

Эпизоотический пульс планеты

В марте—апреле 2006 г. в мире произошло несколько вспышек опасных инфекционных заболеваний животных

Заболевание	Регион	Дата последней вспышки, мес	
Грипп птиц Подтип H5	Азербайджан, Албания, Афганистан, Греция, Египет, Израиль, Иордания, Казахстан, Камерун, Малайзия, Нигерия, Румыния, Сербия-Черногория, Швейцария	03	
	Буркина Фасо, Великобритания, Германия, Дания, Индия, Иордания, Камбоджа, КНР, Кот д`Ивор, Мьянмар, Нигерия, Польша, Судан, Таиланд, Турция, Франция, Чехия	04	
	Подтип H7	КНДР	04
Болезнь Ньюкасла	Болгария	04	
	Япония	05	
Сибирская язва	Великобритания	04	
	Лесото	05	
Ящур	Серотип O	Аргентина	03
		Бразилия, Палестинская национальная автономия	04
	Серотип A	Египет	03
	Серотип SAT2	Ботсвана	04
Губчатая энцефалопатия КРС	США, Швеция	04	
Скрепи овец	Словения	04	
Классическая чума свиней	Болгария, Германия	03	
	Бразилия, Гватемала	04	
Контагиозный метрит лошадей	Великобритания	04	
Африканская чума лошадей	ЮАР	04	
Геморрагическая септицемия рыб	Румыния	03	

УДК 619:616.98:578.828

Лентивирусы копытных. II. Лабораторные модели¹

Б.Ф. Шуляк, Российский ветеринарный журнал

Ключевые слова: культура клеток, лабораторные животные, лентивирусы, ретровирусы

Сокращения: ВАЭК — вирус артрита-энцефалита коз; ВИК — вирус иммунодефицита КРС; ВМВ — вирус мэди-висны; ИНАН — инфекционная анемия лошадей; КК — культура клеток; КРС — крупный рогатый скот; ЛВ — лентивирусы

Возможность изучения и диагностики вирусных инфекций в значительной степени определяется наличием пригодных для репродукции их возбудителей лабораторных моделей, которые применяют для изоляции возбудителей из патологического материала, накопления их в количестве, достаточном для анализа структуры и состава, получения диагностикумов и т.д. Поэтому данное направление было и остается основным плацдармом познания медленных инфекций.

Лабораторные животные

Наибольшую чувствительность к ЛВ проявляют те виды животных, к которым они адаптировались в процессе эволю-

ции. Однако проведение биопробы на парнокопытных (овцах при мэди-висне, козах при артрите-энцефалите, КРС при болезни Джембраны и иммунодефиците КРС) и непарнокопытных (лошадях, пони, мулах и ослах при ИНАН) требует значительных затрат материальных средств, труда и времени. Последний фактор особенно важен, поскольку при инфекциях ЛВ инкубационный период может составлять несколько лет.

Попытки подобрать лабораторных животных, у которых инфекции ЛВ протекали бы с укороченным инкубационным периодом и вызывали бы специфические клинико-патоморфологические изменения, почти всегда оканчивались неудачей. Ниже мы кратко описываем некоторые из них, не исключая возможности того, что в будущем в данном вопросе может наметиться прогресс.

ИНАН

Многие зарубежные (Опперман, Карман, Шухман, Гельм, Герлах, Шермер, Ленерт, Иенсен, Вирт, Тодоров, Траупе, Петерс и др.) и отечественные (Коляков, Гамалея, Левенберг, Свинцов, Семенов, Ольденборгер и др.) ученые пы-

¹ Начало статьи опубликовано в «РВЖ.СХЖ» 2006, №1.

тались найти чувствительных к вирусу ИНАН лабораторных животных. Первым положительного результата достиг в начале 20-х годов прошлого века Опперман, показавший что у экспериментально зараженных крольчат повышается температура тела на 0,5...1 °С, постепенно снижается масса тела, развиваются гематологические и патологоанатомические изменения (увеличение селезенки и сероватое окрашивание печени). У кур инфекция индуцировала круглоклеточную инфильтрацию и гемосидероз печени. Однако изменчивость интенсивности и низкая специфичность этих изменений не позволили использовать биопробу на кроликах и птице в качестве метода диагностики ИНАН.

