



УДК 619:616.98-089

О.М. НЕВОЛЬКО, канд. вет. наук, заст. директора

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, Київ



ДІАГНОСТИКА АФРИКАНСЬКОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ

Представлено результати лабораторних досліджень під час виникнення першого випадку захворювання свиней на АЧС у с. Комишуватка Приморського району Запорізької області. Визначено форму перебігу захворювання. Проведено генотипування збудника АЧС.

В останні десятиріччя африканська чума свиней (АЧС) викликає занепокоєння постійною загрозою світової експансії, розширенням ареалу захворювання. Поява збудника цієї хвороби в свинарських господарствах спричиняє катастрофічні наслідки, на тривалий час паралізує галузь, завдає господарствам чималих економічних збитків, а людям – багато переживань і стресів [1].

АЧС (хвороба Монтгомері, східно-африканська чума, *Pestis Africana suum*, *Africana swine fever*, африканська лихоманка свиней) – висококонтагіозна 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 реєструють надгострий і гострий) [2].

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

Згідно з даними МЕБ з початку 2012 р. АЧС зареєстровано в п'яти країнах світу: Російській Федерації, Україні, Центрально-Африканській Республіці, Танзанії, Південно-Африканській Республіці. В Україні останній випадок АЧС було зареєстровано в 1977 р. у шести районах Одеської області та в м. Одесі [4].

Мета роботи – встановити діагноз на АЧС в осередку виникнення захворювання в с. Комишуватка Приморського району Запорізької області в липні 2012 р. Після виділення вірусу АЧС (ВАЧС) провести його генетичне типування, визначити ступінь вірулентності.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводились у липні – серпні 2012 р. у Приморській державній районній лабораторії ветеринарної медицини Запорізької області, Запорізькій регіональній державній лабораторії ветеринарної медицини, Державному науково-дослідному інституті 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) у Мадриді (Іспанія) та в особистому приватному господарстві в с. Комишуватка Приморського району Запорізької області.

Використовували епізотологічні й клінічні дані, патолого-анатомічні зміни, виявлені під час розтину загиблих тварин, інформацію по комплексу лабораторно-діагностичних досліджень.

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

Ізоляція і титрація вірусу АЧС із застосуванням методу гемадсорбції. Гемадсорбцію виконували на плашках, зважаючи на 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 кожен лунку додавали приготовлену в фосфатно-буферному сольовому розчині гомологічних еритроцитів 1% суспензію й інкубували при 95% відносній вологості, 5% CO₂, t 37°C. Для виявлення гемадсорбції за реакцією на плашці спостерігали впродовж 5 діб. Титрацію виконували шляхом інокулювання моноцитів крові свині граничними розведеннями гомогенізованої селезінки. Титр оцінювали, використовуючи метод Ріда й Менча (1938), і позначали як 50% гемадсорбуючих доз (HAD_{50/ml}).

Для виявлення антитіл до вірусу АЧС (серологічна діагностика) досліджували ексудат із селезінки, використовуючи ОІЕ-indirect ELISA з подальшим підтвердженням результатів за допомогою ОІЕ-імуноблотингу й непрямого імунопероксидазного методу [8].

Генетичну характеристику ізоляту вірусу АЧС було виконано за допомогою ПЛР з подальшим секвенуванням трьох незалежних ділянок геному вірусу АЧС, які валідовані для генотипування ізолятів АЧС. Ці ділянки включають:

– С-термінальний кінець гена, який кодує протеїн VP72 й за допомогою якого диференціюють до 22 окремих генотипів [5];

– повну геномну послідовність гена p54 [6];

– центральну варіабельну ділянку гена B602L [7].



Ізоляти вірусу АЧС із Вірменії (Arm07) та Азербайджану (Az08D), що належать до генотипу II (FAO, 2009), було включено як контрольні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З повідомлення головного управління ветеринарної медицини в Запорізькій області стало відомо, що в Приморському районі в приватному господарстві с. Комишуватка виявлено захворювання свиней.

Було встановлено, що з 21 до 29 липня 2012 р. у приватному об'єкті загинули дві свиноматки й одна 8-місячна свинка. Під час хвороби спостерігали клінічні ознаки – лихоманку, аборти, відмову від корму. Власник лікував тварин антибіотиками самостійно. Позитивних результатів отримано не було.

При патолого-анатомічному розтині трупа загиблої 8-місячної свинки було виявлено, що тварина середньої вгодованості, її шкірні покриви без змін, кров'яних виділень з отворів немає. Серце без патолого-анатомічних змін, легені набрякли, кровонаповнені, з ознаками серозно-геморагічної пневмонії, селезінка збільшена, в'яла, темно-вишневого кольору, по краях печінки – крововиливи, жовчний міхур збільшений, заглоткові лімфовузли також, мрамурові на розрізі. У грудній і черевній порожнинах спостерігали накопичення жовтувато-червоного ексудату. Під час розтину було відібрано шматочки серця, печінки, легень, селезінки, привушні й заглоткові лімфатичні вузли.

