

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (аналитический обзор)

Проведен анализ мировой литературы по генетической характеристике вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (BHV-1). В 1995 году была определена полная первичная структура генома вируса - при помощи секвенирования было выявлено 67 уникальных генов и два гена, дублированных в инвертированных повторах. Большинство генов вируса проявляют гомологию с генами вируса простого герпеса человека (HSV-1). Геном BHV-1 содержит 10 генов с потенциальной способностью кодировать гликопротеины. Выделено 3 временные фазы процесса репликации вируса и экспрессии его генов во время литического цикла инфекции. Выявлены и охарактеризованы регуляторные белки BHV-1 (BICP0, BICP4, BICP22, BICP27, circ-протеин, α -TIF, VP8).

BHV-1 genome characteristic literature was analyzed in this article. There was determined full sequence of virus' genome in 1995. By the use of sequencing there were revealed 67 unique genes and two genes that are duplicated in inverted repeats. The most part of genes have homology with genes of human's herpes simplex virus. BHV-1 genome contains at least 10 genes that have potential ability to encode glycoproteins. There were distinguished 3 temporary phases of virus replication and it's gene expression during lital cycle of infection. Scientists studied and characterized regulatory proteins of BHV-1 (BICP0, BICP4, BICP22, BICP27, circ-protein, α -TIF, VP8).

Инфекционный ринотрахеит (инфекционный пустулезный вульвовагинит, пузырьковая сыпь, инфекционный вульвовагинит, инфекционный некротический ринотрахеит, инфекционный ринит, красный нос, инфекционный катар верхних дыхательных путей) – остро протекающая контагиозная болезнь крупного рогатого скота, проявляющаяся в виде поражений дыхательных путей, половых органов, конъюнктивитов, менингоэнцефалитов, а также аборт у коров.

Впервые болезнь зарегистрирована в США в 1950 г. у откормочного скота N.G.Miller (1955). Вирус выделен H.Madin et al. (1956) из носовых истечений телят с острым респираторным заболеванием. После этого инфекционный ринотрахеит (ИРТ) обнаружен в различных странах мира.

В естественных условиях инфекционным ринотрахеитом болеет крупный рогатый скот, особенно тяжело - телята и молодняк на откорме. Кроме того, генитальная форма заболевания установлена у беловежских зубров. При серологическом обследовании различных видов копытных жвачных антитела к вирусу ИРТ установлены в Танзании у взрослых буйволов. Лабораторные животные к вирусу не чувствительны, однако в ВИЭВ были проведены исследования по адаптации вируса инфекционного ринотрахеита к белым мышам (Н.Н.Крюков, А.Г.Глотов, 1987). При этом у мышей отмечались характерные клинические признаки.

Источником возбудителя инфекции являются больные и переболевшие животные, выделяющие вирус 6—12 мес. после выздоровления. Очень опасны быки-производители, переболевшие генитальной формой и длительное время содержащие вирус в сперме.

Из организма животных вирус выделяется с секретом из носа и глаз, истечениями из половых органов, со спермой, молоком, мочой, калом.

* Научный руководитель – доктор ветеринарных наук, профессор В.В.Максимович

Заболевание вызывается вирусом Bovine herpesvirus 1 (BHV-1), относящемуся к семейству Herpesviridae, подсемейству Alphaherpesvirinae, роду Varicellovirus. Свойства вируса ИРТ общие для всех представителей рода Herpes virus и включают: центральное ядро двухцепочной ДНК, окруженное икосаэдрическим капсидом, состоящим из 162 камсомеров; капсиды в ядре клетки-хозяина и почкование их на ядерной мембране при созревании; трехслойная оболочка, состоящая из компонентов вируса и клетки-хозяина; внутриядерные тельца - включений; способность к длительной персистенции, латенции и рецидивам заболевания.