ЛВ мелкого рогатого скота. Исландские ученые не нашли ни одного лабораторного животного, чувствительного к ЛВ мелкого рогатого скота [24]. Единственное сообщение о клинических последствиях инокуляции ВВМ новорожденным мышатам (развитии карциномы молочной железы) сделали Е. Лике и соавт. в 1976 г. [13]. Наиболее вероятно, что истинным этиологическим агентом данного онкологического заболевания стал вирус опухоли молочной железы мыши, а ВВМ лишь обострил эту ретровирусную инфекцию.

ВИК. Первоначально считали, что ВИК вызывает у кроликов персистентную бессимптомную инфекцию, которая сопровождается репликацией возбудителя, сероконверсией и гиперплазией лимфатических узлов и селезенки [18]. Однако позднее установили, что у этого вида животных через 2...5 мес после заражения ВИК на фоне иммунодепрессии развиваются анорексия, атрофия мышц и неврологические нарушения [9].

Культивирование ЛВ in vitro

В отличие от лабораторных животных КК полностью оправдали надежды исследователей и стали основной моделью при изучении ЛВ.

Для понимания поведения ЛВ в КК (как, впрочем, и in vivo) схематично представим себе устройство их вирионов (рис. 1). На поверхности сферических вирусных частиц ЛВ, имеющих в отличие от других ретровирусов цилиндрическую сердцевину, находятся мажорный структурный протеин (p24...p30), поверхностный (gp120...135) и трансмембранный (gp40...50) гликопротеины. Поверхностный гликопротеин образует шипы, делающие вирион похожим на подводную мину; ими вирус прикрепляется к чувствительным клеткам. Кроме того, он является основной мишенью нейтрализующих антител. Трансмембранный гликопротеин обеспечивает слияние клеточной мембраны

и вирусной оболочки, что необходимо для проникновения агента в клетку. Расплавление плазмалеммы соседних клеток лежит в основе присущего всем ЛВ феномена симпластообразования. Слившиеся клетки (симпласты) содержат от 3...4 (рис. 2) до нескольких десятков (рис. 3...5) ядер (поликарицитоз) и имеют переменный размер. Кроме того, ЛВ проявляют цитолитические свойства. Цитолитическая и симпластообразующая активности рассматриваемых нами ЛВ и даже разных их штаммов неодинаковы. Более того, степень их выраженности меняется в процессе адаптации к КК.

Важнейшая особенность ЛВ, отличающая их от остальных ретровирусов, состоит в способности реплицироваться в неделящихся, полностью дифференцированных клетках. В следующем номере журнала, когда мы будем обсуждать патогенез вызываемых ЛВ болезней, более детально рассмотрим характер взаимодействия ЛВ с макрофагами и их предшественниками (промоноцитами и моноцитами костного мозга и крови). Здесь же только отметим, что в последних все ЛВ присутствуют в форме провирусной ДНК; только тогда, когда те достигают зрелости и становятся макрофагами, вирусная инфекция приобретает продуктивный характер.

In vitro ЛВ (особенно их первичные изоляты) проявляют перmissibility к КК естественно восприимчивых видов животных. Тем не менее их часто удается адаптировать к гетерологичным клеточным системам.

Обычно в первых пассажах полевых изолятов в КК цитопатические изменения отсутствуют или так слабо выражены, что остаются незамеченными. Однако после нескольких слепых пассажей ЛВ начинают проявлять свое присутствие симпластообразованием, поликарицитозом и переменным по темпам и интенсивности разрушением монослоя.

В патологическом материале титр ЛВ нередко бывает недостаточно высоким, чтобы вызвать интенсивную продуктивную инфекцию в КК. Поэтому для повышения результативности вирусологического исследования прибегают к концентрированию из патологического материала клеточных элементов, в которых данный агент реплицируется in vivo. При этом следует учитывать, что ВВМ, ВАЭК и вирус ИНАН проявляют тропизм преимущественно к мононуклеарным клеткам и макрофагам. Длительно считали, что лимфоциты нечувствительны к перечисленным агентам в отличие от ЛВ, вызывающих иммунодефициты [17]. Однако не так давно установили, что провирус ВАЭК присутствует приблизительно в 1 % лимфоцитов головного мозга, легких, селезенки, лимфатических узлов и тонкого отдела кишечника инфицированных коз [25]. Не исключено, что подобные находки ожидают нас и при других медленных инфекциях.

