

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

DOI 10.36016/VM-2020-106-5

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СПУМАВІРУСУ ВРХ НА МОДЕЛІ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

Горбатенко С. К.¹, Солодянкін О. С.¹, Горбатенко В. П.², Коваленко Л. В.¹,
Рудова Н. Г.¹, Кузнецова О. В.¹, Мягких Н. В.¹, Зданевич П. П.¹

¹ Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: st.gorbatenko@gmail.com

² Харківська державна зооветеринарна академія, Харків, Україна

Генетичний матеріал польового ізоляту пінистого вірусу великої рогатої худоби інокульовано підшкірно кролям (5 дослідних і 5 інтактних особин). На молекулярно-генетичному, клітинному та біохімічному рівні вивчали вплив генетичного матеріалу на організм дослідних тварин. Установлено, що персистенція збудника спумавірусної інфекції за результатами молекулярно-генетичного дослідження (ПЛР) становить 60 діб. Зафіксовано перерозподіл клітин лейкоцитарної фракції у бік лімфоцитозу (80–88 %). Через 60 діб після зараження, порівняно з показниками контролю, відмічено зниження концентрації ЦІК на 22,2 % ($p \leq 0,05$) та тенденцію до зниження серомукоїдів (на 6,5 %). По завершенні досліду встановлено статистично вірогідне зниження концентрації ЦІК та підвищення рівня серомукоїдів на 21,5 і 17,6 % відповідно, а також тенденцію до зниження рівня глобулінів, який становив 15,5 %. Результати гематологічного та біохімічного аналізу свідчать про розвиток імуносупресивного стану під впливом інокульованого матеріалу

Ключові слова: ПЛР, гематологічні та біохімічні показники, імуносупресія

Спумавірусна інфекція, що спричинюється пінистим вірусом ВРХ (bovine foamy virus, BFV) має значне поширення у країнах світу з розвиненим скотарством [1–3, 5]. Зважаючи на те, що спумавірусна інфекція, як представник повільної, або мінорної інфекції, становить загрозу здоров'ю поголів'я тварин, обумовлюючи імунодефіцитний стан, який знижує ефективність лікувально-профілактичних засобів, обумовлює зниження обсягів та якості тваринницької продукції, наявність цього вірусу серед поголів'я тварин ускладнює реалізацію планових або вимушених ветеринарно-санітарних програм [2–4]. Фахівці ветеринарної медицини, що переймаються обслуговуванням тваринницьких господарств, повинні бути чітко обізнаними у питаннях епізоотичного стану поголів'я, оскільки плани протиепізоотичних заходів мають за підґрунтя базову характеристику імунного статусу тварин, що перебувають у тій чи іншій зоні [3–5]. Вітчизняні діагностичні засоби, що сьогодні можуть використовуватись у моніторингових обстеженнях поголів'я стосовно спумавірусної інфекції великої рогатої худоби, обмежуються лише молекулярно-генетичними методами, що не може забезпечувати запити ветеринарної практики. Першочерговим завданням у зв'язку з цим є розробка засобу ретроспективної діагностики захворювання, а це передбачає вивчення біологічних властивостей збудника та накопичення вірусної маси [5–7].

У зв'язку з цим, **метою** роботи було проведення дослідження у напрямку вивчення на клітинно-гуморальному та біохімічному рівні впливу збудника мінорної інфекції, а саме спумавірусу, на організм лабораторних тварин (кролів).

Матеріал і методи. Дослід проведено на 10 кролях масою 2–2,5 кг, розділених на 2 групи: перша група, п'ять особин, дослідна — кожному кролю введено одноразово підшкірно 1 см³ нативної крові від тварини-донора, у якій встановлено наявність генетичного матеріалу BFV. Друга група, п'ять особин — контроль. Спостереження за станом дослідних кролів проводили шляхом візуального контролю життєздатності організмів після зараження, а також проведенням гематологічного, біохімічного та молекулярно-генетичного аналізу проб крові. Проби крові відбирали та піддавали дослідженню через кожні 15 діб.

