

Порівняльне вивчення штамів збудника вірусної діареї великої рогатої худоби

С. В. Бондар, В. Г. Скибіцький

Національний аграрний університет
Вул. Героїв оборони, 16, Голосієво, Київ, 03022, Україна

Повідомляються результати порівняльного вивчення морфології, білкового складу віріонів та антигенної характеристики трьох штамів (двох лабораторних та одного польового) збудника вірусної діареї великої рогатої худоби.

Вступ. Вірусна діарея (ВД — пестивірусна інфекція) великої рогатої худоби (ВРХ) широко розповсюджена і характеризується прихованим циклічним епізоотичним процесом, клінічні прояви якого різноманітні в залежності від віку хворих тварин [1].

Інфікування тварин збудником даної хвороби призводить до систематичного розповсюдження вірусу з високим ступенем пригнічення імунореактивності організму. При ураженні вірулентними штамми вірусу спостерігаються субклінічні інфекції, проноси та респіраторні захворювання різного ступеня тяжкості, які іноді переходять у летальну форму [2].

ВД розглядається також як кофактор, що впливає на виникнення та перебіг інших інфекційних захворювань [3, 4].

У тварин, інфікованих в неонатальний період розвитку нецитопатогенними біотипами вірусу, може розвиватися специфічна імунна толерантність, на фоні якої спостерігається персистенція збудника. Такі тварини (вірусносії) часто не мають клінічних проявів хвороби і, за даними робіт [4, 14], складають близько 1—2 % у популяції стада. Через 1—2 тижні 50—70 % уражених телят захворюють на пневмонію та гастроентерити, а близько 25 % з них гинуть [5]. У неімунних сприйнятливих тільних корів при інфікуванні в останній триместр вагітності збудник ВД частіше викликає генітальну форму, що характеризується анома-

ліями розвитку плоду та спорадичними абортми [6].

Гостре захворювання — хвороба слизових — розвивається нечасто. Як правило, в більшості випадків при суперінфекції цитопатогенним штамом вірусу, рідше — після мутації нецитопатогенного штама [7].

Таким чином, збудник хвороби швидко розповсюджується і постійно циркулює в стаді, тварини гинуть лише у випадку гострого перебігу захворювання, але завдяки імунодепресивному впливу ВД на організм, суттєво знижується приріст і сповільнюється розвиток молодняка.

Вивченню ВД ВРХ в Україні приділяється недостатня увага. До цього часу дослідження патології новонароджених тварин, обумовленої змішаними інфекціями, здійснювалося без урахування можливого імунодепресивного впливу ВД. Крім того, відсутні сучасні діагностичні та специфічні засоби профілактики захворювання.

Метою даної роботи було порівняльне вивчення властивостей штамів збудника вірусної діареї для наступної селекції продуцентів видоспецифічних протективних антигенів, необхідних для приготування діагностичних та профілактичних препаратів.

Матеріали і методи. *Віруси.* Для дослідження використано три штами збудника ВД ВРХ (лабораторні штами OREGON C24V і BK-I-№ 28 та польовий штам α И-10).

Культура клітин. Для культивування штамів збудника ВД використано перещеплювану культу-

ру клітин нирки теляти (НТ), яку отримали з Української державної лабораторії ветеринарної медицини Мінагропрому України. Ростове середовище містило гемгідролізат, 10 % ембріональної сироватки ВРХ, 0,002 М глютамін та антибіотики (100 од/см³ натрієвої солі бензилпеніциліну, 100 мкг/см³ сульфату стрептоміцину, 100 мкг/см³ гентаміцину). В підтримуюче середовище ембріональну сироватку крові не вносили.

Очищення та концентрування вірусів. Вірус очищали та концентрували методом диференційного ультрацентрифугування (центрифуга Beckman L5-65) при 80—100 тис. g в градієнті щільності сахарози [8]. Очищені препарати вірусу зберігали при температурі -40 °С до використання.

