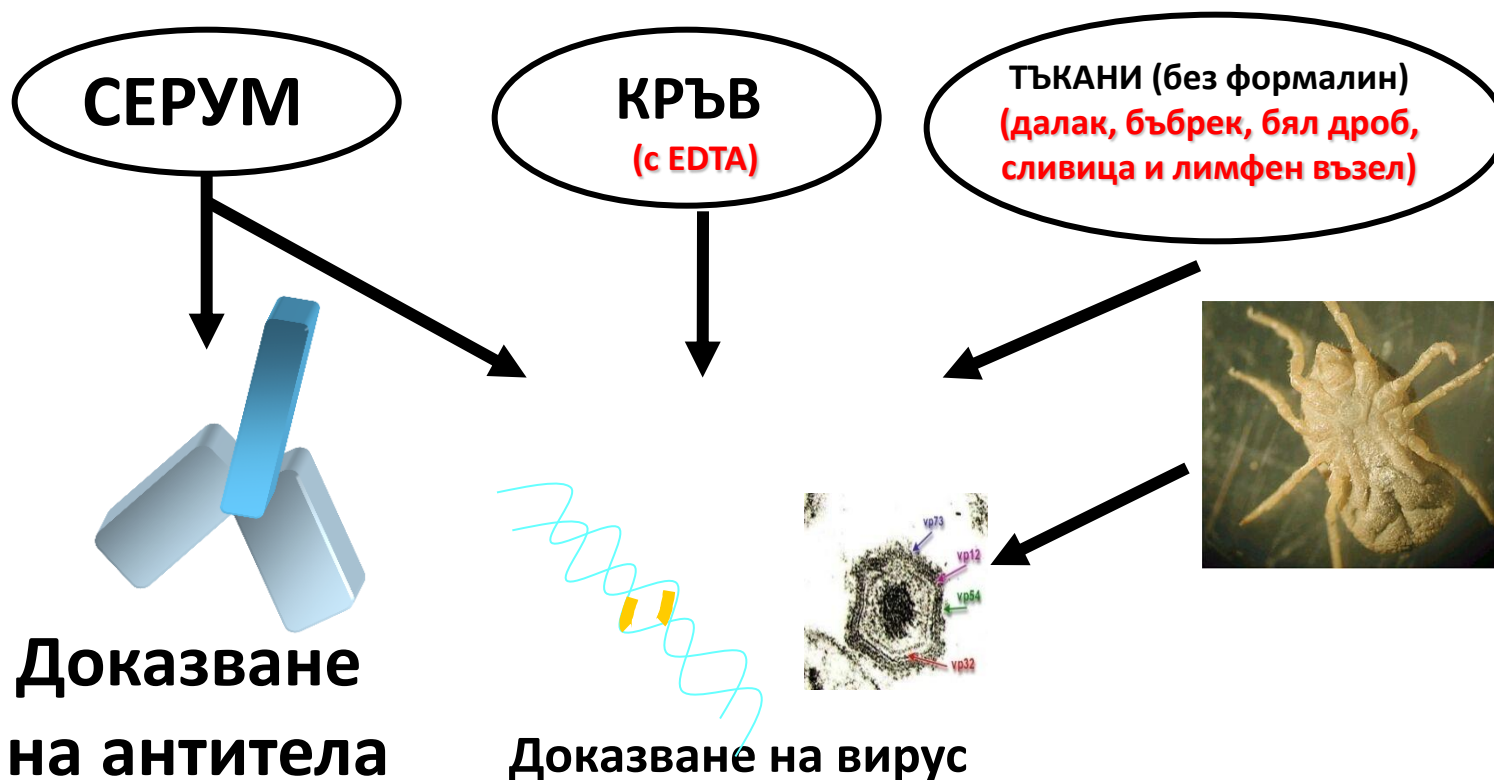
Пробовземане

**ЛАБОРАТОРНАТА
ДИАГНОЗА е основна за
контрола на АЧС**



АЧС ДИАГНОЗА

Правилни проби за диагностика на АЧС



Не е възможно да се проведе правилна диагностика с проби в лошо състояние.

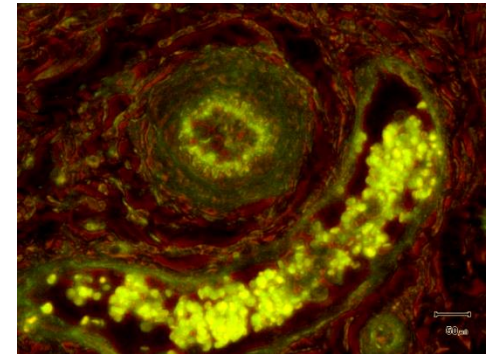
АЧС диагноза

*Принципи и приложение на **вирусологичните тестове** и интерпретация на резултатите*

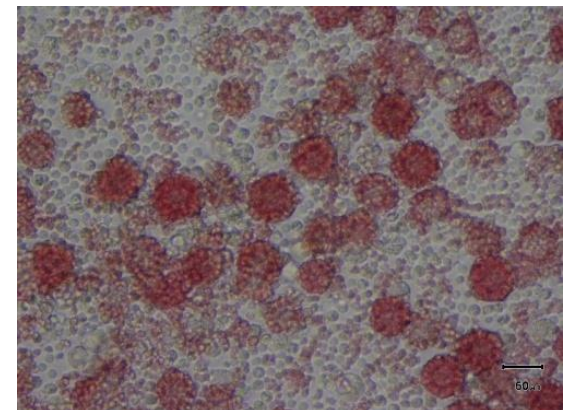
(А) Доказване на вирусен геном

(Б) Доказване на вирусни антигени

1. Директен имунофлуоресцентен тест (DIF)
2. ELISA за доказване на антиген



**(В) Вирусна изолация и
идентификация чрез
ХЕМАДСОРБЦИОНЕН ТЕСТ (HAD)**



АЧС диагноза

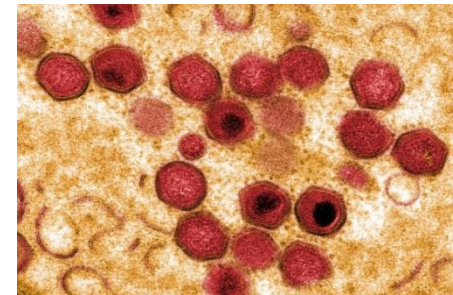
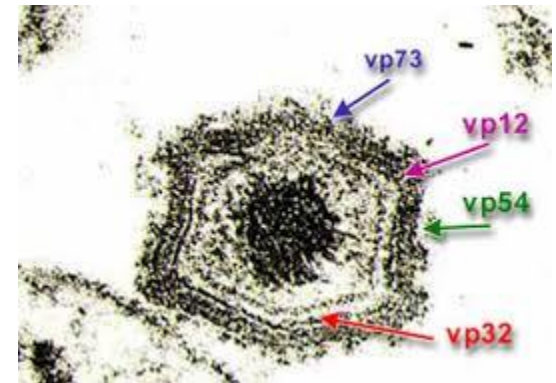
Подходящи проби

- *Кръв, събрана с EDTA или серум*

- Да се избягва употребата на хепарин.
- Пробата се анализира неразредена.