Крім того, на момент загибелі тварини в об'єкті залишалися ще дві восьмимісячні свинки. При термометрії покази температури в однієї з них становили 41,2 °С, в іншої – 38,9 °С. Спостерігали відмову від корму. Шкірні покриви були без змін. Проносу і блювання у загиблих і хворих тварин не було.

Усіх загиблих і хворих свиней лікували антибіотиками (пеніцилін, стрептоміцин, біцилін 5, цефтриаксон, цефазолін, амоксицилін, фармазин 50) згідно з інструкціями до них, а також

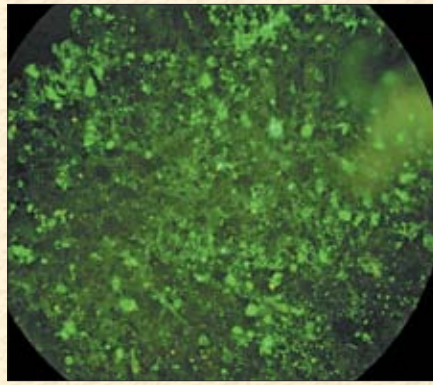


Рис. 1. Результати люмінесцентної мікроскопії при дослідженні МФА

робили ін'єкції анальгіну, преднізолону, диклофенаку, димедролу.

Під час дослідження патологічного матеріалу в Приморській РДЛВМ було виключено захворювання на сибірку. Гематологічне дослідження двох зразків крові від 8-місячних свиней у Приморській РДЛВМ і Запорізькій регіональній ДЛВМ вказало на лейкопенію. У зразках налічувалось 4,0–4,2 тис./мм³ лейкоцитів при нормі 10–21 тис./мм³. 30 липня 2012 р. при дослідженні в Запорізькій регіональній ДЛВМ на АЧС мазків відбитків з внутрішніх органів, пофарбованих

ФІТЦ ІД, було виявлено світіння, характерне для АЧС; оцінка реакції на +++ (рис. 1). Для діагностики використовували набір «Специфические ФІТЦ-иммуноглобулины для иммунофлуоресцентной диагностики африканской чумы свиней» виробництва ГНУ ВНИИ вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии (м. Покров Владимирської обл., РФ). Крім того, з метою диференційної діагностики було виключено бешиху, пастерельоз, сальмонельоз.

Для підтвердження діагнозу 31 липня 2012 р. патологічний матеріал було доставлено в Київ у Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

Дослідження проводили на приладі для полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (ПЛР РЧ) Rotor-Gene 3000 з використанням діагностичного набору для виявлення вірусу АЧС методом ПЛР РЧ «ПЦР-комплект» варіант FRT (виробник – «ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», Москва). Для контролю використовували також сертифікований ре-

Таблиця – Ізоляти вірусу АЧС, вибрані для генотипування й отримані від спалахів хвороби в Східній Європі починаючи з 2007 р., включаючи ізолят, який характеризується в цьому дослідженні

Ізолят		Джерело (регіон)	Носій хвороби	Дата початку спалаху хвороби
ВАЧС	країна			
Abk07	Грузія	Abkhazia Republic Gulripish	Домашня свиня	04.07.2007
Arm07	Вірменія	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

УВАГА! ТРИВАЄ ПЕРЕДПЛАТА НА ЖУРНАЛ НА 2013 РІКІ

ференс-матеріал інактивованого вірусу АЧС, наданий Національною лабораторією з діагностики хвороб свиней (Італія). В результаті діагностичного дослідження патологічного матеріалу методом ПЛР РЧ було виявлено ДНК вірусу африканської чуми свиней у 14 зразках печінки, серця, селезінки, лімфатичних вузлів 8-місячної загиблої свинки. З метою диференціальної діагностики методом ПЛР РЧ було виключено класичну чуму свиней.

За результатами аналізу епізоотичних і клінічних даних, патолого-анатомічних змін і результатів лабораторних досліджень у с. Комишуватка Приморського району Запорізької області було встановлено захворювання свиней на АЧС.

На виконання «Плану дій при підозрі захворювання (загибелі) свиней на африканську чуму свиней» Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи доправив зразок патологічного матеріалу для підтвердження на АЧС до однієї з референс-лабораторій Європейського Союзу з діагностики африканської чуми свиней – Науково-дослідного центру охорони здоров'я тварин Національного інституту з досліджень і технологій, сільськогосподарства і продовольства (CISA-MIC) у Мадриді (Іспанія).

Присутність вірусу АЧС в отриманому зразку була підтверджена через 24 години за методами МEB: ПЛР [8] ІФА (°INGENASA-INGEZIM PPA DAS K2) та ізоляцією вірусу на периферійних макрофагах крові свиней з отриманням специфічної для АЧС гемадсорбції [8]. Титр ізольованого в Україні вірусу АЧС становив $3,1 \times 10^8$ 50% гемадсорбуючих доз на мілілітр ($HAD_{50/ml}$) і був встановлений на периферійних макрофагах крові шляхом граничних розведень з використанням методу Ріда й Менча (1938). Специфічних антитіл до вірусу АЧС не було виявлено в ексудаті з селезінки, який дослідили рекомендованими МEB серологічним непрямым ІФА та імуноблотингом [8].

