

На правах рукописи

Чернявцева Анастасия Павловна

**Сравнительная характеристика основных биологических
свойств различных штаммов герпесвируса лошадей 1**

**16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология**

**Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**



Москва – 2006

Работа выполнена в лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики респираторных вирусных болезней лошадей и крупного рогатого скота ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко Российской академии сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:

доктор ветеринарных наук, Заслуженный деятель науки РФ, лауреат Премии Совета Министров СССР, лауреат Государственной премии Республики Саха (Якутия), профессор Константин Павлович Юров

Официальные оппоненты:

- доктор ветеринарных наук, Заслуженный деятель науки РФ, профессор Валентин Александрович Бурлаков
- кандидат биологических наук, лауреат Премии Совета Министров СССР Григорий Андреевич Надточей

Ведущая организация – ФГУ Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов

Защита состоится « 6 » декабря 2006 г. в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.01 по защите диссертаций на соискание учёной степени доктора наук при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко по адресу: 109472, Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко.

Автореферат разослан « 31 » октября 2006 г.

Учёный секретарь
диссертационного
совета, профессор



Н.П. Овдиенко

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

1.1. Актуальность темы.

В настоящее время в России функционируют 74 конных завода, 400 племенных конеферм, 42 ипподрома. Наиболее многочисленное поголовье – около 54% от общего количества лошадей – содержится в личных и подсобных хозяйствах.

Основной целью развития коневодческой отрасли на период до 2015г. является полное обеспечение сельскохозяйственных, спортивных и других организаций различного назначения и форм собственности, а также физических лиц высококачественными лошадьми (Программа развития коневодства в РФ на период до 2015г., Минсельхоз РФ, в материалах третьего Всероссийского съезда коннозаводчиков, 2004).

В связи с указанным большое значение приобретает обеспечение ветеринарного благополучия отрасли.

К числу наиболее распространённых и опасных вирусных болезней лошадей относится ринопневмония – герпесвирусная инфекция 1. Болезнь характеризуется значительным разнообразием форм клинического проявления. Форма течения ВГЛ-1 инфекции зависит от многих причин: пола, возраста, физиологического состояния (жерёбости), инфицирующей дозы возбудителя, иммунного статуса животных и в значительной степени от биологических свойств возбудителя. В структуре инфекционной патологии лошадей ВГЛ-1 является одной из главных причин респираторных болезней, аборт, перинатальной смерти жеребят и поражения нервной системы.

Нервное проявление ВГЛ-1 инфекции было впервые зарегистрировано в Норвегии в 1966 г (F. Saxegaard, 1966). С тех пор нервная форма ВГЛ-1 инфекции была описана почти в каждой стране. В нашей стране нервную форму ринопневмонии впервые описал К.П. Юров (1984).

Несмотря на то, что в нашей стране нервно-паралитическая форма ВГЛ-1 инфекции регистрируется в виде локальных вспышек, в ряде стран с

развитым коневодством (США, Канада, страны Европы) в последние годы отмечается значительное увеличение заболеваемости лошадей с поражением ЦНС. Экономическая значимость этих вспышек определяется тем, что поражаются высокоценные племенные и спортивные лошади. По данным ряда авторов, проявление нервной формы ВГЛ-1 инфекции варьирует от единичных спорадических случаев до поражения 90 % поголовья. Смертность от болезни также значительно изменяется в течение различных вспышек и может достигать 40 – 50 % (J.A. Mumford and N. Edington, 1980; M.J. Studdert et al., 1981; M.J. Studdert, 1983; C. van-Maanen et al., 2001; B. Stierstorfer et al., 2002; G.P. Allen et al., 2006). Переболевшие лошади теряют свою племенную или спортивную ценность.

Кроме того, в последние годы появились сообщения об интродукции нейропатогенных вариантов ВГЛ-1 в популяции животных других видов: зебры, газели Томпсона, жирафа.

Распространение нервно-паралитической формы ринопневмонии ряд исследователей связывает с появлением новых доминантных штаммов вследствие мутантных изменений в геноме ВГЛ-1 (B. Stierstorfer et al., 2002; J.P. Tearle et al., 2003; M.J. Studdert et al., 2003; A.K. Gupta et al., 2005; J.R. Patel and J. Heldens, 2005 и др.). При этом происходит вытеснение старых эпизоотических вариантов (штаммов) ВГЛ-1. Эти изменения неизбежно определяют необходимость переоценки эффективности существующих средств и методов борьбы с инфекцией.

В связи с этим особенно актуальными являются исследования по изоляции и изучению штаммов в случае аборт у кобыл и респираторной инфекции у жеребят, выявлению нейропатогенных вариантов вируса.

1.2. Цель и задачи.

