ახლადაღმოჩენილი ორთოპოქს ვირუსის (OPXV) გავრცელების შესწავლა შინაურ ცხოველებში

ანა კაპანაძე - გამოყენებითი გენეტიკის მაგისტრი,
ანა გულბანი - სოფლის მეურნეობის მეცნიერების მაგისტრი,
თამარ თიღილაური - ვეტერინარიის მეცნიერებათა ბაკალავრი,
მაკა კოხრეიძე - ვეტერინარიის მეცნიერებათა ბაკალავრი,
ლამარა გელაშვილი - ვეტერინარიის მეცნიერებათა დოქტორი,
ოთარ პარკაძე - ვეტერინარიის მეცნიერებათა ბაკალავრი,
მარინა დონდუაშვილი - სოფლის მეურნეობის მეცნიერებათა დოქტორი

საკვანძო სიტყვები: ახალი ორთოპოქს ვირუსი, პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (PCR), დაავადებაზე ზედამხედველობა.

რეფერატი

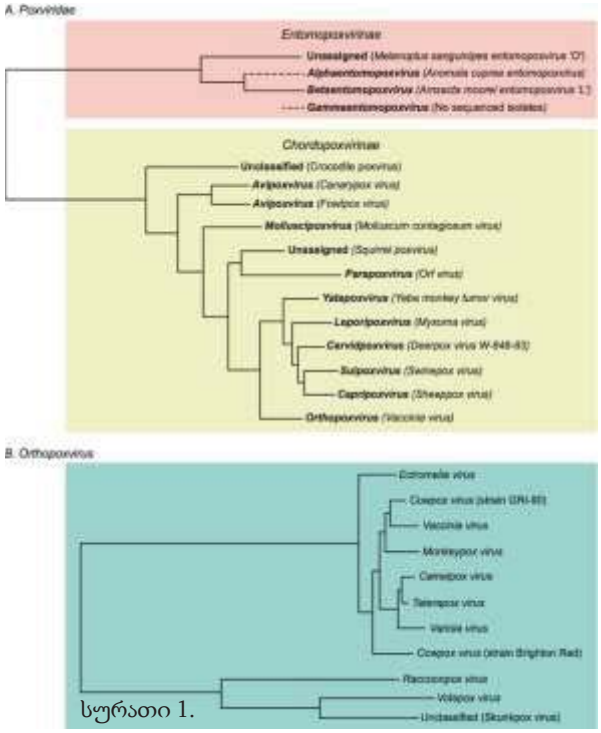
ორთოპოქს ვირუსი (OPXV) დნმ შემცველი ვირუსების *oxviridae*-ს ოჯახის წარმომადგენელია, რომელიც იწვევს დაავადებას ხერხემლიან ორგანიზმებში მათ შორის ადამიანში. საქართველოში OPXV გავრცელება პირველად 1986 წელს იქნა შესწავლილი, წვრილ ძუძუმწოვრებში; 2013 წელს კი ორი ინფიცირებული ადამიანიდან მოხდა ახალი OPXV სახეობის – "ახმეტა ვირუსის" გამოყოფა.

გარდა საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის საფრთხეებისა OPX ვირუსების გავრცელება ქმნის რისკს აგრარული ეკონომიკის მხრივ. ჩვენი პროექტის მთავარ მიზანს წარმოადგენდა საქართველოში გავრცელებული OPX ვირუსების ამოცნობის, დიაგნოსტირების და საეჭვო შემთხვევების შეტყობინების მექანიზმების დანერგვა და ვირუსის გავრცელების შესწავლა შინაურ ცხოველებში. ამისათვის, აშშ-ს დაავადებათა კონტროლის ეროვნულ ცენტრთან (CDC, Atlanta) თანამშრომლობით, სურსათის ეროვნული სააგენტოს (NFA) ვეტერინარები გადამზადდნენ ვირუსის ამოცნობის და ზედამხედველობის მეთოდების წარმართვაში. სოფლის მეურნეობის სახელმწიფო ლაბორატორიაში (SLA) დაინერგა და მოხდა ვალიდაცია ვირუსის სადიაგნოსტიკო ტესტების.

