

Экспериментальная инфекция губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота у коз Experimental infection of spongiform encephalopathy cattle in goats



Надточей Г.А.

г. Москва

Ключевые слова: губкообразная энцефалопатия коров, прион, козы, иммуногистохимия

Key words: BSE, prion, goats, immunohistochemistry

Резюме. На козах белой русской породы и двух козлятах, родившихся от зараженных возбудителем BSE матерей, изучены клинические симптомы, патогистологические изменения и отложение прионного белка в ЦНС, выявляемые иммуногистохимическим методом. Клинические симптомы и характер патогистологических изменений в ЦНС у коз при экспериментальной инфекции BSE практически не отличаются от таковых при скрепи. Инфицированные животные могут погибать внезапно без проявления клинических признаков заболевания. Молодняк, родившийся от коз в инкубационном периоде инфекции BSE, находясь при матери в подсосный период, инфицируются возбудителем.

Summary. Clinical symptoms and histopathological changes were studied in goats of the white Russian breed and in two kids from experimentally BSE infected goats. The immunohistochemical method was used to detect depositions of prion protein in CNS tissues. The clinical symptoms and the

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-6-2

УДК 619:616.988:636.22

Надточей Г.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной цитопатологии и электронной микроскопии, g_a_nadtochei@mail.ru

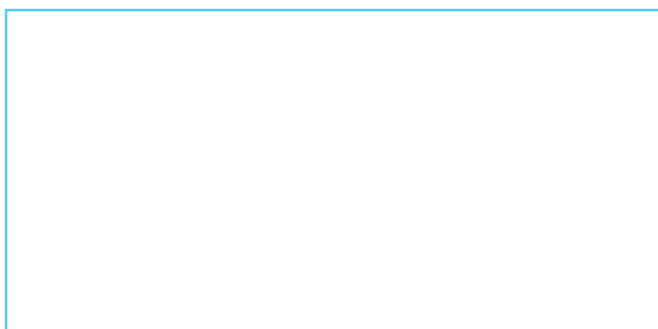
Вангели С.В., к.в.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитопатологии и электронной микроскопии, sergeyvangel@mail.ru

Стаффорд В.В., старший научный сотрудник сектора патоморфологии

Вьюшинский П.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитопатологии и электронной микроскопии

ФГБНУФНЦ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, г.Москва

Nadtochei G.A., Vangeli S.V., Stafford V.V., Viushinskiy P.A.



histopathological changes in CNS of the goats with experimental BSE infection were nearly the same as in goats with scrapie. Infected animals can die suddenly without manifesting clinical signs of the disease. Suckling kids from goats in the incubation period of BSE infection can be infected with the pathogen, as those in reported cases of scrapie.

Введение

Прионные болезни установлены у многих видов животных. Наибольшую известность из них получила губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота (BSE), т.к. имеет беспрецедентные социальные и экономические последствия. Прион BSE с кормом в виде мясо-костной муки был распространен из Англии практически во все страны Европы и многие страны других континентов вызвав широко распространенную эпизоотию болезни коров. С продуктами животного происхождения возбудитель BSE попал в пищевую цепь человека, вызвав смертельное заболевание людей, получившее название вариант болезни Крейтцфельда-Якоба (vCJD) [1]. Сообщение об этом заболевании привело к обвалу мясного рынка на международном уровне и изменению государственной политики в отношении говядины, ограничениям в использование сырья животного происхождения в медицинских целях и вызвало распространенный страх в обществе, что любой может быть заражен. Огромные экономические усилия, направленные на борьбу с этим заболеванием крупного рогатого скота, привели к положительным результатам. По данным МЭБ [2] в 2016 г. Только две страны (Франция и Испания) сообщили о регистрации по одному случаю болезни, в 2017 г. сообщений о болезни ни из одной страны не поступало.