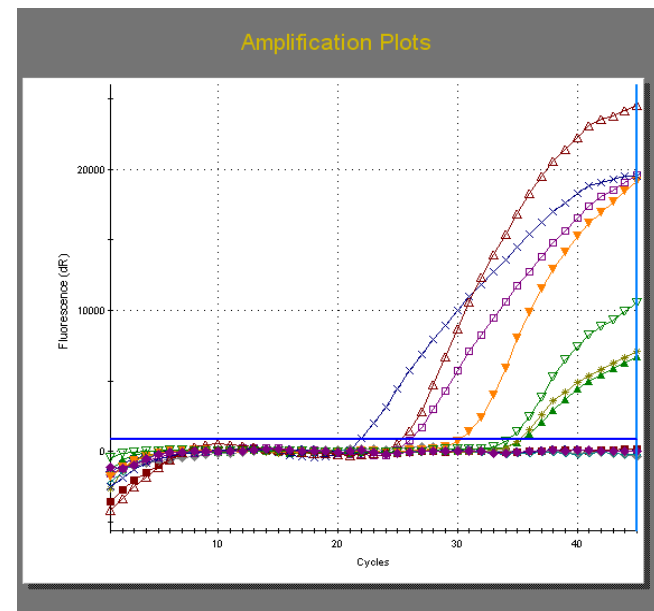
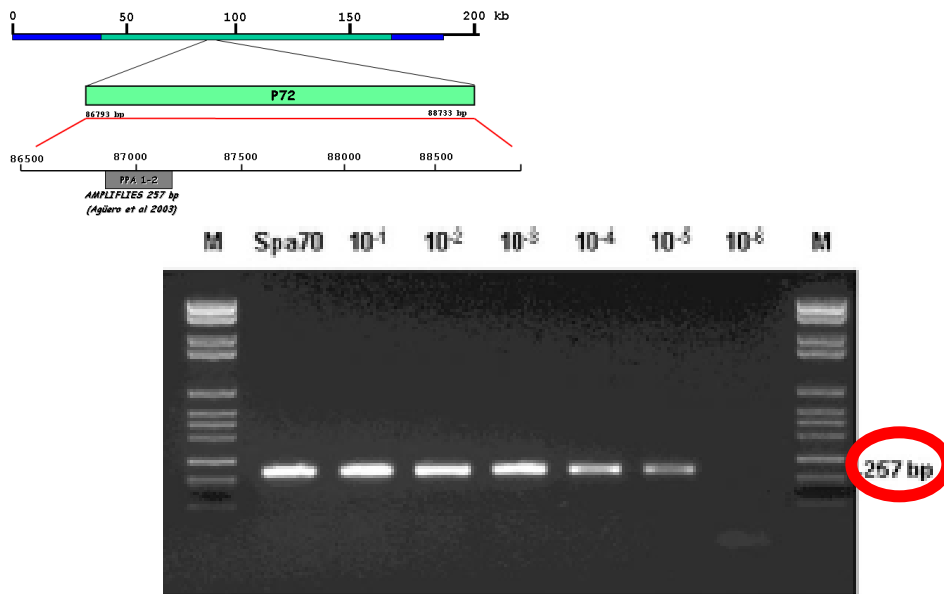
- *Органи:* далак, лимфни възли, тонзили, бъбрек, бял дроб.

- Приготвя се 1/10 хомогенат от материала във ФБР (PBS).
- Изследва се неразредена (или в разреждане 1/10) супернатантната течност след центрофугиране.