პროექტის ფარგლებში საქართველოს სხვადასხვა რეგიონიდან მსხვილი რქოსანი პირუტყვიდან აღებული იქნა 3549 სისხლის, რძის, ნაცხის/ფუფხის ნიმუში; პროექტის მიმდინარე ეტაპამდე ტესტირებულ იქნა 1659 ნიმუში OPXVIgG ანტისხეულების აღმომჩენი ELISA და Orthopoxvirus Generic Real–Time PCR მეთოდების საშუალებით. შეგროვებული ნიმუშების კვლევა გრძელდება ვირუსის პრევალენტობის სრულფასოვანი შესწავლის მიზნით.

შესავალი

პოქს ვირუსების ოჯახი (Poxviridae) წარმოდგენილია დიდი ზომის ორჯაჭვიან დნმ შემცველი ვირუსებით, რომლებიც რეპლიცირდებიან მასპინძელი ორგანიზმის უჯრედების ციტოპლაზმაში. დღემდე სექვენირებული პოქს ვირუსების (POXV) გენომის ზომა მერყეობს 135-360 კილობაზამდე (Hughes and Friedman 2005)



სურათი 1.

POXV მასპინძელი ორგანიზმების მიხედვით იყოფიან ორ სუბოჯახად ესენია: *Chordopoxvirinae*, რომლებიც აინფიცირებენ ხერხემლიანებს და *Entomopoxvirinae*, რომლთა ძირითად მასპინძელს წარმოადგენენ მწერები. ხერხემლიანების POX ვირუსების (*chordopo–xvirinae*) ქვეოჯახში გაერთიანებულია OPX ვი–რუსების (*Orthopoxvirus*) გვარი, რომელიც თავის მხრივ წარმოდგენილია შემდეგი სახე–ობებით: *Camelpox virus (CMLV)), Cowpox virus (CPXV), Ectromelia virus (ECTV), Monkeypox virus (MPXV), Taterapox virus (TATV), Vaccinia virus (VACV), Uasin Gishu virus,Variola virus (VARV), Racconnpox virus (RNCV), Skunkpox virus (SKPV), Volepox virus (VPXV)* (სურათი 1).

მიუხედავად იმისა, რომ კარგად არის შესწა-ვლილი აქამდე ცნობილი OPX ვირუსების (OPXV) სახეობების გენეტიკა, ინფორმაციის ნაკლებობაა მათ ზუსტ გეოგრაფიულ გავრცე-ლებაზე, ბუნებრივ რეზერვუარსა და მასპინძელი ორგანიზმების დიაპაზონზე (Haller et al. 2014).

პოქს ვირუსული დაავადება შეიძლება მიმდინარეობდეს შედარებით მსუბუქად წყლულოვანი დაზიანებებით, ლოკალიზებული კანზე ან მწვავე ხასიათის სისტემური ინფექციის სახით. შე-საბამისად, ინფექცია საწყის ეტაპზე ლოკალიზდება კანზე, ლორწოვანი გარსებზე ან რესპი-რატორულ ტრაქტში, რის შემდეგაც ვირუსი გადაინაცვლებს ლიმფატიკურ ქსელში და იწყება პირველადი ვირემია (Fenner, Wittek, and Dumbell 1989).

