

УДК 619:616.98:578.825.1:636.4

Кузьмич Р.Г., доктор ветеринарных наук, профессор
Максимович В.В., доктор ветеринарных наук, профессор
Багрецов В.Ф., кандидат ветеринарных наук, доцент
Конотоп Д. С., аспирант

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск

ГЕРПЕСВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Герпесвирусная инфекция широко распространена среди людей и животных. Многие герпесвирусы животных до конца не изучены. Частично это связано с особенностями патогенеза, так как вирусы данного семейства находятся в организме в латентном состоянии и проявляют свои патогенные свойства при снижении иммунитета. В связи с этим диагностировать герпесвирусную инфекцию целесообразно с помощью серологических реакций, что также позволит судить о степени распространения данного заболевания.

Herpes virus infection is widely spread among humans and animals. A number of animal herpes viruses remain unstudied yet. It is partially because of peculiarities of pathogenesis, as viruses of this family are kept in organism in a latent condition and show their pathogenic properties when immunity decreases. In this connection it is worthwhile to diagnose a herpesvirus infection with the help of serological reactions, which will also allow to evaluate the extent of this disease spreading.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы, относящиеся к семейству герпесвирусов, очень широко распространены в природе. Они могут вызывать заболевания различных видов диких и домашних животных. В настоящее время известно более 100 герпесвирусов, 8 из них выделены от человека. Впервые клинические проявления генитального герпеса были описаны еще в 1736 году французским ученым Джоном Аструком. С 1993 года заболеваемость генитальным герпесом подлежит регистрации. В 1993 году заболеваемость была 8,5 случаев на 100000 населения, а в 1997 году этот показатель возрос на 65,9% и составил уже 14,1 случаев на 100000 населения. Так в 1999 году в мире было зарегистрировано 86 млн. больных. (В.А. Аковбян и др.) Герпес является одной из самых распространенных вирусных инфекций человека. По данным ВОЗ, около 70% населения нашей планеты инфицировано вирусом простого герпеса (ВПГ) и примерно у 10 - 20% инфицированных имеются те или иные клинические проявления герпетической инфекции. (Rhoda L. Ashley)

Из патогенных для животных вирусов в состав семейства Herpesviridae входят вирусы болезни Ауески, ринотрахеита КРС, ринопневмонии лошадей, герпеса лошадей (LK-N2), злокачественной катаральной горячки КРС, язвенного маммиллита, ринотрахеита кошек, герпеса собак, болезни Марека, инфекционного ларинготрахеита птиц, чумы уток, герпеса птиц и др. (Сюрин В.Н. и др)

В последние годы часто сообщается о вспышках инфекционных болезней животных, неизвестных еще десять лет тому назад. Эти инфекции могут нести неисчислимы экономические потери хозяйствам стран и представляют риск заболевания в связи с тем, что могут передаваться от животных человеку.

Клинические успехи в аллотрансплантации и нехватка донорских органов человека обусловили предложение использовать органы животных в качестве альтернативного терапевтического материала для людей. В этом отношении сви-ньи (поросята) более предпочтительны в качестве источника донорских органов чем, например, приматы. В США уже получено разрешение на проведение нескольких таких опытов.

Основную опасность, однако, вызывает потенциальная возможность ксеногенной передачи вирусов от животных человеку через орган, ткань или клеточную трансплантацию или при воздействии на человека *ex vivo* свиных биологических материалов.

Учитывая возрастающий интерес в плане использования свиней в качестве доноров тканей для ксенотрансплантации, все большую тревогу также вызывает зоонозный потенциал различных вирусов, инфицирующих свиней.

Герпесвирусы состоят из линейной 2-нитчатой ДНК с мол.м. 92-102 кД. Виреоны - частицы округлой формы состоят из 4-х структурных компонентов: нуклеоида, капсида диаметром

120-150 нм, окруженного содержащей липиды оболочкой, мембраны (тегумент) и наружной оболочки. Наружная оболочка вирионов имеет типичное строение и содержит многочисленные выступы (шипы) длиной около 8 нм. Герпесвирусы размножаются в ядре клетки, где могут формировать характерные внутриядерные включения.

Внешне сходство герпесвирусов настолько велико, что под электронным микроскопом их практически невозможно различить. Индивидуальность «родственников» начинает проявляться только тогда, когда дело доходит до антигенных свойств вирионных белков и степени гомологии ДНК. Характерной чертой, помогающей электронно-микроскопическому распознаванию вируса, является наличие большой оболочки, хотя в препаратах также могут присутствовать и безоболочные вирусы.

