

РОЛЬ ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ У ДОСЛІДЖЕННЯХ ШТАМІВ ЕНТЕРОВІРУСІВ СВИНЕЙ

І. Ф. Демиденко, молодший наук. співробітник*
В. П. Романенко, доктор ветеринарних наук, академік НААН
Інститут ветеринарної медицини НААН

Наведено значущість вивчення генетичних ознак (маркерів) у дослідженнях штамів ентеровірусів свиней. Висвітлено результати з клонування методом бляшок референтних штамів ентеровірусів свиней та виділених ізолятів тих же серотипів. Проведено диференційне порівняння виділених клонів за рядом маркерних ознак.

Ентеровіруси свиней, генетичні властивості, маркери, метод бляшок, клонування

Чисельність, значне поширення ентеровірусів та етіологічний зв'язок з широким спектром клінічних синдромів обумовлюють необхідність постійного суворого епізоотичного та епідеміологічного контролю за цими агентами. Ентеровірусами уражуються люди, всі види тварин, птахи, комахи і навіть земноводні. Від часу відкриття цих вірусів вчені різних країн вивчали їх циркуляцію у природному середовищі.

На тепер до ентеровірусів людей належить близько 100 серотипів, а до ентеровірусів свиней, згідно з класифікацією В. П. Романенко, 23 серотипи (8 референтних штамів, класифікованих Н. Dunne et. al. та 14-ти виділених В. П. Романенко зі співав. на території України, Росії та Молдови) [6].

Як вважає більшість дослідників [13, 14, 16, 17, 18], головним еволюційним фактором для ентеровірусів є здатність до рекомбінації як всередині видів, так і між вірусами різних видів і навіть родів пікорнавірусів. Не зважаючи на те, що ентеровіруси традиційно вважаються кишковими вірусами (за первинним місцем репродукції, здатністю до тривалої персистенції у кишечнику, переважно фекально-оральним механізмом передачі), насправді вони здатні спричиняти тяжкі ураження нервової системи (менінгіти, енцефаліти, що супроводжуються гострими в'ялими паралічами), мають ембріотропні властивості [4].

Ентеровірусні інфекції вже давно привертали до себе увагу вчених у ветеринарній практиці різних держав. Вперше ентеровіруси свиней виділили С. Moscovici, А. Ginervi, V. Mazzaracchio [15]. Починаючи з 1969 р., В. П. Романенко із співавторами провели вагомі дослідження щодо ізоляції ентеровірусів свиней, вивчення їх біологічних, фізико-

* Науковий керівник –, доктор ветеринарних наук, професор, член-кор., академік НААН
В. П. Романенко

хімічних та генетичних властивостей. Вперше на території СРСР виявлено захворювання свиней на ензоотичний енцефаломієліт (хворобу Тешена), встановлено і науково обґрунтовано дві нові, раніше невідомі хвороби свиней – ентеровірусний гастроентерит та ентеровірусну пневмонію свиней, яким у 1978 р. надано нові нозологічні одиниці [2, 7, 8, 10, 12].

У більшості випадків за одними клініко-епізоотологічними та патолого-анатомічними характеристиками чітко визначити, який саме штам ентеровірусу викликав конкретне захворювання не можливо. Вирішальне значення для постановки вірогідного діагнозу мають лабораторні дослідження. До таких методів належить виділення вірусу та його ідентифікація на рівні родини, роду та серотипу.

За літературними даними [1], штами вірусу поліомієліту одного й того ж серотипу можуть вирізнятись один від одного за рядом маркерних ознак. Відмінність може бути наявною також всередині популяцій вірусних часток одного й того ж штаму і, за певних умов, це має значення у суттєвих змінах властивостей їх вірусних популяцій.

Тому однією із важливих умов при вивченні спадковості та мінливості вірусів, так як і будь-яких інших організмів, є отримання нащадків вірусів, усі частки якого мають однакові спадкові ознаки – чисту лінію (клон).