Вирусные частицы имеют следующие размеры, установленные различными способами: 175 нм — метод фильтрования; 148—210 нм — метод ультрацентрифугирования; 100—300 нм — электронная микроскопия. Диаметр нуклеотида — 36—45, молекулярный вес ДНК — $92\text{--}102 \cdot 10^6$ дальтон, диаметр нуклеокапсида — 82—110 нм. Константа седиментации зрелого вириона 1630—1830 S; плавучая плотность в градиенте плотности сахарозы — 1,248—1,267.

Особенностью данного вируса является его длительная персистенция в организме после переболевания и выделение с различными секретами (носовыми истечениями, слезами, спермой, молоком и т.д.). Такие животные являются потенциальным источником распространения заболевания. Выявить их достаточно сложно, так как применяемые серологические методы не обнаруживают специфических антител, а вирусовыделение длительный (около 30 дней) и трудоемкий процесс, который не целесообразен при проведении скрининговых исследований. Бурное развитие молекулярно-биологических методов позволило решить эту проблему.

С помощью рестрикционного анализа и моноклональных антител появилась возможность дифференцировать вирус на генетические подтипы (1.1 – респираторные, 1.2 – генитальные, 1.3 – выделенные от животных с признаками менингоэнцефалитов). Впоследствии штаммы BHV-1.3 были реклассифицированы в отдельный тип BHV-5 (B. Roizman et al., 1995).

Подтип BHV-1.2 был разделен на BHV-1.2a и BHV-1.2b. Считается, что BHV-1.2a вызывает аборт, а BHV-1.2b – не вызывает, хотя оба подтипа ассоциируются со случаями вульвовагинитов и баланопоститов.

Для более глубокого понимания патогенеза и иммуногенеза болезни необходимо было установить нуклеотидную последовательность в ДНК вируса. Анализ генома BHV-1 начался с получения карты клонированных HIND111 фрагментов Mayfield et al. в 1983 году. Дальнейшему изучению генома BHV-1 способствовала международная программа, которая объединяла ученых из разных стран, занимающихся данной проблемой. Так, в 1992 L.J. Bello et al. определили структуру гена тимидинкиназы, а в 1995 году была определена полная первичная структура генома вируса.

Геном вируса представлен двуспиральной молекулой ДНК размером около 136 пар килобаз. Молекула ДНК в свою очередь состоит из длинного уникального сегмента U_L (около 100 килобаз), внутренних повторов IR (11 кило-баз), короткого уникального сегмента U_S (13 килобаз) и терминальных повторностей TR. Повторности пространственно ориентированы в соответствии друг к другу. Сегмент U_S располагается между IR и TR, направляется в двух альтернативных направлениях к U_L . Так, ДНК, выделенная из вирионов, представляется в двух изомерических формах в неравных эквимолярных количествах. Два изомера обозначены как прототипный (P) и инверсионный тип сегмента U_S (J.E. Mayfield et al.,

1983; M. Engels et al., 1986, 1987; W.H. Hammerschmidt et al., 1986, 1988; G. Kutish et al., 1990; C. Simard et al., 1990; G.A. Smith et al., 1990; C. Raggo et al., 1996; O.Y. Abdelmagid et al., 1998; J. Schmitt et al., 1998; P.K. Gupta et al., 1999). Ничего пока не известно о возможной функции этого подвижного механизма, хотя в отличие от Us региона ориентация UL региона фиксирована. Биологический смысл этой инверсии неизвестен (W. Hammerschmidt et al., 1988).

При помощи секвенирования было выявлено 67 уникальных генов и два гена, дублированных в инвертированных повторах. Большинство генов вируса проявляют гомологию с генами вируса простого герпеса человека (HSV-1) и встречаются в том же порядке. Около 20 протеинов ВНВ-1 были обследованы физическими методами, а функции других белков были выведены из гомологии последовательностей, кодирующих известные протеины других герпесвирусов (табл.1).

