

2. ВЕТЕРИНАРНА ВІРУСОЛОГІЯ ТА МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 619:616.98:578.828.5:636.22/.28:636.92

DOI 10.36016/VM-2020-106-4

ГЕМАГЛЮТИНУЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ ЗБУДНИКІВ ПАРАГРИПУ-3, КОРОНАВІРУСНОЇ ТА РОТАВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Корнейков О. М., Бородай Н. І., Олешко А. Ю., Перфілова С. І.
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: korneykov@ukr.net

Аль Джабарі Мунір

Харківська державна зооветеринарна академія, Харків, Україна

Метою роботи було визначення гемаглютинуючої активності різних штамів збудників парагрипу-3, корона- та ротавірусної інфекцій ВРХ. Напрацювання гемаглютинінів вірусів проводили шляхом інфікування перещеплюваних культур клітин вірусами, визначення їхньої інфекційної активності за цитопатичною дією, з подальшим встановленням гемаглютинуючої активності з еритроцитами різних видів тварин. Установлено, що в межах одного виду вірусу можуть існувати штамми, які мають різну гемаглютинуючу активність. Доведено, що найбільш придатними для виявлення гемаглютинінів коронавірусу є еритроцити миші, парагрипу-3 — морської свинки, ротавірусу ВРХ — півня. Установлено залежність між інфекційною активністю вірусу парагрипу-3, корона, ротавірусів та їхньою гемаглютинуючою властивістю — найбільший титр гемаглютинінів спостерігається за умов інфекційної активності збудників парагрипу-3, рота- та коронавірусів $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ та вище. Тривале зберігання збудників парагрипу-3, рота- та коронавірусів ВРХ за температури мінус 18°C та нижче не чинило негативного впливу на їхню гемаглютинуючу властивість, на відміну від зберігання означених вірусів за температури мінус 4°C або багаторазової дефростації

Ключові слова: інфекційна активність, цитопатична дія, пневмоентерит

Успішна боротьба з інфекційними пневмоентеритами великої рогатої худоби (ВРХ) неможлива без встановлення етіологічного значення збудників, що виділяються під час спалахів інфекційних хвороб [1]. Знання щодо біологічних властивостей того чи іншого збудника дозволяє не тільки розуміти особливості патогенного впливу вірусу на макроорганізм, а і своєчасно реагувати на аналогічні випадки шляхом впровадження в господарства заходів профілактики та боротьби, оснований на актуальних для сьогодення засобах діагностики та специфічної профілактики захворювань [2, 3]. Саме наявність у деяких вірусів поверхневих антигенів — гемаглютинінів — є одним з факторів їхньої патогенності. Означені глікопротеїни призводять до інтоксикації організму тварини та є складовою, що характеризує інтенсивність патогенного впливу вірусу [4]. До того ж, слід враховувати, що означені поверхневі глікопротеїни відіграють не останню роль у системі діагностики захворювань вірусної етіології. Так, фахівцями ветеринарної медицини та науковцями широко використовуються гемаглютинуючі властивості вірусу парагрипу-3 (ПГ-3), рота- та коронавірусів для лабораторної діагностики цих захворювань (реакції гемаглютинації та затримки гемаглютинації). Зважаючи на вищенаведене, слід зазначити, що гемаглютинуючі властивості відрізняються не тільки у різних вірусів, але навіть у штамів одного й того ж збудника [5]. Так, у межах одного виду вірусу можуть існувати штамми, що мають на поверхні оболонки гемаглютиніни та ті, що не мають означеного глікопротеїну.

Саме тому, **метою** нашої роботи було встановлення наявності та визначення гемаглютинуючої активності у різних штамів збудників ПГ-3, корона- та ротавірусної інфекцій ВРХ.

Матеріали та методи. Для вивчення гемаглютинуючих властивостей вірусу ПГ-3 та збудників рота-, коронавірусної інфекцій використано еритроцити різних видів тварин та гемаглютиніни, отримані з різних штамів та ізолятів означених вірусів.