Целью нашей работы являлось: выявление и изучение нейропатогенных штаммов вируса герпеса лошадей 1, изолированных из абортированных плодов и респираторных органов лошадей и находившихся в активной

циркуляции в различных регионах РФ и стран СНГ в период с 1974 г. по 2004 г.; изыскание метода контроля реактогенности (нейропатогенности) коммерческих вирус-вакцин против ринопневмонии лошадей.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- отработать методики культивирования эпизоотических штаммов ВГЛ-1 *in vitro*; индикации вируса в реакции непрямой иммунофлуоресценции; индикации вирусной ДНК в ПЦР;
- изыскать адекватную лабораторную модель для оценки вирулентности эпизоотических штаммов ВГЛ 1;
- изучить в сравнительном аспекте особенности экспериментальной инфекции у лабораторных животных (белых мышей линии BALB/с) при заражении их различными штаммами ВГЛ-1;
- разработать лабораторный метод контроля реактогенности (нейропатогенности) коммерческих вирус-вакцин.

1.3. Научная новизна.

Впервые предложен метод дифференциации штаммов ВГЛ-1 по их нейропатогенности для лабораторных животных (белых мышей линии BALB/с). Изучены нейропатогенные свойства эпизоотических штаммов ВГЛ-1, изолированных на территории ряда стран СНГ в период с 1974 г. по 2004 г. Установлено, что девять штаммов из шестнадцати исследованных (56%) обладают нейропатогенными свойствами. У мышат-сосунков линии BALB/с эти штаммы при интрацеребральной инокуляции вызывают нервно-паралитическое заболевание с 100% летальным исходом. Показано, что нейропатогенность свойственна штаммам возбудителя, изолированным из абортированных плодов кобыл.

Меньшее число штаммов (44%), выделенных преимущественно из органов дыхания жеребят, при интрацеребральной инокуляции слабовирулентны и не вызывают появления симптомов поражения ЦНС.

Полученные результаты позволяют объяснить причины возникновения вспышек заболевания лошадей с симптомами поражения ЦНС, их взаимосвязь с вирусными абортами у кобыл.

1.4. Практическая значимость.

Предложена лабораторная модель для дифференциации эпизоотических штаммов ВГЛ-1 по их нейрпатогенным свойствам. Оценка нейрпатогенности штаммов ВГЛ-1 позволяет проводить отбор штаммов, перспективных для создания новых и совершенствования существующих средств диагностики и специфической профилактики герпесвирусных инфекций лошадей. Оценка вирулентности вакцинных штаммов на лабораторных животных (белых мышах линии BALB/c) может служить методом контроля реактогенности (нейрпатогенности) коммерческих вирус-вакцин против ринопневмонии лошадей.

1.5. Личный вклад соискателя заключается в проведении работ по культивированию и титрованию штаммов ВГЛ-1, в организации и проведении работы по экспериментальному воспроизведению инфекции ВГЛ-1 на белых мышах, по реиноляции вируса из органов заражённых животных и его идентификации в реакции нейтрализации, по выявлению ДНК ВГЛ-1 в органах заражённых животных методом ПЦР, по гистологическому исследованию срезов органов, по выявлению ВГЛ-1 методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа, а также в анализе и обобщении результатов исследований.

1.6. Апробация работы.

Материалы работы были представлены на международном симпозиуме «Научные основы обеспечения защиты животных от экзотоксинов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний» (Казань, 2005 г.). Основные положения, выводы и практические

предложения, изложенные в диссертации, обсуждены и одобрены на межлабораторном научно-производственном совещании научных сотрудников ГНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко (Москва, 2006 г.).

1.7. Основные положения, выносимые на защиту.

На защиту выносятся:

- экспериментальные данные, характеризующие нейрпатогенность эпизоотических штаммов ВГЛ-1, находившихся в активной циркуляции на территории РФ и стран СНГ в период с 1974 г. по 2004 г., а также аттенуированных штаммов, используемых в производстве некоторых коммерческих вакцин;
- результаты сравнительного изучения особенностей ВГЛ-1 инфекции на лабораторных животных (белых мышах линии BALB/c);
- рекомендации по лабораторному контролю реактогенности (нейрпатогенности) коммерческих вирус-вакцин против ринопневмонии лошадей.

1.8. Публикации.

По материалам диссертационной работы опубликовано 2 научные работы.

1.9. Структура и объём работы.

Материалы диссертации изложены на 129 страницах компьютерного текста и состоят из следующих разделов: введение, обзор литературы, собственные исследования, выводы, практические предложения, список литературы. Список литературы содержит 165 источников, из них 145 – иностранные. Диссертация иллюстрирована одной схемой, 11 таблицами, 21 рисунком.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Работа выполнена в 2003 – 2006 гг. в лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики респираторных вирусных болезней лошадей и крупного рогатого скота ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко в соответствии с утверждёнными планами научно-исследовательских работ в период 2003 – 2006 гг. (исследования по заданию РНТП 02.02.04; 08.02.02.03.01).

2.1. Материалы и методы.

Вирусы.

