

АНТИГЕННІ ТА ПАТОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ *TESCHOVIRUS A* ТА *SAPELOVIRUS A*, ВИДІЛЕНИХ ВІД СВИНЕЙ І СИНАНТРОПНИХ ТВАРИН В УКРАЇНІ

С.В. Дерев'янюк

*Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва
Національної академії аграрних наук України,
вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна
e-mail: biopreparat@i.ua*

*Хвороба Тешена останнім часом реєструється рідко, однак помірні або безсимптомні інфекції, зумовлені *Teschovirus A* виявляються по всьому світу. **Мета.** Дослідити антигенні та патогенні властивості штамів *Teschovirus A* і *Sapelovirus A*, які циркулюють як серед свинопоголів'я, так і серед синантропних тварин на території України. **Методи.** Біологічні, фізико-хімічні та антигенні властивості вірусів вивчали в перещеплюваних лініях культур клітин СНЕВ та ВНК-21. Гіперімумні сироватки крові до штамів вірусів отримували за модифікованою нами схемою на кролях. Типову належність вірусів визначали в реакції нейтралізації, видову ідентифікацію – у полімеразній ланцюговій реакції зі зворотною транскрипцією. Патогенні властивості штамів вірусів вивчали на поросятах двохмісячного віку при інтрацеребральному зараженні. **Результати.** Із 1051 проб матеріалів відібраних від свиней та синантропних тварин виділено 233 ізоляти вірусів. Встановлено, що ізоляти вірусів і виділені від синантропних тварин мають біологічні, фізико-хімічні та антигенні властивості, притаманні збуднику хвороби Тешена. Встановлено, що віруси, виділені від kota, курки і дикого гусака, патогенні для свиней. Від свиней виділено непатогенні штами Т 3 та Ч 878 нових серотипів *Teschovirus A* та штам Ч 881, який рекласифіковано як *Sapelovirus A* нового генотипу, а також штами Г 31 та Д 32 *Teschovirus A* відомих серотипів, які можуть викликати енцефаломієліти у свиней. Встановлена залежність імуногенних властивостей штамів вірусів від джерел їх виділення. Віруси, виділені з ректальних та назальних змивів мають більш високу імуногенність, ніж віруси, виділені з центральної нервової системи. **Висновки.** Штами вірусів, виділені від синантропних тварин, мають біологічні, фізико-хімічні й антигенні властивості, притаманні збуднику хвороби Тешена. Штами вірусів, виділені від kota, курки і дикого гусака, патогенні для свиней. Таким чином, синантропні тварини та птиця можуть бути джерелом інфекції та фактором передачі збудника хвороби Тешена. Серед свинопоголів'я циркулюють штами *Teschovirus A* відомих серотипів, які у переважній більшості не патогенні для свиней, а також виявлено непатогенні штами *Teschovirus A* нових серотипів та *Sapelovirus A* нового генотипу. Встановлено, що віруси, виділені з ректальних та назальних змивів мають більш високі імуногенні властивості, ніж віруси, виділені з центральної нервової системи. За результатами проведених досліджень штами Т 3 та Ч 878 нових серотипів *Teschovirus A* можуть бути рекомендовані Міжнародному комітету з таксономії вірусів у якості еталонних.*

*Ключові слова: *Teschovirus A*, *Sapelovirus A*, штами вірусів, антигенні властивості, імуногенні властивості, патогенні властивості.*

За даними Міжнародного епізоотичного бюро помірні або безсимптомні інфекції, зумовлені *Teschovirus A* (TV-A), реєструються в усьому світі. На противагу цьому, тешовірусний енцефаломієліт (хвороба Тешена) свиней в даний час є рідкісним захворюванням. Про спалахи повідомляли Білорусь – 1996, 1999 і 2005 рр., Молдова – 2002–2004 рр., Румунія – в 2002 р., Росія – 2004 р., Латвія в 1997 і 2000–2002 рр., Мадагаскар в 1996–2000, 2002 і 2004–2005 рр., Уганда в 2001 р., Японія в 2002 році. В Україні хвороба Тешена свиней реєструвалась в 1996–2005 роках [1].

Збудником хвороби Тешена свиней є тешовірус першого серотипу, який до 1999 року мав назву ентеровірус свиней (ЕВС). За сучасною класифікацією ЕВС 1–7, 11–13 серотипів винесено в окремий рід *Teschovirus*, вид *Teschovirus A*, який на цей час нараховує 13 серотипів. ЕВС 8 серотипу рекласифіковано в окремий рід *Sapelovirus*, вид *Sapelovirus A* (SV-A), а ЕВС 9 та 10 серотипів – у вид *Enterovirus G* (EV-G) у межах роду *Enterovirus* [2, 3].

Збудник хвороби Тешена спричиняє захворювання домашніх та диких свиней, однак може розмножуватись і в організмі гризунів [4]. Дослідження, проведені нами, переконливо доводять, що понад 50 % ізолятів тешовірусів, виділених як від свиней, так і від синантропних тварин, мають антигенну спорідненість з TV-A першого серотипу [5].

Тешовіруси здатні до репродукції як в культурах клітин свиней: перещеплювана лінія культури клітин нирки ембріону свині (СНЕМ), нирки свині (РК-15), тестикулів поросят (ПТП), так й інших видів теплокровних тварин: нирки новонародженого сірійського хом'яка (ВНК-21) [6] та людини: епідермоїдна карцинома гортані (Нер-2) [7].

Метою наших досліджень було вивчити антигенні та патогенні властивості штамів вірусів, виділених від свиней та синантропних тварин на території України.