Среди мер, ограничивших распространение возбудителя BSE, был запрет на использование белка жвачных животных в корм. Однако мясо-костную муку, загрязненную возбудителем BSE, использовали в прошлом в корм овцам и козам, особенно молочным козам, поэтому возможное распространение BSE и поддержание резервуара источника возбудителя через мелких жвачных рассматривается в настоящее время как основная угроза. Естественных случаев BSE у овец не описано, тогда как о BSE у коз сообщалось из Франции [3] и Великобритании [4,5].

Настоящее время в странах Евросоюза проводится широкий надзор за трансмиссивными энцефалопатиями овец и коз, чтобы определить распространенность возникшего BSE у мелких жвачных [3].

В восьмидесятые годы прошлого столетия в нашу страну ввозили племенной мелкий рогатый скот из многих стран Европы, в которых использовали в корм жвачным животным загрязненную патогенным прионом коров импортную из Англии мясокостную муку, и в которых затем была зарегистрирована BSE. Племенной мелкий рогатый скот ввозится и в настоящее время, так за последние 10 лет из стран, ранее неблагополучных по BSE, ввезено 4344 головы племенных овец и коз. Чувствительность коз к возбудителю BSE в экспериментальных условиях при введении возбудителя различными путями подтверждены многими исследованиями [5,12]. В данной работе продолжено изучение клинических симптомов и патогистологических изменений в ЦНС коз, при их инфицировании различными путями.

Материалы и методы

Подопытные животные.

В работе использовали коз белой русской породы в возрасте 3–4 месяца и новорожденных коз, родившихся от зараженных коз в процессе опыта. Двух коз заразили внутривенно, шесть животных алиментарно. Две козы были незараженными в качестве контроля. Все животные содержались попарно в отдельных изолированных боксах. Условия содержания и кормления соответствовали нормам, принятым для этого вида животных.

Материал для заражения

Для заражения использовали 10% гомогенат головного мозга больной BSE коровы. Возбудитель BSE получен из Великобритании в 1990 г и прошел два пассажа на телятах в лаборатории. Гомогенат готовили на питательной среде 199. Для внутривенного заражения суспензию осветляли центрифугированием и использовали надосадочную жидкость в объеме 5 мл. Для алиментарного заражения использовали 1,5 г головного мозга на животное, которые, в конечном счете, разводили в 150 мл среды 199 не осветляя гомогенат вводили животным через зонд. Клиническую оценку состояния животных делали ежедневно сотрудники ухаживающие за животными и научный сотрудник.

Патологоанатомическое обследование животных проводили после естественной смерти животных. Для исследования брали головной мозг, шейный, грудной и поясничные отделы спинного мозга, миндалины, лимфатические узлы, образцы селезенки, внутренних органов и мышц. Материал делили на части. Одну часть образцов тканей

Таблица 1. Характеристика подопытных животных и течение опыта

Экспериментальное животное	Способ заражения	Инкубационный период	Срок падежа	Наличие вакуолей в гол.мозге	Результат иммуногистохимии
Коза №1	в/в	572 дня после заражения	604 дня после заражения	+	+ / -
Козел №2	в/в	732 дня после заражения	802 дня после заражения	+	+ / -
Коза №3	Алиментарно	1556 дня после заражения	1583 дня после заражения	+	+
Коза №4	Алиментарно	Пала внезапно	1590 дня после заражения	+	+
Коза №6	Алиментарно	480 дня после заражения	496 дня после заражения	+	+
Коза №7	Алиментарно	Пала внезапно	510 дня после заражения	+	+
Козел №8	Алиментарно	525 дня после заражения	547 дня после заражения	+	+
Коза №9	Алиментарно	750 дня после заражения	935 дня после заражения	+	+

Таблица 2. Течение болезни у новорожденных животных от инфицированных матерей

Экспериментальное животное	Способ заражения	Инкубационный период	Срок падежа	Наличие вакуолей в гол.мозге	Результат иммуногистохимии
Коза №5	Родилась от козы №1, через 92 дня после заражения и содержалась с матерью 2 мес.	913 дней после рождения	941 дней после рождения	+	+
Коза №10	Родилась от козы №9, через 143 дня после заражения и содержалась с матерью 2 мес.	875 дней после рождения	911 дней после рождения	+	+

фиксировали в 10% растворе формалина в физрастворе для гистологического и иммуногистохимического исследования, вторую часть замораживали и хранили при -70 и -80 °С.