В работе использовали 15 эпизоотических штаммов ВГЛ-1, выделенных в разные годы в лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики респираторных вирусных болезней лошадей и крупного рогатого скота ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко из абортированных плодов и респираторных органов жеребят (профессор К.П. Юров), 1 референтный штамм (КуД) и 3 вакцинных штамма ВГЛ-1: штамм СВ/69 – производственный вакцинный штамм ВГЛ-1 (профессор К.П. Юров); штамм, обозначенный нами как Rm, выделен из коммерческой вакцины «Rhinomune» (производства США); штамм RPK – штамм, выделенный нами из коммерческой вакцины «RPK» (производства ЧССР). Эпизоотические штаммы, прошедшие после их изоляции 6 – 10 пассажей в культуре клеток, хранились в музее лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики респираторных вирусных болезней лошадей и крупного рогатого скота в лиофилизированном виде. Используемые в работе штаммы представлены в таблице 1.

Клеточные культуры.

Штаммы вируса пассировали, используя перевиваемую клеточную культуру почки кролика (RK-13). Штамм СВ/69 культивировали в перевиваемой клеточной культуре почки телёнка (ПТП), штамм Rm – первые два пассажа культивировали в перевиваемой клеточной культуре лёгкого

Таблица 1 – Штаммы ВГЛ-1, использованные в работе

№	штамм	место выделения	год выделения
1	ПП	Московская обл.	2002
2	Став-74	Ставропольский край	1974
3	СТ-1	Ставропольский край	1976
4	СТ-2	Ставропольский край	1976
5	КР-1	Краснодарский край	2004
6	КР-2	Краснодарский край	2004
7	КБ-1	Кабардино-Балкарская Республика	1976
8	АБ-33	Ростовская обл.	1979
9	В/ж	Краснодарский край	1985
10	КИР-1	Киргизия	1974
11	1казп	Ростовская обл.	1974
12	МКЗ-1с	Московская обл.	1987
13	КАЖ	Ростовская обл.	1974
14	ОП-5-75	Рязанская обл.	1975
15	Т-1	Краснодарский край	1974
16	КуD	США, штат Кентукки (референтный штамм)	1954
17	СВ/69	вакцинный штамм	1969
18	Rm	вакцинный штамм	
19	РПК	вакцинный штамм	

эмбриона лошади (EEL), в последующем использовали клеточную культуру RK-13.

Животные.

В опытах использовали 169 мышат-сосунков линии BALB/c в возрасте 3 суток с массой тела 1765 – 2683 мг.

Титрование вирусов.

Инфекционный титр вируса определяли путём заражения культуры клеток: ПТП (для штамма СВ/69), EEL (для штамма Rhinomune), RK-13 (для остальных штаммов). Для титрования использовали 96-луночные планшеты

для клеточных культур (фирмы «CORNING Costar»). Титр вируса оценивали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ по стандартной методике (по Риду и Менчу).

Реакция нейтрализации.

Реакцию нейтрализации с разведениями сывороток и постоянной дозой вируса использовали для определения титра специфических антител в сыворотках лошадей, которые в последующем использовались для идентификации реизолятов вируса из мозга заражённых животных и для непрямого иммунофлуоресцентного анализа.

Двукратные разведения сывороток исследовали против 100ТЦД_{50} вируса. Для постановки реакции использовали 96-луночные планшеты для культур клеток (фирмы «CORNING Costar»). Учёт результатов реакции проводили через 72 часа по наличию цитопатических изменений.

Экспериментальная инфекция.

Для воспроизведения экспериментальной инфекции мышатам опытных групп вводили интрацеребрально по 20 мкл соответствующего штамма вируса в титре $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Животным контрольной группы вводили интрацеребрально по 20 мкл культуральной жидкости неинфицированной культуры.

В течение 21 дня ежедневно проводили клинический осмотр заражённых животных. В течение первых 10 дней после заражения фиксировали изменение массы тела путём взвешивания на весах модели ЕК-205-А ($d=0,1\text{мг}$) производства ООО «ПетВес» (Санкт-Петербург).

Реизоляция вируса.

Головной мозг, лёгкие, печень, селезёнку мышат асептично отбирали после естественной смерти или эвтаназии и гомогенизировали в 200 – 400 мкл среды Игла MEM. Наличие вируса в полученной суспензии проверяли в культуре клеток по развитию характерного цитопатического действия. Для заражения культуры клеток полученную суспензию центрифугировали при 3000 об./мин. 20 мин. и полученный супернатант использовали для

заражения. Во всех случаях при отсутствии ЦПД в первом пассаже проводили три последовательных «слепых» пассажа.

Для идентификации каждого реизолята использовали реакцию нейтрализации со специфической сывороткой. Индекс нейтрализации, превышающий $2 \lg$ ТЦД₅₀/мл, принимали за свидетельство принадлежности реизолированного вируса к ВГЛ-1.

Полимеразная цепная реакция.

