

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПАРВОВИРУСА И ЕГО РОЛЬ В ПАТОЛОГИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (обзор)

Х.З. ГАФФАРОВ, М.А. ЕФИМОВА

На основе анализа результатов обширных исследований во многих странах описаны свойства и распространенность парвовируса крупного рогатого скота (КРС). К I типу относятся парвовирусы КРС, выделенные в США, Европе, Северной Америке, Африке и Австралии (по антигенным свойствам они идентичны, но отличаются от парвовирусов животных других видов и человека). Японские изоляты, имеющие антигенные отличия от представителей I типа, относят ко II типу. Для парвовируса КРС характерна способность агглютинировать эритроциты морских свинок и человека. Это ДНК-содержащий вирус с размером вириона 23 нм. Репликация и сборка происходят в клеточном ядре. Наибольшие титры ($10^{6,75}$ - $10^{8,0}$ ТЦД₅₀/мл) достигаются при культивировании парвовируса I типа в первичных культурах клеток легких, почек, селезенки, тестикул и надпочечников эмбриона коровы. Для успешного выделения парвовируса I типа необходимо использовать эмбриональную сыроворотку коров, свободную от специфических антител. Пероральное или внутривенное заражение безмолозивных или новорожденных телят, лишенных соответствующих антител, сопровождается развитием симптомокомплекса диареи в течение 24-48 ч. Чаще всего вирус обнаруживают в кишечнике, лейкоцитах крови, лимфоузлах, селезенке, тимусе и в клетках надпочечников. Вирус длительно персистирует в организме коров, обуславливает аборт и эмбриональную смертность, проникая через плацентарный барьер. Вирус обнаруживают в тимусе, легких и селезенке мумифицированных плодов. Сведения, накопленные в основном за рубежом, показывают, что парвовирусная инфекция регистрируют во многих странах. Доля серопозитивных животных в разных стадах (Великобритании, Австралии, Германии, Австрии, Италии, Алжире и др.) варьировала от 14 до 100 %. По нашим данным, в девяти регионах Среднего Поволжья специфические антитела к парвовирусу в ИФА выявляются у 26,6-58,4 % глубокостельных коров и телят. Парвовирус участвует в формировании смешанных респираторно-кишечных инфекций у телят и различных форм патологий репродуктивных органов у взрослого поголовья КРС. Обсуждается необходимость введения в отечественную ветеринарную практику средств иммуноферментной диагностики и инактивированной ассоциированной вакцины с широким спектром специфической защиты.

Ключевые слова: парвовирус I типа, крупный рогатый скот, ИФА, вакцина.

В молочном скотоводстве при использовании интенсивных технологий на фоне высокой продуктивности животных, нарушения обмена веществ и различных иммунодефицитов активизируются возбудители респираторно-кишечных инфекций, из которых экономически наиболее важное значение имеют патогены, обуславливающие бесплодие, раннюю эмбриональную смертность и аборт (1-3). В развитии этих патологий крупного рогатого скота (КРС) доминируют вирус герпеса I типа, вирус диареи КРС — болезни слизистых (ВД-БС), вирус парагриппа-3 (ПГ-3), респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), аденовирусы I и II подгрупп, парво- и реовирусы. Среди этой обширной группы долгие годы малоизвестными и неизученными в нашей стране оставались парвовирусы КРС (4-7).

Парвовирусы патогенны для многих видов животных и птиц, а также для человека. Впервые в США из содержимого кишечника телят с признаками энтерита был выделен вирус, который в отличие от других энтеровирусов КРС обладал гемадсорбирующими свойствами и был назван Haden-virus (hemadsorbing enterovirus) (8). Изучая его основные биологические свойства, Р.А. Wachman (9) установил, что вирус хорошо размножается в первичной культуре клеток тестикул телят, вызывая цитопатогенные изменения и полный лизис клеток на 3-4-е сут после заражения. При этом инфекционный титр достигал $10^{4,5}$ - $10^{5,0}$ ТЦД₅₀/0,1 мл. Через 18-24 ч появлялись эозинофильные ядерные включения. Выяснилось, что вирус Haden агглютинирует эритроциты крови морской свинки, человека и со-

баки. Реакции гемагглютинации (РГА) и торможения гемагглютинации (РТГА) происходили при 4 °С в диапазоне рН 5,0-8,0. Вирус проявлял устойчивость к ряду химических и физических агентов (табл. 1), сохранял активность при рН от 3 до 9. В присутствии ингибиторов синтеза ДНК 5-йод-2-дезоксинуридина и 5-бром-2-дезоксинуридина инфекционная и гемагглютинирующая активность подавлялась (см. табл. 1). Следовательно, вирус Haden относился к ДНК-содержащим.

1. Изменение ТЦД₅₀ и гемагглютинирующей активности (ГА) вируса Haden при действии химических и физических факторов (9)

Фактор	Контроль		Опыт	
	ТЦД ₅₀ /0,1 мл	ГА-титр	ТЦД ₅₀ /0,1 мл	ГА-титр
5-Йод-2-деоксиуридин (100 мг/мл)	10 ^{4,00}	1:512	10 ^{1,25}	1:128
5-Бром-2-деоксиуридин (100 мг/мл)	10 ^{4,25}	1:1024	10 ^{0,25}	1:64
Хлороформ	10 ^{4,25}	1:1024	10 ^{4,25}	1:1024
Na-Дезоксихолат	10 ^{4,50}	1:1024	10 ^{4,00}	1:1024
56 °С, 60 мин	10 ^{4,00}	1:1024	10 ^{4,25}	1:1024
рН 3, 60 мин	10 ^{4,25}	1:1024	10 ^{4,25}	1:1024

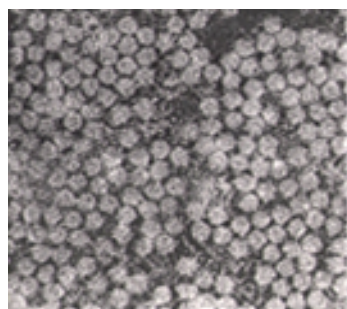


Рис. 1. Парвовирус крупного рогатого скота. Увеличение ×120 000, негативное контрастирование (9).