Матеріали і методи. У дослідах використано штами ентеровірусів свиней 21 серотипу за тривіальною класифікацією Романенка В.П. [8], з яких 7 штамів (Konratice, F 59, F 34, F 78, F 12, F 7, V 13, відповідно 1 – 6 та 8 серотипів) класифіковані Dunne H.W. зі співавт. [9] і в 1970 році люб'язно надані професором Derbyshire H.W. (Велика Британія); 14 штамів (М 2323, К 9, К 22, Л 90, М 116, Ч 73, Г 95, Б 111, Ч 184, Д227, И249, П142, В151, И393, відповідно 10-23 серотипів) виділені та класифіковані Романенко В.П. зі співавт. [8], еталонні штами TV-A 11-ти серотипів (Tirol, O 3b, O 2b, PS 36, F 26, PS 37, F 43, UKG 173/74, VIR 2899/84, VIR 460/88, Dresden), штам V 13 SV-A та штами UKG 410/73 та LP 54 EV-G згідно чинної міжнародної класифікації [10], які були люб'язно надані професором Dauber M. (Німеччина).

Як дослідні використано штами вірусів, виділені на території України від свиней: Д 32 та Г 31 виділені з головного мозку, Ч 878 – назального змиву, Т 3, Ч 881 – ректального змиву та віруси, виділені від синантропних тварин: 56 виділений з клоаки курки, вірус 57 – з ректального змиву kota та вірус 743 – з головного мозку дикого гусака. Для порівняння патогенних властивостей були відібрані штами TV-A першого серотипу Tirol (еталонний) та Ч 2372 (вірулентний), який використовується для контролю напруженості імунітету у вакцинованих тварин.

Усі використані штами зберігаються в колекції вірусів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

In vitro віруси досліджували в перещеплюваних лініях культур клітин СНЕВ та ВНК-21. Для вирощування культур клітин використовували поживні середовища 199 (ТОВ НВП «Біо-тест-лабораторія», Україна), Ігла, 0,5% розчин гідролізату лактатальбуміну (ГЛА) (Інститут поліомієліту і вірусних енцефаломієлітів РАМН, РФ, 5% розчин гемогідролізату (Науково-дослідний інститут експериментальної медицини, Республіка Білорусь), сироватку крові великої рогатої худоби (АТ «Конотопм'ясо», Україна) та ембріональну сироватку крові великої рогатої худоби (Sigma-Aldrich, USU).

Вирощування культур клітин проводили в плоских колбах та пробірках при температурі 37°C. Зняття клітин зі скла – за допомогою 0,02% розчину Версену, підігрітого до 37°C. Посівна концентрація клітин в плоскі колби становила 60 – 100 тис. клітин/см³, в пробірці 100 – 150 тис. клітин/см³ Суспензію клітин доводили до значення рН 7,2 – 7,4, додавали антибіотики з розрахунку 100 ОД бензилпеніциліну натрієвої солі та 100 мкг стрептоміцину сульфату на 1 см³ середовища.

Для визначення біологічної активності штамів вірусів готували 10-кратні розведення вірусу на фізіологічному розчині. Віруси інкубували при температурі 37°C. Облік результатів цитопатичної дії (ЦПД) проводили на 3 – 7 добу. Титр вірусів вираховували за методом Reed L.J. і Muench H. [11].

Патогенні та імуногенні властивості вірусів вивчали на поросятах 2 – 3 місячного віку. Культуральну вірусомісну суспензію вводили дослідним поросяттям інтрацеребрально в дозі 1×10^6 ТЦД₅₀/см³, а 10 % мозкову суспензію штаму Ч 2372 в дозі $0,4 \times 10^{4,5}$ ТЦД₅₀/см³. Клінічні спостереження за зараженими поросяттями вели 60 діб.

Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з дослідними тваринами проводили згідно Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та науковою метою» (Страсбург, 1986 р.) [12] і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.) [13]. Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти [14].

Фізико-хімічні властивості віріонів, а саме: стійкість до ліпідорозчинників (ефіру і хлороформу), протеолітичного ферменту (трипсину), середовищ з діапазоном значень рН від 2,2 до 11, терморезистентність у присутності 1 М розчину MgCl₂, дію інгібітору синтезу дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) (5-бром-2-дезоксиуридину) вивчали згідно загальноновизнаних вірусологічних методів [15, 16, 17].

Гіперімунні кролячі сироватки крові до штамів вірусів отримані за модифікованою нами схемою, вводячи почергово антиген внутрішньошкірно без ад'юванту та підшкірно з ад'ювантом Montanide ISA 25 (SEPPIC, Франція) [18].

Типову належність вірусів визначали в реакції нейтралізації (РН) в культурі клітин за використання 100 ТЦД₅₀ вірусу та 10 нейтралізуючих

доз гіперімунних кролячих сироваток крові до еталонних штамів TV-A, SV-A, EV-G та EBC [19].

Для видової ідентифікації вірусів у полімеразній ланцюговій реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ ПЛР) використовували розроблені нами праймери [20]. Підбір праймерів здійснювали за результатами аналізу генів TV-A, EV-G та SV-A з використанням програми «Align X (Vector NTI Suite)» і бази даних GenBank, EMBL, DDBJ.