АЧС диагноза

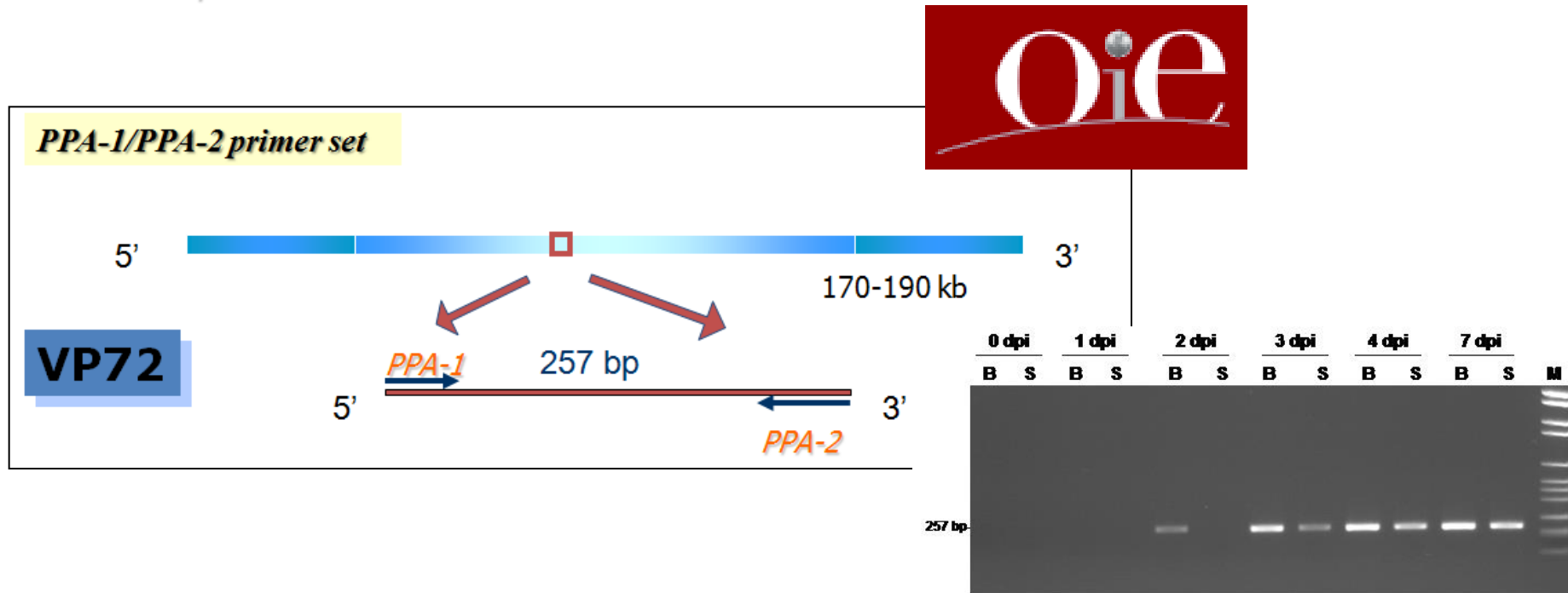
Доказване на геном → PCR



✓ Малки фрагменти от вирусната ДНК се амплифицират чрез PCR до откриваеми количества.

АЧС диагноза

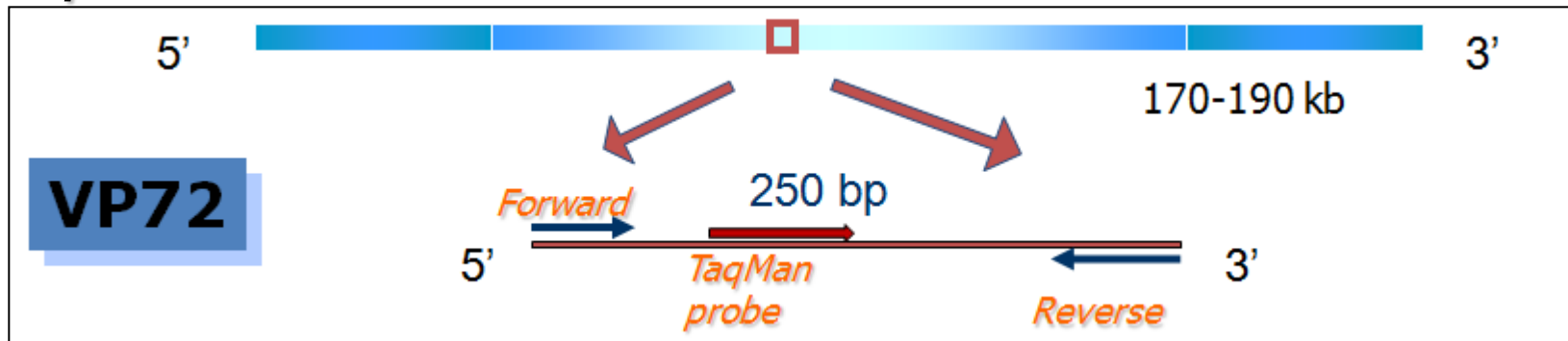
Конвенционален PCR



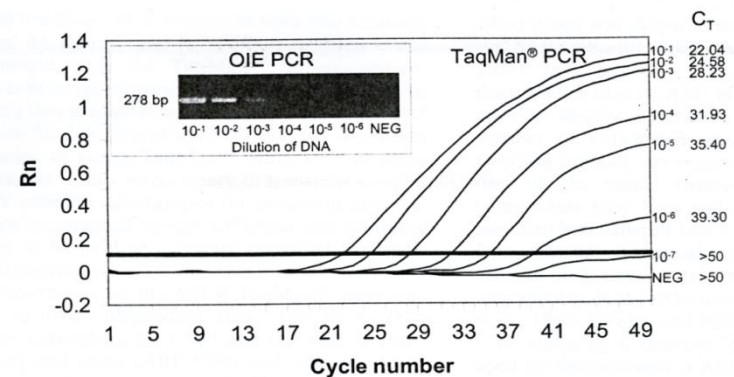
- Доказва широк спректър на ASFV изолати.
- Чувствителност под 1HADU_{50} за реакция.
- Широко приложение в НРЛ на ЕС.

АЧС диагноза

PCR в реално време



- Доказва широк спектър на ASFV изолати.
- Високо рентабилна за много проби наведнъж.
- Широко приложение в НРЛ на ЕС.



Праймери и TaqMan сонда: *King et al., 2003, J.Virol.Methods 107: 53-61*

АЧС диагноза

Предимства на PCR в диагностиката на АЧС:

- ✓Широк спектър от изолати, принадлежащи към всички известни генотипове на вируса, включително нехемадсорбиращите вируси и изолатите с ниска вирулентност, **могат да се докажат** чрез използване на праймери от високо консервативния регион на генома.
- ✓**Диференциална диагноза от CSFV** при всеки акутен фебрилен хеморагичен синдром при прасета.
- ✓PCR е успешен избор в случай на **хиперакутна, акутна или субакутна инфекция**
- ✓Тъй като този тест доказва само генетична секвенция на вируса, **PCR може да бъде положителен, дори когато няма доказан инфекциозен вирус чрез вирусна изолация.**
- ✓**Подходящи са всички видове клинични проби.** Особено приложим е, когато тъканите са **загнили.**

АЧС диагноза

АЧС/КЧС диференциална диагноза

- Няма ваксина

АЧС

Антитела = ИНФЕКЦИЯ

- Няма неутрализиращи антитела “според класическата концепция”
- Антитела от: 7-12 дни след заразяването.
Перзистират за дълъг период (години).
- Имуно-комплекс
Ag- Ab, ниска чувствителност на техниките за доказване на Ag

- Има ваксини

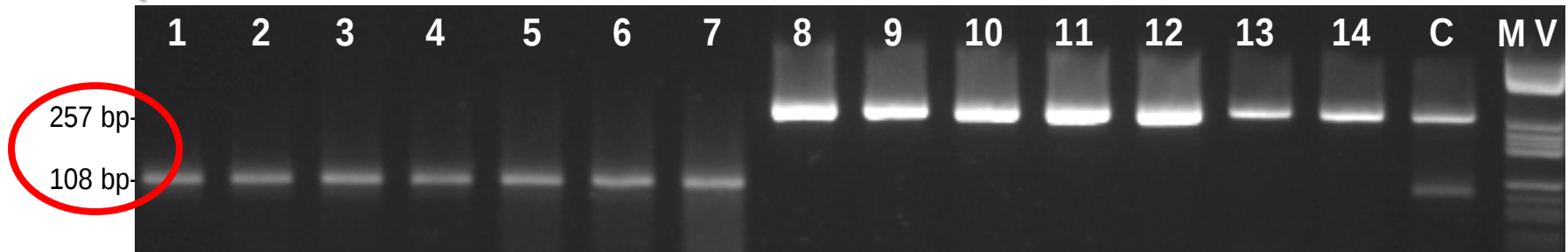
КЧС

- Индуцират се неутрализиращи антитела
- Антитела от:
14-24 дни след заразяването и перзистират за месеци.