Выделение ДНК из суспензии мозга, лёгких, печени, селезёнки осуществляли с использованием «Реагента в пробирках для выделения ДНК из биопроб с целью последующего анализа методом полимеразной цепной реакции ДНК-ЭКСПРЕСС» производства НПФ «Литех» (Москва).

Наличие ДНК ВГЛ-1 в суспензии из мозга, лёгких, печени и селезёнки мышей определяли методом ПЦР с праймерами, специфичными нуклеотидной последовательности фрагмента гена гликопротеина В, как описано у R. Kirisawa et al. (1993). Размер амплифицируемого фрагмента – 1181 п. н. Локализация праймеров на геноме ВГЛ-1 показана в таблице 2.

Таблица 2 – Праймеры, использованные для постановки ПЦР

праймер	последовательность нуклеотидов (5' – 3')	локализация на геноме
		ВГЛ-1
F	СТТGTGAGATCTAACCGCAC	2427 – 2446
R	GGGTATAGAGCTTTCATGGG	3607 – 3588

Праймеры синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва). Для постановки реакции амплификации использованы реактивы компании «Fermentas AB» (Литва).

Для анализа ПЦР-амплифицированной ДНК использовали метод электрофореза в 0,8% агарозном геле. Для проведения электрофореза использованы реактивы компании «Fermentas AB» (Литва).

Гистологическое исследование.

Головной мозг, лёгкие, печень, селезёнку мышат, заражённых штаммами КР-1 и КБ-1 ВГЛ-1, отбирали для гистологического исследования после эвтанази, осуществлённой на 5 сутки после интрацеребральной инокуляции им вируса. Отобранные органы помещали в фиксирующую жидкость (10%-ный водный раствор нейтрального формалина). Для изготовления гистосрезов зафиксированные органы заключали в парафин. Полученные на микротоме гистосрезы окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали в световом микроскопе.

Непрямой иммунофлуоресцентный анализ.

Головной мозг и лёгкие мышат, заражённых штаммами КР-1 и КБ-1 ВГЛ-1, отбирали для иммунофлуоресцентного анализа после эвтанази, осуществлённой на 5 сутки после интрацеребральной инокуляции им вируса. Отобранные органы помещали в фиксирующую жидкость (10%-ный водный раствор нейтрального формалина). Для изготовления гистосрезов зафиксированные органы заключали в парафин. Полученные на микротоме гистосрезы наклеивали на обезжиренные предметные стёкла и депарафинировали путём проведения через два ксилола, 96- и 70%-ный спирты и воду (по 2 – 3 минуты в каждой жидкости).

Подготовленные срезы фиксировали охлаждённым фосфатно-солевым буфером (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM K₂HPO₄, pH 7,2). Затем срезы инкубировали в 300 мкл лошадиной сыворотки с титром специфических антител в РН 1:32, взятой в разведении 1:5. Инкубация производилась во влажной камере при температуре 37⁰С в течение 45 мин. После этого срезы отмывались фосфатно-солевым буфером 3 – 4 раза по 2 – 3 минуты каждый раз. Затем срезы инкубировали в 300 мкл меченой изоцианат флуоресцентном сывороткой во влажной камере при температуре

37°C в течение 45 мин. После чего предметные стёкла отмывались, как описано выше и готовились для исследования под микроскопом с нефлуоресцирующим иммерсионным маслом.

Обнаружение яркой жёлто-зелёной флуоресценции принимали за свидетельство наличия ВГЛ-1.

Статистическая обработка результатов.

Математическая обработка полученных данных проводилась с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2003. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета "СТАТРАК-WIN".

2.2. Результаты исследований.

2.2.1. Культуральные свойства эпизоотических штаммов ВГЛ-1, использованных в работе.

В опытах использовали штаммы с титром 6,5 – 7,5 lg ТЦД₅₀/мл. Штаммы вируса пассировали, используя перевиваемую клеточную культуру почки кролика (RK-13).

После заражения указанной культуры клеток цитопатические изменения характеризовались появлением в клеточном монослое очагов округлённых клеток через 24 часа после заражения. Через 48 часов в клеточном монослое наблюдалось образование пустот, окружённых многоядерными синцитиями.

При этом штаммы различались по их способности размножаться и вызывать деструктивные изменения в культуре клеток.

По характеру цитопатического действия различали:

- штаммы, которые вызывали разрушение монослоя с образованием крупных округлых клеток, часто собранных вместе напоподобие виноградных гроздьев (штаммы В/ж, КИР-1, КАЖ, Т-1);

- штаммы, цитопатическое действие которых выразалось преимущественно формированием многоядерных клеток и симпластов (штаммы КБ-1, МКЗ-1с);
- штаммы, характеризующиеся смешанным цитопатическим действием (штаммы ПП, Став-74, СТ-1, СТ-2, КР-1, КР-2, АБ-33, 1каЗп, ОП-5-75).