Таблица 1 - Протеины, специфичные ВНВ-1 (по M. Schwyzer et al., 1996)

Функция	Название
Гликопротеин	gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK, gM
Оболочка	UL20, UL34, UL43, UL49.5
Тегумент	UL11, UL36, UL37, UL41 (изолированные белки вириона), UL46, UL47, UL48 (альфа-транс-индуцирующий фактор), UL49, US9
Капсид	UL18, UL19 (мажорный капсидный белок), UL26/26.5 (сывороточная протеаза и ее субстрат), UL35, UL38
Только вирион	UL4, UL21, UL24
Расщепление / упаковывание	UL6, UL15, UL25, UL28, UL32, UL33
Репликация ДНК	UL29 (большая ДНК, связанная с белком), UL30, UL42 (ДНК полимеразы и добавочный белок), UL5, UL8, UL52 (хеликазы/праймазы), L1L9 (оригинальный связующий белок)
Фермент	L1L23 (тимидинкиназа), UL39, UL40 (субъединицы 1 и 2 рибонуклеотидной редуктазы), UL2 (урацил-ДНК-гликозилаза), UL50 (dUTPase), UL13, US3 (протеин киназа), UL12 (ДНКазы)
Регуляторная	В1СР0, В1СР4, В1СР22, В1СР27
Неизвестная	UL3, UL7, UL14, UL16, UL17, UL31, UL51, US2
ВНВ-1 специфичность	UL0.5, UL3.5, circ, UL1.5

Геном ВНВ-1 содержит, по крайней мере, 10 генов с потенциальной способностью кодировать гликопротеины. Эти сложные белки играют важную роль в инфекционном процессе и иммунном ответе. Локализуясь на оболочке вириона и на поверхности инфицированных клеток, они представляют собой важные мишени для иммунной системы инфицированного организма. Также они служат медиаторами внедрения вириона в клетку-хозяина, слияния и распространения вируса от клетки к клетке. Основные свойства и функции гликопротеинов ВНВ-1 представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Гликопротеины BHV-1 и их функции (по M. Schwyzer et al., 1996)

Название ^a	Свойства ^b	Функции ^c	Взаимодействия ^c
1	2	3	4
gB (UL27) (форма gI)	(101 K) вирусная оболочка, N-связанный гликозилированный, высоко иммуногенный	Обязательный (необходимый) для репликации, консервативный; прикрепление, проникновение, распространяется от клетки к клетке, слияние с оболочкой клетки	Гетеродимерная формация с расщепленными собственными фрагментами; связанный с гепаран-подобными рецепторами
gC (UL44) (форма gII)	91K вирусная оболочка, N- и O- связанный гликозилированный, высоко иммуногенный	Необязательный (несущественный) для репликации, переменное прикрепление, гемагглютинин (вирулентность)	Связывание с гепаран-подобными рецепторами (для дополнения фактора СЗб)
gD (U56) (форма gIV)	71K вирусная оболочка, N- и O- связанный гликозилированный, конформационно чувствительный, высоко иммуногенный	Условно-необходимый для репликации (проникновение, распространение от клетки к клетке), интерферирование может быть комплементарным gH	Приобретает остатки 6-фосфорнокислой маннозы и связывается с рецепторами 6-фосфорнокислой маннозы, отличными от heparan sulfate рецепторов
gE (US8)	92K вирусная оболочка, N- связанный	Необязательный, распространение от клетки к клетке, вирулентность	gI (Fc-рецептор)
gI (US7)	гликозилированный (40K) вирусная оболочка	(способность инвазировать нервную ткань) Необязательный, распространение от клетки к клетке, (вирулентность)	gE (Fc-рецептор)
gL (UL1)	(ПК)	Консервативный (проникновение) (транспорт и поддержка gH)	(gH)
gG (US4) (форма gX)	(47K), Секреторный протеогликан	Необязательный (функция неизвестна)	
gK (UL53)	(35K)	Формирование синцития (многоядерная протоплазма, не разделенная на отдельные клетки)	
gM (UL10)	(43K)	Необязательный (распространение в CNS)	
gJ (US5)	Не существует у BHV	Необязательный (не влияет на размножение вируса в месте инокуляции или в периферической или центральной нервной системе")	

^a Наименование белков, в скобках прежнее обозначение.

^b В скобках: Молекулярный вес, предсказанный от последовательности нуклеотида.

