



Тваринництво, ветеринарна медицина

УДК 616-07:57.083.2

© 2018

УДОСКОНАЛЕННЯ ЗАСОБІВ ДІАГНОСТИКИ ТА СПЕЦИФІЧНОЇ ПРОФІЛАКТИКИ ХВОРОБИ ТЕШЕНА

С.В. Дерев'янка¹, Л.М. Решотко², Т.О. Бова³,
О.О. Дмитрук⁴, А.М. Головко⁵, В.В. Кацімон⁶

^{1, 2, 3} кандидати біологічних наук

⁵ доктор ветеринарних наук, професор, академік НААН

^{1, 2, 3, 4} Інститут сільськогосподарської мікробіології

та агропромислового виробництва НААН,

вул. Тараса Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна

^{5, 6} Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна

e-mail: ¹biopreparat@i.ua, ³tanya_bova@list.ru, ⁴oks.dmytruk@gmail.com,

⁵anatolii_golovko@mail.ru, ⁶ww12@yandex.ua

Надійшла 26.09.2017

Мета. Удосконалити засоби діагностики та специфічної профілактики хвороби Тешена відповідно до рекомендацій Міжнародного епізоотичного бюро.

Методи. Використано еталонні та виробничі штами тешовірусів свиней. Накопичення вірусів проводили в перещеплюваній культурі клітин нирки ембріона свині та нирки новонародженого сірійського хом'яка. У досліджах застосовували реакцію нейтралізації вірусу, реакцію імунофлюоресценції, імуноферментний аналіз, імунопероксидазну реакцію, полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією. **Результати.** На основі нового вітчизняного штаму *Teschovirus A* «Дніпровський-34» створено набори діагностикумів хвороби Тешена та інактивовану вакцину проти неї з характеристиками, які значно перевищують вітчизняні та закордонні аналоги. **Висновки.** Удосконалено засоби діагностики та специфічної профілактики хвороби Тешена.

Ключові слова: хвороба Тешена, полімеразна ланцюгова реакція, імуноферментний аналіз, імунопероксидазний метод, імунофлюоресцентний аналіз, вірус, вакцина.

Хвороба Тешена (тешовірусний енцефаломієліт, ензоотичний енцефаломієліт, Тешенська хвороба) свиней — одна з найнебезпечніших хвороб, збудником якої є тешовірус свиней першого серотипу, який належить до виду *Teschovirus A* (TV-A), роду *Teschovirus* родини *Picornaviridae* [1].

Ураження центральної нервової системи вірусом супроводжується негнійним запаленням мозку та його оболонок, призводить до розладу координації рухів, гіперстезії, судомних скорочень м'язів тулуба, прогресованих парезів і паралічів кінцівок у свиней. Захворюваність свиней на ензоотичний

енцефаломієліт коливається в межах від 14 до 90%, а в середньому становить 40%, із яких може загинути від 20 до 100% тварин [2].

Тешовіруси 2–6-, 9- і 10-го серотипів зумовлюють спорадичні спалахи енцефаломієлітів [3]. За клінічними та патолого-анатомічними ознаками захворювання, спричинені тешовірусами різних серотипів, не відрізняються одне від одного. Крім того, подібні симптоми характерні для хвороби Ауескі, класичної чуми свиней, гемаглютинаційного енцефаломієліту та інших інфекційних хвороб. Отже, вирішальне значення для встановлення остаточного діагнозу має лабораторна діагностика, яка включає виділення й ідентифікацію збудника та виявлення антитіл у сироватках крові свиней [4].

Одним із основних методів профілактики хвороби є щеплення тварин. Наявні нині живі та інактивовані вакцини проти хвороби Тешена з багатьох причин не можуть відповідати сучасним вимогам [5]. Основною вимогою до сучасних інактивованих вакцин є антигенна відповідність вакцинних штамів епізоотичним, відсутність реактогенності та формування в короткі терміни напруженого і тривалого імунітету.

Мета досліджень — удосконалити лабораторну діагностику хвороби Тешена на основі серологічних, імунологічних і молекулярно-генетичних методів відповідно до вимог Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ) та розробити інактивовану вакцину.