Виремията започва рано след инфектирането и перзистира за дълъг период от време → Multiplex PCR

АЧС диагноза

MULTIPLEX CSFV / ASFV RT-PCR методи: *CSFV и ASFV диференциално доказване в клинични проби*



PPC-3/4 + PPA-1/2

3% агарозен гел

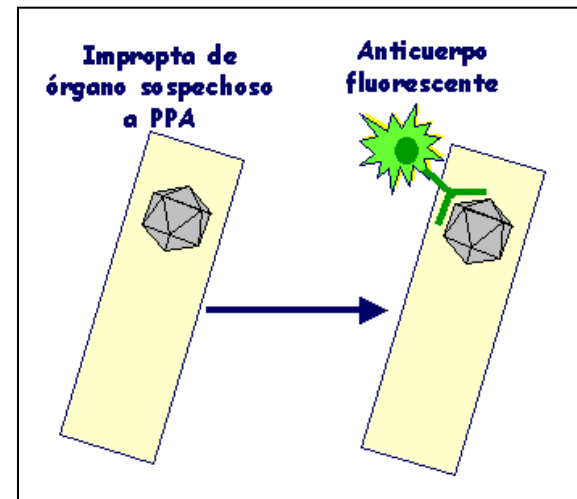
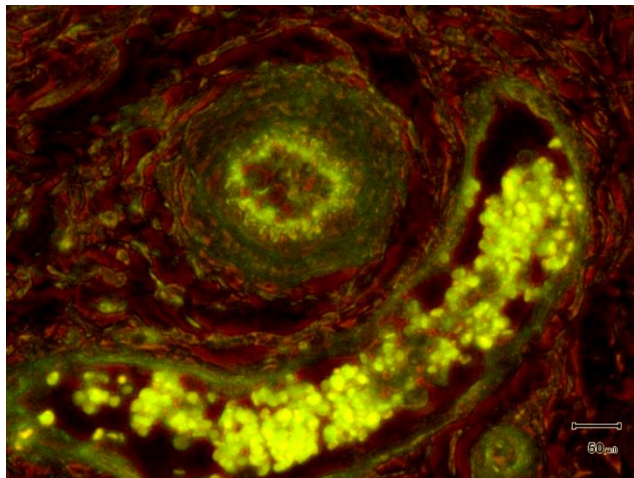
- 1-7: Проби от Испания2001 заразени с CSFV прасета. 1 и 2: Серум, 3: Кръв, 4: Бъбрек, 5: Лимфен възел, 6: Далак, 7: Тонзила.
- 8-14: Проби от Испания70 ASFV експериментално заразено прасе. 8: Кръв, 9: Далак, 10: Бъбрек, 11: Лимфен възел, 12: Серум, 13: Черен дроб, 14: Тонзила.
- C: Multiplex PCR положителна контрола.

Multiplex PCR, CSF чувствителност: 0.32 TCID₅₀/PCR

АЧС диагноза

1. Директен имунофлуоресцентен метод (DIF)

ПРИНЦИП → Принципът на теста е микроскопско доказване на вирусни антигени на отпечатъчни препарати или тънки криосрезове от органични материали от прасета, съмнителни да са били заразени с вируса на АЧС. Вътреклетъчните антигени се доказват с използването на FITC-конюгирани специфични антитела. ***В цитоплазмата на инфектираните клетки се наблюдават флуоресциращи inclusion телца или гранули.***



АЧС диагноза

1. Директен имунофлуоресцентен тест (DIF)

ПРАВИЛНИ ПРОБИ → бъбрек, далак и различни лимфни възли.

Тестът е **високочувствителен** за случаи на **остра форма** на АЧС.

За **субакутна** или **хронична форми**, DIF показва **чувствителност** **едва около 40 %**, вероятно поради присъствието на антиген-антителни комплекси, които блокират реакцията с АЧС-конюгираното антитяло.

АЧС диагноза

2. ELISA за доказване на антиген

✓Препоръчва се единствено **за остра форма** на заболяването поради ниската му чувствителност в присъствие на антиген-антителни комплекси.

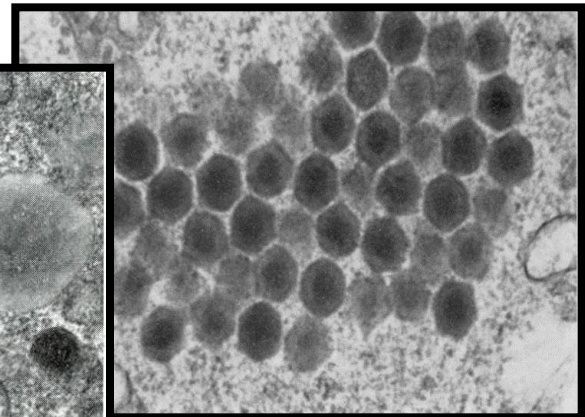
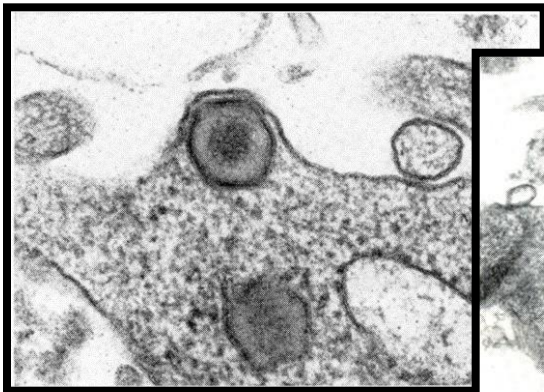
✓**Чувствителността на антиген-ELISA** може **се повиши и** да доказва положителни резултати при животни, показващи клинични признаци при остра форма на АЧС.