После очистки и концентрирования вируса в градиенте плотности цезия электронная микроскопия с негативным контрастированием показала, что его вирион имеет размер 23 нм, представляет собой изометрическую частицу без оболочки и содержит 32 капсомера диаметром 2-4 нм, которые уложены по икосаэдральному типу (рис. 1). Вместо оболочки выявлены небольшие, похожие на кольцо образования размером 7-8 нм. В вирионах были идентифицированы три белка: с молекулярной массой 66,80 кД (75,6-82,7 %), 76,15 кД (7,7-10,6%) и 85,50 кД (9,6-13,8 %). На основании изученных свойств он классифицирован как парвовирус

КРС I типа и считается референтным штаммом (9-11).

Дальнейшие исследования по выделению и изучению биологических свойств парвовируса КРС проводились на западе США (12), в Алжире (13), Англии (14), Австрии (15), Японии (16), Австралии (17, 18), в России (19).

Оптимальные условия выделения парвовируса КРС I типа. Группа ученых из США (20) в молочных стадах Колорадо и Южной Дакоты, в которых регистрировались болезни новорожденных неонатальной диареей, провели вирусологические исследования 129 проб фекалий и образцов кишечника телят, полученных при вскрытии. После деконтаминации разведения суспензий помещали на монослой активно делящихся клеток почек или легких коровьего эмбриона (соответственно ПЭК и ЛЭК). При этом использовали первичные культуры клеток и сыворотку плода коровы, свободную от антител к парвовирусу КРС. В результате получили 33 вирусных изолята (10 идентифицированы как парвовирус, 23 — как энтеровирус). В Великобритании из проб фекалий 3-месячного павшего теленка, у которого регистрировали признаки энтерита, после инокуляции первичной культуры клеток ПЭК выделили вирус, условно обозначенный как 32459. Он оказался идентичным штамму Haden в перекрестной реакции нейтрализации (РН) и РТГА и характеризовался как мелкий ДНК-содержащий вирус. Штамм 32459 отличался от парвовируса Haden I типа тем, что агглютинировал эритроциты овец, кролика и крыс. У двух 3-месячных телят интравенозная инокуляция и интраназальная инстиляция штамма 32459 вызвали клинические признаки болезни

с формированием антител и вирус был обнаружен в носовой слизи через 2 сут после заражения (14, 21). В других экспериментах в США при обследовании 114 гол. скота у 41 особи в 6 стадах из 10, где имели место различные формы патологий, титры антигемагглютининов составили 1:40 и выше. Антитела, аналогичные антителам из фетальной сыворотки, выявлялись также в сыворотке крови телят, не принимавших молозива (12). Антигемагглютинины к парвовирусу КРС I типа обнаружены также в сыворотке крови лошадей, коз и собак (14).

В 65 из 70 проб сывороток крови взрослого поголовья КРС, полученных в 7 стадах Северного Квинсленда (Австралия), установили высокие титры вируснейтрализующих антител к парвовирусу I типа. Результаты этих исследований в дальнейшем подтвердились у большого процента животных в РТГА выявлением антител к парвовирусу КРС I типа, инактивированному β -пропиолактоном. Для выделения возбудителя авторы выбрали серопозитивное стадо из 125 животных до 6-месячного возраста, от которых собрали пробы фекалий. Каждый образец разводили в фосфатном буфере, 3-кратно замораживали, размораживали и осветляли центрифугированием, после чего инокулировали монослой первичной культуры клеток тестикул коровьего эмбриона полученными препаратами (по 0,5 см³, адсорбция при 37 °С в течение 1 ч). Смену поддерживающей среды, содержащей 1 % эмбриональной сыворотки КРС, свободной от антител к парвовирусу КРС I типа, проводили на 3-и, 7-е и 14-е сут. Дважды в неделю отбирали по две культуры на покровном стекле: одну окрашивали гематоксилином и эозином, другую экстрагировали глициновым буфером для последующего выявления агглютинации с эритроцитами морской свинки и человека 0 группы. В результате выделили 10 цитопатогенных агентов (ЦПА), из которых 4 были идентифицированы как энтеровирусы, 2 — как представители семейства *Reoviridae*, 3 — как аденовирусы, 1 — как представитель семейства *Parvoviridae*. Изучение выделенного парвовируса показало, что его гемагглютирующая активность не ингибируется антисыворотками к парвовирусу мышей, крыс, кошек и свиней, а тесты с 25 отрицательными и 25 положительными антисыворотками КРС к инактивированному антигену парвовируса КРС I типа подтвердили принадлежность выделенного ЦПА к этой группе парвовирусов. Более того, в РТГА из 500 проб, случайно отобранных в мясных стадах Северного Квинсленда, 70 % оказались положительными по парвовирусу КРС I типа в разведении 1:100 (17). G. Siegle (22), а также P.J.K. Durham и R.H. Johnson (18) на основании исследования физико-химических и культуральных свойств изолята BPV-267, выделенного в Австралии, также идентифицировали его как парвовирус КРС I типа.

В Австрии от трех латентно инфицированных клинически здоровых телят в возрасте 6-11 нед были получены 105 проб смывов и органов, из которых после инокуляции первично трипсинизированных культур клеток семенника теленка выделили 27 изолятов (из конъюнктивальных и носовых смывов — 6, из проб кала — 7, из респираторного тракта, кишечника, брыжеечных лимфоузлов, селезенки и почек — 14). Чаще всего удавалось выделить парвовирус КРС из желудочно-кишечного тракта. Обнаружение вируса в печени и селезенке интерпретировали как следствие вирусемического рассеивания (23, 24).