Електронна мікроскопія. Для дослідження морфології віріонів препарати готували із очищених та сконцентрованих зразків вірусу, які наносили на сіточку з формваровою плівкою-підкладкою. Препарати контрастували 2 %-м розчином фосфорно-вольфрамової кислоти (рН 6,8) і вивчали в електронних мікроскопах JEM-1200 (Японія) та EM-125 при інструментальному збільшенні 60000.

Електрофорез білків. Електрофоретичний аналіз білків штамів ВД в поліакриламідному гелі (ПААГ) здійснювали за методом [9] у присутності SDS (3 %) та β-меркаптоетанола (2 %). Стартовий гель містив 5 % акриламід-бісакриламід, а гель розділення — 14 %. Як маркери використано стандартний набір калібрувальних білків («Pharmacia»,

Швеція): фосфорилаза В (97400), альбумін (67000), овальбумін (43000), карбоксильна ангідрараза (30000), інгібітор трипсину (20000), α-лактальбумін (14400).

Антитіла та білки. Для реакції імуноблоту було використано поліклональну кролячу антивірусну сироватку до поверхневих антигенів, яку отримували гіперімунізацією кролів очищеними препаратами штамів вірусу при концентрації загального білка в інокуляті 2 мг/мл. Для реакції імунохімічного фарбування в імуноблоті використовували білок А золотистого стафілокока, мічений ферментом (пероксидазою хрому), виробництва АТЗТ НВК «ДіапрофМед» (Україна).

Імуноблот. Для переносу білків штамів вірусу з ПААГ брали нітроцелюлозну мембрану виробництва «Millipore» (США). Електроперенос здійснювали за методикою [10] при силі струму 100 мА протягом 2—2,5 год. Білки штамів вірусів, адсорбовані на нітроцелюлозній мембрані, інкубували на шейкері зі специфічними сироватками протягом 2 год при температурі 37 °С.

Результати і обговорення. При культивуванні трьох штамів збудника вірусної діареї в перещеплюваній культурі клітин НТ відмічено однотипний характер обумовленого ними цитопатичного ефекту (ЦПД). Внаслідок ЦПД в моношарі з'являлися осередки дрібнозернистих клітин. Цей моношар поступово майже повністю руйнувався. В той же час ознаки ураження моношару клітин різними