Все герпесвирусы имеют цикл внутриклеточного развития в ядре и цитоплазме пораженной клетки, при этом в ядре накапливаются включения вирусных частиц, что увеличивает как размеры самого ядра, так и клетки в целом (патогенез возникновения гигантских клеток). Вирусная ДНК транскрибируется в ядре. Синтезированные информационные РНК транспортируются в цитоплазму и транслируются. Белки поступают в ядро, объединяются с вновь синтезированной ДНК с образованием нуклеокапсидов. Последние, проходя через модифицированные участки внутреннего слоя ядерной мембраны, приобретают наружную оболочку. Герпесвирусы с целью маскировки от иммунокомпетентных клеток макроорганизма, используют мембранную мимикрию, т. е. формируют дополнительную оболочку вириона из мембранных элементов использованной клетки. Сформировавшиеся вирионы транспортируются к поверхности клетки в везикулах, которые сливаются с плазматической мембраной.

Проникнув в организм, вирус герпеса лимфогенным, гематогенным или неврогенным путем достигает определенного регионарного чувствительного ганглия (спинального или черепного), где постоянно персистирует. Герпесвирусы не всегда разрушают пораженные клетки. Наоборот, феномен пожизненной инфекции, характерный для них, заключается в их персистенции в клетках определенных тканей с периодической активизацией. Хроническая герпетическая инфекция является наиболее распространенным в мире иммунодефицитным заболеванием с пожизненной персистенцией в нервных ганглиях вируса и периодическим обострением процесса, локализующегося на постоянных для каждого больного местах (глаза, слизистая гениталий, кожа и т.д.). (Баринский И.Ф.) Латентное состояние вируса основано на биологическом равновесии между микро- и макроорганизмами. Под воздействием разнообразных провоцирующих факторов (психоэмоциональное возбуждение, интоксикация, перегревание и др.) возникает рецидив болезни, обусловленный реактивацией латентного ВПГ, что приводит к формированию рецидивирующего заболевания.

Существуют две гипотезы, которые допускают развитие рецидивов на основе как статического, так и динамического состояния вируса. Согласно первой гипотезе, вирус находится в клетках паравертебрального сенсорного ганглия в интегрированном или свободном непродуктивном состоянии. Под влиянием "пускового фактора" вирус, активировавшись, перемещается из ганглия по аксону периферического нерва в эпителиальные клетки, где реплицируется. Предполагается, что этому способствуют восприимчивость клеток и ослабление иммунного контроля. Согласно гипотезе динамического состояния, репликация и выброс из ганглия небольших количеств вируса происходят постоянно. Достигая по нерву кожи, ВПГ вызывает микрофокусы инфекции, которые сдерживаются механизмами защиты, что предупреждает рецидивы или ослабляет их проявления. На развитие рецидивов влияет также состояние местного иммунитета. Его угнетение создает условия для репликации достигшего кожи вируса. Определяющим фактором приживления герпесвирусов в организме и частоты обострений инфекции являются врожденные или приобретенные иммунодефицитные состояния (ИДС). При прогрессирующих ИДС происходит генерализация герпесвирусных инфекций, что приводит к смертельному исходу.

ВПГ обуславливает патологию беременности и родов, нередко приводя к "спонтанным" абортam и гибели плода, или вызывает генерализованную инфекцию у новорожденных. Наиболее часто (85%) инфицирование новорожденного происходит интранатально (при прохождении родового канала), независимо от того, имеются в данный момент очаги повреждения в области

шейки матки и вульвы или нет (при бессимптомном выделении вируса). Трансплацентарное поражение плода ВПГ происходит редко и может привести к прерыванию беременности.

Целью наших исследований явилось изучение степени распространения герпесвирусной инфекции среди свиней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для серологической диагностики герпесвирусной инфекции методом ИФА нами были использованы тест-системы ВектоВПГ - Ig M-стрип и ВектоВПГ – Ig G-стрип ЗАО «Вектор-Бест» (Россия, Новосибирск).

В качестве исследуемого материала использовали сыворотки крови свиноматок (здоровых и с нарушением воспроизводительной функции) и абортированных плодов, принадлежащих РУСП СГЦ «Заднепровский». Кровь отбирали из орбитального венозного синуса, используя иглы диаметром 1,2-2,0 мм и длиной 5-7 см. Полученную кровь оставляли в пробирках на 1-1,5 часа при комнатной температуре для образования сгустка. Образовавшийся сгусток отделяли от стенок пробирки тонкой спицей и центрифугировали сыворотку при 3 тыс. об./мин в течение 5 минут. После центрифугирования, используя микропипетку и стерильные одноразовые наконечники, отсасывали полученную сыворотку в стерильные пробирки типа «Эппендорф»