Матеріали та методи досліджень. У дослідженнях використано штами TV-A першого серотипу «Чернігівський-2372» та «Дніпровський-34», виділені на території України, еталонні штами TV-A першого серотипу Talfan, Tirol, Teschen 199 і штами TV-A 2–11-го серотипів O 3b, O 2b, PS 36, F 26, PS 37, F 43, UKG 173/74, VIR 2899/84, VIR 460/88, Dresden, штам *Sapelovirus A* (SV-A) V 13 та штами *Enterovirus G* (EV-G) UKG 410/73 та LP 54, надані професором Мальте Даубером (Німеччина), які зберігаються в колекції штамів вірусів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. Для розробки молекулярно-генетичних методів діагностики хвороби Тешена використано створені нами олігонуклеотидні видоспецифічні праймери до TV-A, SV-A та EV-G [6, 7].

Виділення та культивування вірусів проводили в перещеплюваних культурах клітин нирки ембріона свині (СНЕВ) і нирки новонародженого сірійського хом'яка (ВНК-21). Гіперімумні сироватки крові одержували на кролях за схемою, розробленою нами [8].

Реакцію нейтралізації вірусу (РН), імуноферментний аналіз (ІФА), реакцію імунофлюоресценції (РІФ), імунопероксидазну реакцію (ІПР), полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією (ЗТ ПЛР) проводили згідно з методичними рекомендаціями [9].

Результати досліджень. Для удосконалення та розробки нових діагностичних тест-систем використано штам «Дніпровський-34», здатний до репродукції в перещеплюваних культурах клітин СНЕВ та ВНК-21, де зумовлює цитопатичний ефект через 24–72 год і накопичується в титрі $7,0\text{--}8,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

За імунізації кролів одержано сироватки крові з титром віруснейтралізаційних антитіл не менше ніж 1:512. У результаті вивчення антигенних властивостей штаму «Дніпровський-34» у РН з еталонними штамами встановлено, що цей штам антигенно споріднений TV-A першого серотипу Talfan, Teschen 199, Tirol, Ч 2372 на 100% та не вступає в серологічні реакції з еталонними штамами інших серотипів — TV-A, SV-A та EV-G. Висока антигенна спорідненість епізоотичному й еталонним штамам TV-A і висока імуногенність зумовили відбір штаму «Дніпровський-34» як виробничого. За результатами комісійних випробувань штам «Дніпровський-34» депоновано в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів під реєстраційним номером 486 та отримано патент України на корисну модель [10].

За його використання розроблено набори діагностиків хвороби Тешена в РН, РІФ, ІФА та ІПР.

Набір діагностиків хвороби Тешена в РН використовується для ідентифікації вірусів, виділених від свиней, та виявлення віруснейтралізаційних антитіл у сироватках крові тварин. Передбачено проведення РН як традиційним, так і мікрометодом, що дає змогу зменшити використання реакційної

суміші в 10 разів. Облік результатів здійснюють на 4–5- і 7–8-й дні. Відсутність цитопатичної дії упродовж терміну спостереження свідчить про наявність у досліджених матеріалах вірусу чи антитіл до збудника хвороби Тешена.

З метою скорочення терміну постановки діагнозу розроблено тест-систему для експрес-діагностики на основі РІФ та ІПР. Тест-систему застосовують для ідентифікації збудника у мазках-відбитках головного та спинного мозку й ідентифікації вірусів, виділених від загинувших, вимушено забитих у стадії парезу і паралічу хворих тварин. Облік результатів РІФ проводять за допомогою люмінесцентного мікроскопа. У позитивних випадках виявляють специфічне світіння у вигляді яскраво-зеленої блискучої люмінесценції клітин за відсутності світіння на скельцях з негативною сироваткою. Облік результатів ІПР здійснюють візуально або під оптичним мікроскопом. У позитивних випадках виявляють жовтуваті або коричневі кристали. Розроблені тест-системи дають змогу встановити діагноз упродовж кількох годин.

За використання штаму «Дніпровський-34» розроблено діагностичну тест-систему ІФА для виявлення імуноглобулінів класу G до збудника хвороби Тешена в сироватках крові свиней. На одному планшеті можна досліджувати 22 зразки в 4-х повторях. Облік результатів проводять на рідері за 450 нм/620 нм. Термін встановлення діагнозу — близько 8 год.

Для видової ідентифікації збудника ензотичного енцефаломієліту розроблено набір діагностиків для ЗТ ПЛР на основі розроблених нами олігонуклеотидних праймерів:

Sense Primer: **TeschoF51 5'- CCAGCAGCC-TCTGTTTCAGAAAG,**

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

Праймери фланкують ділянку молекули РНК довжиною 650 нуклеотидних залишків, починаючи з 5271 по 5908 нуклеотид (AF296096). Їх ідентичність для всіх тешовірусів свиней за результатами аналізу банку генів становить 100%.

