

УДК 619:616.98-089

О. М. НЕВОЛЬКО, кандидат ветеринарних наук

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (м. Київ)

ДІАГНОСТИКА АФРИКАНСЬКОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ

Представлено результати лабораторних досліджень при виникненні першого випадку захворювання свиней на африканську чуму свиней (АЧС) в с. Камишуватка, Приморського району, Запорізької області. Визначено форму перебігу захворювання. Проведено генотипування збудника АЧС, що викликав спалах захворювання.

Ключові слова: африканська чума свиней, діагностика, свині, ОІЕ, ІФА, полімеразна ланцюгова реакція, генотипування.

Постановка проблеми. Африканська чума свиней в останні десятиріччя завдає свинарству всього світу тривог постійними загрозами світової експансії, розширенням ареалу захворювання. Поява збудника цієї хвороби у свинарських господарствах призводить до катастрофічних наслідків, паралізує галузь на тривалий час, завдає великих економічних збитків господарствам, а людям – моральних переживань та стресів [1].

Африканська чума свиней (АЧС, хвороба Монтгомері, східно-африканська чума, *Pestis Africana suum*, *Africana swine fever*, африканська лихоманка свиней) – високо контагіозна хвороба свиней, що характеризується гарячкою, геморагічним діатезом, значними крововиливами, дистрофічно-некротичними змінами у внутрішніх органах, надзвичайно високою смертністю. Хвороба може мати надгострий, гострий, підгострий, хронічний і латентний перебіг (найчастіше надгострий і гострий) [2].

У природних умовах хворіють дикі та свійські свині незалежно від породи, віку та пори року [3].

Згідно з даними МЕБ з початку 2012 року АЧС зареєстровано в 5 країнах світу: Російській Федерації, Україні, Центрально-Африканській Республіці, Танзанії, Південно-Африканській Республіці. В Україні останній випадок на АЧС реєструвався в 1977 році в шістьох районах Одеської області та м. Одеса [4].

Мета роботи. Встановити діагноз на АЧС в осередку виникнення захворювання в с. Камишуватка, Приморського району, Запорізької області в липні 2012 року. Після виділення вірусу африканської чуми свиней (ВАЧС) провести його генетичне типування, визначити ступінь вірулентності.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження проводились у липні - серпні 2012 року у Приморській державній районній лабораторії ветеринарної медицини, Запорізькій регіональній державній лабораторії ветеринарної медицини, Державному науково-дослідному інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, референс-лабораторії Європейського Союзу з діагностики африканської чуми свиней – Науково-дослідному центрі охорони здоров'я тварин, Національного інституту з досліджень і технологій, сільського господарства і продовольства (CISA-MIC) м. Мадрид та особистому приватному господарстві с. Камишуватка, Приморського району, Запорізької області.

Використовували епізоотологічні та клінічні дані, патологоанатомічні зміни виявлені під час розтину загинувших тварин, інформацію по комплексу лабораторно-діагностичних досліджень:

Вірусологічна діагностика АЧС:

Виявлення геному вірусу АЧС. ДНК була екстрагована з 10 % очищеної, гомогенізованої суспензії селезінки в фосфатно-буферному сольовому розчині, використовуючи High Pure template extraction kit, виробник ROCHE, згідно інструкції виробника. Для ампліфікації геномної ДНК вірусу АЧС використовували ОІЕ звичайну ПЛР і ОІЕ-ПЛР в режимі реального часу. Досліджували не розведену і розведену (1:10) ДНК. Зразки досліджували в дублікатах.

Виявлення антигену вірусу АЧС за допомогою ІФА. Для виявлення антигену вірусу АЧС досліджували нерозведену і розведену (1:10) гомогенізовану селезінку використовуючи Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA test (INGENASA-INGEZIM PPA DAS K2) згідно інструкції виробника.