✓При всички случаи се препоръчва **използване на този тест само за 'стадна' диагностика** и при сравнително изпитване с другивирусологични тестове.

АЧС диагноза

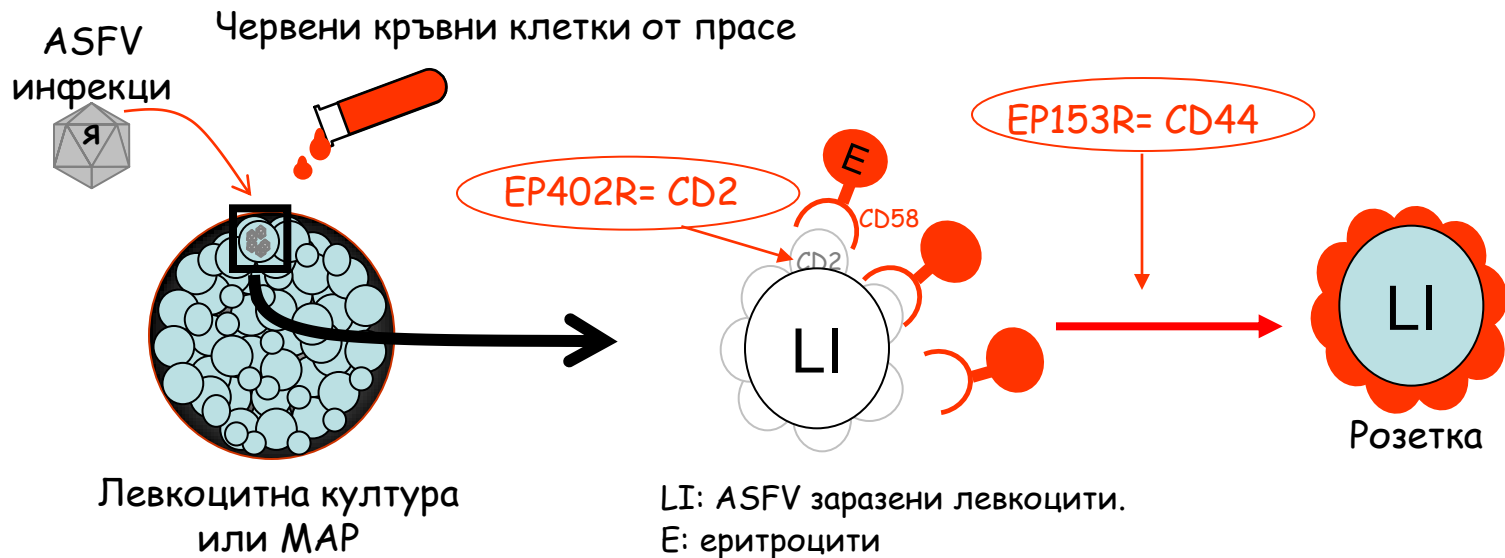
ИЗОЛАЦИЯ НА ВИРУСА

ПРИНЦИП → Вирусната изолация се основава на заразяване с материал от проби на чувствителни първични клетъчни култури от свински произход, моноцити и макрофаги. Ако вирусът на АЧС присъства в пробата, той ще се размножи в клетките и в заразените клетки ще се наблюдава характерен **цитопатичен ефект (CPE)**.



АЧС диагноза

ХЕМАДСОРБЦИОНЕН ТЕСТ (HAD)



Хемадсорбцията представлява прикрепване на голям брой свински еритроцити по повърхността на заразени клетки. HAD техниката се препоръчва за идентификация на вируса на АЧС поради **високата му чувствителност и специфичност**.

АЧС диагноза

ВИРУСНА ИЗОЛАЦИЯ И ХЕМАДСОРБЦИОНЕН ТЕСТ (HAD)

Вирусната изолация и идентификация с HAD са препоръчителни като **референтен тест за потвърждаване на положителни резултати от ELISA, PCR или DIF**. Същите се препоръчват в случай, че АЧС е била вече потвърдена с други методи, особено в **случай на първично огнище или случай на АЧС**.

АЧС диагноза

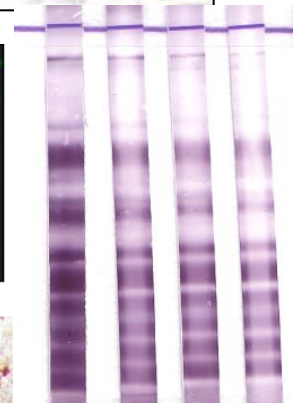
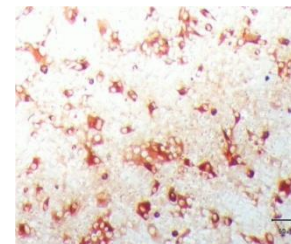
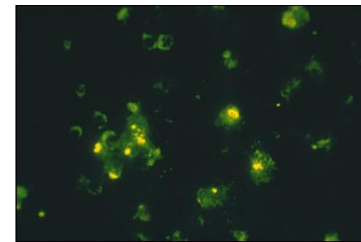
Принципи и приложение на **методи за доказване на антитела** и интерпретация на резултатите