Праймери для ідентифікації TV-A мають наступну послідовність:

Sense Primer: **TeschoF51 5'-CCAGCAGCCTCTGTTCAGAAAG**

Antisense Primer: **TeschoR51 5'-GC(A/G)TACTTGTATGAGGCCCATC**

Вони фланкують ділянку гену поліпротеїну TV-A 11 серотипу штаму Dresden (AF296096, Gene Bank) довжиною 650 нуклеотидних залишків, починаючи з 5271 по 5920 нуклеотид.

Для ідентифікації сапеловірусів SV-A були отримані наступні праймери, які фланкують ділянку гену поліпротеїну ("2A protein") SV-A штаму V13 (AF406813, Gene Bank) з 3141 по 3598 нуклеотиди, довжиною 458 нуклеотидних залишків:

Sense Primer: **Pev8F6 5'-TGCCAAACTAAGAACGCCACTG**

Antisense Primer: **Pev8R6 5'-TCACCTTCTGCCATCCACAATC**

Видоспецифічні праймери для геному EV-G мають наступну послідовність:

Sense Primer: **Pev9F1 5'-GGATTGCGGTCAAGCACTTCTGTT**

Antisense Primer: **Pev9R1 5'-CGTGGTTAGGATTAGCCGCATTC**

Вони підібрані до ділянки гена поліпротеїну EV-G штаму UKG/410/73 (AF363453, Gene Bank) у межах 187 – 513 нуклеотидів, розмір ПЛР-фрагменту складає 327 нуклеотидних залишків.

Для проведення ЗТ ПЛР рибонуклеїнову кислоту (РНК) вірусів виділяли з досліджуваних зразків за допомогою набору «РНК-сорб-В» (Центральний науково-дослідний інститут епідеміології, РФ). З виділеної РНК отримували кДНК за допомогою реакції зворотної транскрипції. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на чотирьохканальному ампліфікаторі «Терцик» (НВФ «ДНК-Технологія», РФ). Реакційна суміш об'ємом 0,025 см³ вміщувала: 67 ммоль трис-НСl (рН 8,8), 16,6 ммоль (NH₄)₂SO₄, 2,0 ммоль MgCl₂, 0,01% твін-20, по 100 мкмоль дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, 2 нмоль (НВФ „ДНК Технологія”) кожного з пари специфічних праймерів, 2 од. Таq-полімерази, 0,005 см³ зразків кДНК.

Ампліфікацію специфічних ділянок кДНК інфекційних агентів проводили за параметрами, представленими в таблиці 1.

Детекцію продуктів реакції проводили за допомогою електрофорезу у 1,5 агарозному гелі, забарвленому бромідом етидію з використанням трис-боратного буфера (НВФ «ДНК-Технологія», РФ) при градієнті напруги 10 В/см. Результати оцінювали візуально переглядом гелю після електрофорезу на транслюмінаторі під УФ світлом за наявністю (або відсутністю) червоно-помаранчевих фрагментів ДНК певного розміру. Специфічність ампліфікованого фрагмента ДНК визначали за його розміром відносно фрагментів стандартних маркерів (рис. 1.).

Таблиця 1

Температурні і часові параметри ампліфікації специфічної ділянки кДНК

№ циклу	Температура ампліфікації, °С			Час, хв.	Кількість циклів
	TV-A	SV-A	EV-G		
1	95	95	95	5	1
2	94	94	94	1	5
	58	58	60	1	
	74	74	74	1	
3	94	94	94	0,5	35
	58	58	60	0,5	
	73	73	73	0,5	
4	72	72	72	5	1

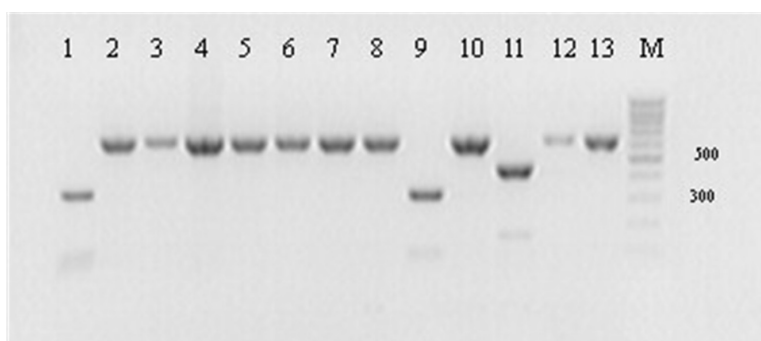


Рис.1. Результати перевірки видоспецифічності розроблених праймерів
Електрофорез у 1,5 % агарозному гелі: 1,9 доріжки – EV-G; 2–8, 10, 12, 13
доріжки –TV-A;11 доріжка – SV-A; M – маркер.

Результати. У результаті досліджень 1051 проб матеріалів, відібраних від свиней та синантропних тварин, виділено 233 ізоляти вірусів, що становить 22,2 % (табл. 2.). Встановлено, що усі досліджувані віруси, виділені від свиней та синантропних тварин, були здатні до репродукції як в культурі клітин СНЕВ, так і ВНК-21. Цитопатична дія (ЦПД) вірусів проявлялась через 24 – 72 години та характеризувалась дегенеративними змінами культури клітин, появою поодиноких округлих клітин з подальшим зростанням їх кількості до повного руйнування моношару. Різних типів ЦПД ми не спостерігали (Рис. 2 – 5). Інфекційні титри вірусів були в межах від 5,5 до 7,5 lg ТЦД₅₀/см³.