Для постановки ИФА использовали разборные планшеты на 96 лунок с иммобилизованным антигеном. Перед постановкой реакции исследуемые сыворотки разводили в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток во вспомогательном планшете. Необходимое количество сыворотки переносили в лунку основного планшета, куда предварительно вносили раствор для разведения сывороток. Таким образом, в лунках планшета исследуемые сыворотки разбавлялись в 100 раз. В последующем добавляли пероксидазный конъюгат, цитратно-фосфатный буферный раствор и концентрат тетраметилбензидина (ТМБ). Перед добавлением очередных антигенов проводили 5-ти кратную промывку планшета фосфатно-солевым буферным раствором с твином и инкубацию в термостате при $t\ 37,5C^0$ в течении 30 минут. На последнем этапе, после добавления раствора ТМБ и инкубации в темноте в течении 25 минут при $18-25C^0$ проводили остановку реакции добавлением стоп-реагента (раствор серной кислоты с концентрацией 1 моль/л). Реакцию учитывали с помощью спектрофотометра, путем измерения оптической плотности (ОП) на длине волны 450 нм и визуально (изменение голубого окрашивания на желтый цвет) не позднее 10-15 минут после остановки реакции.

Реакцию оценивали по превышению оптической плотности (ОП) в исследуемых пробах в сравнении с отрицательным контролем. *Положительными* считались пробы, ОП которых было равно или превышало критическое значение, которое вычисляли по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{cp}K + 0,10$$

Для определения титра антител, перед основной реакцией проводили титрование исследуемых сывороток. В лунки верхнего ряда планшета вносили предварительно разведенные в 100 раз сыворотки крови, в остальные лунки вносили необходимое количество раствора для разведения сывороток. Многоканальной пипеткой переносили по 100 мкл разведенных сывороток крови из лунок верхнего ряда в лунки 2-го ряда. После перемешивания, пробы из лунок 2-го ряда вносили в лунки 3-го ряда и далее, последовательно, до последнего ряда, откуда сбрасывали по 100 мкл содержимого лунок. Таким образом, в вертикальных рядах планшета получали последовательные 2-кратные разведения исследуемых сывороток (от 1:100 до 1:12800). Дальнейший ход анализа проводили аналогично вышеописанному для выявления положительных сывороток.

Титром считали последнее разведение исследуемой сыворотки, при котором ОП в соответствующей лунке превышало $ОП_{cp}K$ на 0,1 о.е.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Реакцию организма на внедрение вируса оценивали по уровню вырабатываемых антител к ВПГ-1,2 типов - иммуноглобулинов (Ig). Антитела к ВПГ образуются обычно через 3 - 4 недели после инфицирования и их уровень остается относительно постоянным длительное время. Считается, что IgG отражают факт имевшегося когда-либо инфицирования вирусом герпеса или латентную инфекцию, а IgM - маркер свежей инфекции или обострени хронической.

На первом этапе проводили скрининговое исследование сывороток крови свиней и крупного рогатого скота, с целью выявления степени носительства антител к ВПГ-1,2 типов у данных видов сельскохозяйственных животных. Пробы крови от крупного рогатого скота исследовали для исключения ложноположительных результатов, обусловленных возможным наличием в организме антител к вирусу, относящемуся к семейству *Herpesviridae* (возбудитель инфекционного ринотрахеита КРС). При генитальной форме данного заболевания, на слизистых оболочках половых органов животных образуются пустулезные поражения схожие с таковыми у человека.

Сначала определяли наличие иммуноглобулинов класса G (учитывая, что в организме вирус ВПГ 1,2 типов находится в латентном состоянии). В сыворотке крови крупного рогатого скота у здоровых животных и животных, с диагнозом - инфекционный ринотрахеит (коровы и телята), антитела к ВПГ обнаружены не были. В сыворотке крови свиней (свиноматки) выявлено 8 положительных проб (всего 24 пробы), что составляет 33,3%, причем в 7-ми пробах антитела обнаружены в сыворотке крови свиноматок, с нарушением воспроизводительной функции.

При определении в этих же пробах сыворотки крови крупного рогатого скота и свиней иммуноглобулинов класса M получен отрицательный результат. Это свидетельствует об отсутствии у животных остропротекающего заболевания, вызываемого ВПГ 1,2 типов, что соответствует многочисленным литературным данным. Отсутствие антител к ВПГ в пробах крови крупного рогатого скота, с диагнозом-инфекционный ринотрахеит, подтверждает отсутствие родства между вирусами ВПГ и ИРТ, относящихся к одному семейству *Herpesviridae*. С нашей точки зрения, это видимо связано с видовым барьером. Учитывая все вышеизложенное, в дальнейшем, мы исследовали сыворотки крови на наличие иммуноглобулинов класса G от свиноматок различных групп (супоросные, подсосные, с нарушением воспроизводительной функции и др)