Изолят 214/72 как прототип, идентичный 27 выделенным, был подробно изучен. Цитопатическое действие (ЦПД) регистрировали по появлению гранулированных, круглых и овальных дегенерированных клеток



Рис. 2. Множественные внутриядерные тельца — включения парвовируса I типа различной формы через 72-96 ч после заражения первичной культуры клеток семенника телянка. Ядра клеток увеличены, матрикс в напряженном состоянии. Увеличение $\times 1500$, окрашивание гематоксилином и эозином (15).

и полному отслоению разрушенных клеток от стекла через 72-96 ч после заражения. Культура клеток семенника телянка оказалась вполне пригодной в качестве субстрата. Инфекционный титр составлял 6,5-8,0 lg ТЦД₅₀/0,1 мл (у референтного штамма Haden эти показатели находились в пределах 7,0-8,5 lg ТЦД₅₀/0,1 мл). При выращивании на стеклянных пластинках, которые фиксировали жидкостью Карнуа с окрашиванием гематоксилином и эозином, в клетках обнаруживались внутриядерные тельца-включения (рис. 2). Аналогичные включения выявляли при окрашивании акридиновым оранжевым. Биологические, биохимические и би-

физические свойства полученного изолята полностью соответствовали критериям, установленным для вирусов семейства *Parvoviridae*. В перекрестной РН он оказался идентичным референтному штамму Haden парвовируса КРС типа I (15).

В СССР парвовирус КРС (штамм В-2) впервые был выделен в 1972 году из носовой слизи больного телянка с респираторным синдромом (19). Вирус оказался устойчивым к воздействию эфира и хлороформа, к прогреванию при 56 и 60 °С в течение 30-60 мин. Проба с 5-йод-2-дезоксисуридином показала его принадлежность к ДНК-содержащим вирусам. Электронная микроскопия с негативным контрастированием выявляла вирионы парвовируса размером 24 ± 2 нм. Однако в перекрестных РН и РТГА обнаружилось, что В-2 не имеет антигенного родства с референтным штаммом Haden и в отличие от всех ранее выделенных парвовирусов КРС I типа не обладает гемагглютинирующими свойствами в нативном состоянии, на основании чего его отнесли к третьему серотипу (21, 25). В последующие годы интерес к парвовирусам как объектам исследования получил значительное развитие в работах других авторов (26-29).

Особенности внутриклеточной репродукции и культивирования парвовируса КРС I типа. Репликация ДНК и сборка парвовирусов происходит в клеточном ядре. Относительная простота их генома позволяет предположить, что значительная часть функций, необходимых для репликации, обеспечивает клетка-хозяин. В случаях автономных парвовирусов для синтеза их ДНК необходимо, чтобы зараженная клетка находилась в ранней S-фазе.

В течение первых 3 ч после заражения монослойной культуры клеток адсорбируется 90 % вируса. Эклипс-фаза длится 16 ч, после чего проявляется ЦПД, в том числе наблюдаются внутриядерные включения (30). Новый вирус в культуральной жидкости обнаруживается через 24 ч после инокуляции. Максимальный титр в ТЦД₅₀ равен $10^{-5,5}$ /мл. Количество выявляемых гемагглютининов изменяется пропорционально инфекционному титру вируса (31). Титр внеклеточного вируса в течение всего периода репродукции ниже титра внутриклеточного вируса (32).

Вирусный антиген в цитоплазме можно обнаружить методом флуо-

ресцирующих антител через 6 ч после заражения, через 48 ч происходит поражение ядра, к 72-му ч формируются внутриядерные тельца-включения, которые из эозинфильных в процессе развития (через 18-24 ч) превращаются в базофильные. Большая часть вирусов освобождается из клеток к началу проявления ЦПД. В культуре тестикулярных клеток КРС вирус достигает титра $10^{6,75}-10^{8,00}$ (15).

Парвовирус КРС типа I хорошо размножается в первичной культуре клеток легких, селезенки, тестикул, надпочечников и почек эмбрионов, для которых характерна высокая восприимчивость и активное клеточное деление (31, 33).

Для оптимальной репликации парвовируса КРС типа I используют первичные клеточные культуры, приготовленные из органов коровьего эмбриона с использованием 0,5 % раствора трипсина для обработки эмбриональной ткани. В качестве ростовой применяют среду Эрла со сбалансированным содержанием солей, 0,5 % лактоальбумина и эмбриональной сыворотки коров. После подсчета клеток в исходной суспензии ее разводят ростовой питательной средой до значений 150 000-250 000 кл/см³. Через 18-24 ч после посева и образования сплошного монослоя клеточную культуру однократно промывают фосфатным буфером Дульбекко (Dulbecco) с целью удаления сыворотки, вносят вирус, выдерживают 2 ч при 37 °С для его адсорбции, после чего клетки дважды промывают и добавляют поддерживающую среду. Размножение вируса сопровождается развитием цитопатических изменений (появление зернистости, округление и разрушение зараженных клеток), которые в зависимости от инокулируемой дозы и митотического показателя заражаемой культуры клеток развиваются через 3-5 сут после инфицирования (17).