Інгібітори ДНК не впливали на репродукцію вірусів в культурі клітин, що свідчить про їх належність до РНК-вмісних вірусів. Ліпідорозчинники хлороформ та етиловий етер, протеолітичний фермент трипсин не змінювали інфекційну активність вірусів, що вказує на відсутність зовнішньої ліпидовмісної оболонки та їх належність до кишкових вірусів. Досліджувані штами вірусів частково інактивуються прогріванням при температурі 50°C впродовж 1 години, а внесення 1 М розчину MgCl₂ призводило до стабілізації їх титрів. Різні значення рН середовища в інтервалі 2,2 – 11,0 не змінювали інфекційну активність вірусів.

Таблиця 2

Результати виділення вірусів з проб матеріалів, відібраних від свиней та синантропних тварин

Вид тварин	Проби	Досліджено проб	Виділено ізолятів	% виділення
	Матеріал			
Свині	Головний мозок	65	24	36,9
	Спинний мозок	25	4	16,0
	Ректальні змиви	120	68	56,7
	Назальні змиви	58	10	17,2
	Кишечник	39	6	15,4
	Внутрішні органи	204	48	23,5
	М'язи	169	4	2,4
	Сало	23	8	34,8
Миші	Головний мозок	73	11	15,1
	Кишечник	61	8	13,1
	Внутрішні органи	61	8	13,1
Пацюки	Головний мозок	6	2	33,3
	Кишечник	9	1	11,1
	Внутрішні органи	6	0	0
Кролі	Ректальні змиви	20	5	25
	Внутрішні органи	10	9	90
	М'язи	15	2	13,3
Заєць	Головний мозок	1	0	0
Коти	Ректальні змиви	15	6	40
Собаки	Ректальні змиви	3	2	66,7
Кури	Ректальні змиви	12	4	33,3
Ворони	Головний мозок	7	0	0
	Кишечник	6	0	0
Галки	Головний мозок	6	0	0
	Кишечник	9	2	22,2
Горобці	Головний мозок	7	0	0
	Кишечник	5	0	0
Качки	Ректальні змиви	2	0	0
Дикі качки	Головний мозок	1	0	0
Гуси	Ректальні змиви	1	0	0
Дикі гуси	Головний мозок	3	1	33,3
Мухи	Тіло	9	0	0
Всього		1051	233	22,2

Для вивчення антигенних та патогенних властивостей були відібрані віруси, виділені від синантропних тварин: 56 – виділений з клоаки курки, вірус 57 – з ректального змиву kota та вірус 743 – з головного мозку дикого гусака, штами вірусів, виділені від свиней: Д 32 та Г 31, виділені з головного мозку, Ч 878 – назального змиву, Т 3, Ч 881 – ректального змиву. Для порівняння патогенних властивостей були відібрані еталонний штам TV-A першого серотипу Tirol та вірулентний штам TV-A першого серотипу Ч 2372, який використовується для контролю напруженості імунітету у вакцинованих тварин.

У реакції нейтралізації вірусів з еталонними штамми TV-A, EV-G, SV-A та EBC встановлено, що штам вірусу Д 31 нейтралізується сироваткою крові, одержаною до штаму тешовірусу свиней 1 серотипу, Г 31 – до

штамів TV-A 1, 10, та 11 серотипів, штам Ч 881 – сироваткою крові до SV-A. Штами Ч 878 та Т 3 не вступають у серологічні реакції з еталонними штамми відомих серотипів, а нейтралізуються лише гомологічними сироватками крові, антигенно відрізняються між собою, тобто належать до нових, раніше невідомих серотипів TV-A (табл. 3).

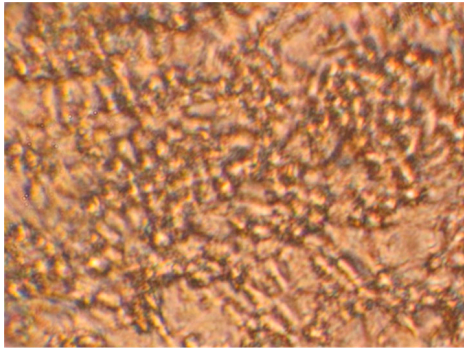


Рис. 2. Цитопатична дія еталонного штаму TV-A першого серотипу Tirol в культурі клітин CNEB через 24 години

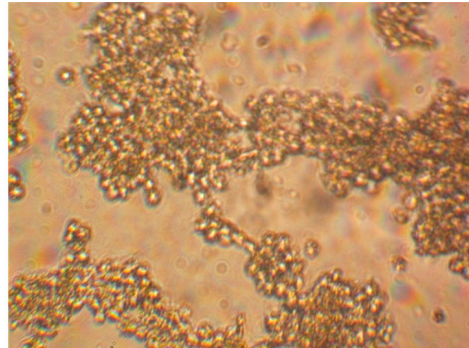


Рис. 3. Цитопатична дія TV-A першого серотипу Tirol в культурі клітин CNEB через 36 годин

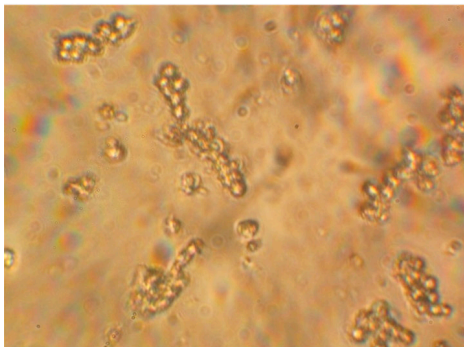


Рис. 4. Цитопатична дія штаму TV-A Tirol в культурі клітин CNEB через 48 годин

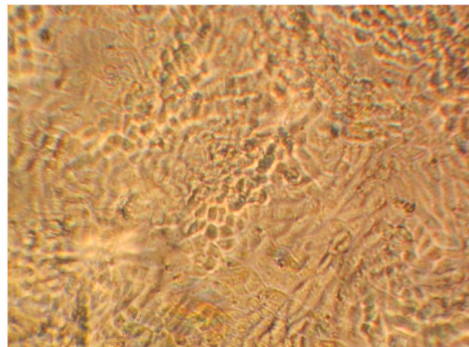


Рис. 5. Культура клітин CNEB, не інюкульована вірусом

Таблиця 3
Антигенні та патогенні властивості вірусів, виділених від свиней та синантропних тварин