Для детекції провірусної ДНК BFV використано системи праймерів Int1–Int2 (зовнішня пара, довжина ампліфікованого продукту становить 430 п.н.) та Int3–Int4 (внутрішня пара, довжина ампліфікованого продукту 221 п.н.) шляхом «гніздового» варіанту ПЛР згідно з рекомендаціями розробників [7]. Для проведення зворотної транскрипції та отримання кДНК використано ревертазу MMLV згідно з рекомендаціями виробника. Ампліфікацію проведено на ампліфікаторі Biometra (США). Візуалізацію результатів ПЛР-аналізу було проведено шляхом горизонтального гель-електрофорезу у 1,5–2 %-му агарозному гелі.

Гематологічні дослідження проводили у відповідності до розробленої науковцями лабораторії вивчення лейкозу ННЦ «ІЕКВМ» стандартної операційної процедури Л-01С-2013 «Проведення гематологічного дослідження периферійної крові тварин». У відповідності з методикою вивчали зміни у чисельності лейкоцитарної фракції дослідних тварин, чисельність і співвідношення клітинних елементів лейкоцитарної фракції у мазках, підданих фарбуванню за Романовським-Гімза, а саме плазмочитів, лімфоцитів, сегментоядерних гранулоцитів — еозинофілів, базофілів, нейтрофілів, атипичних та молодих форм вищеозначених клітин. У динаміці вивчали рівень гемоглобіну гематиновим методом по Салі та швидкості осадження еритроцитів (ШОЕ).

Біохімічні дослідження сироватки крові проводили з визначенням стартових показників стосовно рівня загального білка спектрофотометрично, білкового профілю (альбуміни, глобуліни) — за допомогою стандартних наборів реактивів виробництва фірми «Реагент» (Україна). Визначали концентрацію неспецифічних циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середньої молекулярної маси за методом Гриневича та Алферова, серомукоїдів — за методом Веймера та Мошина.

Результати досліджень. Під час молекулярно-генетичного дослідження проб крові від кролів дослідної групи через п'ятнадцять діб після інокуляції генетичний матеріал BFV було виявлено у чотирьох особин (№№ 1, 3, 4, 5) з п'яти. Дослідженням через 30 діб після інокуляції позитивний результат щодо виявлення генетичного матеріалу вищеозначеного збудника встановлено у двох особин (№ 3 та № 5). Третім дослідженням (через 45 діб після початку досліду) отримано аналогічні результати відносно другого — генетичний матеріал знову виявлено у пробах крові дослідних тварин № 3 та № 5. Через два місяці після інокуляції (четверте дослідження) генетичний матеріал BFV збудника встановлено лише у пробі крові однієї дослідної тварини, а саме кроля № 3.

Установлено, що стартові показники крові кролів дослідної групи (гемоглобін, кількість еритроцитів та лейкоцитів, формула крові) були в межах норми: Hb — 10–13 г/дл, еритроцити — $6,2\text{--}7,2 \times 10^6/\text{мл}$, лейкоцити — $3,5\text{--}7,8 \times 10^3/\text{мл}$, ШОЕ — 1–3 мм/год. Як у попередньому розділі, спостереження проводили упродовж досліду. Установлено, що показник швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ) у дослідній групі в порівнянні з контролем суттєво підвищився на 30-ту добу після експериментального зараження, однак під час наступного відбору крові (45 діб) спостерігалася тенденція до зниження значень цього показника і до кінця експерименту значення ШОЕ залишались у межах норми. У цьому часовому проміжку (30–45 діб після зараження) спостерігалось підвищення концентрації гемоглобіну в усіх кролів дослідної групи в порівнянні з контрольною групою, у яких таких змін гематологічних показників не спостерігалось.