Другой способ изоляции ЛВ состоит в выращивании фрагментов тканей инфицированных животных в ступке плазмы [1].

Самый эффективный метод изоляции ЛВ из патологического материала основан на совместном культивировании клеток инфицированного животного и чувствительной КК. При каждом пересеве «смешанной» КК добавляють суспензию чувствительной к вирусу незараженной КК. Этот метод нашел применение как для изоляции ЛВ, так и для получения хронически инфицированных этими агентами линий клеток.

Цитопатические изменения в первых пассажах ЛВ в КК отсутствуют или слабо выражены и остаются незамеченными. Только после «слепого» серийного пассирования можно убедиться в том, что удалось изолировать ЛВ. Сроки появления первых признаков цитопатического эффекта ЛВ в КК переменны и зависят от ряда факторов, в т.ч. вирулентности изолята, заражающей дозы, числа пассажей, которые прошла КК. Окрашивание препаратов зараженной КК (например, гематоксилином и эозином) позволяет быстрее обнаружить симпласты и поликарициты. С помощью иммуофлюоресцентного и иммуоферментного анализов, а также полимеразной цепной реакции можно обнаружить вирусный анти-

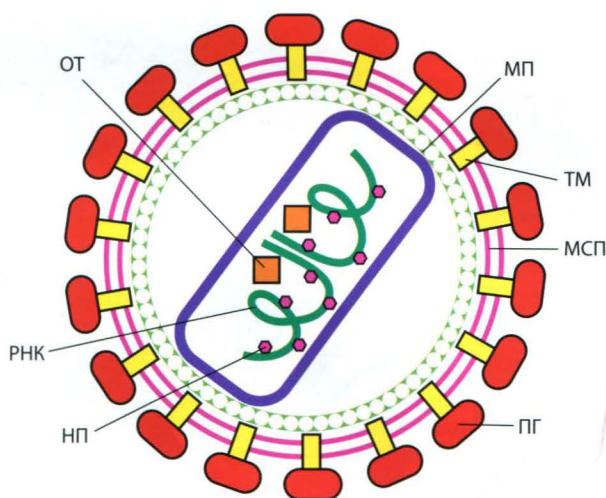


Рис. 1. Структура вириона ЛВ.

Обозначения. НП — нуклеокапсидный протеин; МСП — мажорный структурный протеин; МП — матриксный протеин; ОТ — обратная транскриптаза; ТМ — трансмембранный гликопротеин; ПГ — поверхностный гликопротеин

ген в КК на более ранних пассажах тестируемого материала и в более короткие сроки после заражения КК.

Адаптация ЛВ к КК обычно сопровождается снижением их вирулентности, что в будущем, вероятно, может стать основой для создания живых вакцин против этих инфекций.

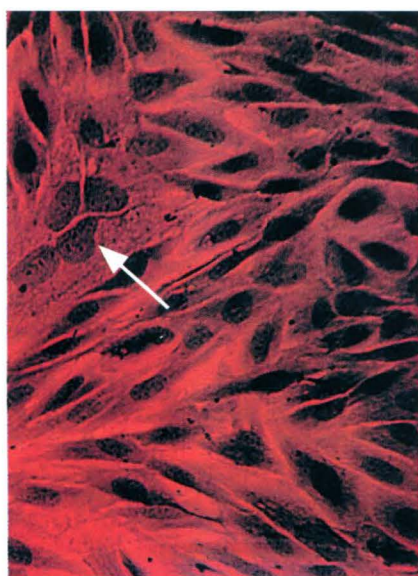
ИНАН. Способность к репродукции в КК штаммов вируса ИНАН неодинакова. Большая часть высоковирулентных изолятов эффективно размножается только в первичных культурах моноцитов/макрофагов лошади [11].

Однако изоляты вируса ИНАН нередко удается адаптировать и к другим КК, включая перевиваемые, посредством многократного «слепого» пассирования. Частично утрачиваемая при этом вирулентность агента обычно восстанавливается после заражения им восприимчивых животных [7]. К числу клеточных систем, в которых данный агент способен активно размножаться *in vitro*, относятся КК селезенки [19], костного мозга [12], фибробластов [10], эндотелия [15], почки и кожи эмбриона лошади [14], а также перевиваемые линии клеток собаки и кошки [2, 4].