Для отримання чистих ліній вірусів використовують декілька методів: метод кінцевих розведень, метод бляшок та метод отримання клонів із популяції однієї інфікованої клітини. При цьому припускають, що популяція вірусу в одній із чутливих систем (наприклад, у культурі клітин), інфікованої кінцевим розведенням, або одна бляшка походить із одиничної вірусної частки.

Метод бляшок – це найчутливіший метод отримання чистих ліній (клонів) при роботі з ентеровірусами. Він дає змогу здійснити точний кількісний підрахунок інфекційних вірусних часток, проводити первинну ідентифікацію ентеровірусів за формою, величиною, динамікою розвитку бляшок [1].

Існування клону як сукупності генетично однорідних віріонів обмежено часом, оскільки у популяції клону можуть утворитися віріони із спадково зміненими властивостями. Відбір із такої популяції клону за певною ознакою дає змогу отримати штам або культуру вірусу, клонованого саме за визначеною ознакою. Однорідність такого штаму може бути збережена консервацією його методом ліофільного висушування і певною мірою пасажами в умовах, які забезпечують нормальний розвиток конкретної властивості.

Генетичною ознакою (маркером) може бути будь-яка властивість вірусу, яка передається спадково і має відповідну якісну і кількісну характеристику у визначених умовах зовнішнього середовища. Найбільш широко вивчено генетичні ознаки у вірусів: поліомієліту, ящуру, віспи і вісповакцини, грипу, чуми птахів, хвороби Ньюкасла, альфавірусів та деяких інших видів [5].

Щодо предметних досліджень ентеровірусів свиней за маркерними ознаками, то таких досліджень в Україні не проводилося.

Мета дослідження – отримати чисті лінії (клони) ентеровірусів свиней за допомогою методу бляшок. Провести диференціальне вивчення їх генетичних ознак за маркерами та дослідити існування різниці не тільки між різними штамами ентеровірусів, але й всередині самих штамів.

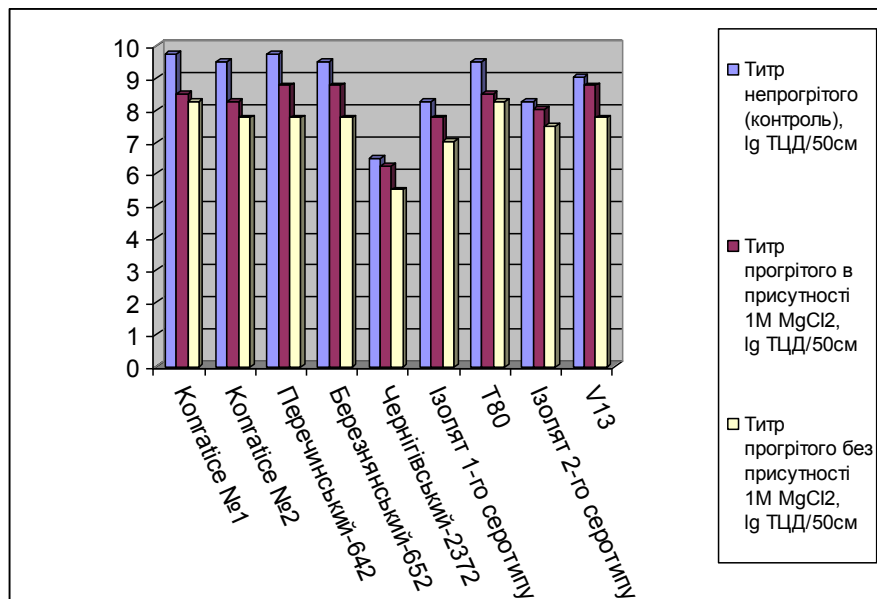
Матеріали і методи дослідження. Для дослідів використовували штами ентеровірусів свиней: *Konratice*, *T80*, *V13* (отримані Романенко В. П. у 1970 р. від доктора Derbyshire I. B. Pirbright Laboratore (Великобританія) виділені В. П. Романенком епізоотичні культури і доведені: до вакцинного штаму – Перечинський-642, до діагностичного – Березнянський-652 та патогенний штам Чернігівський-2372, який використовується для визначення імуногенних властивостей вакцини проти хвороби Тешена свиней, а також виділені ізоляти, що належать до 1-, 2- та 8-го серотипів. Клонування штамів методом бляшок проводили на перещеплювальній культурі клітин СНЕВ відповідно до модифікованого методу В.П. Романенко [9].

