

ВІРУСНА ДІАРЕЯ ВРХ В УКРАЇНІ: ПРОЕКТ ЗА УЧАСТІ ВЧЕНИХ УКРАЇНИ, СЛОВАЧЧИНИ ТА ШВЕЙЦАРІЇ, ЩО СПОНСУЄТЬСЯ НАЦІОНАЛЬНИМ НАУКОВИМ ФОНДОМ ШВЕЙЦАРІЇ

Герілович А.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна

Вілсек С.

Університет ветеринарної медицини і фармації, Косіче, Словаччина

Петерханс Е.

Інститут ветеринарної вірусології, Бернський університет, Берн, Швейцарія

Швейцарський національний фонд створив програму, присвячену зміцненню наукового співробітництва між країнами Східної Європи та Швейцарії (програми SCOPES). Крім того, передача досвіду і ноу-хау між вченими різних країн допомагає підвищити ефективність управління програмами.

Метою нашого проекту, підготовленого спільно трьома авторами, є: встановити основні епідеміологічні особливості вірусної діареї ВРХ України, отримати інформацію про генетичні властивості вірусних штамів вірусної діареї ВРХ, що циркулюють в Україні, та підготувати молодих вчених з України щодо технологій, розроблених у лабораторіях Кошице та Берну.

УДК 619:616.98:578.11

110-річчю відкриття псевдосказу тварин Аладаром Ауєскі присвячується

ДО ОБГРУНТУВАННЯ ГІПОТЕЗИ ЕПІЗООТОЛОГІЧНОЇ ІЄРАРХІЇ БІОЛОГІЧНИХ ГОСПОДАРІВ ВІРУСУ ХВОРОБИ АУЄСКИ

Бузун А.І.

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»
Національної Академії Аграрних Наук України*

У поточному 2012 році принагідно згадати як 110 років тому видатним угорським вченим Аладаром Ауєскі була відкрита хвороба, названа ним як *псевдосказ* і на його честь увічнена європейською науковою спільнотою як *хвороба Ауєскі (ХА)*. Це важливо ще й у сенсі зв'язання правильності курсу розвитку наукової думки: адже у рідкі моменти прозріння людству розкривається Істина у первородній повноті її деталей, трактування яких з часом може її перекичувати та спрямовувати людські зусилля у хибному напрямку. У 1902 році професор А. Ауєскі оприлюднив результати вивчення етіології масового захворювання корів, собак та котів на сказ шляхом біопроби на кролях: він спостерігав у кролів небачену досі хворобу, яка чітко вирізнялася від усіх хвороб, що на той час відтворювалися на «кролячій» моделі – зокрема від сказу [1]. Наступними дослідженнями вчений довів чутливість до псевдосказу інших видів гризунів – морських свинок та мишей. На цих моделях він показав, що збудник ХА присутній не лише у мозку уражених сільськогосподарських та домашніх тварин, але, на відміну від сказу, й у їх крові. Причому в суміші з гліцерином етіологічний агент може тривалий час зберігатися, а прогрівання й фенол його інактивують. Від свиней збудника ХА вперше було виділено Weiss'ом у 1909 році, а його вірусна природа (здатність проходити кризу «бактеріальні» фільтри) була доведена іншими вченими (Schmiedhoffer, 1910; Sangiorgi, 1914). Американський вчений Shope (1931) встановив імунологічну ідентичність угорському штаму вірусу ХА збудника поширеної на той час в США нейроінфекції корів «mad itch» («скаженого свербіжу») і, таким чином, вперше показав глобальність поширення (убіквітарність) псевдосказу.

Отже, вже в початковий період вивчення ХА, по-перше, була наглядно доведена полігостальність збудника, а, по-друге, показана його убіквітарність. Проте з винаходом молекулярно-генетичних підходів до конструювання генно-модифікованих варіантів збудника уявлення про природу ХА почали трансформуватися в бік пристосування знань про природу ХА, здобутих упродовж століття, до новостворених технологій.

