

УДК 619:616-07:57.083

ДЕРЕВ'ЯНКО С.В., канд.біол.наук, с.наук.сп., e-mail: biopreparat@i.ua

РЕШОТЬКО Л.М., канд.біол.наук, e-mail: reshotkol@ukr.net

ДМИТРУК О.О., e-mail: oks.dmytruk@gmail.com

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН,

ГОЛОВКО А.М., д-р вет. наук, проф., член-кор. НААН, e-mail: admin@biocontrol.com.ua

КАЦИМОН В.В., e-mail: ww12@yandex.ua

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

УДОСКОНАЛЕННЯ СИСТЕМИ ДІАГНОСТИКИ ТА СПЕЦИФІЧНОЇ ПРОФІЛАКТИКИ ТЕШОВІРУСНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ СВИНЕЙ (ХВОРОБИ ТЕШЕНА)

*Удосконалено систему діагностики та специфічної профілактики хвороби Тешена відповідно до рекомендацій Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ). На основі нового вітчизняного штаму *Teschovirus A* першого серотипу Дніпровський-34 створено набори діагностикумів хвороби Тешена в реакція нейтралізації, імунофлюоресценції, імунопероксидазній реакції та в імуноферментному аналізі. Для видової ідентифікації збудника вперше розроблено вітчизняний набір діагностикумів в полімеразній ланцюговій реакції зі зворотною транскрипцією. Створено інактивовану вакцину проти хвороби Тешена з характеристиками, які значно перевищують вітчизняні та закордонні аналоги. Відповідно до рекомендацій МЕБ необхідно 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.*

Ключові слова: *тешовірус, енцефаломієліт свиней, діагностика, інактивована вакцина.*

Вступ. Тешовірусний енцефаломієліт свиней (ензоотичний енцефаломієліт, хвороба Тешена, Тешенська хвороба) свиней одна з найбільш небезпечних хвороб, збудником якої є *Porcine teschovirus* першого серотипу, який відповідно до останніх змін внесених Міжнародним комітетом з таксономії вірусів належить до виду *Teschovirus 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, прогресуючих парезів і паралічів кінцівок у свиней. Захворюваність свиней на ензоотичний енцефаломієліт коливається в межах від 14 до 90 %, а в середньому – до 40 %, із яких може загинути від 20 % до 100 % [2].

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

Одним із основних методів профілактики хвороти є щеплення тварин. Існуючі на сьогодні живі та інактивовані вакцини проти хвороби Тешена по багатьом параметрам 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 та довготривалого імунітету.

Мета роботи. Удосконалити лабораторну діагностику хвороби Тешена на основі серологічних, імунологічних та молекулярно-генетичних методів відповідно до рекомендацій Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ), розробити інактивовану вакцину з високими споживчими характеристиками, та запропонувати зміни до чинної «Інструкції про заходи з профілактики та боротьби з ензоотичним енцефаломієлітом (хворобою Тешена) свиней».

Матеріали і методи досліджень. В роботі використано штами *Teschovirus A* першого серотипу Чернігівський-2372 та Дніпровський-34, виділені на території України, еталонні штами *Teschovirus A* (попередня видова назва *Porcine teschovirus*) першого серотипу Talfan, Tirol, Teschen 199 та штами *Teschovirus A* 2-11 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* (попередня видова назва *Porcine sapelovirus*) V 13 та штами *Enterovirus G* (попередня видова назва *Porcine enterovirus B*) 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 *Teschovirus A Sapelovirus A, Enterovirus G* [6].

Виділення та культивування вірусів проводили в перещеплюваних культурах клітин нирки ембріону свині (СНЕВ) та нирки новонародженого сірійського хом'яка (ВНК-21). Гіперімунні сироватки крові одержували на кролях за схемою розробленою нами [7].

Реакцію нейтралізації вірусу (РН), імуноферментний аналіз (ІФА), реакцію імунофлюоресценції (РІФ), імунопероксидазну реакцію (ІПР), полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією (ЗТ ПЛР) проводили згідно методичних рекомендацій [8].

Результати досліджень та їх обговорення. Для удосконалення та розробки нових діагностичних тест-систем використано штам Дніпровський-34, здатний до репродукції в перещеплюваних культурах клітин СНЕВ та ВНК-21, де викликає цитопатичний ефект через 24-72 години, і накопичується в титрі 7,0-8,5 Іг ТЦД₅₀/см³.