Для гистологического исследования материала заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5 микрон и окрашивали гематоксилином и эозином общепринятыми методами.

Для иммуногистохимического исследования срезы получали на стеклах Superfrost Plus и работу проводили по методу, данному Oliver Andreoletti [13], за исключением того, что в качестве первичных антител использовали моноклональные антитела 8H4 (Sigma, кат. № P0110), вторичные антитела к иммуноглобулину мышей, меченные авидином и конюгат стрептовидин-пероксидаза. В качестве субстрата использовали диаминобензидинтетрахлорид фирмы ООО "ХЕМА".

Результаты исследований и их обсуждение

Инкубационный период сильно колебался при обоих способах заражения (таблица №1), хотя, если исключить животных №3 и №4, он является относительно близким и колебался от 480 до 750 дней. Животные №3 и №4 были сестрами одного помета и одна из них проявила длительный инкубационный период, вторая без видимых признаков заболевания внезапно пала, однако они погибли почти одновременно. У животных родившихся от зараженных матерей и содержащихся с матерями два месяца инкубационный период был практически одинаковым около 2,5 месяца (таблица №2).

Две козы (№4 и №7) погибли внезапно без проявления заметных клинических признаков заболевания, хотя срок их выживания различался в три раза. У остальных животных первые признаки отклонения от нормы заключались в повышенной настороженности к персоналу. Постепенно у трех коз стало проявляться угнетение, вялость, развивалась дрожь мышц шеи и лопаток, дрожь головы, иногда непроизвольное вскидывание головы вверх, животные в спокойном состоянии стояли опустив голову. У одной козы проявлялось необычное запрокидывание головы с поворотом шеи вбок, обычно с правой стороны на лево. Два животных часто залеживались, плохо поедали корм и постепенно теряли в весе. У двух коз проявлялся скрежет зубами. Нарушение координации движения обычно развивалось быстро концу периода выживания. В целом клинические признаки болез-

ни были практически аналогичны клинической картине скрепи. При гистологическом исследовании срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, выявлялась вакуолизация тканей головного мозга в той или иной степени во всех его отделах. Наиболее выраженной она была в мозжечке, таламусе (Рис. 1), менее в боковых отделах коры мозга.

Для иммуногистохимического исследования срезы после обработки 98%-муравьиной кислотой и термической обработке автоклавированием при 2,2 атм, обработанные мышиными моноклональными антителами 8H4, реагирующими с козими PrPsc, выявляли отложение коричневого осадка (депозиты белка PrPsc) в виде грубых частиц (Рис.2,2а) или тонкого пылевидного осадка (Рис.3) экстранейронально. У животного №4 кроме того в таламусе выявлены были отложения грубого осадка в виде бляшек.

Обсуждение

Наши опыты выявили сильное колебание инкубационного периода у коз независимо от способа заражения животных. Это, видимо, можно объяснить неоднородностью генотипов использованных в опыте животных. Об этом свидетельствуют опыты некоторых исследователей показавших, что ген PrP у коз высоко полиморфен и некоторые полиморфизмы могут влиять на инкубационный период [14].

Клинические симптомы проявления BSE у коз в наших экспериментах полностью совпадают с описанными ранее другими авторами [4,6,8,15] и отличаются только колебаниями в проявлении отдельных признаков. Они, как и по нашим данным, отмечают, что клинические симптомы BSE у коз практически не отличаются у них от клинических симптомов скрепи.

Патогистологическая характеристика поражений различных отделов ЦНС при BSE у коз, а также иммуногистохимическая характеристика выявляемых отложений белка PrPsc, также очень сходны с таковыми при скрепи, что отличается рядом исследований [4,6,14,15]. Наши результаты согласуются с этими данными.