Останнім часом все частіше практики та науковці звертають увагу на виникнення спалахів ХА серед ВРХ, овець, кіз, котів та собак, які не мали будь-яких різновидів контакту зі свинями, їх відходами, виділеннями чи зі свининою, проте заражаються вірусом ХА невідомого походження і, іноді, як наприклад в Польщі генетично пов'язані з вакцинними штамми ХА, що застосовуються у свинарстві [2]. У той же час в сучасних офіційних підходах до викорінення ХА панують погляди про існування єдиного резерваційного біологічного господаря збудника, а саме – свині [3, 4].

Метою наших досліджень було вивчення можливості резервування збудника ХА в організмі мишей та курей.

Матеріали та методи. *Культури клітин та ембріони.* Перещеплювану культуру клітин нирки хом'яка лінії ВНК-21; перещеплювана культура клітин нирки свині лінії РК-15; перещеплювану культуру клітин коронарно-судинного сплетіння телят лінії КСТ підтримували згідно до паспортних вимог у Відділі біотехнології ННЦ «ІЕКВМ» і використовували у вигляді 2 – 4-добових моношарових культур, вирощених у пробірках та пластикових матрацах; використано по 1,5–2,0 л суспензій кожної з культур у посівних концентраціях (350 – 400 тис. клітин/см²). Курячі ембріони (КЕ) вільні від специфічних патогенів інкубації були надані Відділом вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» (n=80).

Вірус та антигенні матеріали. *Вірус хвороби Ауєскі (ВХА),* штаму «18в-УНДІЕВ», з інфекційної активністю 5,0 - 7,5 Іg TCID₅₀/мл, а- адаптований до культур клітин РК-15 та пасажований через підсисних поросят («свинячий» трофоваріант), б- адаптований до клітин лінії ВНК-21 та пасажований через мишенят-сосунків («мишачий» трофоваріант), а також в- адаптований до курячих ембріонів («курячий» трофоваріант).

Для освітлення на свинях музейний розплідок штаму «18в-УНДІЕВ» вводили інтраназально поросят-сисунам віком 3 доби (n= 2) у дозі 0,5 см³ (приблизно 3,5 Іg TCID₅₀) в кожен ніздрю. Поросят утримували в режимі штучного вигодовування до появи клінічних ознак ХА. Суспензії патматеріалу поросят освітлювали центрифугуванням і використовували для зараження культури клітин лінії РК-15 (2-й адаптаційний пасаж). У культурі клітин РК-15 проводили 5 суміжних пасажів («свинячий» трофоваріант збудника ХА).

Для отримання «мишачого» трофоваріанту на 1-му пасажі музейним розплідком штаму «18в-УНДІЕВ» інтрацеребрально заражали 6 мишенят-сисунів віком 3-и доби. Суспензії головного мозку мишенят з ознаками нервових розладів освітлювали центрифугуванням і вводили інтраперітонеально наступній партії мишенят (n=4) у дозі 0,1 см³ (приблизно 3,3 Іg TCID₅₀). Після загибелі заражених мишенят фрагменти їхнього головного мозку об'єднували у ступці та готували з них 30 %-ну суспензію (2-й пасаж вірусу), якою після освітлення заражали наступну партію мишенят. Проведено 7 суміжних пасажів вірусу на мишах.

Курячий трофоваріант вірусу ХА отримали шляхом 15-разового послідовного пасажування штаму «18в-УНДІЕВ» на 5 – 7-добових курячих ембріонах (КЕ). У кожному пасажі по 5-7 КЕ заражали у алантоїсну порожнину: на першому пасажі музейним розплодком штаму (у дозі 0,2 см³, приблизно 3,0 Іg ТЦД₅₀), а далі – 10 %-ними освітленими суспензіями мозку та паренхіматозних органів ембріонів, відібраних після загибелі ембріонів на 4–5ту добу після зараження ембріонів. Освітлені низько швидкісним центрифугуванням (до 3000 об./хв.) вважали «курячим» трофоваріантом збудника.