При імунізації кролів одержано сироватки крові з титром віруснейтралізуючих антитіл не менше ніж 1:512. В результаті вивчення антигенних властивостей штаму Дніпровський-34 в РН з еталонними штамами встановлено, що зазначений штам антигенно споріднений *Teschovirus A* Talfan, Teschen 199, Tirol, Ч 2372 на 100% та не вступає в серологічні реакції з еталонними штамами інших серотипів *Teschovirus A, Sapelovirus A* та *Enterovirus G*. Висока антигенна спорідненість епізоотичному й еталонним штамам *Teschovirus A* та висока імуногенність обумовили відбір штаму Дніпровський-34 як виробничого. За результатами комісійних випробувань штаму Дніпровський-34 депоновано в депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів під реєстраційним номером 486 та отримано патент України на корисну модель [9].

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 віруснейтралізуючих антитіл в сироватках крові тварин. Передбачено проведення РН як традиційним, так і мікрометодом, що дозволяє зменшити використання реакційної суміші в 10 разів. Облік результатів здійснюють на 4-5 і 7-8 дні. Відсутність цитопатичної дії впродовж терміну спостереження свідчить про наявність в досліджених матеріалах вірусу чи антитіл до збудника хвороби Тешена.

З метою скорочення терміну постановки діагнозу розроблено тест-системи для експрес діагностики на основі РІФ та ІПР. Тест-системи застосовують для ідентифікації збудника у мазках-відбитках головного та спинного мозку та ідентифікації вірусів, виділених від загиблих, вимушено забитих у стадії парезу та паралічу хворих тварин. Облік результатів РІФ проводять за допомогою люмінесцентного мікроскопа. У позитивних випадках виявляють специфічне світіння у вигляді яскраво-зеленої блискучої люмінесценції клітин при відсутності світіння на скельцях з негативною сироваткою. Облік результатів ІПР проводять візуально або під оптичним мікроскопом. У позитивних випадках спостерігається наявність жовтуватих або коричневих кристалів. Розроблені тест-системи дозволяють встановити діагноз впродовж декількох 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 чотирьох повторях. Облік результатів проводять на рідері при 450 нм/620 нм. Термін встановлення діагнозу – до 8 годин.

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

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

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, представленими в таблиці 1. Детекцію продуктів реакції – за допомогою електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі, забарвленому бромідом етидію з використанням трис-боратного буфера при градієнті напруги 10 В/см.

Результати оцінювали при перегляді гелю після електрофорезу на транслюмінаторі під УФ-світлом за наявністю (або відсутністю) червоно-помаранчевих фрагментів ДНК певного розміру. Специфічність ампліфікованого фрагмента ДНК визначили за його розміром відносно фрагментів стандартних маркерів. Час встановлення діагнозу до 8 годин.

Таблиця 1

Програма ампліфікації специфічної ділянки кДНК

№ циклу	Температура ампліфікації тешовірусів свиней , °С	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	

В ході комісійних досліджень підтверджено високу специфічність та чутливість розроблених тест-систем. Розроблені нами засоби діагностики дозволяють в короткий термін встановити діагноз відповідно до рекомендацій МЕБ.

На основі штаму *Teschovirus A* першого серотипу Дніпровський-34 розроблено інактивовану вакцину для специфічної профілактики хвороби Тешена свиней та проведено її комісійні випробування. Одноразове внутрішньом'язове введення вакцини в дозі 2 см³ сприяє формуванню специфічного імунітету у свиней до збудника хвороби Тешена вже на 7 добу і зберігається упродовж 11 місяців. Максимальний рівень віруснейтралізуючих антитіл у крові щеплених тварин на 60 добу сягав 1:8192. Середньгеометричний титр антитіл становить 1:512, що забезпечує захист вакцинованих поросят навіть при інтрацеребральному введенні 10 летальних доз контрольного епізоотичного високо вірулентного штаму Чернігівський-2372 вірусу хвороби Тешена свиней.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Удосконалено систему діагностики та специфічної профілактики хвороби Тешена. На основі нового вітчизняного штаму *Teschovirus A* першого серотипу Дніпровський - 34 створено набори діагностикумів хвороби Тешена в РН, РІФ, ІФА та ПІР. Для видової ідентифікації збудника вперше розроблено вітчизняний набір діагностикумів в ЗТ ПЛР. Створено інактивовану вакцину проти хвороби Тешена з характеристиками, які значно перевищують вітчизняні та закордонні аналоги. Відповідно до вимог МЕБ необхідно 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 ІФА та ПІР та видової ідентифікації збудника в ЗТ ПЛР. Відповідно до сучасної номенклатури та таксономії вірусів затвердженої Міжнародним комітетом з таксономії вірусів необхідно змінити назву збудника хвороби. Крім того, відповідно до рекомендацій МЕБ необхідно внести доповнення у назву хвороби.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The Online (10th) Report of the ICTV (2017) : [Electronic resource]. – Mode of access: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/. – Title from the screen.
2. Романенко В. Ф. Рекомендации по диагностике и мерам борьбы с энзоотическим энцефаломиелитом (болезнью Тешена) свиней / В. Ф. Романенко, В. И. Сорока, О. Г. Прусс. – Київ, 1992. – 17 с.
3. Typisierung von 17 porzinen Enterovirusisolationen aus Polioenzephalomyelitisfällen der Jahre 1983–1991 / K. H. von Witte, J. Auerbach, K. U. Loss, S. Neuhaus, D. Prager // DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr. – 1994. – Vol. 101. – P. 453–492.
4. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines / Office International des Epizooties. – 6 ed. – Paris : OIE, 2008. – 957 p.
5. Бузун А. И. Подтиповые различия среди штаммов и изолятов возбудителя болезни Тешена / А. И. Бузун, М. В. Бабкин // Ветеринарна медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Харків, 2000. – Т. 78. – С. 23–28.
6. Головка А. М. Конструювання видоспецифічних праймерів для молекулярно-генетичної ідентифікації тешовірусів та ентеровірусів А і В / А. М. Головка, С. В. Дерев'янка, Т. О. Бова, В. І. Сорока, В. В. Кацимон // Сільськогосподарська мікробіологія : міжвід. темат. наук. зб. – Чернівці: ЦНТЕІ, 2009. – Вип. 10. – С. 156–165.