Ізоляція і титрація вірусу АЧС з використанням методу гемадсорбції. Метод гемадсорбції виконували на плашках, використовуючи феномен адсорбції еритроцитів на моноцитах крові, інфікованих вірусом АЧС. Моноцити крові свині інокулювали розведеною 1:10, гомогенізованою селезінкою (18 лунок, 10 мкл інокуляту на лунку). Після інокуляції в кожну лунку додавали приготовленої 1% суспензії в фосфатно-буферному сольовому розчині гомологічних еритроцитів і інкубували при 95 % відносній вологості, 5 % CO₂, 37 ° С. Для виявлення гемадсорбції за реакцією в плашці спостерігали впродовж 5 днів. Титрацію виконували шляхом інокулювання моноцитів крові свині граничними розведеннями гомогенізованої селезінки. Титр оцінювали використовуючи метод Ріда і Менча (1938) і виражали, як 50 % гемадсорбуючих доз на мл (HAD_{50/ml}).

Серологічна діагностика АЧС.

Для виявлення антитіл до вірусу АЧС досліджували ексудат з селезінки використовуючи ОІЕ-indirect ELISA з подальшим підтвердженням результатів за допомогою ОІЕ – імуноблотингу і непрямого імунопероксидазного методу [5].

Молекулярна характеристика вірусу АЧС.

Генетична характеристика ізоляту вірусу АЧС була виконана за допомогою ПЛР з подальшим секвенуванням трьох незалежних ділянок геному вірусу АЧС, які валідовані для генотипування ізолятів АЧС. Ці ділянки включають:

- 1) С-термінальний кінець гену, який кодує протеїн VP72, і за допомогою якого диференціюють до 22 окремих генотипів [6];
- 2) повна геномна послідовність гену р54 [7];
- 3) центральна варіабільна ділянка гену В602L [8].

Ізоляти вірусу АЧС з Armenii (Ar07) і Azerbaijan (Az08D), які належать до генотипу II (FAO, 2009) були включені, як контролю.

Результати досліджень. З повідомлення Головного управління ветеринарної медицини в Запорізькій області стало відомо, що у Приморському районі в приватному подвір'ї с. Комишуватка було виявлено захворювання свиней.

Встановлено, що в період з 21. 07. 2012 року по 29.07.2012 року в приватному подвір'ї загинуло 2 свиноматки і одна восьмимісячна свиня. Під час хвороби спостерігались клінічні ознаки – лихоманка, аборти, відмова від корму. Лікування проводилося антибіотиками самостійно власником тварин, але позитивних результатів не отримано.

При патологоанатомічному розтині трупу останньої загинувшої восьмимісячної свині виявлено: тварина середньої вгодованості, шкірні покриви без змін,

кров'яних виділень з отворів не виявлено. Серце без патологоанатомічних змін, легені набряклі, кровонаповнені з ознаками серозно-геморагічної пневмонії, селезінка збільшена, дрябла, темно-вишневого кольору, по краям печінки крововиливи, жовчний міхур збільшений, заглоткові лімфовузли збільшені, мармурові на розрізі. У грудній та черевній порожнинах спостерігалось накопичення жовтуватого-червоного ексудату. Під час розтину були відібрані шматочки серця, печінки, легень, селезінки, лімфатичні вузли привушні та заглоткові.

Крім того на момент загибелі третьої свині у подвір'ї залишалось ще дві восьмимісячні свині. При проведенні термометрії температура в однієї свині $41,2^{\circ}\text{C}$, в другій $38,9^{\circ}\text{C}$, спостерігалася відмова від корму. Шкірні покриви були без змін. Проносу і блювання у загиблих і хворих тварин не спостерігалось.

Всі загиблі і хворі свині піддавалися лікуванню антибіотиками (пеніцилін, стрептоміцин, біцилін 5, цефтриаксон, цефазолін, амоксицилін, фармазін 50) згідно інструкцій до них, також робили ін'єкції: аналгін, преднізолон, диклофенак, дімедролу.

У Приморській РДЛВМ при дослідженні патологічного матеріалу було виключено захворювання на сибірку. Гематологічне дослідження 2 зразків крові від 8 місячних свиней в Приморській РДЛВМ та Запорізькій РегДЛВМ вказало на лейкопенію. В зразках нараховувалось 4.0-4.2 тис лейкоцитів на мм кубічний., при нормі 10-21 тис. При дослідженні в Запорізькій регіональній державній лабораторії ветеринарної медицини на АЧС 30.07.2012 мазків відбитків з внутрішніх органів, пофарбованих ФИТЦ ИД виявлено світіння, характерне для АЧС оцінка реакції на +++ (рис. 1). Для діагностики використовувався набір «Специфические ФИТЦ-имуноглобулины для имунофлуоресцентной диагностики африканской чумы свиней» виробництва ГНУ ВНИИ вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии, м.Покров, Володимирської обл., Російської Федерації. Крім того, з метою диференційної діагностики були виключені бешиха, пастерельоз, сальмонельоз.