Рівень експресії протективних антигенів збудника ХА (комплексу оболонкових вірусних глікопротеїнів gC, gB, gD, які мають гемаглютинуючі властивості) в різних видах його біологічних господарів вивчали шляхом титрування в РГА всіх трьох трофоваріантів вірусу, отриманих у першому досліді і взятих у однакових за інфекційною активністю вірусу ХА концентраціях.

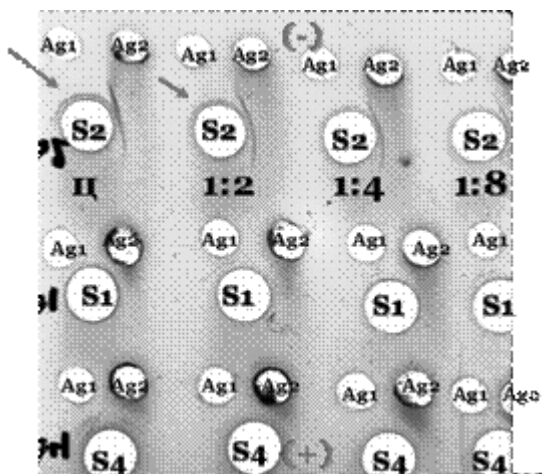
Окремо кожному з мозкових вірусних суспензій, отриманих у перебігу пасажування вірусу на свинях, мишах та курячих ембріонах титрували в пробірковій культурі клітин лінії РК-15 загальноприйнятим методом. Перед постановкою РГА, яку проводили в трьох повторах упродовж тижня з моменту закінчення титрування, вірусні трофоваріанти розбавляли фосфат-желатиновим буфером до вмісту 4,0 Іg ТЦД_{50/см³} вірусу ХА. Для постановки РГА використовували 0,5–1,0%, як свіжі, так і формалінізовані еритроцити миші у фосфат-желатиновому буфері за методикою Tetsu et al. (1989). Для постановки ІПМ використовували культуру клітин РК-15, вирощену на скельцях-вкладках (слайдах) та зафіксовану через 36–52 години після зараження відповідними трофоваріантами вірусу ХА за множинності зараження не вище 10⁻⁷ ТЦД_{50/клітинну}.

Для виготовлення ІЕОФ-антигенів ВХА вірусну масу частково очищали від баластних речовин методом їх преципітації поліетиленгліколем з молекулярною масою 6000 (ПЕГ-6000) у кінцевій концентрації 4 %. Вірус ХА, очищений від баластних речовин, концентрували методом преципітації ПЕГ-6000 у кінцевій концентрації 7,5% у присутності 0,3М NaCl.

Вірус-специфічні сироватки. Специфічну сироватку (антигемаглютинін) для оцінки експресії протективних антигенів вірусу ХА, отримували з використанням гемаглютинину вірусу ХА з активністю 512 ГАО/50 мкл, який було приготовано методом адсорбції-елюції на гепарині, полімеризованому глутаровим альдегідом [3]. Мишей-донорів за 3 тижні до початку імунізації гемаглютиніном вірусу ХА двічі щеплювали вакциною рідко інактивованою проти ХА виробництва Сумської біофабрики (у дозах 0,5 та 1,0 см³, відповідно, з інтервалом 10 у діб). Імунізували 15 білих лабораторних мишей (маса тіла 15–18г) за наступною схемою: 5 інтраперітонеальних ін'єкцій у дозі 1,0 см³ з інтервалом 5–7 діб.

Діагностикуми. Референс-сироватки ВХА позитивні та негативні для РН, виготовлені у референс-центрі МЕБ при Національному науково-ветеринарному центрі Польщі PIWet (м. Пулава).