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

8. Методичні рекомендації з вірусологічного моніторингу ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней / розроб. Т. О. Бова, В. І. Сорока, С. В. Дерев'янку, Л. М. Решотько, Л. В. Божок, А. М. Головка, В. В. Кацимон; Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. – Чернігів : ЧДЦНП, 2014. – 19 с.

9. Пат. u201009325, Україна, МПК (2011.01) C12N 7/00, A61K 39/125, A61K 39/187 (2011.01), C12R 1/92 (2006.01). Штам *Porcine teschovirus* для виробництва ветеринарних імунобіологічних препаратів / С. В. Дерев'янку, В. І. Сорока, А. О. Бокун, Л. В. Божок, Т. О. Бова; заявник та патентовласник Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН. – № 57372 ; заявл. 26.07.2010 ; опубл. 25.02.2011, Бюл. № 4.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ДИАГНОСТИКИ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ТЕШОВИРУСНОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА СВИНЕЙ (БОЛЕЗНИ ТЕШЕНА) / Дерев'янку С.В., Решотько Л. Н., Дмитрук О.А., Головка А.Н., Кацимон В.В.

*Усовершенствована система диагностики и специфической профилактики болезни Тешена в соответствии с рекомендациями Международного эпизоотического бюро (МЭБ). На основе нового отечественного штамма *Teschovirus A* первого серотипа Днепровский-34 созданы наборы диагностикомов болезни Тешена в реакции нейтрализации, иммунофлюоресценции, иммунопероксидазной реакции и в иммуноферментном анализе. Для видовой идентификации возбудителя впервые разработан отечественный набор диагностикомов в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Создано инактивированную вакцину против болезни Тешена с характеристиками, которые значительно превышают отечественные и зарубежные аналоги. Согласно рекомендаций МЭБ необходимо внести изменения в действующую «Инструкцию о мероприятиях по профилактике и борьбе с энзоотическим энцефаломиелитом (болезнью Тешена) свиней», а именно: рекомендовать для диагностики применение тест-систем на основе иммуногистохимии, твердофазного иммуно-ферментного анализа и видовой идентификации возбудителя в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.*

Ключевые слова: тешовирус, энцефаломиелит свиней, диагностика, инактивированная вакцина.

IMPROVEMENT OF SYSTEM DIAGNOSTIC AND SPECIFIC PROPHYLAX OF TESCHOVIRUS ENCEPHALOMYELITIS (TESCHEN DISEASE) / Derevianko S.V., Reshotko L.M., Dmytruk O.O., Golovko A.M., Katzymon V.V.

Introduction. Recently, the International Committee on Taxonomy of the Virus (ICTV) has made significant changes in the taxonomy and nomenclature of Picornaviridae. The World Organisation for Animal Health (OIE) has proposed new methods for the diagnosis of *Teschovirus encephalomyelitis*. In this regard, the domestic diagnostic and prophylaxis system of the *Teschovirus encephalomyelitis* needs to be improved.

The goal of the work. To improve the means of diagnosis and specific prevention of *Teschovirus encephalomyelitis* in accordance with the recommendations of the World OIE, to develop an inactivated vaccine with high consumer characteristics, and to propose changes to the current "Instructions on measures for the prevention and control of enzootic encephalomyelitis (Teschen disease) of pigs".

Materials and methods of research. Reference and production strains of *Teschovirus A*, *Sapelovirus A* and *Enterovirus G* are used in this work. Accumulation of viruses was carried out in a digestive culture of embryonic kidney cells of pigs and kidneys of newborn Syrian hamster. In experiments were used the virus neutralization reaction, immunofluorescence, immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay, polymerase chain reaction with reverse transcription.