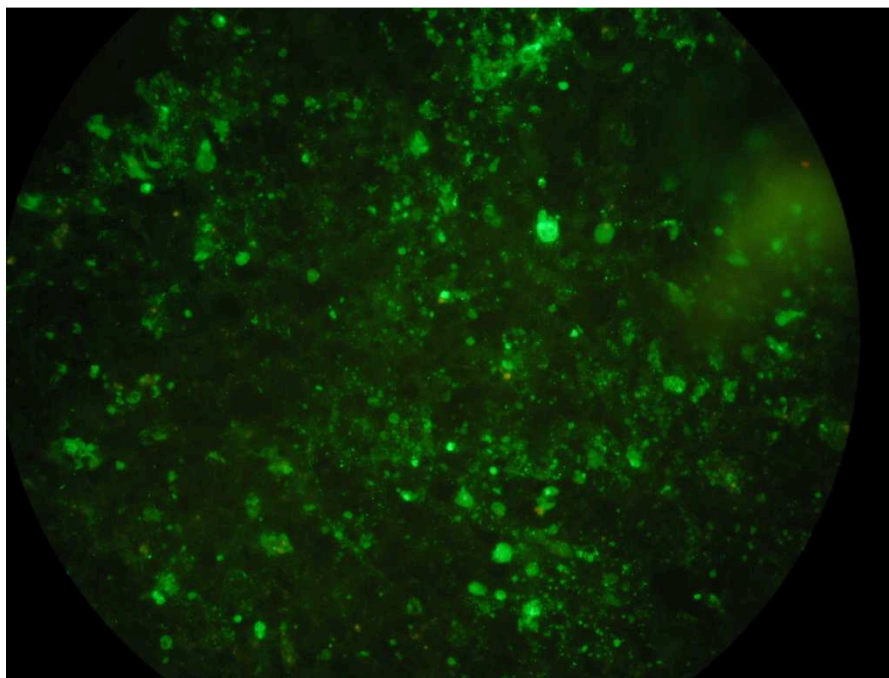


Рис. 1. Результати люмінесцентної мікроскопії при дослідженні МФА.

Для підтвердження діагнозу паталогічний матеріал було доставлено до Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи 31.07.2012 р.

Дослідження проводили на приладі для полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (ПЛР-РЧ) Rotor-Gene 3000. При дослідженні використовували діагностичний набір для виявлення вірусу АЧС методом ПЛР РЧ «АЧС ПЦР-комплект FRT» виробництва «ФБУН ЦНИИ Эпидемиология Роспотребнадзора г. Москва, РФ. Для контролю використовували також сертифікований референс-матеріал інактивованого вірусу АЧС, наданий Італійською Національною лабораторією з діагностики хвороб свиней. В результаті проведення діагностичного дослідження паталогічного матеріалу методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу було виявлено ДНК вірусу африканської чуми свиней в 14 зразках від печінки, серця, селезінки, лімфатичних вузлів 8 місячної загинувшої свині. З метою диференціальної діагностики методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу виключено класичну чуму свиней.

За результатами аналізу епізоотичних та клінічних даних, патолого-анатомічних змін та результатів лабораторних досліджень в Запорізькій області, Приморському районі с. Комишуватка було встановлено захворювання свиней на африканську чуму свиней.

На виконання «Плану дій при підозрі захворювання (загибелі) свиней на африканську чуму свиней» Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи направив для підтвердження на АЧС зразок паталогічного матеріалу в одну з референс-лабораторій Європейського Союзу з діагностики африканської чуми свиней – Науково-дослідного центру охорони здоров'я тварин, Національного інститут з досліджень і технологій, сільського господарства і продовольства(CISA-NIC) м. Мадрид.