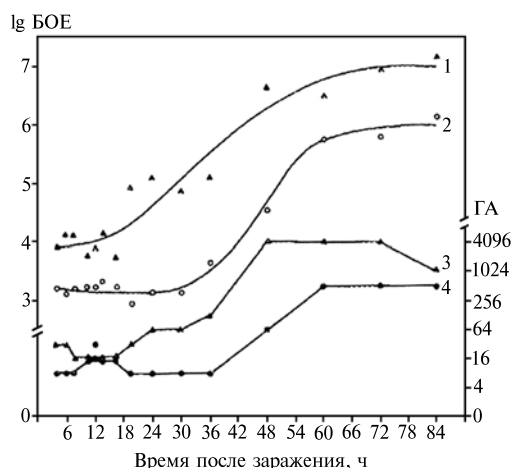


Рис. 3. Репликация (по числу бляшкообразующих единиц — БОЕ) в культуре клеток легкого эмбриона крупного рогатого скота и геммагглютинирующая активность (ГА) у парвовируса: 1 и 2 — соответственно внутри- и экстрацеллюлярный вирус, 3 и 4 — внутри- и экстрацеллюлярный геммагглютинин (31).

представляется важнейшим предварительным условием для успешного выделения парвовируса КРС I типа (15).

Уровень геммагглютининов, связанных с клетками, достигает максимального титра (1:4096) через 48 ч. В экстрацеллюлярной среде геммагглютинины обнаруживаются через 36 ч, максимальные показатели (1:512)

Для разных типов клеток высокая геммагглютинирующая активность и инфекционность регистрируется в культуральной жидкости после каждого пассажа. Высокие титры получают при репликации парвовируса I типа в первичных культурах клеток легкого, почек, селезенки, тестикул и надпочечников эмбриона КРС. Установлено, что после трех пассажей наибольшее накопление вируса в клетках легкого наступает обычно через 72 ч после инокуляции ($10^{6,2}-10^{6,8}$ ТЦД₅₀/мл). К 20-24-му ч зараженные клетки увеличиваются в размере, приобретают звездчатую форму, спустя 72 ч равномерно округляются и отделяются от стекла. Использование эмбриональной сыворотки коров, свободной от антител, пред-

регистрируют к 60-84 ч после заражения. Следовательно, титр вируса, связанного с клетками, выше, чем титр экстрацеллюлярного вируса (рис. 3).

Сравнительное испытание первичных культур клеток почек и семенника телят, взятых соответственно в возрасте 1-3 и 3-6 сут, показало (30), что использованный в этих опытах штамм Haden удается пассировать 3-5 раз. Размножение вируса контролировали по ЦПД и титру гемагглютининов в культуральной жидкости. Эти же авторы обнаружили, что парвовирус КРС I типа размножается в первичной и вторичной культуре клеток новорожденных телят. Цитопатический эффект, который наступает не ранее 72-го ч, проявляется грануляцией монослоя и округлением клеток. При 3-м пассаже титр гемагглютининов достигал соответственно 1:2048 и 1:1024. При использовании первичных и вторичных клеток семенника теленка вирус размножается только на первом пассаже (34).

Однако G.J. Spahn с соавт. (35), R.C. Bates с соавт. (31) и F.V. Johnson с соавт. (36) подчеркивают, что первичные культуры эмбриональных клеток легкого, почек, селезенки, семенников и надпочечников более восприимчивы к парвовирусу КРС I типа и позволяют получить наиболее высокие титры вируса в РГА (табл. 2).

2. Репликация и гемагглютигирующая активность (ГА) парвовируса I типа при пассировании в эмбриональных и перевиваемых культурах клеток крупного рогатого скота (31)

Культура эмбриональных клеток	ГА-титр по пассажам			Перевиваемая линия	ГА-титр по пассажам		
	1-й	2-й	3-й		1-й	2-й	3-й
Легкие	512	512	2048	FB4BM	256	32	4
Почки	512	256	128	MDBK	32	< 2	< 2
Тестикулы	2048	512	128	Vero	< 2	< 2	< 2
Селезенка	256	1024	512	L	< 2	< 2	< 2
Кишечник	4096	4096	512	HeLa	< 2	< 2	< 2
Надпочечник	4096	128	4096	BHK	< 2	< 2	< 2

Во многих работах также показано, что парвовирус КРС I типа не размножается в перевиваемых клеточных линиях КРС, обезьян, мышей, хомяков и человека. В первичных культурах клеток эмбрионов кур и морских свинок наблюдают abortивную инфекцию с постоянной потерей инфекционности (15, 31, 32, 37, 38).

Спектр патогенности парвовируса КРС I типа. Парвовирусы обладают уникальными биологическими свойствами: они способны селективно реплицироваться в делящихся клетках костного мозга, кишечника и эмбрионов млекопитающих. Поэтому органы пищеварения вследствие постоянного обновления клеток слизистой играют ведущую роль в репродукции вируса. Клинически парвовирусная инфекция проявляется в основном в виде поражения пищеварительных органов (18, 22, 23, 31, 35). Неслучайно штамм Haden впервые был выделен именно из фекалий больных телят с симптомокомплексом диареи (8). Экспериментальное пероральное и внутривенное заражение телят, лишенных молозива и необходимых антител, через 24-48 ч приводило к развитию диареи. Более выраженные клинические признаки отмечают у телят, инфицированных внутривенно. Специфический антиген обнаруживают в клетках многих органов, но наиболее часто — в эпителиальных клетках тощей, подвздошной, слепой кишки и в лейкоцитах крови. Исходный вирус выделялся от зараженных телят в период с 24-48 ч до 11 сут после заражения. Вирус изолировали из лейкоцитарной фракции крови через 2 сут после инфицирования, иногда — из эритроцитов. После перорального поступления вируса его регулярно обнаруживали в лимфоузлах, селезенке и тимусе, он накапливался в высоких титрах в клетках надпочечников и был изолирован из легких, по-

чек, тестикул и яичников, сердечной мышцы, спинномозговой жидкости и мозга. При внутривенном заражении вирус выделяли из всех органов (самые высокие титры — в лимфатической ткани и надпочечниках) (20, 21, 23).