Results of research and discussion. On the basis of the new domestic strain *Teschovirus A Dniprovsky-34* a set of diagnoses of *Teschovirus encephalomyelitis* was created in the reaction of neutralization, immunofluorescence, immune peroxidase reaction and in the enzyme-linked immunosorbent assay. For the specific identification of the pathogen, for the first time, a domestic set of diagnosticums was developed in a polymerase chain reaction with reverse transcription. An inactivated vaccine against *Teschovirus encephalomyelitis* has been created with characteristics that significantly exceed domestic and foreign analogues.:

Conclusions and prospects for further research:

The means of diagnostics and specific prophylaxis of *Teschovirus encephalomyelitis* have been improved. According to the requirements of OIE, amendments to the current "Instructions on measures for the prevention and control of enzootic encephalomyelitis (*Teschen disease*) of pigs", namely: to recommend for the diagnosis of the use of test systems based on immunohistochemistry, enzyme-linked immunosorbent assay and the species identification of the pathogen in polymerase chain reaction with reverse transcription. According to the modern nomenclature and taxonomy of viruses approved ICTV it is necessary to change the name of the pathogen. In addition, according to the recommendations of the OIE, an addition to the name of the illness should be added.

Keywords: *Teschovirus, encephalomyelitis of pigs, diagnostik, killed vaccine.*

REFERENCES

1. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The Online (10th) Report of the ICTV (2017) [Website]. – Retrieved from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ (date of treatment 18.01.2018) [in English].
2. Romanenko V.F., Soroka V.Y. & Pruss O.H. (1992) *Rekomendatsii po diahnostike i meram bor'by s enzootycheskym entsefalomyelitom (boleznyu Teshena) sviney* [Recommendations for the diagnosis and control of enzootic encephalomyelitis (*Teschen's disease*) of pigs]. K [in Russian].
3. Witte von K.H., Auerbach J., Loss K.U., Neuhaus S. & Prager D. (1994) Typisierung von 17 porcinen Enterovirusisolationen aus Polioencephalomyelitisfällen der Jahre 1983–1991 [Typing of 17 porcine enterovirus isolates from polioencephalomyelitis cases from 1983–1991]. *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* Vol. 101., 453–492 [in Duetsch].
4. OIE. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines (2008). – 6 Ed. – Paris [in English].
5. Buzun A.I. & Babkin M.V. (2000) Podtipovye razlichiya sredi shtamov i yzolyatov vzbudatelya bolezni Teshena [Subtype differences amongst strains and isolates of *Teschen's pathogen*] *Veterinarna meditsina. – Veterinary Medicine. Vol. 78*, 23–28 [in Russian].
6. Golovko A.M., Derevianko S.V., Bova T.O., Soroka V.I. & Katsymon V.V. (2009) Konstruyuvannya vydospetsyfychnykh praymeriv dlya molekulyarno-henetychnoyi identyfikatsiyi teshovirusiv ta enterovirusiv A i B [Construction of species-specific primers for molecular genetic identification of tesovirus and enteroviruses A and B]. *Mizhvidomchyy tematychnyy nauk. zb.: "Sil'skohospodars'ka mikrobiolohiya". – Interdepartmental thematic sciences. book: "Agricultural Microbiology"*. Vol. 10., 156–165 [in Ukrainian].
7. Volkova I.V., Bova T.O., Derevianko S.V. (2011) Pat. 58734 Ukrayina, MPK G01N 33/53 (2006.01) *Sposib oderzhannya hiperimunnoyi syrovatky krovi do virusiv tvaryn i roslyn* [A method for obtaining hyperine blood serum for animal and plant viruses]. Byul. № 8 [in Ukrainian].
8. Bova T.O., Soroka V.I., Derevianko S.V., Reshot'ko L.M., Bozhok L.V., Golovko A.M. et al. (2014) *Metodychni rekomendatsiyi z virusolohichnoho monitorynhu enzootychnoho entsefalomyelitu (hvoroby Teshena) svynei* [Methodical recommendations on virological monitoring of enzootic encephalomyelitis (*Teschen disease*) of pigs]. - Chernihiv: ChDTsNII [in Ukrainian].
9. Derevianko S.V., Soroka V.I., Bokun A.O., Bozhok L.V., Bova T.O. (2011) Pat. 57372 Ukrayina, MPK (2011.01) S12N 7/00, A61K 39/125, A61K 39/187 (2011.01), C12R 1/92 (2006.01). *Shtam Porcine teschovirus dlya vyrobnytstva veterynarykh imunobiolohichnykh preparativ* [Porcine teschovirus strain for the production of veterinary immunobiological drugs]. byul. 4 [in Ukrainian].