Присутність вірусу АЧС в отриманому зразку була підтверджена через 24 години прописаними МЕБ методами: ПЛР [5] ІФА (@INGENASA-INGEZIM PPA DAS K2) і ізоляцією вірусу на переферійних макрофагах крові свиней з отриманням специфічної для АЧС гемадсорбції [5]. Титр ізолюваного в Україні вірусу АЧС становив 3.1×10^8 50% гемадсорбуючих доз на мілілітр ($\text{HAD}_{50/\text{ml}}$) і був встановлений на переферійних макрофагах крові шляхом граничних розведень, використовуючи метод Ріда і Менча (1938). Специфічних антитіл до вірусу АЧС не було виявлено в ексудаті з селезінки, який був досліджений прописаним МЕБ серологічним непрямым ІФА і імуноблотингом [5]

Генетичну характеристику проводили, на вірусній ДНК, екстрагованій з гомогенізованої селезінки, секвенуванням трьох незалежних ділянок вірусу АЧС:

- 1) 478 пн С-термінальний кінець гену, який кодує протеїн VP72, і за допомогою якого диференціюють до 22 окремих генотипів
- 2) повна геномна послідовність гену р54
- 3) центральна варіабільна ділянка гену B602L

Тринадцять ізолятів ВАЧС генотипу II отриманих від диких і домашніх свиней починаючи з 2007 року і які є доступними в банку Референт лабораторії Європейського Союзу були включені в дослідження, як контролю (Таблиця 1).

Ізоляти вірусу АЧС вибрані для генотипування і отримані від спалахів хвороби в східній Європі починаючи з 2007 р. включаючи ізолят, який характеризується в даному дослідженні

Ізолят		Джерело (Регіон)	Господар хвороби	Дата початку спалаху хвороби
ВАЧС	Країна			
Abk07	Грузія	Abkhazia Republic Gulripish	Домашня свиня	04/07/2007
Arm07	Арменія	Dilijan town	Домашня свиня	07/08/2007
Che07	Росія	Chechnya Republic Shatoysky	Європейський дикий кабан	04/12/2007
Az08D	Азербайджан	Qebele district	Домашня свиня	22/01/2008
Az08B	Азербайджан		Домашня свиня	22/01/2008
Ing08	Росія	Ingushetia Republic Sunzhensky	Європейський дикий кабан	21/07/2008
Oren08	Росія	Orenburg Chernorechye	Домашня свиня	10/07/2008
NO08/Av	Росія	Republic North Osetia Vladikawkaz	Домашня свиня	18/07/2008
NO08/Ar	Росія	Republic North Osetia Prigorodni	Домашня свиня	21/07/2008
Dagestan09	Росія	Tarumovsky, Respublika Dagestan	Європейський дикий кабан	11/09/2009
StPet09	Росія	Kirovsky, Leningradskaya Oblast	Домашня свиня	01/10/2009
Kalmykia09	Росія	Yashaltinsky, Kalmykiya-Khal'mg Tangch	Домашня свиня	10/10/2009
Rostov09	Росія	Krasnosulinsky, Rostovskaya Oblast	Домашня свиня	20/10/2009
Ukr12/Zapo	Україна	Zaporozhye region	Домашня свиня	30/07/2012

Три вірусних геномних сегмента ампліфікованих ПЛР з ізоляту ВАЧС (названого як Ukr12/Zapo) були ідентичними до всіх вірусів вздовж 478 пн С-кінця гена р72 і 558 пн всієї довжини гена р54. Отримані нуклеотидні і амінокислотні послідовності були порівняні з гомологічними послідовностями, доступними в ГенБанку щонайменше від 1 вірусу з кожного 22 (I-XXII) р72 описаних генотипів [6]. Філогенетичне дерево з корнем мінімальної еволюції було побудоване використовуючи програму MEGA (v5.0) з використанням моделі р-відстані нуклеотидних замін. На основі філогенетичного аналізу український ізолят ВАЧС можна віднести до генотипу II разом з Кавказьким, Магадаскарським, Мозамбіцьким і Мавріцьким ізолятами. (Рис. 2). Такий самий результат було отримано при проведенні філогенетичного аналізу на основі гену р54.