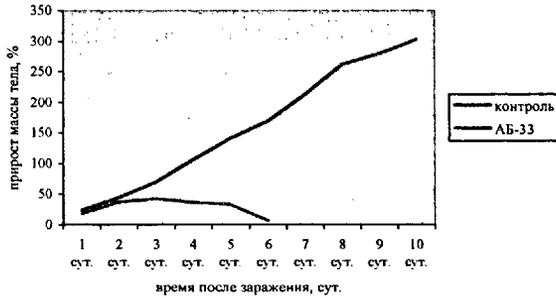
2.2.2. Нейропатогенность эпизоотических штаммов ВГЛ-1 для белых мышей линии BALB/c.

При выполнении данного раздела работы использовали 15 эпизоотических штаммов ВГЛ-1, а также референтный штамм ВГЛ-1 КуД.

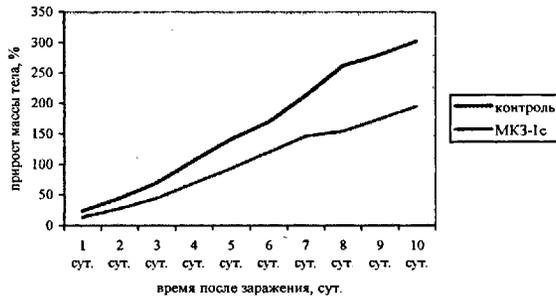
Проведёнными исследованиями установлено, что часть штаммов (эпизоотические штаммы ПП, СТ-1, СТ-2, КР-1, КР-2, Став-74, АБ-33, 1каЗп и референтный штамм КуД), обладает выраженной в разной степени нейропатогенностью для белых мышей линии BALB/c. После их инокуляции у мышей наблюдали развитие нервного симптомокомплекса. Первые признаки заболевания регистрировали на 3 – 5 день после заражения. Заболевание начиналось с возбуждения, повышения тонуса скелетной мускулатуры, затем появлялось нарушение координации движений, стремление двигаться вперёд, плавательные движения в положении на боку. Смерть наступала на 5 – 8 сутки после заражения (48 – 72 часа от начала заболевания), летальность составляла 100%.

Характерным признаком заболевания служило снижение массы тела (отставание в росте). На рис. 1 приведены типичные кривые изменения массы тела мышат, заражённых нейропатогенным штаммом (АБ-33) и штаммом, не обладающим нейропатогенностью (МКЗ-1с).

Масса тела у мышей с клиническими признаками поражения центральной нервной системы, отличалась (при ежедневном взвешивании) от массы тела контрольных животных с первого дня после заражения. Незначительный прирост массы тела наблюдался лишь в первые 2 – 3 дня, после чего



а)



б)

Рис. 1. Кривые изменения массы тела мышат, заражённых нейропатогенным штаммом – АБ-33 (а) и штаммом, не обладающим нейропатогенностью – МК3-1с (б) по сравнению с контрольными.

ежедневно до момента смерти фиксировались отрицательные приросты по сравнению с предыдущим днём. При этом, как правило, снижение массы тела по сравнению с предыдущим днём наблюдалось за сутки до появления первых клинических признаков.

У контрольных животных не наблюдали каких-либо признаков заболевания в течение всего срока наблюдения. Прирост массы тела на 10 – й

день эксперимента составлял в среднем 301,7% к массе тела на момент начала опыта.

Инфекционный вирус реизолировали в культуре клеток RK-13 из проб мозга мышей, погибших (подвергнутых эвтаназии в агональной стадии) с признаками поражения ЦНС. При заражении клеточной культуры RK-13 супернатантом суспензии мозга мышонка, инфицированного штаммом В/ж и погибшего на 8 сутки после инокуляции без каких-либо клинических признаков инфекции вирус удалось реизолировать путём двух последовательных пассажей в культуре клеток RK-13. Во втором случае (летальный исход на 14 день после инокуляции) размножение вируса не регистрировали в течение трёх последовательных слепых пассажей. Идентификацию каждого реизолата осуществляли, используя реакцию нейтрализации со специфической сывороткой.

Инфекционный вирус не выявлен в мозге контрольных животных, подвергнутых эвтаназии на 5 – й и 10 – й день от начала эксперимента.

Суммарные данные по реизолации вируса и выявлению ДНК ВГЛ-1 методом ПЦР в суспензии мозга погибших и убитых мышат представлены в табл. 3.

Используя метод полимеразной цепной реакции ДНК ВГЛ-1 выявили во всех исследованных пробах мозга мышей, погибших (или подвергнутых эвтаназии в агональной стадии) с явлениями поражения ЦНС, а также в мозге одного мышонка, заражённого штаммом В/ж и погибшего на 8 день после инокуляции без признаков поражения нервной системы. Определяя ДНК ВГЛ-1 в мозге мышонка, заражённого штаммом В/ж и погибшего на 14 день после инокуляции без каких-либо клинических признаков инфекции, а также в мозге контрольных животных, получили отрицательный результат.