Диференціювали виділені клони за маркерами: час появи бляшок, розмір бляшок – дрібні, малі, середні, великі (маркер S); форма бляшок – кругла, неправильна, чіткі краї, нерівні; колір – мутні (маркер p^t), прозорі (маркер p^c), крапчасті (маркер p^f), «червоні» (маркер p^i); цитопатична активність до перещеплювальної культури клітин СНЕВ; термореزистентність (маркер Tr) у присутності 1 М $MgCl_2$ і без нього, здатність розмножуватися за різних температур (маркер rct).

Результати дослідження і обговорення. За допомогою методу бляшок у п'ятьох послідовних пасажах отримали 10 клонів досліджуваних штамів ентеровірусів свиней. Внаслідок проведеного клонування, виявили, що штам *Konratice* продукував два типи бляшок: великі (діаметром 0,5 см) та середні (діаметром 0,3 см), клони інших штамів та ізолятів, були однорідними впродовж всіх п'яти пасажів. За морфологічними ознаками бляшки, утворені референтними штамами, мали чіткі рівні межі та матове забарвлення, а бляшки, утворені, ізолятами – були блискучими з нерівними краями. Бляшки виділених ізолятів з'являлися через 72–96 год після внесення вірусу на культуру клітин, а референтних штамів – через 48–72 год.

Цитопатична дія (ЦПД) на культуру клітин СНЕВ отриманих клонів референтних штамів ентеровірусів свиней проявлялася через 24–48 год після зараження дрібними фокусами круглих клітин, які через 4–6 годин перетворювалися на вогнища круглих клітин, що охоплювали 50–70 % всього моношару. ЦПД клонів виділених ізолятів проявлялася через 48–72 год. Після проведення клонування час виникнення ЦПД на культуру клітин СНЕВ клонів референтних штамів подовжився на 24 год, а клонів ізолятів – на 24–48 год. Після проведення клонування, спостерігали зростання титрів інфекційної активності до культури клітин СНЕВ як референтних штамів, так і виділених ізолятів.

Терморезистентність отриманих клонів штамів ентеровірусів свиней визначали прогріванням проб на водяній бані впродовж 1 год за температури 56 °С у присутності 1 М $MgCl_2$ і без нього. Проби вірусів непрогрітих, прогрітих у присутності іонів магнію і без них титрували у культурі клітин СНЕВ. Визначили, що інфекційна активність виділених клонів штамів ентеровірусів свиней при прогріванні з 1М $MgCl_2$ зменшувалася тільки на 0,25–1,25 Іг ТЦД/50см, тоді як при прогріванні без 1М $MgCl_2$ – значно більше, на 1,25–1,75 Іг ТЦД/50см (рис.1) [2, 3].



1. Терморезистентність виділених клонів штамів ентеровірусів свиней в присутності і без 1 М $MgCl_2$

Висновки

Проведені дослідження доводять існування різниці за генетичними маркерами як між штамми різних серотипів, так і між штамми одного й того ж серотипу. Це дає підставу продовжити наші предметні дослідження з виявлення наявності внутрішньотипових відмінностей між клонами за іншими маркерними ознаками для подальшого використання отриманих результатів у вірусологічній практиці.

Список літератури

1. Ворошилова М.К. Энтеровирусные инфекции человека / Ворошилова М.К. – М.: Медицина, 1979. – 360 с.
2. Демиденко І.Ф. Внутрішньотипова антигенна характеристика штамів ентеровірусів свиней / І.Ф. Демиденко // Вет. біотехнологія. – 2011. – № 18. – С. 60–63.
3. Демиденко І.Ф. Клонування ентеровірусів свиней і порівняльне вивчення генетичних властивостей одержаних клонів / І.Ф. Демиденко // Вет. біотехнологія. – 2013. – № 22. – С. 133–140.
4. Задорожна В.І. Молекулярна епідеміологія інфекції, викликані ентеровірусом типу 71 / В.І. Задорожна // Профілактична медицина. – 2008. – № 3. – С. 44–51.