ВМВ. В работе с ВМВ в основном применяют КК овец и их плодов, реже КК плодов коров.

Наиболее чувствительна к агенту КК хороидного сплетения овцы. За рубежом эксплантаты этой ткани выращивают в сгустке плазмы. Автор данной статьи предложил оригинальный способ получения КК хороидного сплетения, основанный на обработке измельченной ткани смесью трипсина и химотрипсина. После кратковременного контакта с раствором ферментов взвесь ткани в питательной среде механически диспергируют встряхиванием, а ферменты нейтрализуют фетальной сывороткой. Такой щадящий метод позволяет с минимальными затратами времени и труда и без использования специальной аппаратуры (магнитной мешалки, центрифуги и т.д.) получать большой выход жизнеспособных клеток, образующих монослой в течение 5...7 дней. Коэффициент пересева данной КК в первых пассажах составляет 1 : 2...1 : 3, а в последующем может быть увеличен до 1 : 5.

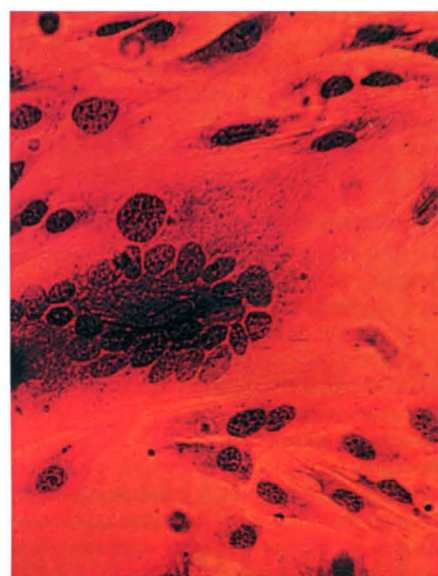
Несколько менее чувствительны к вирусу КК тестикулов баранчика (или эмбриона овцы) и легкого плода овцы или



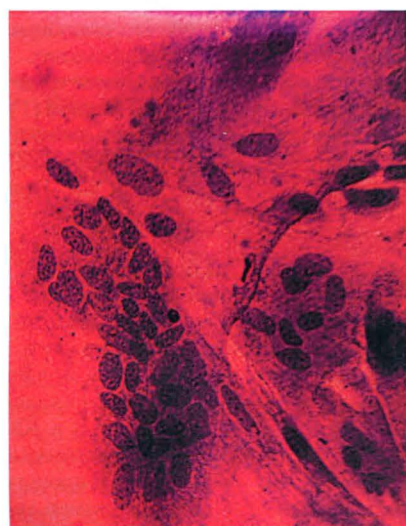
2



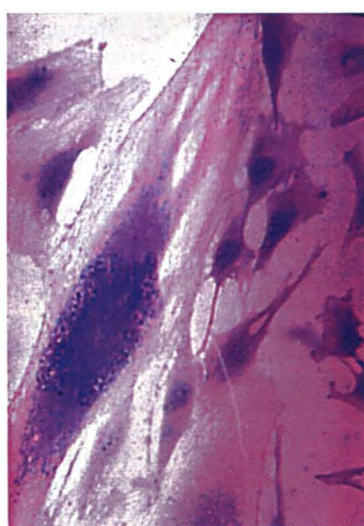
3



4



5



6



7

Рис. 2...7. Цитопатическое действие ВМВ в культуре клеток хороидного сплетения плода овцы (комментарии в тексте)

коровы. Но и в них титр вируса достаточно высок, чтобы использовать культуральную жидкость без концентрирования для постановки РСК (для других тестов ее приходится концентрировать).

Оптимальный способ изоляции ВМВ — сокультивирование клеток патологического материала (фракции лейкоцитов крови, хоридного сплетения и др.) с чувствительной КК. Этот метод также нашел применение при создании хронически инфицированных ВМВ линий клеток легкого плода коровы.