(А) Скрининг с ELISA

1. OIE-ELISA (Индиректна ELISA)
2. INGENASA-ELISA (Блокираща ELISA)

(В) Потвърдителни тестове

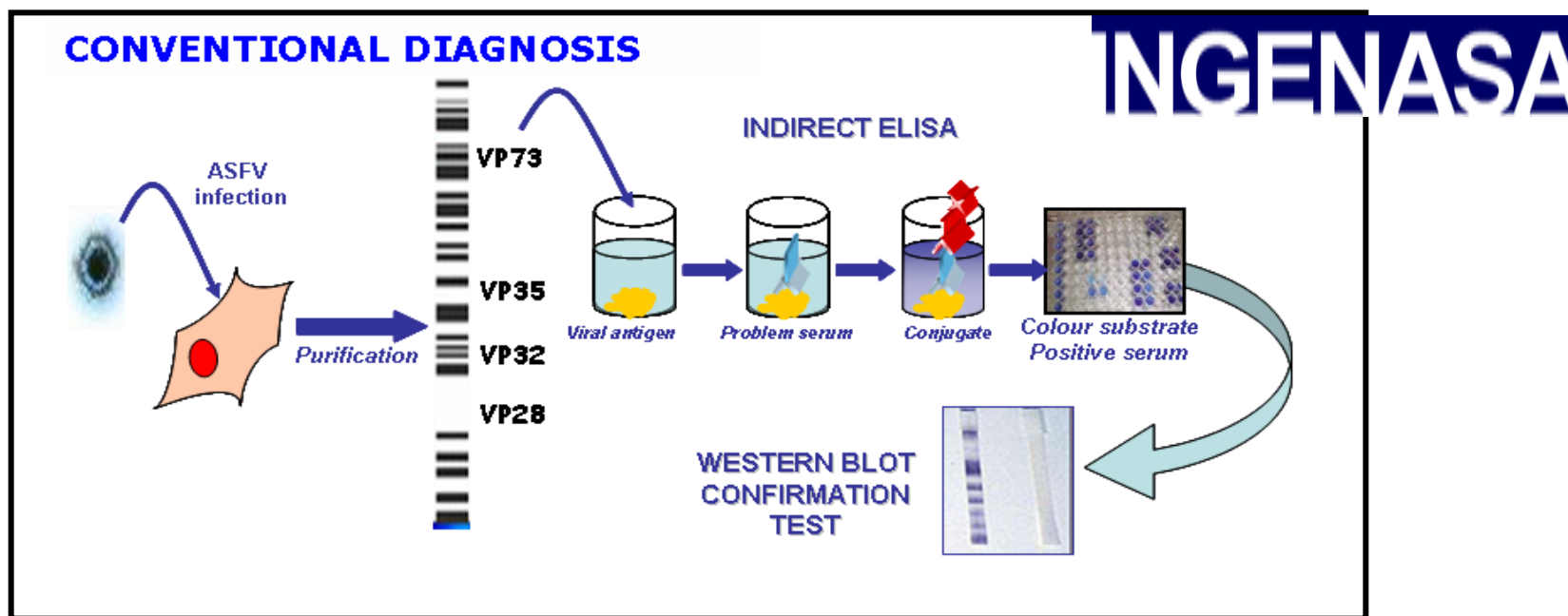
1. Имуноблот (IB)
2. Имунопероксидазен тест (IPT)
3. Индиректен имунофлуоресцентен тест (IFI)



АЧС серологична диагноза



Методи за доказване на антитела



ELISA е най-широко прилагания и удобен тест за широкомащабни серологични проучвания.

АЧС диагностични процедури



Препоръчителни серологични тестове

Имуноблот (IB) и индиректен имунофлуоресцентен метод (IIFT)
или имунопероксидазен тест (IPT) → **ПОТВЪРДИТЕЛНИ АЧС**
СЕРОЛОГИЧНИ МЕТОДИ

Използват се за потвърждение
на съмнителни и положителни
при ELISA серуми

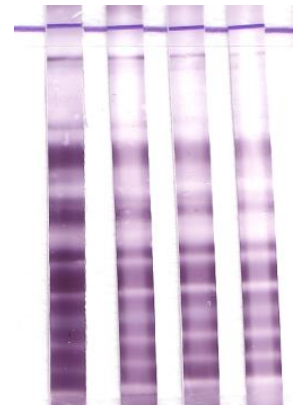


АЧС диагностични процедури

ИМУНОБЛОТ → основното за метода

АЧС вирусни протеини, електрофоретично сепарирани върху PAGE (полиакриламидни гелове), се преместват с постоянен интензитет върху нитроцелулозен филтър и се нарязват на ленти, съдържащи IP15, IP 23.5, IP 25, IP 25.5, IP 30, IP 31, IP 34 и IP 35.

Тези протеини непроменливо реагират
чрез имуноблот **при всички**
заразени животни.