Еритроцити тварин отримували з крові (миші, півня, морської свинки, кролів) шляхом знекровлення тварин (миші) або у відповідності до правилами відбору проб крові від тварин [6]. Кров, відібрану в розчин Альсівера, центрифугували протягом 10 хв зі швидкістю обертання ротору від 1 000 до 2 000 об./хв. Осад еритроцитів ресуспендували 10-кратним об'ємом 0,2 М фосфатнобуферного фізіологічного розчину (ФБФР). Означену процедуру повторювали тричі, а в подальшому готували суспензію еритроцитів різної концентрації (0,5, 0,7 і 1,0 %) ретельно змішуючи їх з ФБФР. Експериментальні дослідження на тваринах проведені з урахуванням основних принципів біоетики.

З метою отримання гемаглютининів вірусів використовували польові ізоляти вірусів (ПГ-3) та штами (ПГ-3, рота- та коронавірус), що довгостроково (10–20 років) зберігаються в депозитарії ННЦ «ІЕКВМ». З метою підвищення рівня гемаглютининів вірусів з низькою інфекційною активністю проводили їх концентрацію за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ). З цією метою використовували ПЕГ 50 %-ї концентрації з молекулярною вагою 6 000, шляхом додавання його до вірусвміщуючої рідини (до кінцевої концентрації 6 %), залишаючи суміш на 18 год за температури 4 °С. У подальшому отриману суміш центрифугували за режимом 5–10 тис. об./хв впродовж 25–40 хв. Осад ресуспендували в 1:50–1:100 початкового об'єму в фізіологічному розчині, що вміщує 0,025 % ЕДТА та повторно центрифугували за 4 тис. об./хв. Надосадову рідину використовували як гемаглютинуючий препарат, зберігаючи його за температури 4 °С.

Реакція гемаглютинації ставилась мікрометодом на полістиролових плашках з лунками U-подібної форми. До постановки реакції в усі лунки полістиролової плашки вносили 50 мкл фосфатного буферу, а в крайні лунки — по 50 мкл досліджуваного препарату, після чого робили двократні розведення. У подальшому до кожної лунки з відповідним гемаглютинуючим препаратом додавали 50 мкл суспензії еритроцитів різної концентрації, отриманих від різних тварин. З метою контролю чистоти лунок, якості еритроцитів і визначення часу їхнього осідання в один ряд плашки вносили еритроцити без гемаглютинуючого препарату. Після ретельного струшування плашок залишали їх за кімнатної температури до повного осідання еритроцитів (визначали за контрольними лунками). Реакцію враховували після повного осідання еритроцитів у контрольних лунках. Реакція вважалась позитивною у разі утворення аглютинованими еритроцитами рівномірного осаду, що схожий на «парасольку». За відсутності гемаглютинації еритроцити осідають в центрі лунки, утворюючи осад, що схожий на «гудзик» [7].

З метою визначення впливу температурного фактору на гемаглютинуючі властивості різних збудників вірусів пневмоентеритів ВРХ досліджено вплив тривалого зберігання означених вірусних антигенів (1 місяць) за температури мінус 18 °С та мінус 4 °С, а також за умов багаторазової дефростації (1–3) за означених температур.

Результати досліджень та обговорення. Проведеними дослідженнями встановлено, що збудник парагрипу-3 ВРХ проявляє свої гемаглютинуючі властивості лише по відношенню до еритроцитів морської свинки. Під час визначення гемаглютинуючої активності вірусу ПГ-3 встановлено пряму залежність між концентрацією еритроцитів і здатністю збудника до аглютинації еритроцитів. Слід зазначити, що здатність вірусу ПГ-3 штаму М-87 аглютинувати еритроцити морської свинки спостерігали лише у разі його використання в нативному вигляді незалежно від їхньої концентрації (табл. 1).