^c В скобках: Свойства, предложенные на основе гомологии последовательностей с другими вирусами герпеса.

Помимо изучения поверхностных белков вируса исследования ученых были направлены на определение механизма репликации вируса и основных компонентов этого процесса.

U.V. Wirth et al. выделили 3 временные фазы процесса репликации вируса и экспрессии его генов во время литического цикла инфекции:

- 1 – предранняя фаза (IE, «immediate earle», alpha),
- 2 – ранняя фаза (E, «earle», beta),
- 3 – поздняя фаза (L, «late», gamma).

Регуляция этих процессов происходит за счет кодируемых вирусом белков (активаторов/репрессоров) и энзимов. Гены, кодирующие эти белки и энзимы, расположены в инвертированных повторах и смежных сегментах. Экспрессия генов в первую фазу цикла активируется при помощи поздних структурных белков.

Регуляция экспрессии генов происходит при связывании клеточных или вирусных факторов транскрипции с определенными участками генома вируса. Данные участки, так называемые «cis-active» участки, необходимы для инициации и накопления предшественников, а также могут взаимодействовать с положительными и отрицательными трансактиваторами. Благодаря совокупности cis- и трансактивных элементов происходит контроль дозированной экспрессии герпесвирусного генома на различных фазах инфекции.

M. Schwyzer et al. изучали регуляторные белки BHV-1 при помощи Вестерн-блоттинга и иммунофлуоресценции с использованием специфических антисывороток. Объектом изучения были три мажорных IE протеина (ICP0, ICP4, ICP22), cis-протеин и ранний протеин ICP27. Для исследования их функций использовались различные CAT-промоторные конструкции в переходных лабораторных тестах экспрессии. При этом наблюдались как трансактивация, так и трансрепрессия, зависящие от белка-эффектора и мишени промотера (табл. 3). Сходные комбинации положительных и отрицательных эффектов свойственны и другим герпесвирусам.

Таблица 3 - Предполагаемые функции регуляторных протеинов BHV-1 (по M. Schwyzer et al., 1996)

Протеин	Свойства	Функции	Наличие в вирионе
ICP0	Необязательный для репликации; трансактиваторы IER 4.2/2.9/1.5, ER 2.6, LAT, только промоторы	Трансрепрессоры IER1.7.	Нет
ICP4	Трансактиваторы ER 2.6, LAT, только промоторы	Трансрепрессоры IER 4.2/2.9/ 1.5, IER1.7.	Нет
ICP22		Генеральный трансрепрессор (подавитель функции)	Да
ICP27 (UL 54)	Стимулятор процесса образования mRNA		Нет
Circ	Не существенный		Да
Альфа TIF (UL48)	Трансактиваторы IER 4.2/2.9/1.5		Да
VP8 (UL47)	Протеинкиназа; усиление (стимуляция) альфа TIF функции		Да

Изучением механизма латентной инфекции занималась группа ученых под руководством А.С. Bratanich. В своих исследованиях они определили, что во время латентной инфекции экспрессия генов в нейронах строго ограничена и практически не происходит. Единственный проявляющий активность промотор – это «ассоциированный с латентностью транскрипт» (LAT- РНК, «latency associated transcript»). Он контролирует транскрипцию в гене, противоположном ВІСР0-гену. Так как LAT-РНК во время латенции не транслируется, ученые предположили, что она выступает как «антисмысловая РНК», оказывая отрицательное влияние на экспрессию генов первой фазы вирусной репликации (alpha).

Процесс реактивации вируса достаточно не изучен. Однако, вирусные энзимы, такие как тимидинкиназа, хотя и не так существенны для репликации вируса в культуре клеток, могут брать на себя метаболические функции в нейронах и таким образом обеспечивать выход вируса (С. Whetstone et al.,1992). При этом образуются вирионы, с исходной степенью вирулентности, которые по нервным путям продвигаются на периферию и там экскретируются. В большинстве случаев реактивация протекает бессимптомно, за редким исключением, когда у животных отмечаются слабо выраженные клинические признаки болезни.