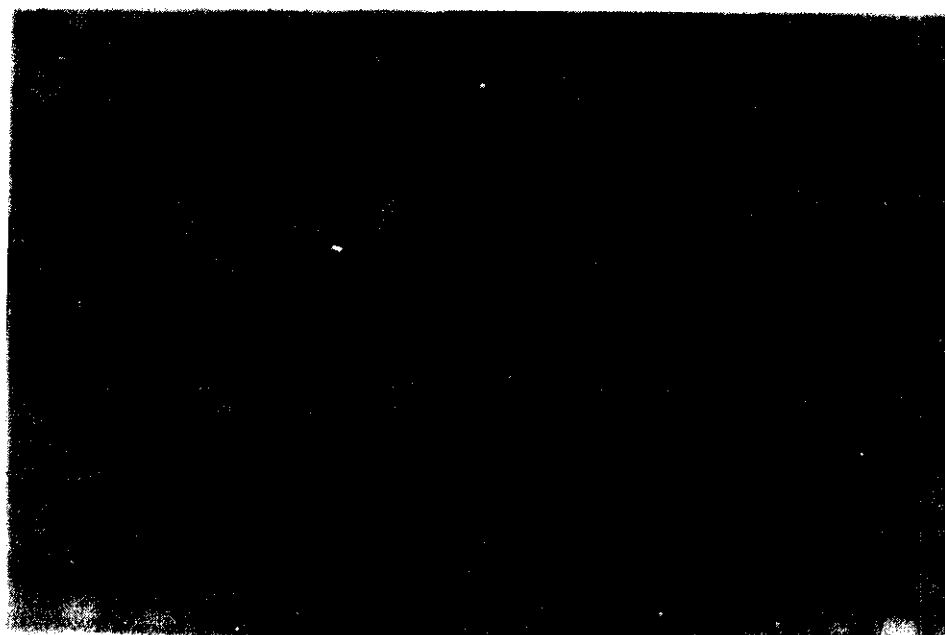


Рис. 1. Електронна мікроскопія збудника ВД великої рогатої худоби

штамами спостерігалися у різний період після інфікування культури клітин. Так, штам ВК-І-№ 28 обумовлював перші ознаки ЦПД вже через 24 год, у той час як штами OREGON та α И-10 — лише через 48—72 год після інокуляції культури. Максимальний титр вірусів в інфікованих культурах спостерігався через 48—72 год і становив від 5,5 ІгТЦД₅₀/мл (штам α И-10) до 6,5 ІгТЦД₅₀/мл (штам ВК-І-№ 28). Титр вірусу штама OREGON був в межах 6 ІгТЦД₅₀/мл.

При вивченні морфології віріонів за допомогою електронної мікроскопії було встановлено, що вони сферичної форми діаметром 47—56 нм, з характерними шипоподібними поверхневими виступами не досить чіткої форми (рис. 1). У препаратах постійно виявляли повністю сформовані віріони та порожні (без вмісту нуклеїнової кислоти).

При дослідженні білкового спектра штамів за допомогою електрофорезу білків в ПААГ виявлено білковий спектр віріонів, характерний для пестивірусів, зокрема, чотири структурних глікопротеїди: gp53 (53—55 кДа), gp48 (46—48 кДа), gp25 (25 кДа) — білки зовнішньої ліпидовмісної оболонки, та білок р14 (14 кДа) — білок серцевини, а також неструктурний вірус-асоційований білок р80 (80 кДа) (рис. 2). Отримані дані збігаються з літературними повідомленнями [3, 11, 12]. Слід

зауважити, що накопичення білків різними штамми при тотожних умовах культивування помітно відрізнялося. Зокрема, штам OREGON накопичував у більшій кількості поверхневий білок зовнішньої оболонки gp53 (на який продукуються віруснейтралізаційні антитіла) в порівнянні з іншими двома штамми [13].

При дослідженні антигенних зв'язків цих штамів у перехресному імуноблоті виявили чітку антигенну спорідненість між штамми α И-10 та OREGON, а у випадку штама ВК-І-№ 28 такої спорідненості не спостерігалося (рис. 3). На нашу думку, це явище можна пояснити тим, що штам ВК-І-№ 28 належить, можливо, до іншої антигенної групи штамів ВД [14].

Щоб це встановити, нині проводяться аналогічні дослідження з вивчення антигенної характеристики еталонного штама NADL ВД ВРХ.

С. В. Бондарь, В. Г. Скибицкий

Сравнительное изучение штаммов возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота

Резюме

Сообщаются результаты сравнительного изучения морфологии, белкового состава вирионов и антигенной характеристики трех штамов (двух лабораторных и одного полевого) возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота.

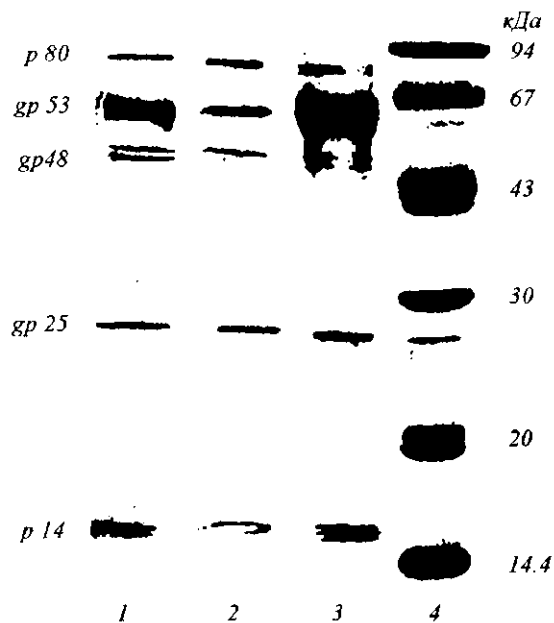


Рис. 2. Електрофорез білків штамів ВД у ПААГ: 1 — білки штама ВК-І-№ 28; 2 — білки штама α И-10; 3 — білки штама OREGON; 4 — маркери