Результати досліджень. Отримання специфічної сироватки проти вірусу ХА для оцінки експресії його антигенів. Титр вірус-нейтралізуючих антитіл у сироватках крові мишей (n= 4), отриманих за випробуваною експериментальною схемою становив 1:128-1:1024; а титр антигемаглютинінів ВХА – 1:256 - 1:2048, в імуноелектроосмофорезі (ІЕОФ) – 1:2 - 1:8. Результати вивчення специфічності отриманих сироваток в ІЕОФ засвідчили, що лише одна з чотирьох антисироваток проти гемаглютинінів вірусу ХА не мала антитіл проти інших вірусних антигенів – сироватка № 2 (рис. 1) лише у нерозбавленому стані та у розведенні 1:2 утворювала ледь помітні смуги преципітації (показано стрілками) з антигеном ВХА, у складі якого практично не було гемаглютиніну («курячий» трофоваріант ВХА). На рис. 1 видно, що сироватка № 2 у розведеннях 1:4–1:8 реагувала виключно з антигеном ВХА, у складі якого був вірусний гемаглютинін («мишачий» трофоваріант ВХА). На цьому ж рисунку видно, що сироватки № 1 та 4 реагували у всіх розведеннях з обома антигенними препаратами вірусу ХА, а отже не були моно-специфічними щодо гемаглютинінів ВХА. Сироватка миші №3 проти гемаглютинінів ВХА мала найнижчий з усіх чотирьох титр в ІЕОФ (1:2), причому вона однаково активно реагувала з обома антигенними препаратами ВХА, тобто також не була моноспецифічною щодо гемаглютинінів ВХА.



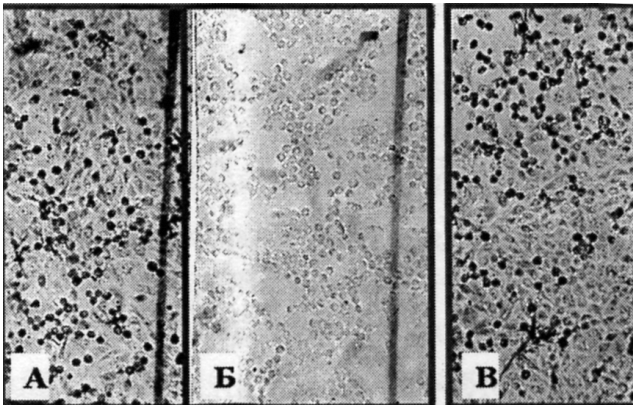
Позначки: Ag₁ – антиген з «курячого» трофоваріанту ВХА; Ag₂ – антиген з «мишачого» трофоваріанту ВХА; S_{1,2,4} – сироватки мишей № 1, 2, 4; «ц-1:8» – розведення сироваток мишей; (+, –) – полюси електрофорезу

Рис. 1. Результати ІЕОФ. Пояснення за текстом

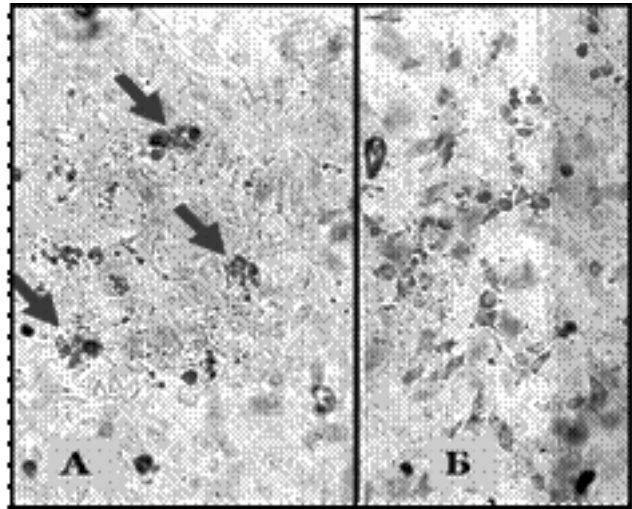
Перевірка специфічності отриманих сироваток мишей імунопероксидазним методом (рис. 2) підтвердила, що сироватки №1, 3 та 4 в усіх ефективних розведеннях (з 1:20 до 1:80) активно реагують як з «курячим», так і з «мишачим» трофоваріантами збудника ХА, розмноженими в культурі клітин ВНК-21. У той же час сироватка № 2 у розведеннях 1:60–1:80 за тих же умов виявляла лише «мишачий» трофоваріант збудника (не показано), що свідчило про її моноспецифічність щодо гемаглютинінів збудника ХА. На рис. 2 представлено результати імунопероксидазного виявлення «курячого» трофоваріанту ВХА в культурі клітин ВНК-21 у перебігу випробування специфічності зазначених сироваток. Наглядно видно, що лише сироватка № 2 не реагувала з антигенами збудника, що не мають гемаглютинуючої активності: не фарбувалися навіть осередки клітин з ознаками вірусного ЦПД (рис. 2Б).