Натомість штам ЗКСМ вірусу ПГ-3 проявляв свої гемаглютинуючі властивості по відношенню до еритроцитів морської свинки у розведенні від нативного до 1:256. Слід зазначити, що найбільшу гемаглютинуючу активність означеного збудника спостерігали з еритроцитами морської свинки в їх розведенні 1,0 %, причому відмічено пряму кореляцію між проявом гемаглютинуючої активності вірусу ПГ-3 та рівнем його інфекційної активності — за збільшення інфекційної активності збудника до 7,5 lg ТЦД₅₀/см³ та вище, відповідно його цитопатичної дії на перещеплювані культури клітин, збільшувалась його гемаглютинуюча активність (до 1:256 за використання еритроцитів морської свинки у 1,0 %-му розведенні). Найнижчу гемаглютинуючу активність спостерігали в ізолюваного вірусу ПГ-3 — відмічено його здатність аглютинувати еритроцити морської свинки лише в нативному стані.

Що стосується особливостей прояву гемаглютинуючих властивостей збудників вірусних ентеритів ВРХ — рота- та коронавірусів, то проведеними дослідженнями встановлено, що діагностичне значення мають лише ротавірус штаму 238 і коронавірус штаму ВС-1 (табл. 2).

Таблиця 1 — Дослідження гемаглютинуючих властивостей польових ізолятів і виробничих штамів вірусів ПГ-3

Вірус	Інфекційна активність вірусу, Іg ТЦД ₅₀ /см ³	Еритроцити	Титр гемаглютининів за розведення еритроцитів, %		
			0,5	0,7	1,0
Штам ЗКСМ	7,0	білої миші	—	—	—
		морської свинки	1:32	1:64	1:64
		півня кроля	— —	— —	— —
	7,5	білої миші	—	—	—
		морської свинки	1:64	1:256	1:256
		півня кроля	— —	— —	— —
Штам М-87	5,4	білої миші	—	—	—
		морської свинки	нат.	нат.	нат.
		півня кроля	— —	— —	— —
	7,0	білої миші	—	—	—
		морської свинки	нат.	нат.	нат.
		півня кроля	— —	— —	— —
Ізолят вірусу ПГ-3	4,4	білої миші	—	—	—
		морської свинки	нат.	нат.	нат.
		півня	—	—	—
		кроля	—	—	—

Примітка. Нат. — у нативному стані, тобто таке, що не підлягало розведенню.

Таблиця 2 — Результати визначення гемаглютинуючих властивостей збудників рота- та коронавірусної інфекцій з еритроцитами різних видів тварин

Вірус	Інфекційна активність вірусу, Іg ТЦД ₅₀ /см ³	Еритроцити	Титр гемаглютининів за розведенні еритроцитів, %		
			0,5	0,7	1,0
Коронавірус штаму ВС-1	6,7	білої миші	1:16	1:16	1:32
		морської свинки	—	—	—
		півня кроля	— —	— —	— —
	7,4	білої миші	1:16	1:64	1:64
		морської свинки	—	—	—
		півня кроля	нат. —	1:2 —	1:2 —
Ротавірус штаму 238	5,0	білої миші	—	—	—
		морської свинки	—	—	—
		півня кроля	1:16 —	1:16 —	1:16 —
	7,2	білої миші	—	—	—
		морської свинки	—	—	—
		півня кроля	1:64 —	1:128 —	1:128 —
Ротавірус штаму Tiverval	5,2	білої миші	—	—	—
		морської свинки	—	—	—
		півня	—	нат.	нат.
		кроля	—	—	—

Продовження табл. 2

Ротавірус штаму Tiverval	7,4	білої миші	—	—	—
		морської свинки	—	—	—
		півня	нат.	1:2	1:4
		кроля	—	—	—
Ротавірус штаму Lincoln	6,0	білої миші	—	—	—
		морської свинки	—	—	—
		півня	—	—	—
		кроля	—	—	—
	6,8	білої миші	—	—	—
		морської свинки	—	—	—
		півня	—	нат.	—
		кроля	—	—	—
Ротавірус штаму 480	6,7	білої миші	—	—	—
		морської свинки	—	—	—
		півня	—	—	—
		кроля	—	—	—

Примітка. Нат. — у нативному стані, тобто таке, що не підлягало розведенню.