Таким образом, девять штаммов из шестнадцати (56%), включая референтный штамм КуД, оказались нейрпатогенными для мышат линии BALB/c. Этиологическая роль вируса в развитии нервного

Таблица 3 – Результаты реиноляции вируса и выявления ДНК ВГЛ-1 методом ПЦР в суспензии мозга погибших (или подвергнутой эвтаназии в агональной стадии) мышат.

штамм	количество мышей в группе	реиноляция вируса в культуре клеток		выявление ДНК ВГЛ-1 методом ПЦР	
		пробы	%	пробы	%
ПП	6	6/6 ¹⁾	100	6/6	100
Став-74	6	6/6	100	6/6	100
СТ-1	6	6/6	100	6/6	100
СТ-2	6	6/6	100	6/6	100
КР-1	6	6/6	100	6/6	100
КР-2	6	6/6	100	6/6	100
АБ-33	6	6/6	100	6/6	100
1ка3п	8	8/8	100	8/8	100
КuD	8	8/8	100	8/8	100
В/ж	6	1/1	100	1/1	100
	6 ²⁾	1/0	0	1/0	0
контроль	9	4/0	0	4/0	0

1) числитель – количество исследованных проб; знаменатель – количество положительных проб

2) повторное воспроизведение опыта (второй пассаж)

симптомокомплекс была доказана реиноляцией инфекционного вируса из мозга заражённых животных в культуре клеток и его идентификацией в РН со специфической сывороткой. ДНК ВГЛ-1 в мозге таких мышат была выявлена также с помощью ПЦР.

Семь из шестнадцати исследованных штаммов (КБ-1, В/ж, КИР-1, МКЗ-1с, КАЖ, ОП-5-75, Т-1) не вызвали развития у мышей клинических признаков поражения центральной нервной системы при интрацеребральной инокуляции в течение всего срока наблюдения. Масса тела таких мышей постоянно возрастала и через 10 дней составляла 125,2 – 218,1% к массе тела до заражения. Исключение составлял штамм В/ж. У одного мышонка (из шести в группе) наблюдалось отставание в росте и летальный исход на 8

день после инокуляции без каких-либо клинических признаков поражения ЦНС. При повторном воспроизведении опыта (второй пассаж) также наблюдалось отставание в развитии одного из шести мышат и летальный исход на 14 день после заражения.

Полученные экспериментальные данные позволяют нам сделать заключение, что полевые штаммы вируса ринопневмонии лошадей различаются по их вирулентности для белых мышей линии BALB/c. Белые мыши линии BALB/c могут служить адекватной лабораторной моделью для изучения нейротропных свойств штаммов ВГЛ-1, дифференциации по этому признаку эпизоотических штаммов возбудителя.

2.2.3. Патоморфологические и иммуногистологические исследования.

На данном этапе работы использовали два эпизоотических штамма ВГЛ-1: КБ-1 (Кабардино-Балкарская республика; 1976 год) и КР-1 (Краснодарский край; 2004 год).

В предыдущих исследованиях было установлено, что штамм КР-1 ВГЛ-1 обладает выраженной нейротропностью для мышат линии BALB/c. Штамм КБ-1 ВГЛ-1 не вызывает развития у мышей клинических признаков заболевания при интрацеребральной инокуляции.

В данном опыте мышата были разделены на 3 группы. Восемью мышатам группы № 1 вводили интрацеребрально по 20 мкл штамма КР-1 в титре 6,5 Ig ТЦД₅₀/мл. Восемью мышатам группы № 2 вводили интрацеребрально по 20 мкл штамма КБ-1 в титре 6,5 Ig ТЦД₅₀/мл. Восемью мышатам группы № 3 вводили интрацеребрально по 20 мкл культуральной жидкости неинфицированной культуры клеток РК-13.

Суммарные данные по реизоляции вируса из суспензии мозга, лёгких, селезёнки, печени мышат, подвергнутых эвтаназии на 2, 4 и 6 сутки после

инокуляции, а также данные по выявлению ДНК ВГЛ-1 в этих органах методом ПЦР, представлены в табл. 4.

Таблица 4 – Результаты реиоляции вируса и выявления ДНК ВГЛ-1 методом ПЦР в суспензии мозга, лёгких, селезёнки и печени мышат, подвергнутых эвтаназии на 2, 4 и 6 сутки после инокуляции.

штамм	день после инокуляции	реиоляция вируса в культуре клеток				выявление ДНК ВГЛ-1 методом ПЦР			
		мозг	лёгкие	селезёнка	печень	мозг	лёгкие	селезёнка	печень
КБ-1	2	2/2 ^{*)}	2/0	2/0	2/0	2/2	2/0	2/0	2/0
	4	2/2	2/0	2/0	2/0	2/2	2/0	2/0	2/0
	6	2/2	2/0	2/0	2/0	2/2	2/0	2/0	2/0
КР-1	2	2/2	2/1	2/0	2/0	2/2	2/2	2/0	2/0
	4	2/2	2/2	2/0	2/0	2/2	2/2	2/0	2/0
	6	2/2	2/2	2/0	2/0	2/2	2/2	2/0	2/0
контроль	2	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0
	4	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0
	6	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0

^{*)} числитель – количество исследованных проб; знаменатель – количество положительных проб.