Наблюдаемая взаимосвязь между парвовирусной инфекцией и патологией репродуктивных органов у разных видов животных (наряду с обнаружением антител против парвовируса КРС I типа в коммерческой эмбриональной сыворотке) (22) стала стимулом для изучения роли парвовируса КРС I типа как этиологического фактора при эмбриональной патологии (24). Экспериментальное заражение коров в разные периоды стельности показало, что вирус проникает через плацентарный барьер и обуславливает аборт и эмбриональную смертность. При введении вируса на 3-4-м мес стельности внутривенно или на 5-6-м мес в амнион коровы абортывали соответственно через 3 и 5 нед (9, 39). Вирус обнаруживали в тимусе, легких и селезенке мумифицированных плодов, а в организме коров он длительно персистировал (39, 40).

После внутривенного введения парвовируса КРС I типа коровам во время 1-го, 2-го и 3-го периодов стельности инфицировались эмбрионы и плацента. Некоторые эмбрионы были абортываны в 1-й и в начале 2-го периода стельности, другие удалены с применением кесарева сечения через 5-60 сут после заражения. При гистологическом изучении обнаружили внутриядерные тельца-включения в паренхиме печени и в эпителиальных клетках кишечника у 4 эмбрионов, зараженных во 2-й период и удаленных через 5-10 сут после заражения. Такие же включения и множественные локальные некрозы обнаруживали в корковом слое надпочечников и в наружном зародышевом слое мозжечка. Плоды, зараженные в 3-й период, родились живыми, но их органы, исследованные через 20 сут после заражения, содержали вирус. Эмбрионы, возраст которых при заражении составил 93 сут и более, через 10 сут продуцировали антитела, ингибирующие гемагглютинацию, что соответствовало появлению IgM и IgG (24, 37, 38).

В опыте Н.Д. Liggitt с соавт. (41) парвовирус (10^8 БОЕ в 5 мл) вводили с помощью лапаротомии 130-суточным плодам и исследовали их через 5, 10, 20, 40 и 60 сут после заражения. Между 5-ми и 10-ми сут наблюдали увеличение числа Е-розеткообразующих лимфоцитов, повышение количества IgM в сыворотке крови (максимум — на 20-е сут после заражения), заметное и постепенное увеличение количества IgG и незначительное — IgG₂. Вируснейтрализующие антитела выявлялись на 10-е сут (1:128) и к 60-м сут достигали значительного титра (1:2048). Лимфоидная гиперплазия наиболее отчетливо проявлялась в лимфоузлах, расположенных вблизи от места выделения вируса. Парвовирус обнаруживали в плодах в течение всего периода исследования.

Распространенность парвовирусной инфекции КРС среди поголовья молочного скота. Сведения, накопленные в основном за рубежом, показывают, что парвовирусная инфекция КРС широко распространена во многих странах — в США (12, 35), Японии (16), Великобритании (14), Австрии (15), Германии (34), Канаде (42), Австралии (17, 33) и др. После первых сообщений о выделении парвовируса КРС в 1959 году появились данные, указывающие на повсеместное выявление в сыворотке крови животных антител к парвовирусу I типа (22). В частности, F.R. Abinanti с соавт. (8), а также G.J. Spahn с соавт. (35) показали, что в штате Мериленд (США) в трех стадах у 86 % взрослого поголовья КРС в сыворотке крови в РТГА обнаруживаются антитела к парвовирусу КРС в титрах 1:20 и выше. На западе США в 29 из 35 стад, в которых регистрировали аборт среди маточного поголовья или диарею новорожден-

ных телят, серологическое обследование выявило антитела к указанному парвовирусу. Доля серопозитивных животных при этом варьировала от 14 до 100 % (23). Обследование 177 коров из 12 молочных стад в Южной Каролине подтвердило парвовирусную инфекцию во всех стадах. При этом у 56,7 % коров титры антител составили 1:16 и выше (43). В Великобритании в 6 стадах из 10 в 46 % случаев была установлена серопозитивность (14). В Северном Квинсленде (Австралия) из 500 взрослых особей (выборка из 7 стад) у 70 % имелись антитела к парвовирусу КРС I типа (17). В северо-восточной Италии при исследовании 101 пробы сывороток крови животных из 350 стад на наличие парвовирусной инфекции КРС у 98 % в РТГА регистрировали положительный результат (44, 45). Аналогичные данные были получены в пробах сывороток крови КРС в Алжире: у 70 % животных подтвердилось наличие антител к парвовирусу КРС I типа (13).

Исследование сывороток крови у группы телят отъемного возраста с респираторным симптомокомплексом показало наличие смешанной инфекции (парвовирус и вирус ПГ-3) (37). При оценке степени распространения этой инфекции среди поголовья молочного скота серопозитивность считалась статистически достоверной, если положительный результат получали для разведений 1:32 и выше. Антитела к парвовирусу КРС I типа могут присутствовать в эмбриональной сыворотке КРС, используемой для выращивания клеточных культур. Это обстоятельство указывает на активную реакцию организма коров на внутриматочную инфекцию (12).

В России многие годы недооценивалась роль парвовирусной инфекции в патологии крупного рогатого скота, что сдерживало разработку средств лабораторной диагностики и специфической профилактики. Нами предложена тест-система на основе ИФА для выявления антител к парвовирусу КРС I типа в одном разведении (1:400) и количественного определения антител в четырех разведениях (1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400) в сыворотке крови инфицированных, переболевших и вакцинированных животных. Соответствие диагностических параметров и показателей качества этой тест-системы требованиям международных стандартов (46-47) подтверждены испытанием в лабораторных и производственных условиях (48).