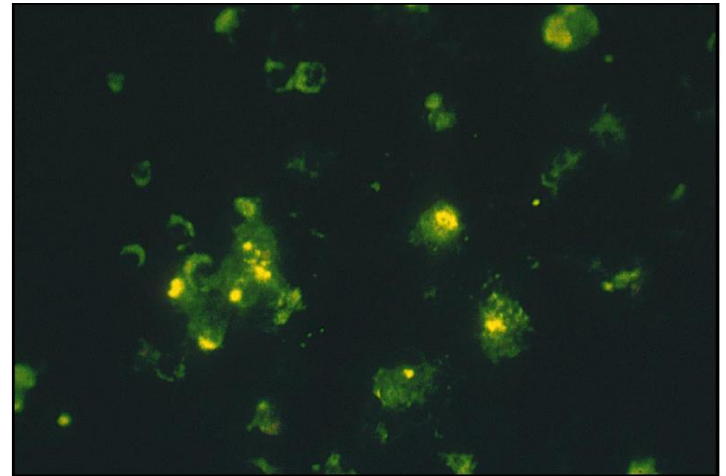


АЧС диагностични методи

Индиректен имунофлуоресцентен метод

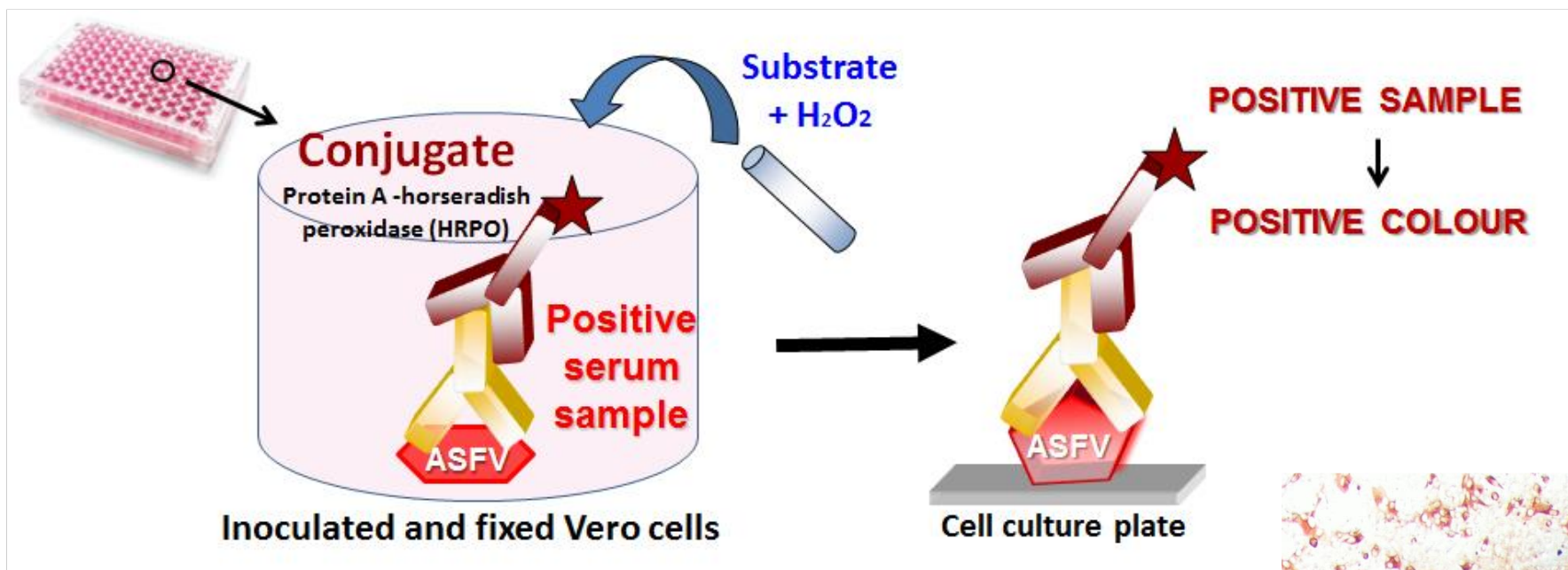
Основан е на откриването на АЧС антитела, свързани върху монослой на MS клетки, инфектирани с адаптиран АЧС вирус. Реакцията антиген-антитяло се доказва чрез белязан флуоресцеин А-протеин. Положителните проби показват специфична флуоресценция около ядрото на заразените клетки.

IIFT е **бърза техника с висока чувствителност** и специфичност за доказване на АЧС антитела в серуми или тъканни ексудати.



АЧС серологична диагноза

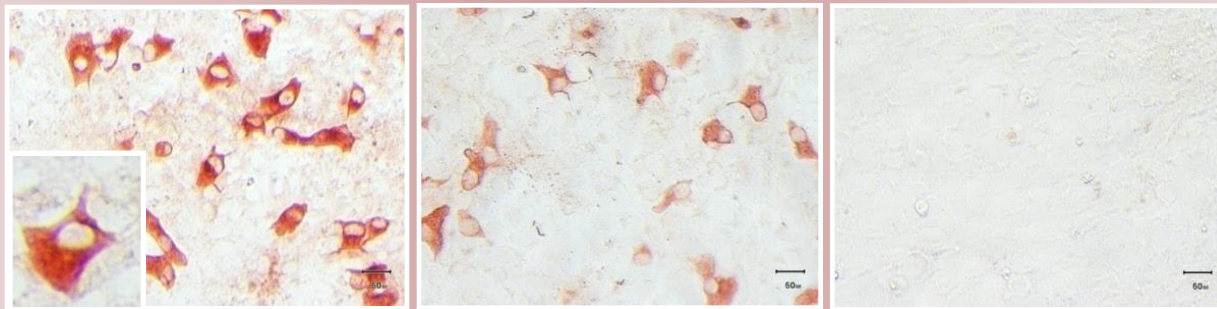
Имунопероксидазната техника (IPT) е имуноцитохимична техника върху фиксирани клетки за детерминиране на антиген-антителен комплекс чрез действие на пероксидазен ензим.



АЧС серологична диагноза

ПРЕДИМСТВА НА ИМУНОПЕРОКСИДАЗНАТА ТЕХНИКА

1. Висока специфичност и чувствителност;
2. По-лесна интерпретация на резултатите *(в сравнение с индиректната имунофлуоресценция)*;
3. Анализи на голямо количество серуми *(88 серумни проби в една плака)*.



АЧС серологична диагноза

Доказването на АЧС-специфични антитела е основно при контрола на заболяването. Методът се препоръчва особено **за субакутни и хронични форми, а също така за широкомащабни изследвания и **АЧС програми за ерадикация и контрол**.**

Правилната интерпретация на резултатите от серологичните тестове трябва да се извършва, имайки предвид всички **клинични, вирусологични и епидемиологични находки.**