Штам	Матеріал з якого виділено	Видова та типова належність	Патогенність для свиней
56	Змив з клоаки курки	ЕВС 1,2,4,10,16,18,20,23	Патогенний
57	Ректальний змив kota	ЕВС 1,4,10, 17,18,20,23	Патогенний
743	Головний мозок дикого гусака	ЕВС 2, 4, 10	Патогенний
Д 32	Головний мозок свині	TV-A 1	Патогенний
Г 31	Головний мозок свині	TV-A 1, 10, 11	Не патогенний
Т 3	Ректальний змив свині	TV-A новий серотип	Не патогенний
Ч 878	Назальний змив свині	TV-A новий серотип	Не патогенний
Ч 881	Ректальний змив свині	SV-A	Не патогенний
Tirol	Головний мозок свині	TV-A 1	Не патогенний
Ч 2372	Головний мозок свині	TV-A 1	Не патогенний
Ч 2372*	Головний мозок свині	TV-A 1	Патогенний

Примітка: * вірусомісна мозкова суспензія

У реакції нейтралізації з сироватками крові до референтних штамів ентеровірусів свиней згідно тривіальної класифікації Романенка В.П. встановлено, що вірус 56 мав антигенні зв'язки з ентеровірусами свиней 1, 2, 4, 10, 16, 18, 20, 23 серотипів, вірус 57 – з 1, 4, 10, 17, 18, 20, 23 серотипами, вірус 743 – 2, 4, 10 серотипами.

У полімеразній ланцюговій реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ ПЛР) встановлено, що кДНК штамів вірусів Г 31, Т 3, Ч 878 комплементарна лише з праймерами до тешовірусів свиней і утворює продукт ампліфікації довжиною 650 нуклеотидів і за своїми генетичними властивостями належить до роду *Teschovirus* виду *Teschovirus A*. кДНК штаму Ч 881, який за антигенними властивостями належить до SV-A, продуктів ампліфікації з видоспецифічними праймерами до TV-A, SV-A та EV-G не утворював.

При інтрацеребральному зараженні віруси, виділені від синантропних тварин і птиці, викликали захворювання поросят на 3 – 21 добу з клінічними ознаками та летальністю, характерними для класичної форми хвороби Тешена. При інфікуванні поросят вірусами 56 та 57 на 7 – 21 добу захворіло 100 % поросят, а летальність становила 67 %. При зараженні поросят вірусом 743 симптоми хвороби Тешена спостерігали на 3 – 7 добу. Смерть наступала у дослідних поросят на 6 – 16 добу. Летальність становила 100%. При розтині загиблих та захворілих тварин відмічено ін'єкцію судин головного мозку, синюшність носових перегородок, інші органи лишались без змін. З відібраних від загиблих свиней проб матеріалів були виділені віруси, ідентичність яких введеним вірусам була підтверджена в реакції нейтралізації (табл. 3).

Отже, штами вірусів, з яких 56 виділені зі змивів клоаки курки, 57 – ректальних змивів kota та 743 – головного мозку гусака патогенні для свиней і обумовлюють симптоми класичної форми хвороби Тешена.

Поросят, яким вводили культуральну суспензію штаму Д 32 та мозкову суспензію штаму Ч 2372 захворіли на 9 – 11 добу та загинули на 12 – 16 добу. Штами вірусів Т 3, Ч 878, Ч 881, виділені в Україні від свиней, та еталонний штам TV-A першого серотипу Tirol патогенних властивостей не мають. По закінченню дослідів із проб матеріалів, відібраних від заражених цими вірусами поросят, впродовж 7 послідовних пасажів в культурі СНЕВ вірусів не виділено.

Імуногенна активність досліджуваних штамів була різною. Так, на введення еталонного штаму TV-A першого серотипу Tirol та штамів Д 32, Г 31, Ч 2372, виділених з головного мозку свиней, антитіла не утворювалися. На введення штамів вірусів Т 3, Ч 878 і Ч 881, виділених з ректальних та назальних змивів свиней, антитіла утворювались у титрах 1:16 – 1:512.

Обговорення. Таким чином, одержані результати свідчать про те, що на території України серед синантропних тварин циркулюють штами вірусів, які за певних умов можуть викликати хворобу Тешена. Віруси 56, 57 та 743, які були виділені від синантропних тварин, патогенні для свиней. При інтрацеребральному введенні цих вірусів у поросят спостерігаються симптоми та патолого-анатомічні зміни, характерні для хвороби Тешена. Біологічні (здатність вірусу до репродукції в культурах клітин,

тип ЦПД) та фізико-хімічні властивості (стійкість до ліпідорозчинників, протеолітичного ферменту трипсину, середовищ з діапазоном значень рН від 2,2 до 11, терморезистентність у присутності 1 М розчину $MgCl_2$, дію інгібітору синтезу дезоксирибонуклеїнової кислоти) цих вірусів не відрізняються від властивостей, притаманних збуднику хвороби Тешена. За антигенними властивостями віруси 56, 57, 743 належать до відомих серотипів. Нейтралізуються сироватками крові до ентеровірусів свиней декількох серотипів, у тому числі і до еталонних штамів 1 серотипу, до якого відноситься збудник хвороби Тешена. Отже, синантропних тварин можна розглядати як джерело інфекції та фактор передачі збудника цієї хвороби.