Заключение

Клинические симптомы и характер патогистологических изменений в ЦНС у коз при экспериментальной инфекции BSE практически не отличаются от таковых при скрепи у этих животных.

Козы, пораженные возбудителем губкообразной энцефалопатии коров, могут погибать внезапно без проявления клинических признаков заболевания.

Молодняк, родившийся от коз, находящихся в инкубационном периоде инфекции BSE, находясь при матери в подсосный период заражаются болезнью. Необходимо отметить так же, что экспериментальная инфекция ГЭП КРС коз может служить лабораторной моделью изучения возбудителя нового варианта болезни Крейтцфельда-Якоба.

Работа выполнена в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг., тема (проект) № 0578-2015-0002 "Создать лабораторную модель на кроликах и морских свинках для изучения биологических свойств патогенных прионов". Финансирование работы было получено в рамках Государственного задания из федерального бюджета без привлечения дополнительных источников финансирования.

Литература

1. Collinge J. A new variant of prion disease / Collinge J, Rossor M. // Lancet. 1996 Apr 6;347(9006):916-7.
2. <http://www.oie.int/index.php?id=1937>
3. Eloit M. BSE agent signatures in a goat/Eloit M., Adjou K, Couplier M, Fontaine JJ, Hamel R, Lilin T, Messiaen S, Andreoletti O, Baron T, Bencsik A, Biacabe AG, Beringue V, Laude H, Le Dur A, Vilotte JL, Comoy E, Deslys JP, Grassi J, Simon S, Lantier F, Sarradin P // Vet Rec. 2005 Apr 16;156(16):523-4.

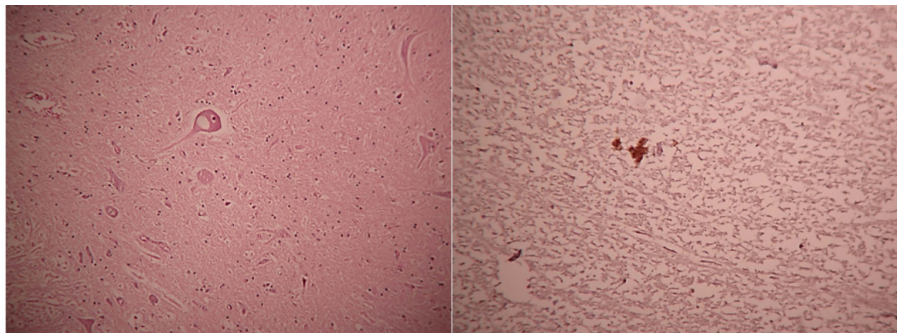


Рисунок 1. Шейный отдел спинного мозга. Рисунок 2. Молекулярный слой мозжечка, гематоксин-эозин. Животное №5. Иммуногистохимия. Животное №9.

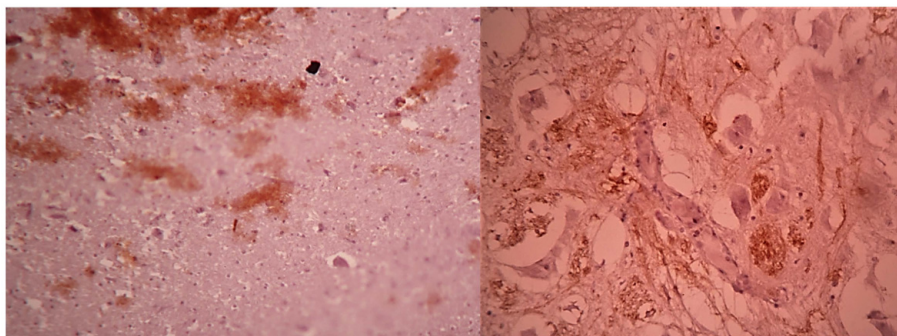


Рисунок 2а. Таламус, иммуногистохимия. Рисунок 3. Таламус, иммуногистохимия. Животное №4. Животное №9.