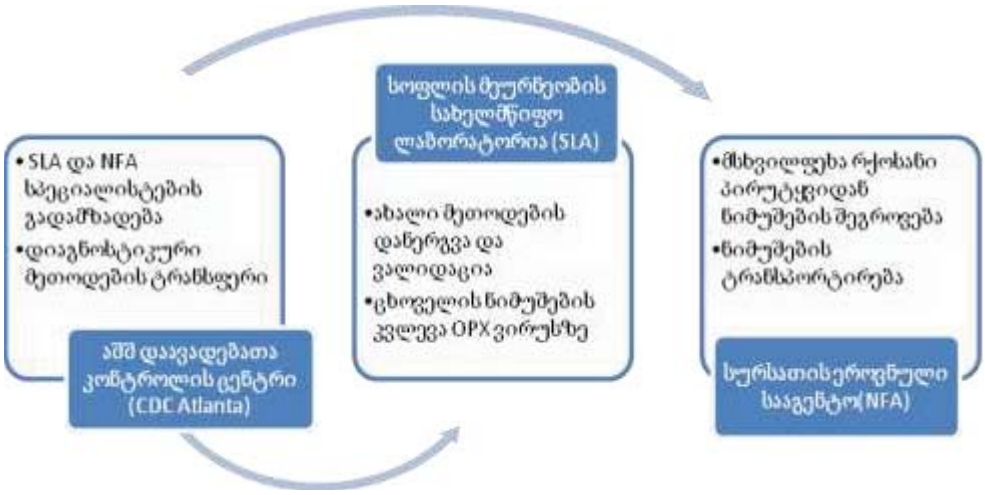
ვარიოლა ვირუსით (VARV) გამოწვეული დაავადება Smallpox, ე.წ ყვავილი, ცნობილია რო-გორც ყველაზე მომაკვდინებელი დაავადება კაცობრიობის ისტორიაში, რომელმაც მხოლოდ მე-20 საუკუნის მანძილზე 500 მილიონამდე ადამიანის სიცოცხლე იმსხვერპლა. 1980-იან წლე–ბში ე.წ ყვავილის ვირუსის ერადიკაციის პროგრამა წარმატებით დასრულდა ჯანდაცვის მსო–ფლიო ორგანიზაციის მიერ მსოფლიო მასშტაბით წარმართული ვაქცინაციის საფუძველზე (Thèves, Biagini, and Crubézy 2014).

მოგვიანებით, მსოფლიოს მასშტაბით გავრცელდა ახალი, ე.წ არა-ვარიოლა (non-Variola), OPX ვირუსები. უკანასკნელ წლებში ორი ახალი სახეობის OPXV იდენტიფიცირდა ევროპაში და ერთი ჩრდილოეთ ამერიკაში (Osadebe et al. 2015). 2015 წელს ახალი ე.წ აბატინო ვირუსი (OPVA) დაფიქსირდა იტალიაში და ამავე წელს ალასკაზე, ადამიანში ვირუსული ინფექციის გამომწვევ აგენტად დადგინდა ახალი სახეობის OPXV(AK2015) (Gigante et al. 2019; Gruber et al. 2018).

2013 წელს საქართველოში, ქალაქ ახმეტაში დაფიქსირდა OPX ვირუსზე კერძოდ კი Cowpox ვირუსზე საეჭვო შემთხვევა, ორ პაციენტში, რომლებსაც ჰქონდათ მჭიდრო კავშირი მსხვი-ლფეხა რქოსან პირუტყვთან. შესაბამისი სეროლოგიური და მოლეკულურ-ბიოლოგიური (სექვე-ნირება) კვლევების საფუძველზე დადგინდა, რომ აღნიშნული შემთხვევა ორივე პაციენტში გა-მოწვეული იყო ახალი OPX ვირუსის სახეობით, რომელსაც „ახმეტა ვირუსი“ ეწოდა (Anon n.d.; Vora et al. 2015). მოგვიანებით „ახმეტა ვირუსი“ გამოყოფილ იქნა საქართველოში გავრცელე–ბული მინდვრის თაგვების ორ სახეობაში: *A. uralensis da A. flavicollis* (Doty et al. 2019). OPX ვირუ–სების გავრცელება საქართველოში პირველად აღწერილი იყო წვრილ ძუძუმწოვრებში შ. ცა–ნავას მიერ, 1986 წელს (Tsanava et. Al. 1989).

„ახმეტა ვირუსის“ თავდაპირველი იდენტიფიკაცია გართულებული იყო შესაბამისი სადია–გნოსტიკო და ზედამხედველობითი საშუალებების არ არსებობით ქვეყანაში. OPX ვირუსების საქართველოში გავრცელებაზე არასრულფასოვანმა ინფორმაციამ ცხადყო ქვეყანაში ვირუსზე