Сероиммунологический мониторинг, проведенный нами в девяти регионах Среднего Поволжья, в которых проявлялись клинические признаки поражения желудочно-кишечного тракта и респираторных инфекций у телят, а также имела место патология репродуктивных органов у маточного поголовья, показал, что методом ИФА специфические антитела к парвовирусу выявляются во всех обследованных регионах у 26,6-58,4 % особей. Антитела в диагностически достоверных титрах обнаруживались как у глубокостельных коров и нетелей, так и у телят с 10-х сут жизни. Более высокий процент положительно реагирующих животных наблюдали в хозяйствах, где размещался импортный скот. Полученные результаты указывают на факты циркуляции в регионе парвовируса КРС I типа среди разных возрастных групп.

Одновременное выявление в тестируемых образцах сывороток крови сероконверсии к антигенам парвовируса КРС I типа, вируса ПГ-3 (77,8 %), вируса герпеса I типа (47,3 %) и реовируса I типа (24,7 %) у больных и переболевших животных позволяет утверждать, что парвовирус I типа участвует в формировании смешанных респираторно-кишечных инфекций у молодняка и нарушениях функций репродуктивных органов у взрослого поголовья КРС.

В настоящее время отечественных аналогов вакцин, изготовленных на основе антигенов парвовируса I типа и реовируса I типа КРС, не существует, в связи с чем нами сконструирована ассоциированная вакцина,

обеспечивающая специфическую защиту плода, новорожденных телят, молодняка в период дорастивания и откорма, а также стельных коров и телок от инфицирования эпизоотическими (полевыми) штаммами парво-, рео-, герпесвирусов I типа и возбудителя вирусной диареи, циркулирующих на территории РФ (49). Разработанная ассоциированная вакцина содержит антиген парвовируса I типа КРС (штамм Parvo-32459), по комплексу вирусных антигенных компонентов существенно отличается от производимых отечественных средств профилактики широким спектром специфического действия, не имеет аналогов в России, патентоспособна (50).

Таким образом, представление о биологических свойствах, степени распространения и потенциале парвовируса крупного рогатого скота (КРС) I типа в этиопатогенезе респираторно-кишечных инфекций у молодняка и нарушениях функций репродуктивных органов у взрослого поголовья можно считать сложившимся. Для этого вируса характерно латентное носительство преимущественно у взрослых животных. В клетках эмбриона/плода он активно размножается, вызывая различные нарушения беременности, ведущие к рассасыванию, отмиранию, мумификации и выкидышам. Описанные методические подходы могут служить ориентиром для выработки рекомендаций по диагностике этой малоизвестной нозоодиницы. Наиболее высокие титры (по инфекционности и гемагглютинирующей активности) достигаются при репликации парвовируса КРС I типа в первичных культурах эмбриональных клеток легкого, почек, тестикул и надпочечников. Процент серопозитивных животных в разных стадах варьирует от 14 до 100 %, при этом антитела к парвовирусу КРС I типа выявляются повсеместно. С использованием разработанной нами тест-системы и общепринятых методов серодиагностики нами впервые получены данные о распространении парвовируса КРС в хозяйствах Среднего Поволжья, указывающие на его циркуляцию среди разновозрастных групп скота.

*ФГБУ Федеральный центр токсикологической,
радиационной и биологической безопасности,
420075 Россия, г. Казань, Научный городок, 2,
e-mail: vnivi@mail.ru, marina-2004r@mail.ru*

*Поступила в редакцию
1 октября 2012 года*

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2013, № 6, pp. 16-26

BIOLOGICAL PROPERTIES OF BOVINE PARVOVIRUS AND ITS ROLE IN CATTLE PATHOLOGY (review)

Kh.Z. Gaffarov, M.A. Efimova

*Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, 2, Nauchnyi Gorodok, Kazan, 420075 Russia,
e-mail: vnivi@mail.ru, marina-2004r@mail.ru*

Received October 1, 2012

doi: 10.15389/agrobio.2013.6.16eng

Abstract

Basing on analysis of extensive investigations in many countries, the properties and prevalence of bovine parvovirus are described. The isolates of bovine parvovirus I from the United States, Europe, North America, Africa, and Australia are identical on antigenic properties, but differ from other animal and human parvoviruses. Japanese isolates which differ from bovine parvovirus I on antigenic patterns are referred to the bovine parvovirus II. Bovine parvovirus can agglutinate the human and Guinea pig red cells. This is a DNA-containing virus with the virion size of 23 nm. Virus replication and the assembling occur in the cell nucleus. The highest titers ($10^{6.75}$ - $10^{8.00}$ TCID₅₀/ml) are produced by parvovirus I cultivation in primary cell cultures of lung, kidney, spleen, testis and adrenals from cattle embryos. To isolate parvovirus I, the cattle fetal serum free of specific antibodies must be used. Oral or intravenous infection of the newborn calves or the calves who were not fed with colostrum results in the diarrhea syndrome within 24-48 hours. The virus is commonly found in the intestines, blood leukocytes, lymph nodes, spleen, thymus and in the adrenal cells. In cows it persists for a long time and penetrates through the placental barrier causing abortions and embryo mortality. The virus was found in the thymus, lungs and spleen of mummified fetuses. The rate of

seropositive animals in different herds in the UK, Australia, Germany, Austria, Italy, Algeria, etc. varies from 14 to 100 %. According to our data, 26.6 to 58.4 % of pregnant cows and calves from nine regions of the Middle Volga are positive on antibodies to parvovirus in ELISA. This percentage was higher in the herds with imported cattle. Parvovirus is involved in mixed respiratory and intestinal infections in calves and the reproduction abnormalities in adult cattle. To control the infections caused by bovine parvovirus in the national cattle husbandry, the enzyme immunoassay (EIA) diagnostic kit and the inactivated associated vaccine with a wide range of specific activity have been developed. The patented EIA test meets the international standards, and the vaccine is also patentable.

Keywords: parvovirus type I, cattle, ELISA, vaccine.