Експресію гемаглютинінів збудника ХА вивчали за якісними на кількісними показниками у біологічних системах тварин, що входять до кола біологічних господарів цього герпесвірусу – свиней, мишей та курей. Вже на етапі вивчення особливостей накопичення гемаглютинуючих антигенів «мишачого» та «курячого» трофоваріантів збудника у культурі клітин РК-15 виявлено якісні відмінності у експресії вірусних гемаглютинінів, що виявлялися імунопероксидазним методом (у якості референтної застосовували антисироватку № 2 проти гемаглютинінів вірусу ХА). На рис. 3А показано результати імунопероксидазного фарбування гемаглютинінів вірусу, адаптованого впродовж 5 пасажів до курячих ембріонів, в культурі клітин РК-15 через 26 годин після зараження у дозі 4,0 ІgТЦД₅₀. За результатами титрування у культурі клітин РК-15 вихідна інфекційна активність «курячого» трофоваріанту становила 7,0 ІgТЦД_{50/см³}. З рисунку 3А видно, що гемаглютинуючі антигени у «курячого» трофоваріанту в клітинах перещеплюва-

ної культури РК-15 майже не експресуються: специфічна щодо вірусних гемаглютининів антисироватка виявляє накопичення цих антигенів у ядрах та навколо-ядерному просторі лише окремих клітин свині (показано стрілками). Одночасно, на рис. 3Б видно, що за тих же експериментальних умов гемаглютинуючі антигени у «мишачого» трофоваріанту в клітинах перещеплюваної культури РК-15 експресуються дуже інтенсивно: специфічна щодо вірусних гемаглютининів антисироватка виявляє масове накопичення цих антигенів у ядрах та в цитоплазмі клітин свині, зібраних у фокуси (осередки розмноження вірусу).



Позначки: Імунопероксидазне виявлення «курячого» трофоваріанту ВХА в культурі клітин ВНК₂₁ з використання антисироваток мишей-донорів № 1(А), 2(Б), 4 (В), взятих у розеденнях 1:60



Позначки: А – імунопероксидазне виявлення гемаглютинину ВХА у «курячому» трофоваріанті збудника; Б – імунопероксидазне виявлення гемаглютинину ВХА у «мишачому» трофоваріанті збудника сироваткою миші №2 в культурі клітин РК-15.

Рис. 2. Результати ІПМ. Пояснення за текстом

Рис. 3. Результати ІПМ. Пояснення за текстом

Слід зазначити, що за результатами титрування у культурі клітин РК-15 вихідна інфекційна активність «мишачого» трофоваріанту склала 6,5 ІgТЦД_{50/см³} (табл. 1). Тому доза зараження клітин РК-15 у цих дослідженнях була навіть нижче щодо «курячого» трофоваріанту. Отже отримані результати засвідчують принципову різницю у експресії протективних антигенів різних трофоваріантів збудника ХА в клітинах свині *in vitro*.

З таблиці 1 видно, що хоча інфекційна активність трьох трофоваріантів за результатами титрування у культурі клітин РК-15 була приблизно однаковою і складала 4,5 – 7,5 Іg ТЦД_{50/см³}, проте їхня активність в реакції гемаглютинації з еритроцитами миші (РГА, тест на накопичення протективних антигенів) різнилася на 30 % («мишачий» трофоваріант мав титр 1:64–1:128, а авінізований – 1:4–1:16). Зроблено висновок що «авінізація» ВХА призводить до поступової втрати вірусом гемаглютинуючої активності, що може свідчити про менше накопичення або про певні видозміни протективного антигену ВХА.