Инфекционный вирус был реизолирован в культуре клеток RK-13 из всех проб мозга мышей, заражённых штаммом КР-1 ВГЛ-1 и подвергнутых эвтаназии на 2, 4 и 6 сутки после инокуляции, а также из лёгких одного (из двух) мышонка, подвергнутого эвтаназии на 2 сутки и из лёгких всех мышат, убитых на 4 и 6 сутки после инокуляции им вируса. Инфекционный вирус не был выявлен в селезёнке и печени мышат этой группы.

Инфекционный вирус также был изолирован из всех проб мозга мышей, заражённых штаммом КБ-1 ВГЛ-1 и подвергнутых эвтаназии на 2, 4 и 6 сутки после инокуляции. В лёгких, селезёнке и печени мышат этой группы вирус не выявлен.

Вирус не выявлен в мозге, лёгких, селезёнке и печени контрольных животных.

При постановке полимеразной цепной реакции ДНК ВГЛ-1 выявили во всех исследованных пробах мозга и лёгких мышат, заражённых штаммом КР-1, а также во всех пробах мозга мышат, заражённых штаммом КБ-1.

Определяя ДНК ВГЛ-1 в органах контрольных животных, получили отрицательный результат.

Исследуя в световом микроскопе окрашенные гематоксилин-эозином срезы мозга мышат, заражённых штаммом КР-1 и подвергнутых эвтаназии на 5 сутки после инокуляции вируса, обнаружено, что оболочки мозга инфильтрированы лимфоидными клетками (рис. 2). Скопления лимфоидных клеток обнаружены также под оболочками мозга и по ходу кровеносных сосудов. Подобные изменения не были обнаружены в мозге мышат, заражённых штаммом КБ-1, и в мозге мышат контрольной группы.

Исследуя срезы из лёгких мышат, заражённых интрацеребрально штаммом КР-1 и подвергнутых эвтаназии на 5 сутки после заражения, обнаружено значительное кровенаполнение сосудов лёгких, а также десквамация эпителия бронхов на обширных участках лёгких. Эпителий бронхов округлый, набухший, неоднородно окрашен, отслаивается от базальной мембраны (рис. 3).

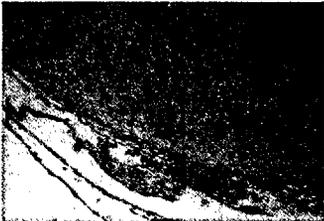


Рис. 2. Инфильтрация оболочки мозга мышонка, заражённого штаммом КР-1 (окраска гематоксилин-эозином). Увеличение $\times 160$.



Рис. 3. Десквамация эпителия бронхов в лёгких мышонка, заражённого штаммом КР-1 (окраска гематоксилин-эозином). Увеличение $\times 160$.

В лёгких мышат, заражённых штаммом КБ-1, и в лёгких мышат контрольной группы подобных изменений не обнаружено.

В срезах, изготовленных из селезёнки и печени мышат, заражённых штаммами КР-1 и КБ-1, не обнаружено каких-либо отклонений от нормы. В качестве контроля использовали срезы органов мышат из контрольной группы.

При учёте результатов непрямого иммунофлуоресцентного анализа яркая жёлто-зелёная флуоресценция, свидетельствующая о наличии ВГЛ-1, была обнаружена в оболочках и под оболочками мозга мышат, заражённых штаммом КР-1, в клетках головного мозга, а также вдоль кровеносных сосудов мозга (рис. 4).

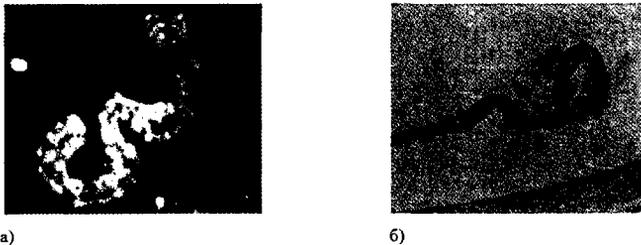


Рис. 4. а) Специфическая флуоресценция в оболочке мозга мышонка, заражённого штаммом КР-1. Увеличение $\times 900$. б) Лимфоидная инфильтрация оболочки мозга мышонка, заражённого штаммом КР-1 (окраска гематоксилин-эозином). Увеличение $\times 400$. Серийные срезы.

2.2.4. Нейропатогенность вакцинных штаммов ВГЛ-1 для белых мышей линии BALB/c.

Большой практический и научный интерес представляет изучение реактогенных свойств аттенуированных вакцинных штаммов ВГЛ-1.