Це узгоджується з літературними даними. Раніше було доведено, що тешовіруси здатні до репродукції в організмі гризунів [4]. Встановлено, що пікорнавіруси, які циркулюють серед свинопоголів'я, можуть інфікувати людей на початку життя [21]. Відмічено здатність тешовірусів свиней до репродукції в культурі клітин Нер-2 [7]. Таким чином, дослідження етіологічної ролі пікорнавірусів і тешовірусів – зокрема є життєво важливим.

Від свиней виділено тешо- та сапеловіруси як відомих, так і нових серотипів та генотипів. Штам Д 32 за результатами серологічних та молекулярно-генетичних досліджень належить до TV-A 1 серотипу, патогенний для свиней. Штам Г 31 антигенно споріднений TV-A 1, 10, 11 серотипів, у ЗТ ПЛР вступає в реакцію з праймерами до TV-A і є непатогенним для поросят.

За антигенними властивостями штами Т 3 та Ч 878 відрізняються від еталонних штамів TV-A, SV-A, EV-G за міжнародною класифікацією та ЕВС за класифікацією Романенка В.П., антигенно відмінні між собою та утворюють нові серотипи. За результатами ЗТ ПЛР належать до виду *Teschovirus A*. Патогенних властивостей не мають.

Штам Ч 881 за результатами реакції нейтралізації віднесено до роду *Sapelovirus* виду *Sapelovirus A*, однак в ЗТ ПЛР кДНК цього штаму не утворює продуктів ампліфікації з видоспецифічними праймерами до TV-A, SV-A та EV-G, тобто цей штам є генетично відмінним. Патогенних властивостей він не має.

Останнім часом нові штами виділяють і в Європі. Так, в Угорщині з фекальних зразків поросят дикого кабана виділено штам WB2C-TV / 2011 / HUN (JQ429405), який в полімеразній ланцюговій реакції показав різницю в регіоні геному, що кодує капсидний білок VP1 (66–74% амінокислотної ідентичності) у порівнянні з доступними еталонними штамми тешовірусів. Автори запропонували штам WB2C-TV / 2011 / HUN (JQ429405) в якості еталонного нового серотипу [22].

Відмічена залежність імуногенних властивостей штамів вірусів від джерел їх виділення. Так, штами вірусів Т 3, Ч 878 та Ч 881, виділені з ректальних і назальних змивів, будучи непатогенними, спричиняли значно вищий рівень утворення віруснейтралізуючих антитіл, що можна пояснити їх природною адаптацією до розмноження в шлунково-кишковому

му тракту й органах дихання. Їх інтрацеребральне введення не викликало клінічних симптомів ураження центральної нервової системи поросят. Штами тешовірусів свиней Д 32, Г 31, Ч 2372 та Tіgol, які виділені з мозку загиблих тварин, менш імуногенні, можливо, пригнічують гуморальну реакцію, і тому більш вірулентні. Навіть введення культуральної суспензії штаму вірусу Ч 2372, атенуйованого в культурі клітин СНЕВ, також не зумовлювало утворення антитіл у заражених поросят, будучи авірулентним.

Перспективним є продовження вивчення патогенних властивостей вірусів, виділених від синантропних тварин та птиці, а також проведення їх серологічної та генетичної рекласифікації відповідно до міжнародних вимог. Міжнародному комітету з таксономії вірусів будуть подані пропозиції доповнити класифікацію виду *Teschovirus A* двома новими серотипами та запропоновано штами Т 3 та Ч 878 як еталонні. Необхідно провести сиквенс-аналіз геному штаму Ч 881 *Sapelovirus A* для виявлення генетичних змін.

Висновки. Штами вірусів, виділені від синантропних тварин мають біологічні, фізико-хімічні й антигенні властивості, притаманні збуднику хвороби Тешена. Штами вірусів 56, виділені зі змивів клоаки курки, 57 – ректальних змивів kota та 743 – головного мозку гусака патогенні для свиней. Таким чином, синантропні тварини можуть бути джерелом інфекції та фактором передачі збудника хвороби Тешена. Серед свинопоголів'я циркулюють штами *Teschovirus A* відомих серотипів, які можуть викликати енцефаломієліти у свиней, а також виявлено непатогенні штами *Teschovirus A* нових серотипів та *Sapelovirus A* нового генотипу. Штами Т 3 та Ч 878 нових серотипів *Teschovirus A* можуть бути рекомендовані Міжнародному комітету з таксономії вірусів у якості еталонних. Встановлена залежність імуногенних властивостей штамів вірусів від джерел їх виділення. Віруси, виділені з ректальних та назальних змивів, мають більш високі імуногенні властивості, ніж віруси, виділені з центральної нервової системи.

Подяка. Ця стаття присвячена пам'яті українського вченого, академіка НААН, доктора ветеринарних наук, лауреата Державної премії України, заслуженого працівника науки і техніки Володимира Пилиповича Романенка, який багато уваги приділяв вивченню ентеровірусів свиней. Автор вдячний професору Мальту Дауберу з Інституту вірусної діагностики імені Ф. Лефлера Федерального центру вірусних хвороб тварин Німеччини за надані еталонні штами *Teschovirus A*, *Sapelovirus A* та *Enterovirus G*.