Відбір крові через 30 днів після зараження показав збільшення кількості лейкоцитів (до $9,8\text{--}9,9 \times 10^3/\text{мл}$). Виходячи з розрахунків лейкоцитарної формули відбулось це за рахунок підвищення кількості паличкоядерних гранулоцитів. Також незначно збільшилися показники гемоглобіну в усіх кролів дослідної групи (до 15–17 г/дл) в порівнянні з контрольною групою, в якій таких змін гематологічних показників не спостерігалось. Зросли показники швидкості осідання еритроцитів до 3–4 мм/год. Подібні зміни є характерними для запальних процесів. Через місяць після експериментального зараження гематологічні показники крові дослідної групи кролів (лейкоцити, гранулоцити, ШОЕ) відновились до рівня початкових величин. Це свідчить про те, що наявність збудника спумавірусної інфекції в організмі кролів суттєво не впливає на гематологічні показники їхньої крові, хоч звертає на себе увагу перерозподіл елементів лейкоцитарної фракції у бік значного (до 80–88 %) збільшення співвідношення лімфоцитів, що свідчить про розвиток імуносупресивного стану в організмі дослідних кролів.

Динаміку зміни співвідношення клітин лейкоцитарної фракції у період проведення досліду наведено в табл. 1.

Таблиця 1 — Динаміка перерозподілу співвідношення клітин лейкоцитарної фракції (%)

Терміни проведення експерименту, діб	Рівень показників							
	с/я нейтрофіли		п/я нейтрофіли		базофіли		лімфоцити	
	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль
15	29,4 ± 2,6	25,4 ± 2,6	4,5 ± 1,2	5,6 ± 1,2	1,4 ± 0,5	1,3 ± 0,2	48,3 ± 4,0	47,6 ± 4,0
30	26,6 ± 3,3	23,4 ± 3,3	3,6 ± 1,4	3,8 ± 1,5	0,8 ± 0,4	2,2 ± 0,3	59,1 ± 3,0	52,2 ± 3,0
45	19,4 ± 2,6	27,1 ± 1,9	4,5 ± 1,1	4,1 ± 0,7	0,5 ± 0,3	3,2 ± 0,6	67,3 ± 4,0	49,4 ± 5,0
60	18,7 ± 2,2	24,6 ± 2,4	5,8 ± 1,4	4,3 ± 1,1	0,8 ± 0,4	2,6 ± 0,5	85,2 ± 5,0	51,3 ± 4,0
75	21,2 ± 3,5	26,4 ± 3,7	3,8 ± 1,5	3,2 ± 0,2	0,9 ± 0,4	1,8 ± 0,3	80,6 ± 3,0	47,6 ± 3,0
90	23,7 ± 2,3	30,3 ± 2,1	3,3 ± 1,2	4,4 ± 1,2	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	81,8 ± 4,0	49,1 ± 5,0
105	21,9 ± 3,9	32,5 ± 2,9	3,9 ± 0,7	5,5 ± 1,3	0,8 ± 0,3	1,8 ± 0,3	88,4 ± 3,0	50,6 ± 2,0
120	20,8 ± 2,7	33,4 ± 2,7	4,1 ± 1,1	5,9 ± 1,3	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,1	87,2 ± 5,0	49,4 ± 6,0

Аналізуючи отримані результати гематологічних досліджень та ураховуючи біохімічні показники у порівняльні часові періоди дослідів варто засвідчити, що після інокуляції в організм дослідних кролів генетичного матеріалу спумавірусу виражені зміни досліджуваних показників відбулися через 30 діб, коли спостерігалася тенденція до підвищення рівня загального білка на 9,4 % в основному за рахунок підвищення глобулінової фракції, уміст якої збільшився на 17,4 %, та зниження концентрації ЦІК на 8,6 % порівняно з відповідними показниками контрольної групи. При цьому статистично вірогідне підвищення встановлено щодо рівня серомукоїдів — на 21,2 %. Через 60 діб після зараження порівняно з показниками контролю відмічено зниження концентрації ЦІК на 22,2 % ($p \leq 0,05$) та тенденцію до зниження серомукоїдів (на 6,5 %). Під час останнього відбору крові (105-та доба дослідів) встановлено статистично вірогідне зниження концентрації ЦІК та підвищення рівня серомукоїдів на 21,5 та 17,6 % відповідно, а також тенденцію до зниження рівня глобулінів, яке склало 15,5 %.