Мы располагали тремя вакцинными штаммами ВГЛ-1:

1) штамм СВ/69 – производственный вакцинный штамм ВГЛ-1 (получен К.П. Юровым); 2) штамм, обозначенный нами как Rm, выделен из коммерческой

вакцины «Rhinomune» (производства США); 3) штамм RPK – штамм, выделенный из коммерческой вакцины «РПК» (производства ЧССР).

На рис. 5 приведены графики изменения массы тела мышей, заражённых различными вакцинными штаммами ВГЛ-1.

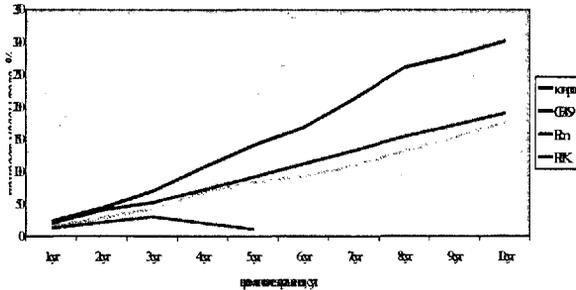


Рис. 5. Изменение массы тела мышей, заражённых различными вакцинными штаммами ВГЛ-1.

В результате проведённых исследований установлено, что один из штаммов – штамм RPK, выделенный из коммерческой вакцины «РПК» (производства ЧССР) – вызывает острую нейропатологию у белых мышей. Первые признаки заболевания у мышей были зарегистрированы на 3 сутки после инокуляции им вируса. Наблюдалось возбуждение, повышение тонуса скелетной мускулатуры, затем стремление двигаться вперёд, которое через 24 часа от начала заболевания становилось почти непрерывным, плавательные движения в положении лёжа на боку. Период плавательных движений удлинялся с 10 – 15 секунд (в начале заболевания) до 35 – 45 секунд на 2 сутки после появления первых симптомов. Смерть животных была зарегистрирована на 5 сутки после заражения (48 часов от начала заболевания), летальность составляла 100%.

В наших исследованиях инфекционный вирус был изолирован в культуре клеток RK-13 из всех проб мозга мышей, заражённых штаммом RPK и погибших с признаками поражения ЦНС.

3. ВЫВОДЫ.

1. Белые мыши линии BALB/c являются адекватной лабораторной моделью для выявления и изучения нейрпатогенных свойств различных эпизоотических и аттенуированных штаммов вируса герпеса лошадей 1.
2. Установлено, что в числе штаммов ВГЛ-1, находившихся в активной циркуляции на территории ряда стран СНГ в период с 1974 по 2004 гг., более половины (56%) обладают выраженной нейрпатогенностью для мышей линии BALB/c. Другая группа штаммов (44%) при интрацеребральной инокуляции мышатам линии BALB/c не вызывает видимых признаков поражения ЦНС.
3. Показано, что нейрпатогенность свойственна, главным образом, штаммам возбудителя, выделенным из абортirованных плодов.
4. Все штаммы, изолированные из респираторных органов жеребят, а также отдельные штаммы из абортirованных плодов, не вызывают у мышей поражения ЦНС. Экспериментальная инфекция характеризуется у них только угнетением и задержкой в росте.
5. Изучение нейрпатогенности трёх коммерческих препаратов на основе аттенуированных штаммов ВГЛ-1 показало, что производственный вакцинный штамм RPK обладает выраженными нейрпатогенными свойствами для мышей линии BALB/c. Два других штамма (CB/69 и

Rhinomune) не патогенны для белых мышей. Следовательно, метод интрацеребрального заражения мышат-сосунков линии BALB/c может быть рекомендован для контроля реактогенности (нейропатогенности) коммерческих вирус-вакцин против ВГЛ-1.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.

Материалы диссертации использованы в дополнении, подготовленном Референтной лабораторией МЭБ по ринопневмонии лошадей (эксперт К.П. Юров) для нового издания «Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines», раздел Equine diseases in list B, глава Equine rhinopneumonitis, Office International des Epizooties.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Татаурова А.В. Нейропатогенность полевых штаммов герпесвируса лошадей 1 для белых мышей. / Татаурова А.В., Юров К.П., Алексеенкова С.В. // Материалы международного симпозиума «Научные основы обеспечения защиты животных от экзотоксинов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний». – Казань, 2005, Т.2, С. 329 – 330.
2. Татаурова А.В. Нейропатогенные штаммы возбудителя ринопневмонии – вирусного аборта кобыл / Татаурова А.В., Юров К.П., Алексеенкова С.В. // Ветеринария. – 2006. – № 3. – С. 20 – 23.

Принято к исполнению 30/10/2006
Исполнено 31/10/2006

Заказ № 878
Тираж: 100 экз.

Типография «11-й ФОРМАТ»
ИНН 7726330900
115230, Москва, Варшавское ш., 36
(495) 975-78-56
www.autoreferat.ru