5. Земсков М.В. Основы общей микробиологии, вирусологии и иммунологии: [науч. пособ.] / Земсков М.В., Соколов М.И., Земсков В.М. – М.: Колос, 1972. – 287 с.
6. Романенко В.Ф. Классификация энтеровирусов свиней / В.Ф. Романенко, О.Г. Прусс, Н.В. Бабич [и др.] // Вісн. аграр. науки. – 1993. – № 1. – С. 94–101.
7. Романенко В.П. Ентеровіруси і їх значення в патології свиней / В.Ф. Романенко // Вісн. аграр. науки. – 1996. – № 7. – С. 48–52.
8. Романенко В.П. Керованість інфекційним процесом при ентеровірусних хворобах свиней / В.П. Романенко, В.Б. Білоштан, І.Ф. Соколянський [та ін.] // Вісник аграрної науки. – 2007. – № 7. – С. 34.–36.
9. Романенко В.Ф. Бляшкообразующие свойства энтеровирусов свиней // В.Ф. Романенко, О.Г. Прус // Тезисы докладов Всесоюзной межвузовской науч. конф. по вет. вирусологии. – М., 1973. – Ч.1. – С. 47– 48.
10. Романенко В. Ф. Вирусные гастроэнтериты свиней / В. Ф. Романенко // Ветеринария. – 1975. – № 4. – С. 47–49.
11. Романенко В. Ф. Изучение действия ингибиторов нуклеинового обмена на репродукцию вируса энзоотического энцефаломиелита свиней / В. Ф. Романенко // Тез. докл. Всесоюз. межвузовск. научн. конф. по вирусологии. – М., 1973. – Ч.1 – С. 38–39.
12. Романенко В.Ф. Инфекционные желудочно-кишечные болезни свиней / Романенко В.Ф. – М.: Колос, 1984. – 158 с.
13. Chevaliez S. Molecular comparison of enterovirus 11 strains circulating in Europe during an epidemic of multisystem hemorrhagic disease of infants indicates that evolution generally occurs by recombination / S. Chevaliez, A. Szendroi, V. Caro [et al.] // Virology. – 2004. – Vol. 325, № 1. – P. 56–70.
14. Evolution of the genome of human enterovirus B: incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species / A. M. Lindberg, P. Andersson, C. Savolainen [et al.] // J. Gen. Virol. – 2003. – Vol. 84. – P. 1223–1235.
15. Moscovici C. Isolamenta su coltura di Tissuti di un virus da enteric suina/ C. Moscovici, A. Ginervi, V. Mazzaracchio // Zooprofilassi . – 1956. – № 1. – S. 417–426.
16. Oberste M.S. Evidence for frequent recombination within species human Enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes / M.S. Oberste, K. Maher, M.A. Pallansch // J. Virol. – 2004. – Vol. 78, № 2. – P. 855–867.
17. Natural genetic recombination between co-circulating geterotypic enteroviruses / G. Oprisan, M. Combiescu, S. Gullot [et al.] // J. Gen. Virol. – 2002. – Vol. 83, № 9. – P. 2193–2200.
18. Simmonds P. Recombination and selection in the evolution of picornaviruses and other mammalian positive-stranded RNA viruses / P. Simmonds // J. Virol. – 2006. – Vol. 80, № 22. – P. 11124–11140.

Представлена важность изучения генетических свойств (маркеров) при исследованиях штаммов энтеровирусов свиней. Показаны результаты по клонированию методом бляшек референтных штаммов энтеровирусов свиней и выделенных изолятов тех же серотипов. Проведено дифференциальное сравнение выделенных клонов по маркерным признакам.

Ентеровіруси свиней, генетическі ознаки, маркери, метод бляшек, клонування.

The importance of genetic properties (markers) studies is shown in research of swine enteroviruses strains. The results of plaque method cloning of reference strains of swine enteroviruses and selected isolates of the same serotypes are shown. Differential comparison of allocated clones for marker features is carried out.

Swine enteroviruses, genetic signs, markers, plaque method, cloning.