Результати біохімічних досліджень проб крові в окремі часові періоди дослідів наведені в табл. 2.

Таблиця 2 — Біохімічні показники сироватки крові кролів в окремі періоди дослідів

№ з/п	Загальний білок, г/л	Альбумін, г/л	Глобуліни, г/л	Циркуючі імунні комплекси, мг/мл	Серомукоїди, мг/мл
До інокуляції генетичного матеріалу					
Дослід					
1	83,1	59,3	23,8	0,15	0,22
2	59,6	44,8	14,8	0,13	0,22
3	76,9	52,4	24,5	0,13	0,25
4	74,8	49,7	25,1	0,11	0,26
5	72,9	51,1	21,8	0,12	0,22
М ± m	73,5 ± 4,7	49,5 ± 4,9	24,0 ± 0,7	0,13 ± 0,01	0,23 ± 0,008
Контроль					
6	71,2	55,2	16,0	0,11	0,22
7	65,3	45,5	19,8	0,12	0,22
8	75,8	53,1	22,7	0,10	0,23
9	67,0	48,3	18,7	0,10	0,23
10	70,6	54,5	16,1	0,11	0,22
М ± m	69,9 ± 1,2	51,3 ± 1,9	18,7 ± 1,3	0,11 ± 0,004	0,22 ± 0,002
30 діб після інокуляції					
Дослід					
1	81,8	54,1	27,7	0,13	0,29
2	77,2	52,9	24,3	0,11	0,28
3	74,4	45,0	29,4	0,14	0,27
4	81,2	47,0	34,2	0,10	0,27
5	69,8	47,6	22,2	0,15	0,26
М ± m	76,9 ± 2,4	49,3 ± 1,8	27,6 ± 2,4	0,126 ± 0,01	0,274 ± 0,006

№ з/п	Загальний білок, г/л	Альбумін, г/л	Глобуліни, г/л	Циркулюючі імунні комплекси, мг/мл	Серомукоїди, мг/мл
Контроль					
6	73,6	45,2	28,4	0,12	0,21
7	71,2	45,8	25,4	0,14	0,24
8	69,5	44,0	25,5	0,15	0,21
9	67,1	50,6	16,5	0,13	0,22
10	70,1	48,2	21,9	0,15	0,25
M ± m	70,3 ± 1,3	46,8 ± 1,3	23,5 ± 2,3	0,138 ± 0,006	0,226 ± 0,008
105 дів після інокуляції					
Дослід					
1	64,2	45,9	18,3	0,11	0,24
2	61,7	45,3	16,4	0,12	0,30
3	71,2	47,0	24,2	0,11	0,29
4	75,8	50,0	25,8	0,14	0,32
5	70,0	45,3	24,7	0,14	0,32
M ± m	68,6 ± 2,8	46,7 ± 0,9	21,9 ± 1,9	0,124 ± 0,006	0,294 ± 0,016
Контроль					
6	64,2	45,3	18,9	0,16	0,32
7	79,3	47,0	32,3	0,15	0,26
8	63,2	45,3	17,9	0,18	0,22
9	75,8	46,5	29,3	0,16	0,24
10	78,7	48,2	30,5	0,14	0,21
M ± m	72,2 ± 3,2	46,5 ± 0,6	25,8 ± 2,5	0,158 ± 0,008	0,250 ± 0,022

Виходячи з біологічної ролі досліджених біомаркерів неспецифічного імунітету (ЦІК середньої молекулярної маси є індукторами клітинної ланки, а серомукоїди супресорами гуморальної ланки вродженого імунітету) можна зробити висновок, що експериментальне зараження кролів спумавірусом спричиняє незначну активізацію імунної системи через 30 дів після інфікування з подальшим вираженим пригніченням функціонального стану обох ланок неспецифічного імунітету кролів у наступні періоди дослідження.

Висновки. 1. Інокуляція кролям генетичного матеріалу збудника спумавірусної інфекції ВРХ спричиняє короткочасну, до 60 дів, персистенцію за даними молекулярно-генетичного дослідження.