АНТИГЕННЫЕ И ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *TESCHOVIRUS A* И *SAPELOVIRUS A*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ СВИНЕЙ И СИНАНТРОПНЫХ ЖИВОТНЫХ В УКРАИНЕ

С.В. Деревянко

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного
производства Национальной академии аграрных наук Украины
ул. Шевченко, 97, Чернигов, 14027, Украина

Резюме

Болезнь Тешена в последнее время регистрируется редко, однако умеренные или бессимптомные инфекции, обусловлены *Teschovirus A* проявляются по всему миру. **Цель.** Исследовать антигенные и патогенные свойства штаммов *Teschovirus A* и *Sapelovirus A*, циркулирующих как среди свинопоголовья, так и среди синантропных животных на территории Украины. **Методы.** Биологические, физико-химические и антигенные свойства вирусов изучали в перевиваемых линиях культур клеток СПЭВ и ВНК-21. Гипериммунные сыворотки крови к штаммам вирусов получали по модифицированной нами схеме на кроликах. Типовую принадлежность вирусов определяли в реакции нейтрализации, видовую идентификацию – в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Патогенные свойства штаммов вирусов изучали на поросятах двухмесячного возраста при интрацеребральном заражении. **Результаты.** С 1051 проб материалов отобранных от свиней и синантропных животных выделено 233 изоляты вирусов. Установлено, что изоляты вирусов, выделенные от синантропных животных, имеют биологические, физико-химические и антигенные свойства, присущие возбудителю болезни Тешена. Установлено, что вирусы, выделенные от коша, курицы и дикого гуся, патогенные для свиней. От свиней выделено непатогенные штаммы Т3 и Ч 878 новых серотипов *Teschovirus A* и штамм Ч 881, который реклассифицировано как *Sapelovirus A* нового генотипа, а также штаммы Г 31 и Д 32 *Teschovirus A* известных серотипов, которые могут вызвать энцефаломиелит у свиней. Установлена зависимость иммуногенных свойств штаммов вирусов от источников их выделения. Вирусы, выделенные из ректальных и назальных смывов, обладают более высокой иммуногенностью, чем вирусы, выделенные из центральной нервной системы. **Выводы.** Штаммы вирусов, выделенные от синантропных животных, имеют биологические, физико-химические и антигенные свойства, присущие возбудителю болезни Тешена. Штаммы вирусов, выделенных от коша, курицы и дикого гуся патогенные для свиней. Таким образом, синантропные животные и птица могут быть источником инфекции и фактором передачи возбудителя болезни Тешена. Среди свинопоголовья циркулируют штаммы *Teschovirus A* известных серотипов, которые в подавляющем большинстве не патогенны для свиней, а также обнаружено непатогенные штаммы *Teschovirus A* новых серотипов и *Sapelovirus A* нового генотипа. Установлено, что вирусы, выделенные из ректальных и назальных смывов, имеют более высокие иммуногенные свойства, чем вирусы, выделенные из центральной нервной системы. По результатам проведенных исследований штаммы Т 3 и Ч 878 новых серотипов *Teschovirus A* могут быть рекомендованы Международному комитету по таксономии вирусов в качестве эталонных.

Ключевые слова: *Teschovirus A*, *Sapelovirus A*, штамм вируса, антигенные свойства, иммуногенные свойства, патогенные свойства.

ANTIGENIC AND PATHOGENIC PROPERTIES OF THE *TESCHOVIRUS A* AND *SAPELOVIRUS A* STRAINS, ISOLATED FROM PIGS AND SYNANTHROPIC ANIMALS IN UKRAINE

S.V. Derevianko

*Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Production
of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,
97 Shevchko str., Chernihiv, 14027, Ukraine*

Summary

Recently, Teschen disease is rarely registered; however, mild or asymptomatic infections caused by *Teschovirus A* have been found worldwide. **Aim.** The aim was to study antigenic and pathogenic properties of *Teschovirus A* and *Sapelovirus A* strains, which are circulating among both porcine population and synanthropic animals in Ukraine. **Methods.** Biological, physicochemical and antigenic properties of viruses were studied in continuous SKECL (swine kidney embryo cell line) and BHK-21 cell cultures. Serums that were hyperimmune against virus strains were obtained from rabbits using a scheme that was modified by us. The affiliation of viruses to the orders was established by the reaction of neutralization, affiliation on the level of species – by reverse transcription polymerase chain reaction. Pathogenic properties of virus strains were studied on two-months-aged piglets using intracerebral infection. **Results.** 233 isolates of viruses were obtained from 1051 samples of materials taken from pigs and synanthropic animals. It was found that isolates of viruses, which were obtained from synanthropic animals, have biological, physicochemical and antigenic properties that are common for a causative agent of Teschen disease. Viruses that were isolated from cats, chickens and wild geese were shown to be pathogenic for pigs. Non-pathogenic T3 and Ч 878 strains of new *Teschovirus A* serotypes were isolated from pigs, as well as Ч 881 strain, which was reclassified as new genotype of *Sapelovirus A*, and also Г 31 and Д 32 strains of previously known serotypes, which can cause encephalomyelitis in pigs. A dependence of immunogenic properties of the virus strains on the sources of isolation was established. Viruses that are isolated from rectal and nasal washings were more immunogenic than viruses isolated from central nervous system. **Conclusions.** Virus strains, which were isolated from synanthropic animals, have biological, physicochemical and antigenic properties of the causative agent of Teschen disease. Virus strains which were isolated from cats, chickens and wild geese are pathogenic for pigs. Thereby, synanthropic animals and poultry can serve as a source of infection and an agent of the pathogen's distribution. Strains of the *Teschovirus A* of the known serotypes are circulating among porcine population, which are generally not pathogenic for pigs, and also non-pathogenic strains of known *Teschovirus A* serotypes and new *Sapelovirus A* genotype were found. Viruses that are isolated from rectal and nasal washings were found to be more immunogenic, than those isolated from central nervous system. According to the results of the study, T3 and Ч 878 strains of new *Teschovirus A* serotypes can be recommended to the International Committee on Taxonomy of Viruses as reference strains.