Наявні в музеї ННЦ «ІЕКВМ» штами ротавірусу ВРХ Tiverval і Lincoln, які зберігалися впродовж тривалого часу, мали рівень гемаглютинину лише за їх дослідження в нативному стані (Lincoln) або з низьким розведенням (Tiverval). Гемаглютиніни штаму ротавірусу 480 за випробування з еритроцитами різних лабораторних тварин виявити не вдалось. За результатами проведених досліджень встановлено, що збудник коронавірусу ВРХ штаму ВС-1 здатний аглютинувати еритроцити білої миші та, у меншій мірі, півня. Натомість ротавірус штаму 238 аглютинував лише еритроцити півня. Як і з попередніми збудниками встановлено пряму залежність між рівнем гемаглютинації вірусів та їхньою інфекційною активністю та концентрацією еритроцитів, що використовувались — найбільший рівень гемаглютинації коронавірусу ВРХ штаму ВС-1 спостерігали за його інфекційної активності 7,4 Іg ТЦД₅₀/см³ та концентрації еритроцитів 0,7–1,0 % — 1:64 з еритроцитами білої миші та 1:2 — з еритроцитами півня. Аналізуючи отримані дані щодо ротавірусу ВРХ штаму 238 отримано аналогічні дані, а саме — за інфекційної активності означеного збудника 7,2 Іg ТЦД₅₀/см³ його здатність аглютинувати еритроцити півня (0,7–1,0 %) проявлялась у розведенні вірусу 1:128.

За результатами визначення впливу температурного фактору на гемаглютинуючі властивості різних збудників вірусів пневмоентеритів ВРХ встановлено, що тривале зберігання означених вірусних антигенів (1 місяць) за температури мінус 18 °С не чинило негативного впливу на їхні гемаглютинуючі властивості (табл. 3).

Таблиця 3 — Вплив тривалого заморожування та послідовних дефростацій на гемаглютинуючі властивості збудників пневмоентеритів ВРХ

Вірус	Титр ГА до заморожування	Зберігання за температури мінус 4 °С				Зберігання за температури мінус 18 °С			
		1 міс.	Дефростація			1 міс.	Дефростація		
			1	2	3		1	2	3
ПГ-3 штаму ЗКСМ	1:256	1:128	1:128	1:32	1:32	1:256	1:256	1:64	1:64
Коронавірус штаму ВС-1	1:64	1:64	1:64	1:16	1:16	1:64	1:64	1:32	1:16
Ротавірус штаму 238	1:128	1:128	1:64	1:32	1:16	1:128	1:128	1:32	1:32
Ротавірус штаму Tiverval	1:4	нат.	—	—	—	1:4	1:2	нат.	—

Примітка. Нат. — у нативному стані, тобто таке, що не підлягало розведенню.

Натомість тривале зберігання вірусних антигенів за температури мінус 4 °С призводило до зниження рівня гемаглютинину у два рази впродовж одного місяця досліджень. Крім того, багаторазова дефростація антигенів, як за умов їх зберігання за температури мінус 4 °С, так і за

температури мінус 18 °С, призводило до зниження їхньої гемаглютинуючої активності у 2–4 рази.

Висновки. 1. Визначено, що найбільш придатними для виявлення гемаглютининів коронавірусу ВРХ є еритроцити миші, ротавірусу ВРХ — півня, парагрипу-3 — морської свинки.