Таблиця 1– Результати вивчення експресії протективних антигенів різних трофоваріантів вірусу ХА за інфекційною та гемаглютинуючою активністю

№ з.п	Характеристика трофоваріантів вірусу ХА		Результати титрування трофоваріантів вірусу ХА за:	
	Історія пасажування	№ пасажу (хазяїн)	Інфекційною активністю (Іg ТЦД _{50/см³})	Гемаглютинаційною активністю (log ₂)
1	«Свинячий» трофоваріант (21 пасаж в клітинах РК-15 та СНЕВ, 1 пасаж через головний мозок поросят-сисунів)	1 (сисуни)	4,5	7-9
2	«Мишачий» трофоваріант (18 пасажів у клітинах РК-15 та СНЕВ, 7 пасажів через головний мозок мишат-сисунів)	1 (SMB)	6,5	5-6
		2 (SMB)	Н.д.	Н.д.
		3 (SMB)	Н.д.	7-9
		4 (SMB)	7,0	Н.д.
		5 (SMB)	Н.д.	Н.д.
		6 (SMB)	Н.д.	7-8
3	«Курячий» трофоваріант (18 пасажів у клітинах РК-15 та СНЕВ, 5 пасажів через курячі ембріони)	7 (SMB)	6,5	7-8
		1 (KE)	7,5	5-6
		2 (KE)	7,0	4-5
		3 (KE)	Н.д.	4-5
		4 (KE)	Н.д.	2-4
		5 (KE)	7,0	2-4

Позначки: Н.д. – не досліджували; SMB - suckling mouse brain, тобто мишенята-сисуни; KE- курячі ембріони.

З метою перевірки вірулентності мишачого трофоваріанту збудника ХА, отриманого на мишенятах-сисунах, для дорослих мишей вірусом 5–7-го пасажів інтраперітонеально в дозі 6,5 ІgТЦД₅₀ було заражено по 4–5 мишей/пасаж. Оскільки статистична вибірка не дозволяє робити остаточні висновки, поки що не можна з впевненістю стверджувати, що серійне пасажування збудника ХА на мишах білих лабораторних призводить до формування варіантів, відповідальних за виникнення персистентної інфекції мишей. Проте попередньо встановлено, що пасажування герпесвірусу через організм миші не впливає на рівень накопичення вірусного гемаглютиніну, але вже після 5-го пасажу на мишатах-сисунах збудник перестає викликати загибель дорослих мишей. У них розвивається персистентна інфекція, що супроводжується накопиченням антигемаглютинінів у титрі 1:4 – 1:64.

Отримані результати свідчать про існування певних закономірностей у взаємовідносинах збудника ХА з його біологічними господарями, які можна сформулювати як епізоотологічну ієрархію біологічних господарів вірусу хвороби Ауескі, тобто: одні біологічні господарі збудника підтримують накопичення у природних популяціях вірусу вірулентних для ссавців варіантів (свині, миші тощо), а інші – відповідальні за селекцію (чи трансформацію) маловірулентних для ссавців варіантів збудника (кури, можливо інші види птиці та ссавців). Отримані результати спростовують популярні уявлення про другорядність ролі гризунів та відсутність участі птиці у резервуванні збудника ХА. Наш експериментальний доробок узгоджується з даними світової літератури [6, 7, 8] і свідчить про існування природних механізмів формування прихованого вірусоносійства серед мишей та курей. Отже, існування автохтонних осередків обігу збудника ХА серед популяцій синантропних гризунів і птиці у природі є суттєво вірогідним, а тому має бути предметом подальших наукових досліджень та повинна враховуватися у плануванні відповідних протиепізоотичних заходів.