REFERENCES

1. Gaffarov Kh.Z., Gumerov V.G., Efimova M.A., Yarullin A.I., Akhmetsafin R.R. *Materialy Mezhdunarodnoi konferentsii «Aktual'nye problemy zdorov'ya skota, zavozimogo v Rossiyu v ramkakh natsional'nogo proekta "Razvitie APK"»* [Russian national project «Development of agro-industrial complex»: Actual problems of imported cattle health (Proc. Int. Conf.)]. Kazan', 2007: 11-15.
2. Pechura E.V., Petrova O.G., Rubinskii I.A. *Bio*, 2007, 3: 45-48.
3. Glotov A.G., Krasnov V.V., Glotova T.I., Shkil' N.A. *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki*, 2010, 4: 76-81.
4. Gaffarov Kh.Z. *Veterinariya*, 1983, 4: 73-76.
5. Efimova M.A., Yarullin A.I., Gaffarov Kh.Z., Gil'mutdinov R.Ya., Khismatullina N.A. *Trudy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 50-letiyu VNIIViM «Problemy profilaktiki i bor'by s osoboopasnymi infektsionnymi boleznyami zhivotnykh»* [Prophylaxis and control of specially dangerous animal diseases (Proc. Int. Conf., dedicated to 50th Anniversary of All-Russian Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology of Russian Academy of Agricultural Science)]. Pokrov, 2008: 132-134.
6. Kochetkov S.A., Prokhvatilova L.B., Mishchenko V.A. *Materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii molodykh uchenykh «Aktual'nye problemy veterinarnoi meditsiny»* [Actual problems in veterinary medicine (Proc. Int. Conf.)]. Pokrov, 2009: 102-106.
7. Gaffarov Kh.Z., Ivanov A.V., Efimova M.A., Yarullin I.A., Dupleva L.Sh. *Veterinariya*, 2012, 11: 25-28.
8. Abinanti F.R., Warfield M.S. Recovery of a hemadsorbing virus (HADEN) from the gastrointestinal tract of calves. *J. Virology*, 1961, 14: 288-289.
9. Bachman P.A. Properties of a bovine parvovirus. *Zbl. Vet. Med.*, 1971: 80-85.
10. Woode G.N., Bridger I.C. Viral enteritis of calves. *Vet. Record.*, 1975, 96: 85-88.
11. Storz J., Warren G.S. Effect of antimetabolites and actinomycin D on the replication of HADEN, a bovine parvovirus. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, 1970, 30: 271-274.
12. Storz J., Bates R.C., Warren G.S., Howard T.H. Distribution of antibodies against bovine parvovirus 1 in cattle and other animal species. *Am. J. Vet. Res.*, 1972, 33: 269-272.
13. Vincent J. Isolement in Algerie de quatre souches de parvovirus bovis. *J. Vincent, Ann. Inst Pasteur*, 1971, 121: 811-814.
14. Huck R.A., Woods D.W., Orr J.P. Isolation of a bovine parvovirus in the United Kingdom. *J. Vet. Rec.*, 1975, 96: 155-156.
15. Von Bosiljka H., Messner A., Bärki F. Bovine Parvoviren — Isolation in Zellkulturen, Zytologie und Kulturausbeute. *Wien. tierärztl. Mschr.*, 66, Helt 12, 1979: 359-364.
16. Inaba Y., Kurogi H., Takahashi E. et al. Isolation and properties of bovine parvovirus type 1 from Japanese calves. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 1973, 42: 54-66.
17. Wosu L.O., Johnson R.H., Goodchild I., Bachman P. Isolation of bovine parvovirus type I in Australia. *J. Aust. Vet.*, 1979, 55: 199-200.
18. Durham P.J.K., Johnson R.H., Parker R.J. Exacerbation of experimental parvoviral enteritis in calves by coccidia and weaning stress. *J. Res. Vet. Sci.*, 1985, 39(1): 16-23.
19. Zudilina Z.F., Mikhailov P.N., Zhidkov S.A. *Aktual'nye voprosy veterinarnoi virusologii* [Actual problems of veterinary virology]. Vladimir, 1976.
20. Bates R.C., Storz J., Reed D.E. Isolation and comparison of bovine parvoviruses. *J. Infect. Dis.*, 1972, 126(5): 531-536.
21. Kryukov N.N., Tret'yakova I.A., Zudilina Z.F., Vecherkin A.S., Sologub V.K., Lobutsova D.V. *Veterinariya*, 1988, 7: 27-29.
22. Siegle G. *Theparvoviruses*. Virology Monographs. N.Y., Springer-Verlag, 1976, V. 15: 235-243.
23. Storz J., Bates R.C. Parvovirus infection in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1973, 163: 884-886.
24. Storz J., Young S., Carroll E.J., Bates R.C., Bowen R.A., Keney D.A. Parvovirus infection of the bovine fetus: Distribution of infection, antibody response, and age-related susceptibility. *Am. J. Vet. Res.*, 1978, 39: 1099-1102.
25. Shcherbakova T.B. *Immunofermentnaya diagnostika parvovirusnoi infektsii krupnogo rogatogo skota. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii* [ELISA diagnostics of cattle parvovirus (PhD Thesis)]. Moscow, 1993.