ზედამხედველობის, ვირუსულ ინფექციაზე საეჭვო შემთხვევების შეტყობინების და სადიაგნოსტიკო მეთოდების დანერგვის აუცილებლობა. მითუმეტეს, რომ ისეთი ზოონოზური დაავადებები როგორიცაა OPX ვირუსული ინფექცია, წარმოადგენენ უდიდეს რისკს, როგორც საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის, ისე აგრარული ეკონომიკის მხრივ. კერძოდ, საქართველოში ყველის წარმოების ტექნოლოგიები მსგავსია ბრაზილიაში გავრცელებულ მეთოდების, სადაც ჩატარებული კვლევისას ნედლი რძიდან გამოიყო სიცოცხლისუნარიანი ვაქცინია ვირუსი (VACV) (Natas et al. n.d.). მომდევნო კვლევების საფუძველზე კი დადგინდა, რომ ინფექციური ვირუსი უძლებს თერმულ დამუშავებას და შესაბამისად აქვს უნარი შეინარჩუნოს სიცოცხლის უნარიანობა საკვებ პროდუქტში, ამ შემთხვევაში ყველში (Rcia et al. n.d.). შესაბამისად ამ ვირუსების შესწავლის საკითხი წარმოადგენს როგორც აგრარულ ისე საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ინტერესს.



დიაგრამა 1. კვლევის ალგორითმი.

ქვეყანაში ახალი OPX ვირუსის გავრცელების შესწავლის მიზნით სოფლის მეურნეობის სახელმწიფო ლაბორატორიამ (SLA) და დაავადებათა კონტროლის ეროვნულმა ცენტრმა (NCDC) „ერთიანი ჯანრთელობის" ინიციატივის საფუძველზე სურსათის ეროვნულ სააგენტოსა (NFA) და ამერიკის დაავადებათა კონტროლის ეროვნულ ცენტრთან (CDC, Atlanta) თანამშრომლობით, წამოიწყეს პროექტი, რომლის ფარგლებშიც ხორციელდება წყლულოვანი დაავადებების გამომწვევი OPX ვირუსების იდენტიფიცირების და დიაგნოსტირებისთვის საჭირო მეთოდოლოგიის დანერგვა და ვირუსის გავრცელებაზე ზედამხედველობა (დიაგრამა 1).

კვლევის მასალა და მეთოდები

ნიმუშების შეგროვება და პირველადი დამუშავება

სურსათის ეროვნული სააგენტოს მიერ მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვიდან ბიოლოგიური მასალის შეგროვება განხორციელდა აქტიური ზედამხედველობის ფარგლებში, აღმოსავლეთ საქართველოს 29 მუნიციპალური ერთეულის 160 სოფელში. დამატებით, საქართველოს მასშტაბით 20 მუნიციპალიტეტიდან ნიმუშები აღებული იქნა OPXV დაავადებაზე საეჭვო შემთხვევებზე მომართვიანობის შედეგად.

აქტიური ზედამხედველობის ფარგლებში თითოეული ცხოველიდან ინფექციის ნიშნების არსებობის ან არ არსებობის მიუხედავად აღებულ იქნა სისხლის ნიმუში; რძის ნიმუშები შეგროვებულ იქნა მხოლოდ გარკვეულ შემთხვევებში, ხოლო ნაცხის/ფუფხის აღება განხორციელდა პირუტყვიდან, რომლებშიც გამოვლენილი იყო ინფექციის ნიშნები (სურ.2). შესაბამის სატრანსპორტო კონტეინერებში შეფუთული ნიმუშები მიეწოდა სოფლის მეურნეობის

სახელმწიფო ლაბორატორიას. საკვლევ მასალას თან ახლდა ეპიდემიოლოგიური მოკვლევისფორმები, რომლებიც მოიცავდა ყველა საჭირო ინფორმაციას ნიმუშზე.

სურათი 3. სისხლის და რძის ნიმუშების შეგროვება მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვიდან

მიღებული ნიმუშების ელექტრონულ ინტეგრირებულ ზედამხედველობის სისტემაში (EIDSS) დარეგისტრირების შემდეგ, სისხლის ნიმუშებიდან განხორციელდა შრატის გამოყოფა და ე.წ ალიქვოტების მომზადება, რომლთა ნაწილი გაიგზავნა ფუნქციურ ლაბორატორიაში, ტესტირებისთვის, ნაწილი კი ინახებოდა -30ºC ტემპერატურაზე. ნაცხის/ფუფხისა და რძის ნიმუშების კვლევა განხორციელდა OPXV PCR მეთოდით, ალიქვოტების ნაწილი ინახებოდა -80 C-ზე. ნიმუშების პირველადი დამუშავება და დიაგნოსტიკური ტესტირებები ჩატარდა სტანდარტული ოპერაციული პროცედურების(SOPs) მიხედვით, რაც შემუშავებული და დამტკიცებული იყო ბიოუსაფრთხოების შესაბამისი პროცედურების დაცვით.