Keywords: *Teschovirus A*, *Sapelovirus A*, virus strains, antigenic properties, immunogenic properties, pathogenic properties.

1. OIE. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines. Paris; 2008; 598.
2. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison R., Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Mushegian AR, Nibert M, Sabanadzovic S, Sanfaçon H, Siddell SG, Simmonds P, Varsani A, Zerbini FM, Gorbalenya, AE, Davison AJ. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol. 2017; 162:2505–2538. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3358-5>
3. Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, Lindberg AM, Pallansch MA, Palmenberg AC, Reuter G, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T and ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Picornaviridae*. J. Gen. Virol. 2017; 98:2421–2422. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000911>
4. Busun AI, Babkin MV. [Biological transmission of the pathogen of Teschen disease of rodents]. Veterinarny Medicin. 2000; 78:32–33. Ukrainian.
5. Derevianko SV, Bova TO, Reshotko LM, Bozhok LV, Soroka VI. [Distribution of teschovirus – pathogens of infectious diseases of swine]. The Agroecology Journal. 2014; 1:88–92. Ukrainian.
6. Derkach IM, Romanenko VP, Biloshtan VB. [Comparative characteristics of field strains of porcine enteroviruses]. Scientific and technical bulletin. 2009; 10:263–269. Ukrainian.
7. Derevianko SV, Bozhok LV, Soroka VI, Gricenko LM, Zadorozhna VI. [Circulation of enteroviruses of pigs and determination of their antigenic relationships with human enteroviruses]. Mikrobiol Z. 2003; 76:62–67. Ukrainian.
8. Romanenko VF, Pruss OG, Babich NV, Polevik EI, Bokun AA, Pinchuk IN. [Classification of Porcine enteroviruses]. Nes of Agrarian Sciences. 1993; 1:94–101. Russian.
9. Dunne HW, Wang TJ, Ammermann EH. Classification of North American porcine Enteroviruses: a comparison with European and Japanese strains. Infection and Immunity. 1971; 4:619–631.
10. Zell R, Dauber M, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D, Wurm R. Porcine teschovirus comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. J. Virol, 2001; 75:1620-1631. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.4.1620-1631.2001>
11. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimation of fifty per cent endpoints. The American Journal of Hygiene. 1938; 27:493–497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
12. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. European treaty series, Strasbourg. 1986; 123. Available at: <http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Word/123.doc>.
13. Reznikov OG. [General ethical principles of animal experimentation]. Endocrinology. 2003; 8:142–145. Ukrainian.
14. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 86/609/EC. 20.10.2010. Official journal of the European Union. L276/33–79.
15. Bögel K, Mayr A. Untersuchungen über die Chloroform-resistenz der Enteroviren des Rindes und des Schwiene. Zbl Vet Med 1961; 8:908–922. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1961.tb00665.x>

16. Matheka HD, Mayr A. Der stabilisierende und reaktivierende Einfluss\ von Trypsin auf das Virus der Teschener Krankheit (SchweinelÄhmung) und die Inaktivierung von Maul-und-Klauenseuche (MKS) Virus durch dieses Enzym, Arch. ges. Virusforsch, 1962; 12:463–471.
17. Melnick J, Wallis C. Cationic stabilization - A new property of enteroviruses, Virology. 1961; 14:74–82. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(62\)90234-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(62)90234-9)
18. Bova TO, Volkov IV, Derevianko SV. Patent 58734 Ukraine. [Method for production of hyperimmune serum to viruses of animals and plants]. Bulletin Industrial Property. 2011; 8. Ukrainian.
19. Soroka VI, Bokun AA, Derevianko SV, Bozhok LV and Bova TO. [Recommendations for the diagnosis, prevention and elimination of tescho- and enterovirus encephalomyelitis pigs]. Institute of Agricultural Microbiology NAAS, Chernihiv. 2006. Ukrainian.
20. Golovko AM, Derevianko SV, Bova TO, Soroka VI, Katsymon VV. [Construction of species-specific primers for molecular-genetic identification of teschoviruses and enteroviruses A and B]. Agricultural Microbiology. 2009; 10: 156–165. Ukrainian.
21. Jie-mei Yu, Xiao-yue Li, Yuan-yun Ao, Li-li Li, Na Liu, Jin-song Li, Zhao-jun Duan. Identification of a Novel Picornavirus in Healthy Piglets and Seroepidemiological Evidence of Its Presence in Humans. J. Virol. 2012; 86: 395–405. <https://doi.org/10.1128/JVI.06253-11>.
22. Boros A, Nemes C, Pankovics P, Kapusinszky B, Delwart E, Reuter G, Porcine teschovirus in wild boars in Hungary. Arch. Virol. 2012; 157:1573–1578. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1327-6>.

Отримано 14.03.2019