Цитопатические изменения, вызываемые ВМВ *in vitro*, впечатляют. По мере развития инфекции в монослое увеличивается количество мелких симпластов (рис. 2), которые за счет слияния друг с другом постепенно увеличиваются — в ряде случаев весь монослой превращается в несколько огромных клеток (рис. 3, 5...7). Ядра в поликариоцитах могут располагаться в виде округло-овальных розеток (рис. 4, 6) или имеющих неправильные очертания скоплений (рис. 5). По нашим наблюдениям, для этого вируса наиболее типично образование ядрами поликариоцитов 1...2-рядного овала или круга (рис. 4, 6); иногда в зараженном ВМВ монослое находят вытянутые поликариоциты, в которых ядра расположены по периферии, образуя 2 почти параллельных ряда (рис. 7). На фоне этих процессов постепенно прогрессирует округление части клеток, которые отделяются от стенок культурального матраса. В конечном итоге большая часть монослоя разрушается.

ВАЭК. Этот ЛВ вызывает в КК такие же цитопатические изменения, как ВМВ. У разных полевых изолятов ВАЭК отмечают доминирование цитолитических или симпластообразующих свойств [3]. Наиболее чувствительны к вирусу КК синовиальной мембраны коз и эпителия вымени [16].

При первичной изоляции ВАЭК очень хорошие результаты дает выращивание эксплантатов тканей (хоридного сплетения, синовиальной оболочки, вымени, лимфатических узлов и легких) инфицированных коз [1]. С той же целью часто проводят заражение чувствительных КК патологическим материалом — синовиальной жидкостью, молозивом, фракцией мононуклеарных клеток крови, гомогенатами вымени, лимфатических узлов, хоридного сплетения, слюнных желез и т.д. [23].

ВИК. К ВИК чувствителен ряд первичных, диплоидных и анеуплоидных КК пяти видов животных: КРС, овцы, собаки, кролика и хорька [5]. Однако в них инфекция ВИК вследствие высокой цитотоксичности носит кратковременный характер и завершается быстрым разрушением монослоя, что длительно мешало изучению агента и разработке средств его специфической диагностики. Первыми успеха добились А.М. Боуиллант и соавт. в 1989 г. посредством сокультивирования зараженной ВИК культуры с перевиваемой линией клеток собаки Cf2Th [5]. Это позволило решить 2 задачи. Во-первых, появилась возможность изоляции агента из патологического материала. Во-вторых, в руках экспериментаторов оказалась персистентно инфицированная клеточная система, которая позволяла получать большой урожай вируса: его титр в стационарной и суспензионной КК достигал $10^6/0,1$ мл и $10^{10}/0,1$ мл соответственно [5].

В настоящее время многие исследователи для получения антигена ВИК сокультивируют зараженные им клетки с КК легкого плода коровы [5], эпидермиса эмбриона кролика [18] и рядом других КК.

Инфекция ВИК в КК помимо лизиса клеток сопровождается симпластообразованием и поликариоцитозом. В типичных случаях ядра рассеяны в цитоплазме поликариоцитов. Исключение составляют изоляты ВИК, выделенные во Флориде (США) в 1993 г., — они индуцировали скопление ядер в розетки [22].

Генно-инженерные модели

В последнее время для изучения отдельных структурных компонентов вирионов ЛВ, а также при создании рекомбинантных вакцин и диагностикумов все шире пользуются ген-

но-инженерными методами. В качестве векторов генов ЛВ применяют плазмиды, дрожжи, другие вирусы и бактерии [20, 21], а модифицированные вирионы ЛВ пытаются использовать в качестве векторов других вирусных агентов. Мне хотелось закончить эту часть обзора словами о том, что данное направление пока еще носит экспериментальный характер. Но нельзя провести четкой грани между настоящим и будущим, о чем свидетельствует статья В.В. Колотвина и соавт., которую мы публикуем в этом номере журнала.

(продолжение следует)