ლაბორატორიული კვლევები

ნიმუშების კვლევა განხორციელდა სეროლოგიური და მოლეკულურ-ბიოლოგიური მეთოდებით, რომელთა პროტოკოლიც შემუშავდა და დაინერგა ამერიკის დაავადებათა კონტროლის ცენტრთან (CDC) თანამშრომლობით.

ენზიმდაკავშირებული იმუნოფერმენტული ანალიზის (Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)) საშუალებით ცხოველიდან გამოყოფილი შრატის ნიმუშებში მოხდა ანტი-Orthopoxvirus IgG ანტისხეულების არსებობის დადგენა.

ნაცხის/ფუფხის და რძის ნიმუშებიდან კი განხორციელდა ვირუსული დნმ-ის გამოყოფა კომერციული ნაკრებების - Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit და Wizard Plus SV Minipreps- გამოყენებით, მწარმოებლის მითითებების შესაბამისად.

რძის, ნაცხის/ფუფხის ყველა ნიმუშის ტესტირება მოხდა OPX ვირუსის აღმომჩენი რეალურ დროში პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის საშუალებით (Orthopoxvirus Generic Real–Time PCR Assay; Li et al. 2007).

თითოეული ნიმუშის კვლევა განხორციელდა წყვილში, უარყოფით კონტროლად გამოყენებულ იქნა ე.წ მასტერ მიქსი და წყალი; დადებითი კონტოროლები კი მოწოდებული იქნა CDC Atlanta– ს მიერ.

შედეგები და დისკუსია

პროექტის ფარგლებში, ამერიკის შეერთებული შტატების დაავადებათა კონტროლის ცენტრთან თანამშრომლობით, სურსათს ეროვნული სააგენტოს ვეტერინარები გადამზადდნენ OPXV დაავადების ამოცნობის, საეჭვო შემთხვევების დაფიქსირების დაზედამხედველობის ღონისძიებების დაგეგმვასა და განხორციელებაში. სოფლის მეურნეობის სახელმწიფო ლაბორატორიის ბაზაზე დაინერგა OPX ვირუსის დიაგნოსტირების სეროლოგიური და მოლეკულურ ბიოლოგიური მეთოდები. ასევე, სოფლის მეურნეობის სახელმწიფო ლაბორატორიამ და პროექტის წამყვანმა სპეციალისტებმა ჩაატარეს ტრენინგები დაქვემდებარებულ რეგიონალურ

ლაბორატორიებში (გურჯაანი, მარნეული, დუშეთი, გორი, ამბროლაური, ქუთაისი, ზუგდიდი, ბათუმი, ოზურგეთი და ახალციხე). ხსენებული რეგიონალური ლაბორატორიების ხელმძღვანელობასა და პერსონალს მიეწოდა ინფორმაცია OPX ვირუსის დიაგნოსტირების მეთოდების, პათოგენთან მუშაობისას გასათვალისწინებელი ბიოუსაფრთხოების ზომების და პროექტის ფარგლებში დაგეგმილი აქტივობების შესახებ.

პროექტის მიმდინარეობის მანძილზე საქართველოს რეგიონებიდან კერძოდ, 8 სხვადასხვა რეგიონის 20 მუნიციპალური ერთეულიდან, დაფიქსირდა POXV ინფექციაზე საეჭვო შეტყობინებები ადგილობრივი ვეტერინარების მიერ, რაც მიუთითებს ქვეყანაში OPX ვირუსული დაავადებების ამოცნობის და შეტყობინების მექანიზმების გაუმჯობესებაზე. მომართვიანობის საფუძველზე შეგროვდა 720 ნიმუში, ცხელი წერტილიდან შეგროვებული ნიმუშები ტრანსპორტირდა სოფლის მეურნეობის სახელმწიფო ლაბორატორიაში შესაბამისი კვლევებისთვის.