Висновки

1. Шляхом серійного пасажування у відповідних біологічних системах отримано та вивчено експресію протективних (гемаглютинуючих) антигенів трьох трофоваріантів збудника хвороби Ауескі. Встановлено, що за інфекційної активності у перещеплюваних культурах ссавців від 4,5 до 7,5 ІgТЦД_{50/см³}, зазначені трофоваріанти чітко розрізняються за рівнем експресії вірусних гемаглютинінів.

2. «Курячий» трофоваріант збудника хвороби Ауескі вже з 4-го пасажу через курячі ембріони майже не експресує вірусних гемаглютинінів, хоча й має високу інфекційну активність у перещеплюваних культурах клітин ссавців (5,0 ІgТЦД_{50/см³} і вище). Це узгоджується з даними літератури про поступову атенуацію вірусу ХА в перебігу серійного пасажування на ембріонах курей і може вказувати на природний механізм гальмування епізоотії хвороби Ауескі за польових умов.

3. «Свинячий» та «мишачий» трофоваріанти збудника експресують вірусні гемаглютиніни *in vitro* у великих кількостях (титри в РГА з мишиними еритроцитами 5 – 9 Іg₂) на всіх досліджених пасажах через відповідних біологічних господарів. Пасажування збудника ХА через організм мишенят-сисунів, за попередніми даними, призводить до формування вірусних варіантів, відповідальних за виникнення персистентної інфекції ХА у дорослих полібредних мишей. Це може вказувати на природний механізм резервації збудника ХА у природних популяціях гризунів, що не враховується в сучасній моделі викорінення хвороби Ауескі в Україні.

Список літератури

1. Aujeszky A.: 1902. Uber eine neue Infektionskrankheit bei Haustieren. Zentralbl. fur Bacter., Parasit. und Infekt. 32:353.
2. Salwa A. A natural outbreak of Aujeszky's disease in farm animals. Pol J Vet Sci. 2004;7(4):261-6.
3. Mettenleiter T.C. (2000) Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis – State of the art, June 1999. Vet. Res. 31, 99-115.
4. Pejsak Z.K., Truscynsky J. (2006). Aujeszky's disease (pseudorabies). In Diseases of Swine (9th edition). Straw B.E., Zimmerman J.J., Allaire S.D., Taylor D.J. Ed.: Blackwell publishing.
5. Komissarenko SV, Avrameas S. [Properties of immunoadsorbents prepared by antigen coupling to glutaraldehydeactivated polyacrylamide gel, BrCN-activated Sepharose and by copolymerization of antigens by glutaraldehyde]. Ukr Biokhim Zh. 1978 Jul-Aug;50(4):500-11.
6. Shimeld, C., Hill, T. J., Blyth, W. A. and Easy, D. L. 1990. Reactivation of latent infection and induction of recurrent herpes eye disease in mice. J. Gen. Virol. 71: 397–404.
7. Tanaka, S., Imamura, T., Sakaguchi, M. and Mannen, K. 1998. Acetylcholine reactivates latent pseudorabies virus in mice. J.Virol. Methods 70: 103–106.
8. Tanaka, S., Mannen, K. 2011. Laboratory Animal Science Usage of Analgesic in a Murine Model Infected Latently with Pseudorabies Virus. J. Vet. Med. Sci. 73(3): 351–354

BEFORE GROUND OF HYPOTHESIS OF EPIZOOTOLGY OF HIERARCHY OF BIOLOGICAL OWNERS TO THE VIRUS OF ILLNESS AUESKI

Buzun A.I.

National Scientific Center „Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine“, Kharkiv, Ukraine

It is showed that “mouse” trophovariant of pseudorabies virus (PRV) strain «18в-УНДІЕВ» lost the patogenity on 7th passage level for mouse but save the properties to produce of protective antigen with hemagglutinin activity on 1:64-1:128 level. In oposite, the “chiken” trophovariant of this agent lost the patogenity on 15th passage level for mouse and swine with omit of properties to produce of agent protective antigen. It is concluded that latent infection mechanism of PRV infection is common to swine, rodents and avian species therefore swine isn't only reservation speciein PR epizootology