Ампліфікацію специфічних ділянок кДНК інфекційних агентів проводили за програмами (таблиця). Детекцію продуктів реакції — за допомогою електрофорезу в 1,5%-му

Програма ампліфікації специфічної ділянки кДНК

№ циклу	Температура ампліфікації тешовірусів свиней, °C	Час, хв.	Кількість циклів
1	95	5	1
2	94	1	5
	58	1	
	74	1	
3	94	0,5	35
	58	0,5	
	73	0,5	
4	72	5	1
5	Зберігання		

агарозному гелі, забарвленому бромідом етидію з використанням трис-боратного буфера за градієнта напруги 10 В/см.

Результати оцінювали під час перегляду гелю після електрофорезу на транслюмінаторі під УФ-світлом, коли є (або немає) червоно-помаранчевих фрагментів ДНК певного розміру. Специфічність ампліфікованого фрагмента ДНК визначали за його розміром щодо фрагментів стандартних маркерів. Час встановлення діагнозу — близько 8 год.

Під час комісійних досліджень підтверджено високу специфічність і чутливість розроблених тест-систем. Розроблені нами засоби діагностики дають змогу в короткий термін встановити діагноз відповідно до рекомендацій МЄБ.

На основі штаму TV-A першого серотипу «Дніпровський-34» розроблено інактивовану вакцину для специфічної профілактики хвороби Тешена свиней та проведено її комісійні випробування. Одноразове введення вакцини в дозі 2 см³ сприяє формуванню специфічного імунітету у свиней до збудника хвороби Тешена вже на 7-му добу і зберігається упродовж 11 міс. Максимальний рівень віруснейтралізаційних антитіл у крові щеплених тварин на 60-ту добу сягав 1:8192. Середньгеометричний титр антитіл становить 1:512, що забезпечує захист вакцинованих поросят навіть за інтрацеребрального введення 10-ти летальних доз контрольного епізоотичного високовірulentного штаму хвороби Тешена свиней «Чернігівський-2372».

Висновки

Удосконалено засоби діагностики та специфічної профілактики хвороби Тешена. Відповідно до вимог МЕБ пропонуємо внести зміни до чинної «Інструкції про заходи з профілактики та боротьби з ензоотичним енцефаломієлітом (хворобою Тешена) свиней», а саме: рекомендувати для діагностики застосування

тест-систем на основі імуногістохімії, твердофазного імуноферментного аналізу та видової ідентифікації збудника в полімеразній ланцюговій реакції зі зворотною транскрипцією. Відповідно до сучасної номенклатури та таксономії вірусів потрібно змінити назву збудника хвороби.

Деревянко С.В.¹, Решотко Л.Н.², Бова Т.А.³, Дмитрук О.А.⁴, Головко А.Н.⁵, Кацимон В.В.⁶

^{1, 2, 3, 4} Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, ул. Тараса Шевченка, 97, г. Чернігов, 14027, Україна, ^{5, 6} Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов, ул. Донецкая, 30, г. Киев, 03151, Україна; e-mail: ¹ biopreparat@i.ua, ³ tanya_bova@list.ru, ⁴ oks.dmytruk@gmail.com, ⁵ anatolii_golovko@mail.ru, ⁶ ww12@yandex.ua

Усовершенствование средств диагностики и специфической профилактики болезни Тешена

Цель. Усовершенствовать средства диагностики и специфической профилактики болезни Тешена в соответствии с рекомендациями Международного эпизоотического бюро. **Методы.** Используются эталонные и производственные штаммы тешовирусов свиней. Накопление вирусов проводили в перевиваемых культурах клеток почки эмбриона свиньи и почки новорожденного сирийского хомяка. В опытах применяли реакцию нейтрализации вируса, реакцию иммунофлюоресценции, иммуноферментный анализ, иммунопероксидазную реакцию, полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией. **Результаты.** На основе нового отечественного штамма *Teschovirus A* «Днепровский-34» созданы наборы диагностикумов болезни Тешена и инактивированная вакцина против нее с характеристиками, значительно превышающими отечественные и зарубежные аналоги. **Выводы.** Усовершенствованы средства диагностики и специфической профилактики болезни Тешена.