Всего было исследовано методом ИФА 197 проб сыворотки крови (191 проб от свиноматок и 6 проб от абортированных плодов). Принимая во внимание тот факт, что всех свиней в обязательном порядке иммунизируют против болезни Ауески, а методом перекрестной иммунофлюоресценции установлено антигенное родство вируса болезни Ауески и простого герпеса, в первую очередь, необходимо было подтвердить специфичность противогерпетических антител. С этой целью сыворотки крови от супоросных свиноматок (группа 13 голов) отбирали трижды. Первый раз кровь отбирали на 30-35 дни супоросности (непосредственно перед ревакцинацией против болезни Ауески). Было выявлено 10 положительных проб, что составляет 76,9%. Так как гуморальный иммунитет достигает пика через 30 дней, последующий отбор проб производили на 55-60 и 70-75 дни супоросности (через 24-28 и 40-45 дней после вакцинации). Было выявлено соответственно 4 и 1 положительные пробы, что составило 30,8% и 7,7%. Снижение количества положительно реагирующих животных можно объяснить образованием в организме перекрестного иммунитета (последовательности нуклеотидов вируса болезни Ауески гомологичны геному гликопротеидов дВ, дС, дД, и дЕ вируса простого герпеса).

Среди подсосных свиноматок, у которых были зарегистрированы прохолосты, малоплодие, мертворожденность и другая гинекологическая патология положительно прореагировало 5 голов из 14 обследованных, что составляет 35,7%. У подсосных свиноматок без нарушений воспроизводительной функции выявлена 1 положительная проба (от 10 голов), что составляет 10%.

В группе «проблемных» свиноматок с нарушением воспроизводительной функции (прохолосты, аборты, малоплодие и т.д.) антитела к ВПГ выявлены в 40 из 116 пробах, что составило 34,5%. Это свидетельствуют о достаточно широком распространении герпесвирусной инфекции среди свиней.

В сыворотке крови от абортированных плодов антител к ВПГ обнаружено не было. Полученные данные подтверждают тот факт, что заражение поросят происходит во время родов, при прохождении плода через инфицированные родовые пути, а антитела к ВПГ от свиноматок попадают к поросенку с первой порцией молозива.

Всего, в результате проведенных исследований сывороток крови свиноматок, иммуноглобулины класса G обнаружены в 62 (191) пробах, что составляет 32,5%. (Табл.1)

Таблица 1

Результаты серологического исследования свиноматок на герпесвирусную инфекцию

В пробах сыворотки крови от положительно реагирующих животных определяли титр антител. Из 27 исследованных проб антитела выявлены в 16 пробах, титр колебался от 1:100 до

Возрастная группа	Исследовано проб	Положительные пробы	%
Свиноматки с нарушением воспроизводительной функции	116	40	34,5
Подсосные свиноматки: -без патологии	10	1	10
-с нарушением воспроизводительной функции	14	5	35,7
Супоросные свиноматки -30-35 дней;	13	10	76,9
-55-60дней;	13	4	30,8
-70-75дней супоросности	13	1	7,7
Проверяемые свиноматки	12	1	8,3
Всего	191	62	32,5

1:12800. Высокий титр антител (1:1600 и выше), позволяющий судить об активности вируса, отмечен в 5 пробах сыворотки крови. Среди абортировавших свиноматок наибольший титр антител (1:1600; 1:3200) был отмечен у 2-х животных, которые абортировали в последние 10 дней супоросности (106-114 дни). От подсосным свиноматок с нарушением воспроизводительной функции высокий титр антител (от 1:1600 до 1:12800) отмечен в 3-х пробах сыворотки. Отсутствие антител установлено в 11 пробах.

ВЫВОДЫ

1. Специфические антитела к ВПГ в сыворотке крови коров и молодняка с диагнозом инфекционный ринотрахеит не выявлены, что свидетельствует об отсутствии общих антигенов у вирусов ВПГ 1,2 типов и ИРТ, относящихся к одному семейству Herpesviridae.
2. Герпесвирусная инфекция имеет достаточно широкое распространение среди свиноматок различных групп, протекает бессимптомно.
3. У свиноматок с нарушением воспроизводительной функции антитела выявлены у 34,5% животных в титрах от 1:100 до 1:12800, что может свидетельствовать об определенной роли ВПГ в гинекологической патологии свиноматок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных. / В.Н. Сюрин [и др.]. - Москва: ВНИИТИБП, 1998.—928с.
2. Аковбян, В.А. Генитальный герпес: современные проблемы и пути их решения. /В.А. Аковбян [и др.]. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2003. - №1.- С.4-18.
3. Баринский, И.Ф. Герпес: Этиология, диагностика, лечение. / И.Ф. Баринский [и др.] - М.: Медицина, 1986. - 269 с.
4. Сухих, Г.Т. Иммуитет и генитальный герпес. / Г.Т.Сухих, Л.В. Ванько, В.И. Кулаков. - Н.Новгород, 1997.—220с.
5. Ashley RL.; Wald A. Genital herpes: reiew of epidemic and potential use of typespecific serology. Clin Microbiol Rev. - 1999. - № 12(1). - P. 1-8.