За последние 20 лет изучение инфекционного ринотрахеита достигло значительных результатов. Во многом этому способствовало бурное развитие и совершенствование молекулярно-генетических методов. Благодаря определению последовательности нуклеотидов в геноме вируса стало возможным прямое определение возбудителя инфекции, и как следствие, создание более эффективных диагностических наборов, которые позволяют достаточно быстро и с высокой степенью специфичности проводить диагностические обследования больших групп животных. Также на основе генетических исследований были созданы маркерные вакцины, которые позволили многим странам стать благополучными по инфекционному ринотрахеиту.

Однако многие аспекты инфекционного процесса остаются недостаточно изученными. Дальнейшая цель исследований состоит в идентификации и характеристике вирусспецифических компонентов и сравнении их с аналогами у других герпесвирусов. Эти работы должны показать, какие протеины являются полезными мишенями для диагностики, контроля и противовирусной терапии и должны позволить предсказать, как и каким образом можно прервать цепь событий, происходящих во время литической и латентной фаз жизненного цикла вируса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болезни сельскохозяйственных животных / П. А. Красочко [и др.]. – Минск: „Бизнесофсет”, 2005. – 800 с.
2. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / А. Г. Глотов [и др.]. – Новосибирск: РАСХН, Сиб. отд-ние, ГНУ ИЭВСиДВ. – 2006. – 196 с.
3. Разработка и сравнительная эффективность тест-систем на основе молекулярной гибридизации и полимеразной цепной реакции для выявления вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / А. Г. Глотов [и др.] // Генодиагностика инфекционных заболеваний: материалы 4-й Всесоюзной науч.-практ. конф. – Москва, 2002. – С. 327-330.
4. Инфекционная патология животных: в 2 т / А. Я. Самуйленко [и др.] – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т.1 – 2006. – 911 с.
5. Крюков, Н. Н. Инфекционный ринотрахеит – пустулезный вульвовагинит крупного рогатого скота / Н. Н. Крюков // Итоги науки и техники / Животноводство и ветеринария. – М., 1980. – С. 32-113.
6. Engels, M. Comparison of the genomes of Infectious Bovine Rhinotracheitis and Infectious Bovine Vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis / M. Engels, F. Steck,

R. Wyler // Archives of Virology. – 1981. – Vol. 67. – P. 169-174.

7. Cloning of HindIII digested bovine herpesvirus-1 DNA fragments from an Indian respiratory isolate / P. K. Gupta [et al.] // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1995. – Vol. 35, № 1. – P. 167-175.

8. Madin, S. N. Isolation of IBR virus / S. N. Madin, C. J. York, D. G. McKercher // Science. – 1956. – Vol. 126, № 6. – P. 721-722.

9. Miller, N. J. Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle / N. J. Miller // J. Am. Vet. Med. Assoc. – 1955. – Vol. 126, № 6. – P. 463-467.

10. Family Herpesviridae / B. Roizman [et al.] / In Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A. and Summers M.D. (editors), Virus Taxonomy, 6th Rep. of the Int. Committee on Taxonomy of viruses // Arch.Virol., Suppl. 10. Springer-Verlag, Wien, New-York. 1995. – P. 114-127.

11. Schwyzer, M. Molecular biology of ruminant viruses / M. Schwyzer, M. Ackerman // Vet. Microbiol. – 1996. – Vol. 53, № 1-2. – P. 17-29.

12. Gene contents in 31-kb segment at the left genome of end of bovine herpesvirus-1 / M. Schwyzer [et al.] // Vet. Microbiol. – 1996. – Vol. 53, № 1-2. – P. 67-77.

13. Genomic heterogeneities in bovine herpes virus type 1 viral isolates: a major variant selected from field isolate / C. Simard [et al.] // Intervirology. – 1991. – Vol. 32, № 3. – P. 117-126.

14. Wirth, U.V. Comparison of immediate early transcripts among bovine herpes virus type-1 and type 5 strains differing in neurovirulent potential / U.V. Wirth // Virus Res. – 1993. – № 27. – P. 1-12.