Ключевые слова: болезнь Тешена, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, иммунопероксидазный метод,

иммунофлюоресцентный анализ, вирус, вакцина.

Derevianko S.¹, Reshotko L.², Bova T.³, Dmytruk O.⁴, Holovko A.⁵, Katsymon V.⁶

^{1, 2, 3, 4} Institute of agricultural microbiology and agroindustrial production of NAAS, Taras Shevchenko Str., 97, Chernihiv, 14027, Ukraine; ^{5, 6} State scientific-and-control institute of biogeotechnology and strains of microorganisms, Donetska Str., 30, Kyiv, 03151, Ukraine; e-mail: ¹ biopreparat@i.ua, ³ tanya_bova@list.ru, ⁴ oks.dmytruk@gmail.com, ⁵ anatolii_golovko@mail.ru, ⁶ ww12@yandex.ua

Improvement of diagnostic tools and specific prophylaxis of Teshen disease

The purpose. To update diagnostic means and methods of specific prophylaxis of Teshen disease according to recommendations of International epizootic bureau. **Methods.** Reference and production strains of Tesho-virus of pigs are used. Accumulation of viruses was carried out in re-vaccinating cultures of kidney cells of an embryo of pig and newborn Syrian hamster. In experiments they used virus neutralization reaction, immunofluorescence, immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay, polymerase chain reaction with reverse transcription. **Results.** Sets of diagnosticums of Teshen diseases and inactivated vaccine against it with the characteristics which considerably exceeding domestic and foreign analogues are created on the basis of new domestic strain *Teschovirus A* «Dneprovskii-34». **Conclusions.** Diagnostic means and methods of specific prophylaxis of Teshen disease are updated.

Key words: Teshen disease, polymerase chain reaction, immunofluorescence analysis, immunoperoxidase method, immunofluorescence analysis, virus, vaccine.

Бібліографія

1. *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The Online (10th) Report of the ICTV (2017)* URL: <https://talk.ictvonline.org/>

ictv-reports/ictv_online_report/

2. Романенко В.Ф., Сорока В.И., Прусс О.Г. Рекомендации по диагностике и мерам борьбы

с энзоотическим энцефаломиелитом (болезнь Тешена) свиней. Киев, 1992. 17 с.

3. Witte von K.H., Auerbach J., Loss K.U., Neuhaus S., Prager D. Typisierung von 17 porzinen Enterovirusisolate aus Polioenzephalomyelitisfällen der Jahre 1983–1991. *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1994. V. 101. P. 453–492.

4. OIE. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines. 6 Ed. Paris, 2008. 957 p.

5. Бузун А.И., Бабкин М.В. Подтиповые различия среди штаммов и изолятов возбудителя болезни Тешена. *Ветеринарна медицина*. 2000. Т. 78. С. 23–28.

6. Головки А.М., Дерев'янка С.В., Бова Т.О. та ін. Конструювання видоспецифічних праймерів для молекулярно-генетичної ідентифікації тешовірусів та ентеровірусів А і В. *Сільськогосподарська мікробіологія: міжвід. темат. наук. зб.* Чернівці: ЦНТЕІ, 2009. Вип. 10. С. 156–165.

7. Головки А.М., Кацімон В.В., Дерев'янка С.В. та ін. Молекулярно-генетична ідентифікація тешовірусів та ентеровірусів свиней А і В. *Вісн.*

аграр. науки. 2011. № 11. С. 33–37.

8. Волкова І.В., Бова Т.О., Дерев'янка С.В. Спосіб одержання гіперімунної сироватки крові до вірусів тварин і рослин: пат. 58734 Україна: МПК G01N 33/53 (2006.01). Заявник і патентовласник Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН. № u201011151; заявл. 17.09.2010; опубл. 26.04.2011, Бюл. № 8.

9. Бова Т.О., Сорока В.І., Дерев'янка С.В. та ін. Методичні рекомендації з вірусологічного моніторингу ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней. Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, Чернівці: ЧДЦНІІ. 2014. 19 с.

10. Дерев'янка С.В., Сорока В.І., Бокун А.О. та ін. Штам *Porcine teschovirus* для виробництва ветеринарних імунобіологічних препаратів: пат. 57372 Україна: МПК (2011.01) C12N 7/00, A61K 39/125, A61K 39/187 (2011.01), C12R 1/92 (2006.01). Заявник і патентовласник Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН. № u201009325; заявл. 26.07.2010; опубл. 25.02.2011. Бюл. № 4.