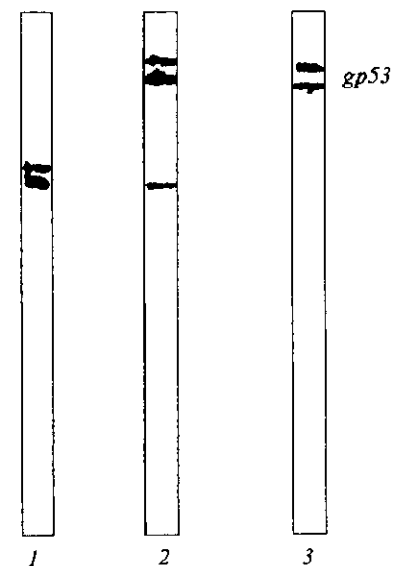


Рис. 3. Імуноблот штамів ВД: 1 — штам ВК-І-№ 28; 2 — штам α И-10; 3 — штам OREGON

S. V. Bondar, V. G. Skibitsky

Comparative study of the strains of bovine virus diarrhoea exiter

Summary

The results of comparative study of morphology, protein structure of virus and antigenic characteristic of the three strains (two laboratory and one field) of exiter of bovine virus diarrhoea are presented.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Baker J. C. Bovine viral diarrhoea virus: A review // Amer. Vet. Med. Assoc.—1987.—190.—P. 1449—1458.
2. Brownlie J. Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease complex in cattle // Practice.—1985.—7.—P. 195—202.
3. Сергеев О. В. Пестивирусы // Вопр. вирусологии.—1997.—№ 1.—С. 5—10.
4. Wolf G., Thierauf P., Wolfmeyer A., Beer M., Pichler J., Kaaden O.-R. Impfindikation und impfstrategie bei BVD. Der Praktischer Tierarzt.—Hannover, 1996.
5. Сюрин В. Н., Белоусова Р. В., Фомина Н. В. Диарея крупного рогатого скота // Диагностика вирусных болезней животных.—М., 1991.—С. 355—371.
6. Manual of standards for Diagnostic tests and vaccines // Office International des epizooties / Ed. S. Edwards.—Brussels, 1996.—P. 651—659.
7. Tautz N., Thiel H.-J., Dubovi E. J., Meyers G. Pathogenesis

of Mucosal Disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion // J. Virol.—1994.—68, N 5.—P. 3289—3297.

8. Скоунс Р. Методы очистки белков.—М.: Мир, 1985.—115 с.
9. Laemmli U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 15.—P. 680—685.
10. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot immunoblotting: current status and outlook // J. Immunol. Meth.—1984.—74, N 1.—P. 313—340.
11. Murphy F. A., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., Ghabrial S. A., Jarvis A. W., Martelli G. P., Mayo M. A., Summers M. D. Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of virus. Sixth report of the Int. Committee on Taxonomy of Viruses.—New York etc.: Springer, 1995.—P. 415—427.
12. Purchio A. F., Larson R., Collett M. S. Characterization of bovine viral diarrhoea proteins // J. Virol.—1984.—50.—P. 666—669.
13. Donis R., Wayne Corapi, Dubovi E. J. Neutralising monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein // J. Gen. Virol.—1988.—69, N 1.—P. 77—81.
14. Van Rijn P. A., van Gennip H. G. P. Separation of the pestivirus genus based on the envelop glycoprotein E2 // Virology.—1997.—237, N 2.—P. 337—348.

УДК 61.619:578.31

Надійшла до редакції 24.02.99