26. Yurov K.P., Tret'yakova I.A., Vecherkin A.S. *Veterinariya*, 1994, 5: 26-27.
27. Mishchenko V.A., Yaremenko N.A., Gusev A.A., Zakharov V.M., Getmanskii O.I., Okulova O.N., Ruchnov Yu.E., Ponamarev A.P., Pavlov D.K. *Veterinariya*, 2000, 5: 19-21.
28. Gaffarov Kh.Z., Ivanov A.V., Nepoklonov E.A., Ravilov A.Z. *Mono- i smeshannyye infektsionnyye diarei novorozhdennykh telyat i porosyat* [Diarrhea mono- and polyinfections in newborn calves and piglets]. Kazan', 2002.
29. Samuilenko A.Ya., Solov'eva B.V., Nepoklonov E.A. et al. *Infektsionnaya patologiya zhyvotnykh* [Animal infectious pathology]. Moscow, 2006.
30. Leary I.I., Storz J. Kinetics of parvovirus replication, cytopathic effects and mitotic arrest in synchronized bovine fetal spleen cells. *Experimentelle und Molekulare Pathologie*, 1982, 37(2): 272-286.
31. Bates R.C., Storz J. Host cell range and growth characteristics of bovine parvoviruses. *J. Infect. Immun.*, 1973, 7: 398-402.
32. Hayder H.A., Storz J., Yougn S. Antigenicity of bovine parvovirus in fetal infections. *Am. J. Vet. Res.*, 1983, 44: 558-563.
33. Durham P.J.K., Johnson R.H. Studies on the replication of a bovine parvovirus. *J. Vet. Microbiol.*, 1985, 10(2): 165-177.
34. Elschner M. Untersuchungen zur Diagnostik von bovinen Parvoviren in Kotproben von Kalbern. *Berl. u. munch. tierarztl. Wschr.*, 1994, Jg. 108, H. 7: 256-260.
35. Spahn G.J., Mohanty S.B., Hetrick F.M. Characteristics of hemadsorbing enteric (HADEN) virus. *Canad. J. Microbiol.*, 1966, 12: 653-660.
36. Johnson F.B., Hoggan M.D. Structural proteins of HADEN virus. *J. Virol.*, 1973, 51: 129-137.
37. Gunenkov A.V., Khalenev G.A., Syurin V.N. *Itogi nauki i tekhniki, seriya Zhyvotnovodstvo i veterinariya* [Results of science and technology. Animal husbandry and veterinary medicine] Moscow, 1975, t. 8: 108-111.
38. Orlyankin B.G., Sergeev V.A., Kachanova S.P. *Parvovirusnyye infektsii i ikh vliyanie na produktivnost' zhyvotnykh (Obzornaya informatsiya)* [Parvovirus infections and their effect on animal productivity]. Moscow, 1985.
39. Bodine A.B., Alberty C.F., Buck C.S., Richardson M.E., Wright R.E. Possible «immuno-protection» of the bovine parvovirus in the uterus: Preliminary communication. *J. Possible Theriogenology*, 1981, 16: 201-206.
40. Durham P.J.K., Lax M.A., Johnson R.H. Pathological and virological studies of experimental parvoviral enteritis in calves. *J. Research in Veterinary Science*, 1985, 38: 209-219.
41. Liggitt H.D., DeMartini J.C., Pearson L.D. Immunologic responses of the bovine fetus to parvovirus infection. *Am. J. Vet. Res.*, 1982, 43: 1355-1359.
42. Sandals W.C.D., Charles Povey R., Meek A.H. Prevalence of bovine parvovirus infection in Ontario dairy cattle. *Can. J. Vet. Res.*, 1995, 59: 81-86.
43. Barnes M.A., Wright R.E., Bodine A.B., Alberty C.F. Frequency of bluetongue and bovine parvovirus infection in cattle in South Carolina dairy herds. *Am. J. Vet. Res.*, 1982, 43: 1078-1080.
44. Cancellotti F.M., Gagliardi G., Dalvit P., Turilli C. The most important infectious diseases of the bovine genital tract. Prevalence and incidence in north-eastern Italy. *Proc. 11th Conference of the Office International des Epizooties, Regional Commission for Europe*. Vienna, 1984: 231-241.
45. Sandals W.C.D. *Prevalence and seroepidemiology of bovine parvovirus*. MSc Thesis, University of Guelph, 1989: 432-437.
46. Gaffarov Kh.Z., Efimova M.A., Ivanov A.V., Dupleva L.Sh., Yarullin A.I. *Test-sistema IFA dlya serologicheskoi diagnostiki parvovirusnoi infektsii krupnogo rogatogo skota i opredeleniya urovnya postvaksinal'nykh antitel*. Pat. RF № 2461008. Zayavl. № 2010136226. Opubl. 10.09.12. *Byul. № 25*. [ELISA test for serological diagnostics of cattle parvovirus infection and estimation of antibodies after vaccination (Patent RF № 2461008. Application № 2010136226. Published 10.09.12. Bulletin № 25)]
47. *Svidetel'stvo o gosudarstvennoi registratsii lekarstvennogo sredstva dlya zhyvotnykh*. Reg. № PVR-1-6.0/02620 ot 30.08.10. [Certificate of state registration of animal remedy № PVR-1-6.0/02620 dated 30.08.10]
48. Efimova M.A., Ivanov A.V., Gaffarov Kh.Z., Yarullin A.I. *Doklady RASKHN*, 2012, 2: 48-51.
49. Gaffarov Kh.Z., Ivanov A.V., Efimova M.A., Dupleva L.Sh., Yarullin A.I. *Veterinariya*, 2012, 6: 22-26.
50. Gaffarov Kh.Z., Ivanov A.V., Efimova M.A., Dupleva L.Sh., Yarullin A.I. *Vaksina assotsirovannaya protiv parvovirusnoi, reovirusnoi, gerpessvirusnoi tipa I infektsii i virusnoi diarei — bolezni slizistykh obolochek krupnogo rogatogo skota inaktivirovannaya emul'sionnaya*. Pat. RF № 2452512. Zayavl. № 2010120755. Opubl. 10.06.12. *Byul. № 16*. [Associated vaccine against parvovirus, reovirus, herpesvirus type I infections and viral diarrhea, a disease of mucosae in cattle (inactivated emulsion) (Patent RF № 2452512. Application № 2010120755. Published 10.06.12. Bulletin № 16)].