2. Персистенція збудника спумавірусної інфекції ВРХ не спричиняє в організмі кролів суттєвих гематологічних змін, хоча перерозподіл клітин лейкоцитарної фракції у бік виразного лімфоцитозу свідчить про розвиток імуносупресивного стану.

3. Експериментальне зараження кролів спумавірусом спричиняє незначну активізацію імунної системи через 30 дів після інфікування, стан якої змінюється у подальшому вираженим пригніченням обох функціональних ланок неспецифічного імунітету.

4. Генетичний матеріал збудника спумавірусної інфекції спричиняє за інокуляції у кролів прояв імуносупресії при лейкоцитозі та перерозподілі лейкоцитарної фракції у бік значного (80–88 %) лімфоцитозу, зниження концентрації ЦІК, рівня глобулінів та підвищення серомукоїдів.

Список літератури

1. Красникова Е. С. Эпизоотическая ситуация по вирусному иммунодефициту крупного рогатого скота в городе Саратове и Саратовской области. *Вестник ветеринарии*. 2011. № 4 (59). С. 70–71. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=17069902>.
2. Romen F. W. et al. Serological detection system for identification of cows shedding bovine foamy virus via milk. *Virology*. 2007. Vol. 364, No. 1. P. 123–131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.009>.
3. Murray S. et al. Expanded tissue targets for foamy virus replication with simian immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Journal of Virology*. 2006. Vol. 80, No. 2. P. 663–670. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.80.2.663-670.2006>.

4. Pamba R., Jeronimo C., Archanbault D. Detection of bovine retrospumavirus by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 1999. Vol. 78, No. 1–2. P. 199–208. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(98\)00179-7](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(98)00179-7).
5. Колотвин В. В. Вирус иммунодефицита крупного рогатого скота: индикация инфекции и распространённость в хозяйствах Российской Федерации: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23, 16.00.03 / Всерос. науч.-исслед. ин-т эксперим. вет. им. Я. П. Коваленко. Москва, 2007. 22 с. URL: <https://search.rsl.ru/ru/record/01003053744>.
6. Pinto-Santini D. M., Stenbak C. R., Linial M. L. Foamy virus zoonotic infections. *Retrovirology*. 2017. Vol. 14, No. 1. P. 55. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12977-017-0379-9>.
7. Materniak M. et al. Similar patterns of infection with bovine foamy virus in experimentally inoculated calves and sheep. *Journal of Virology*. 2013. Vol. 87, No. 6. P. 3516–3525. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02447-12>.

STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF BOVINE FOAMY VIRUS ON THE MODEL OF LABORATORY ANIMALS

Gorbatenko S. K.¹, **Solodiankin O. S.**¹, **Gorbatenko V. P.**², **Kovalenko L. V.**¹,
Rudova N. G.¹, **Kuznetsova O. V.**¹, **Miahkykh N. V.**¹, **Zdanevych P. P.**¹

¹ National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

² Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

Genetic material of the field isolate of bovine foamy virus was inoculated subcutaneously in rabbits (5 experimental and 5 intact animals). The influence of genetic material on the organism of experimental animals was studied at the molecular-genetic, cellular, and biochemical levels. It has been established that the persistence of the causative agent of spumavirus infection according to the results of molecular and genetic research (PCR) is 60 days. Redistribution of cells of leukocyte fraction towards lymphocytosis (80–88%) was recorded. Decrease in the concentration of circulating immune complexes by 22.2% ($p \leq 0.05$) and a tendency to decrease in the seromuroid concentration (by 6.5%) were found on 60th day after infection compared with control indicators. At the end of the experiment it was established a statistically significant decrease in the concentration of circulating immune complexes and an increase in seromuroid level by 21.5% and 17.6% respectively, as well as a tendency to decrease in the level of globulins, which was 15.5%. The results of hematological and biochemical analysis indicate the development of immunosuppressive state under the influence of the inoculated material

Keywords: PCR, hematological and biochemical indicators, immunosuppression