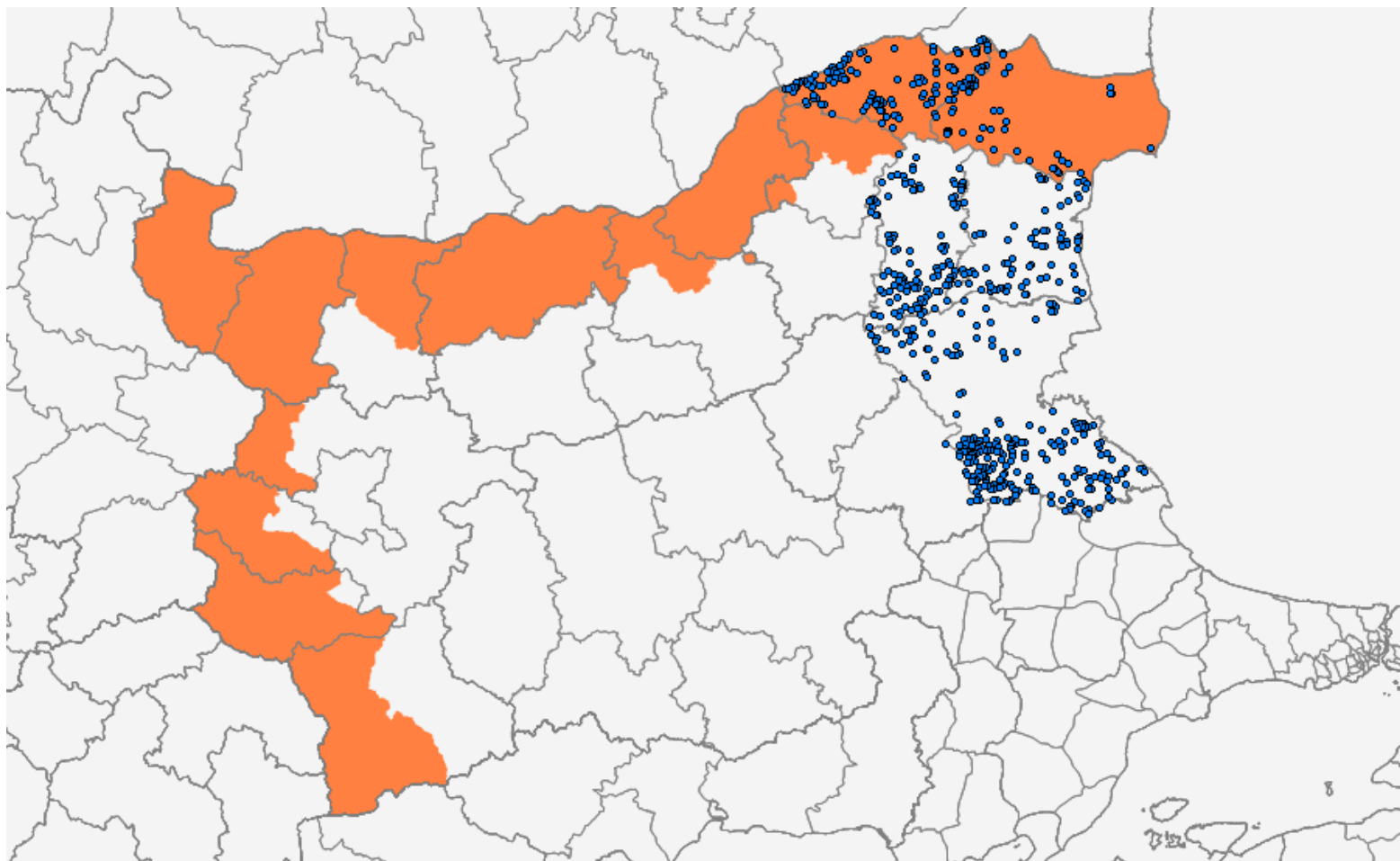
АЧС диагностична стратегия

ВИНАГИ ДА СЕ ПОМНИ!!!!

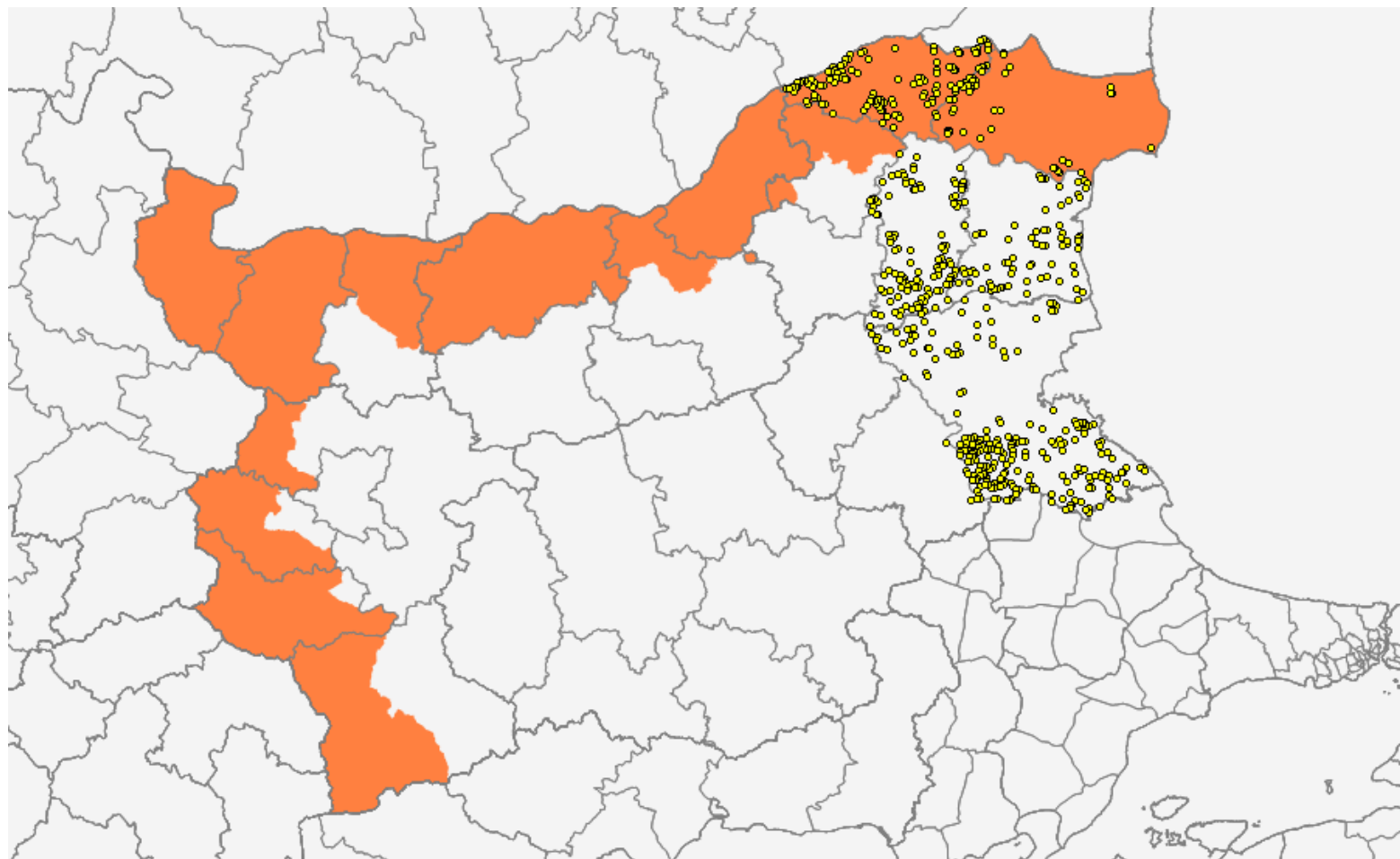
Правилната АЧС диагноза трябва да включва паралелно:

1. **СЕРОЛОГИЧНА ДИАГНОЗА** за определяне **присъствието на антитела** срещу вируса на АЧС (ELISA + IB-IIF или IPT).
2. **ВИРУСОЛОГИЧНА ДИАГНОЗА** за определяне **присъствието на вируса на АЧС или нуклеиновата му киселина** (PCR/DIF + Вирусна изолация)

АЧС – диви свине – серологични изследвания



АЧС – диви свине – молекулярно-биологични изследвания



Благодаря за вниманието!