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Agrimi P., Tolari F., Legrottaglie R. et al. Caprine arthritis-encephalitis. Virus isolation and identification in goat herds in Italy. *Microbiologica*, 1987, 10, 4, 353—361.
2. Benton C.V., Brown B.L., Harshman J.S., Gilden R.V. In vitro host range of equine infectious anemia virus. *Intervirology*, 1981, 16, 225—232.
3. Blondin I., Grillet C., Thiogane Y. Syncytia formation in cultures and analysis of the protein composition of various strains of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) *Ann Rech Vet*, 1989, 20, 2, 153—158.
4. Bouillant A.M., Nielsen K., Ruckerbauer G.M. et al. The persistent infection of a canine thymus cell line by equine infectious anaemia virus and preliminary data on the production of viral antigens. *J Virol Methods*, 1986, 13, 4, 309—321.
5. Bouillant A.M., Ruckerbauer G.M., Nielsen K.H. Replication of the bovine immunodeficiency-like virus in diploid and aneuploid cells: permanent, latent and virus-productive infections *in vitro*. *Res Virol*, 1989, 140, 6, 511—529.
6. Burkala E.J., Narayani I., Hartaningsih N. Serological evidence of an Australian bovine lentivirus. *Vet Microbiol*, 1999, 68, 1—2, 171—177.
7. Carpenter S., Chesebro B., Change in host cell tropism associated with *in vitro* replication of equine infectious anemia virus. *J Virol*, 1989, 63, 2492—2496.
8. Gonda M.A., Luther D.G., Fong S.E., Tobin G.J. Bovine immunodeficiency virus: molecular biology and virus-host interactions. *Virus Res*, 1994, 32, 155—181.
9. Kalvatchev Z., Walder R., Perez F. et al. Infection of rabbits with R29 strain of bovine immunodeficiency virus: virulence, immunosuppression, and progressive mesenteric lymphadenopathy. *Viral Immunol*, 1998, 11, 3, 159—166.
10. Klevjer-Anderson P., Cheevers W.P., Crawford T.B., Characterization of the infection equine fibroblasts by equine infectious anemia virus. *Arch. Virol.*, 1979, 60, 279—89.
11. Kobayashi K., Kono Y., Propagation and titration of equine infectious anemia virus in horse leukocyte culture, National Inst Anim Health (Tokyo), 1967, 7, 8—20.
12. Lichtenstein D.L., Rushlow K.E., Cook R.F. et al. Replication *in vitro* and *in vivo* of an equine infectious anemia virus mutant deficient in dUTPase activity. *J Virol*, 1995, 69, 2881—2888.
13. Lycke E., Svennerholm B. Tumor incidence in Visna virus inoculated mice. *Experientia*, 1976, 32, 4, 514—515.
14. Malmquist W.A., Barnett D., Becvar C.S. Production of equine infectious anemia antigens in a persistently infected cell line. *Arch Virol*, 1973, 42, 361—370.
15. Maury W., Oaks J.L., Bradley S., Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus. *J Virol*, 1998, 72, 9291—9297.
16. Mselli-Lakhal L., Guiguen F., Fornazero C. et al. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection *in vitro*. *Virology*, 1999, 259, 1, 67—73.
17. Narayan O., Clements J.E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J Gen Virol*, 1989, 70, 1617—1639.
18. Pifat D.Y., Ennis W.H., Ward J.M. et al. Persistent Infection of Rabbits with Bovine Immunodeficiency-Like Virus. *J Virol*, 1992, 4518—4524.
19. Raabe M.R., Issel C.J., Montelaro R. Equine monocyte-derived macrophage cultures and their applications for infectivity and neutralization studies of equine infectious anemia virus. *J. Virol. Methods*, 1998, 71, 87—104.
20. Rafnar B., Tobin G.J., Nagashima K. et al. Immune response to recombinant visna virus Gag and Env precursor proteins synthesized in insect cells. *Virus Res*, 1998, 53, 2, 107—120.
21. Reyburn H.T., Roy D.J., Blacklaws B.A. et al. Expression of maedi-visna virus major core protein, p25: development of a sensitive p25 antigen detection assay. *J Virol Methods*, 1992, 37, 3, 305—320.
22. Suarez D.L., van der Maaten M.J., Wood C., Whetstone C.A. Isolation and characterization of new wild-type isolates of bovine lentivirus. *J Virol*, 1993, 67, 8, 5051—5055.
23. Surman P.G., Daniels E., Dixon B.R. Caprine arthritis-encephalitis virus infection of goats in South Australia. *Aust Vet J*, 1987, 64, 9, 266—271.
24. Thormar H. Visna-maedi virus infection in cell cultures and in laboratory animals. *Front Biol*, 1976, 44, 97—114.
25. Zink M.C., Yager J. A., Myers J.D. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *Am J Pathol*, 1990, 136, 843—854.

SUMMARY

B.F. Schuljak. Lentivirus infections of Ungulates. II. Laboratory models.

In this part of review author describes the laboratory models which researches use in the work with 5 lentiviruses — EIAV, MVV, CAEV, BIV & virus of Jembrana disease.