4. Jeffrey M. Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies/Jeffrey M, Martin S, Gonzalez L, Foster J, Langeveld JP, van Zijderfeld FG, Grassi J, Hunter N.// J Comp Pathol. 2006 Feb-Apr;134(2-3):171-81. Epub 2006 Mar 20.
5. Spiropoulos J. Isolation of prion with BSE properties from farmed goat /Spiropoulos J, Lockey R, Sallis RE, Terry LA, Thorne L, Holder TM, Beck KE, Simmons MM.//Emerg Infect Dis. 2011 Dec;17(12):2253-61. doi: 10.3201/eid1712.110333.
6. Foster J. Partial dissociation of PrP(Sc) deposition and vacuolation in the brains of scrapie and BSE experimentally affected goats/Foster J.1., Goldmann W, Parnham D, Chong A, Hunter N.// J Gen Virol. 2001 Jan;82(Pt 1):267-73.
7. Nadtochei G.A. Clinical signs and histological changes in goats experimentally infected with BSE agent./Nadtochei G.A., Yurov K.P., Fateev M.A., Suvorov V.S., Yakousheva O.V.// Emirates Medical Journal. 2005. T. 23, № 1. C. 85
8. Konold T. Monitoring of clinical signs in goats with transmissible spongiform encephalopathies/Konold T, Bone GE, Phelan LJ, Simmons MM, Gonzalez L, Siso S, Goldmann W, Cawthraw S, Hawkins SA.// BMC Vet Res. 2010 Mar 4;6:13. doi: 10.1186/1746-6148-6-13.
9. Aguilar-Calvo P. Effect of Q211 and K222 PRNP Polymorphic Variants in the Susceptibility of Goats to Oral Infection With Goat Bovine Spongiform Encephalopathy /Aguilar-Calvo P, Fast C, Tauscher K, Espinosa JC, Groschup MH, Nadeem M, Goldmann W, Langeveld J, Bossers A, Andreoletti O, Torres JM // J Infect Dis. 2015 Aug 15;212(4):664-72. doi: 10.1093/infdis/jiv112. Epub 2015 Feb 26.
10. Надточей Г.А. Клинические симптомы и патогистологические изменения у коз при экспериментальном заражении возбудителем губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота /Надточей Г.А., Вангели С.В., Степнова С.Н., Вьюшинский П.А.// Инфекционные болезни. 2017. Т. 15. № S1. С. 193
11. Fast C. Protecting effect of PrP codons M142 and K222 in goats orally challenged with bovine spongiform encephalopathy prions /Fast C, Goldmann W, Berthon P3, Tauscher K, Andreoletti O, Lantier I, Rossignol C, Bossers A, Jacobs JG, Hunter N, Groschup MH, Lantier F, Langeveld JPM // Vet Res. 2017 Sep 19;48(1):52. doi: 10.1186/s13567-017-0455-0.
12. VallinoCostassa E. Clinical, pathological, and molecular features of classical and L-type atypical-BSE in goats /VallinoCostassa E, D'Angelo A, Mazza M, Meloni D, Baioni E, Maurella C, Colussi S, Martinelli N, Lo Faro M, Berrone E, Favole A, Crociara P, Grifoni S, Gallo M, Lombardi G, Iulini B, Casalone C, Corona C. // PLoS One. 2018 May 24;13(5):e0198037. doi: 10.1371/journal.pone.0198037. eCollection 2018
13. Oliver Andreoletti PrP Immunohistochemistry / edited by Sylvain Lehmann and Jacque Grassi Techniques in Prion Research // 2004 C.82-96.
14. Goldmann W. Genetic variability of the PrP gene in a goat herd in the UK / Goldmann W, Perucchini M, Smith A, Hunter N // Vet Rec. 2004 Aug 7;155(6):177-8.
15. Jeffrey M. Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease /Jeffrey M, Gonzalez L//Neuropathol Appl Neurobiol. 2007 Aug;33(4):373-94.