Використання С-термінального кінця протеїну р72 і цілого гену р54 є достатнім для віднесення ізоляту вірусу АЧС до більшості попередньо визначених генотипів, центральна варіабельна ділянка, яка характеризується присутністю тандемних повторів послідовностей є найкращою ділянкою геному коли необхідно визначити джерело і карту поширення близькоспоріднених вірусів. Для цього ДНК з зразка було ампліфіковано з використанням набору праймерів CVR1/CVR2 і отримано ПЛР амплікон =200 пн, який по величині і послідовності

відповідає іншим ізолятам генотипу II. Подальшим секвенуванням було виявлено 10 копій тандемних повторів послідовностей (тип VNDBNDBNAA) унікальних для групи вірусів, які циркулюють в кавказькому регіоні починаючи з 2007 [9].

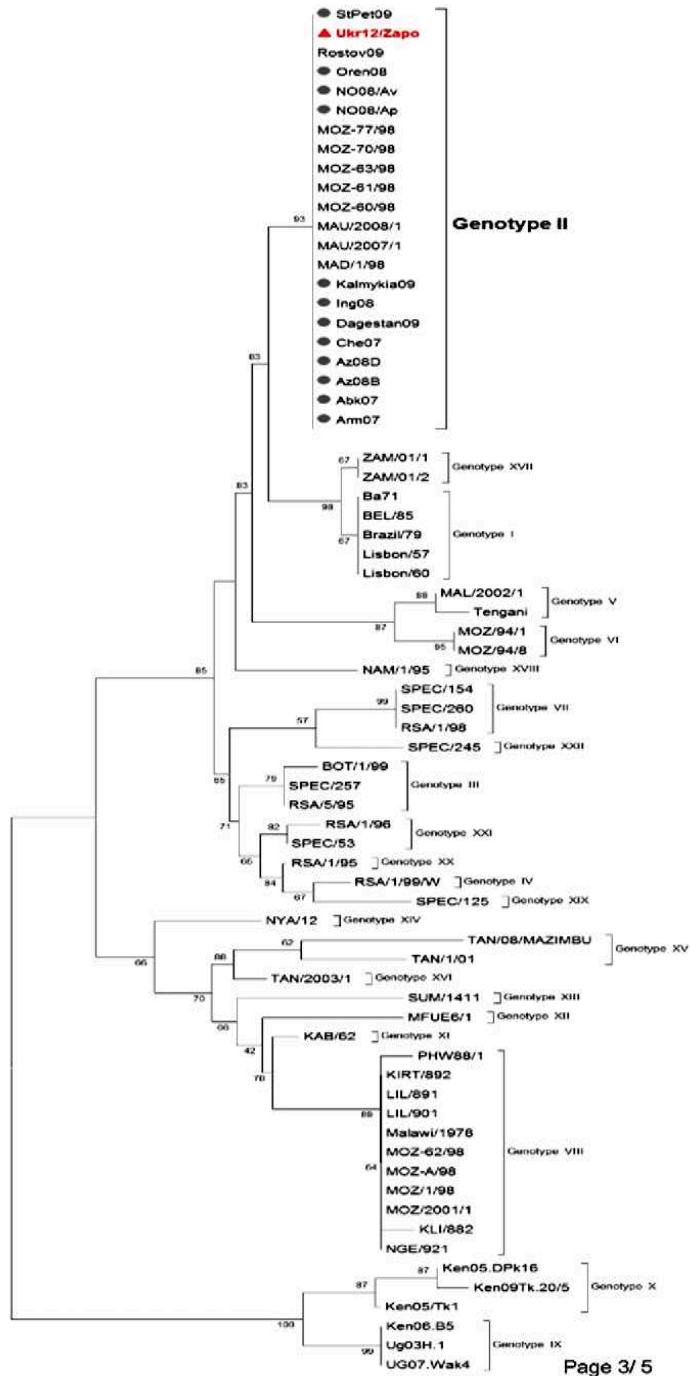


Рис. 2. Філогенетичне дерево мінімальної еволюції Українського ізоляту 2012 ВАЧС (Ukr12/Zapo) на основі С-термінального кінця протеїну р72 відносно 22 р72 генотипів (позначенні, як I-XXII), який включає в себе 71 нуклеотидну

послідовність. Український 2012 ізолят ВАЧС, генотипування якого проводили в даному дослідженні позначений червоним кольором (▲), Кавказькі ізоляти ВАЧС отримані з 2007 по 2009 позначені сірим кольором (●).