2. Установлено пряму залежність між інтенсивністю прояву цитопатичного ефекту, а, як наслідок, інфекційної активності вірусів ПГ-3, рота-, коронавірусів та їхньою гемаглютинуючою активністю — найбільший титр гемаглютининів спостерігається за умов інфекційної активності збудників ПГ-3, рота- та коронавірусів 7,0 Іg ТЦД₅₀/см³ та вище.

3. Зберігання вірусних антигенів впродовж 1 місяця за температури мінус 18 °С та нижче не мало негативного впливу на гемаглютинуючі властивості вірусів ПГ-3, рота- та коронавірусів ВРХ, на відміну від їх зберігання за температури мінус 4 °С або багаторазової дефростації.

Список літератури

1. Мищенко В. А., Думова В. В., Черных О. Ю. Особенности массовых ассоциированных респираторных заболеваний взрослого крупного рогатого скота. *Ветеринария Кубани*. 2011. № 3. С. 13–15. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=16363611>.
2. Fulton R. W. et al. Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2000. Vol. 64, No. 3. P. 151–159. PMID: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1189606>.
3. Ellis J. A. Bovine parainfluenza-3 virus. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2010. Vol. 26, No. 3. P. 575–593. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.08.002>.
4. Hägglund S. Epidemiology, detection and prevention of respiratory virus infections in Swedish cattle: With special reference to bovine respiratory syncytial virus: doctoral thesis. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2005. 59 pp. (Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, 2005: 121). URI: <https://res.slu.se/id/publ/13130>.
5. Бабин Ю. Ю. и др. Анализ варибельности фрагмента гена гемагглютинина изолятов вируса гриппа подтипов Н3 и Н4, выделенных на территории РФ в 2008–2010 гг. *Ветеринария и кормление*. 2011. № 6. С. 8–10. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=20360934>.
6. Правила відбору зразків патологічного матеріалу, крові, кормів, води та пересилання їх для лабораторного дослідження: затверджені Державним департаментом ветеринарної медицини Мінсільгосппроду України (наказ № 15-14/111 від 15.04.1997 р.). 35 с.
7. Головка А. Н. и др. Микробиологические и вирусологические методы исследования в ветеринарной медицине: справ. пособие. Харьков: НТМТ, 2007. 512 с.

HEMAGGLUTINATING PROPERTIES OF BOVINE PARAINFLUENZA-3, CORONAVIRUS AND ROTAVIRUS INFECTIONS' PATHOGENS IN CATTLE

Kornieikov O. M., Borodai N. I., Oleshko A. Y., Perfilova S. I.

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

Al Jabari Munir

Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

The purpose of the work was to determine the hemagglutinating activity of different strains of bovine parainfluenza-3, coronavirus and rotavirus infections' pathogens in cattle. Accumulation of hemagglutinins of viruses was carried out by infecting cell cultures with viruses, determining their infectious activity by cytopathic action, followed by the establishment of hemagglutinating activity with erythrocytes of different species of animals. It has been established that within one type of virus there may be strains that have different hemagglutinating activity. It has been proved that within one type of virus there may be strains that have different hemagglutinating activity. It has been established that for the detection of coronavirus hemagglutinins mouse erythrocytes are the most suitable, bovine parainfluenza-3 virus hemagglutinins — guinea pig erythrocytes, rotavirus hemagglutinins — rooster erythrocytes. The relationship between the infectious activity of parainfluenza-3 virus, corona-, rotaviruses and their hemagglutinating properties has been established — the highest hemagglutinin titer was observed under the conditions of infectious activity of bovine parainfluenza-3 virus, corona-, rotaviruses in 7.0 Іg TCD₅₀/cm³ and higher. Long-term storage of bovine parainfluenza-3, coronavirus and rotavirus infections' pathogens at a temperature of minus 18 °С and lower did not have a negative effects on their hemagglutinating properties, in contrast to the storage of these viruses at a temperature of minus 4 °С or repeated defrosting

Keywords: *infectious activity, cytopathic action, pneumoenteritis*