დამატებით, აქტიური ზედამხედველობის ფარგლებში 2403 მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვიდან შეგროვილ იქნა 3549 სისხლი, რძე და ნაცხის/ფუფხის ნიმუში საქართველოს 29 მუნიციპალური ერთეულიდან.

საერთო ჯამში, შეგროვებული ნიმუშებიდან კვლევის არსებულ ეტაპზე 1659 ნიმუში (სისხლი/შრატი) იქნა შემოწმებული ანტი OPX ვირუსული IgG ანტისხეულების არსებობაზე, მათ შორის აქტიური ზედამხედველობის შედეგად შეგროვებული 639 და OPXV-ზე საეჭვო შემთხვევებზე მომართვიანობის შედეგად აღებული 319 ნიმუში (სურ.4). 1080 რძის და 7 ნაცხის ნიმუშის კვლევა განხორციელდა OPXV Generic Real-Time PCR–მეთოდით.

სურ.4 კვლევის მიმდინარე ეტაპზე გამოკვლეული ნიმუშების რაოდენობა რეგიონების მიხედვით: შიდა ქართლი 658; კახეთი 687; ქვემო ქართლი 500; იმერეთი 223; მცხეთა-მთიანეთი 321; სამცხე-ჯავახეთი 303; სამეგრელო 28; რაჭა 12; გურია 5;

ზემოთ ხსენებული პროექტის განხორციელების აუცილებლობა გაპირობებული იყო 2013 წელს ახალი OPX ვირუსის–„ახმეტა ვირუსის“ აღმოჩენით; პროექტის ფარგლებში ხდება საქართველოში, შინაურ ცხოველებში OPX ვირუსის გავრცელების პირველი დაკვირვების წარმოება. OPXV დაავადებების ზედამხედველობის და დიაგნოსტირების მეთოდების დანერგვამ შესაძლებელი გახადა ცნობილი და ახალაღმოჩენილი პოქსვირუსული პათოგენების სწრაფი იდენტიფიცირება და დაავადების საეჭვო შემთხვევებზე შესაბამისი რეაგირება. აღნიშნული კვლევის ფარგლებში შეგროვებული სინჯების შესწავლა სეროლოგიურ და მოლეკულურ-ბიოლოგიური მეთოდებით კვლავ მიმდინარეობს; შესაბამისად საბოლოო დასკვნების და დაავადების პრევალენტობის შეფასება შესაძლებელი გახდება კვლევის დასრულების შემდეგ.

New Orthopoxviruses spread among cattle in Georgia

Ana Kapanadze - MSc, Master of Applied Genetics,
Ana Gulbani – Master of Agriculture Science,
Tamar Tighilauri – BVS, Bachelor of veterinary science,
Maka Kokhreidze - BVS, Bachelor of veterinary science,
Lamara Gelashvili – PhD,
Otar Parkadze - BVS, Bachelor of veterinary science,
Marina Donduashvili – PhD

Key words: New Orthopoxvirus, PCR , Disease surveillance.

Abstract

The recent discovery of a new Orthopoxvirus (OPXV): "Akhmeta Virus", in Georgia (country) demonstrated the necessity for poxvirus detection and diagnosis capacity in this region. There is a dearth of data on OPXV circulation within the country. Human illness caused by this virus has implications for differential diagnosis of cutaneous lesion-producing zoonotic infections, particularly anthrax. Additionally animal Orthopox virus infection may affect agricultural productivity and food safety.

The main goal of the project was to enhance capacity for detection, diagnosis and report of human and animal OPXV infections and study disease prevalence in livestock. The study goal was successfully fulfilled with collaboration between the State Laboratory of Agriculture (SLA); the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Atlanta (US); National Food Agency (NFA) and the National Center for Disease Control and Public Health (NCDC) of Georgia.

NFA veterinarians were trained to recognize cutaneous lesions among livestock and new assays were validated at SLA for detecting new OPXV variants in domestic animals found in Georgia. 3549 blood, milk, swab/scrubs samples were collected from different regions of the country; to date 1659 were tested on OPXV using Orthopoxvirus IgG ELISA and Orthopoxvirus Generic Real–Time PCR Assays.