Висновки:

1. Присутність вірусу АЧС була підтверджена ізоляцією вірусу з клінічного матеріалу з спалаху хвороби в Запорізькій області в липні 2012.

2. Клінічні ознаки в уражених свиней характеризувалися швидкою загибеллю і лихоманкою з не специфічними для АЧС пошкодженнями, це типово для гострої форми хвороби, яка викликається високовірулентними ізолятами вірусу АЧС.

3. Високий титр вірусу, який був в зразках, разом з відсутністю специфічних антитіл в ексудаті з органів відповідає клінічним спостереженням, які підтверджують властивість високовірулентного вірусу, який викликав спалах хвороби. Не виявлення антитіл найбільш вірогідно було в результаті загибелі свиней до розвитку гуморальної імунної відповіді до детектуючого рівня.

4. Секвенування трьох незалежних ділянок геному вірусу АЧС [5] показало, що ізолят ВАЧС був на 100% гомологічний з ізолятами, які викликали спалахи хвороби в східній Європі починаючи з занесення вірусу в Грузію в 2007, і дало можливість віднести штам вірусу, який викликав хворобу до генотипу II.

5. Спільність генотипу дозволяє припустити, що вірус АЧС був занесений з Російської Федерації.

Список використаної літератури

1. *Загребельний В. О.* Африканська чума свиней: ризики та загрози./ Загребельний В. О., Вержиковський О. М., Неволько О. М., Прискока В.А.// – Здоров'я тварин і ліки. – 2012. - №2. – С.16 -18.

2. *Каришева А. Ф.* Африканська чума свиней / [А. Ф.Каришева] // Спеціальна епізоотологія. – К., Вища освіта, 2002, - С. 333-334.

3. *Сюрин В. Н.* Вирусные болезни животных /В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьев, Н. В. Фомина//. – М.; ВНИТИБП, 1998. – С.770-787.

4. *Пустовіт І.* Епізоотичний стан Одеської області з африканської чуми свиней у 1977 р., /Пустовіт І., Бучанський М. // Вет.мед. України, - 2007.- №1. С. 26-31, 41-45.

5. *OIE.* May 2012, posting date. Chapter 2.8.1. African swine fever. In Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2012. World Organization for Animal Health, Paris, France. <http://www.oie.int/fileadmin>.

6. *Boshoff C. I.* Genetic characterization of African swine fever vsruses from outbreaks in southern Africa (1973-1999)/ Boshoff C. I., Bastos A. D., Gerber L. J., Vosloo W. //Vet Mskrobiol. – 2007. – P. 45-55.

7. *Gallardo C.* Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB6021(CVR) genes. / Gallardo C., Mwaengo D. M., Macharia J. M., Arias M., Taracha E. A., Soler A., Okoth E., Martin E., Kasiti J., Bishop R. P. //Virus Genes 38- 2009, P.85-95.

8. *Gallardo C.* African swine fever virus p72 genotype IX in domestic pigs, Congo./ Gallardo C., Anhuero R., Pelayo V., Poudeyvigne F., Leon T. et all. // Emerg infect Dis. Aug 2011; 17(8):1556-8.

9. *Rowlands R. S.* African swine fever virus isolate, Gorgia,2007./ Rowlands R. S., Michaud V., Heath L., Hutchings G., Oura C., Vosloo W. // Emerg infect Dis 14, 2008. P.1870-1874.

ДИАГНОСТИКА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ / О. М. Неволько

Представлены результаты лабораторных исследований при возникновении первого случая заболевания свиней на африканскую чуму свиней (АЧС) в с. Камышеватка, Приморского района, Запорожской области. Определена форма протекания заболевания. Проведено генотипирование возбудителя АЧС вызвавшего вспышку заболевания.

Ключевые слова: африканская чума свиней, диагностика, свиньи, ОИЕ, ИФА, полимеразная цепная реакция.

DIAGNOSIS OF AFRICAN SWINE FEVER / O. M. Nevolko

The results of laboratory studies at the first case of African swine fever (ASF) in Kamyshevotka village, Primorsky District, Zaporozhye region. The form of the disease is determined. ASF agent that caused the outbreak is genotyped.

Keywords: African swine fever, diagnostics, swine, OIE, ELISA, PCR.

Рецензент – доктор ветеринарных наук В. А. Прискока