Генетичну характеристику проводили на вірусній ДНК, екстрагованій

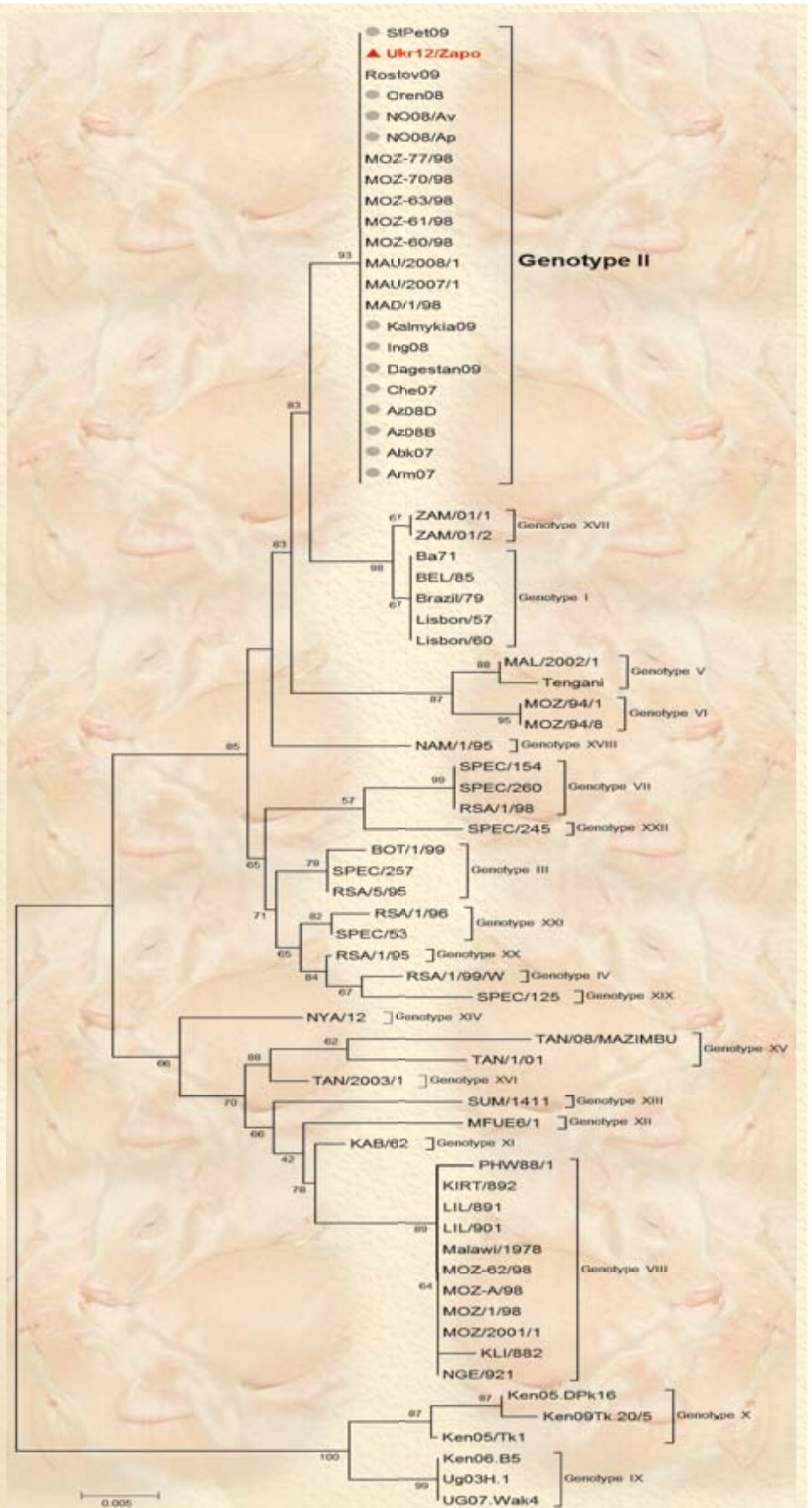


Рис. 2. Філогенетичне дерево мінімальної еволюції українського ізоляту 2012 ВАЧС (Ukr12/Zapo) на основі С-термінального кінця протеїну р72 відносно 22 р72 генотипів (позначені як I–XXII), який включає в себе 71 нуклеотидну послідовність. Український 2012 ізолят ВАЧС, генотипування якого проводили в цьому дослідженні, позначено червоним кольором (▲), кавказькі ізоляти ВАЧС, отримані в 2007–2009 рр., – сірим кольором (●)



із гомогенізованої селезінки, секвенуванням трьох незалежних ділянок вірусу АЧС:

1) 478 пн С-термінальний кінець гена, який кодує протеїн VP72 і за допомогою якого диференціюють до 22 окремих генотипів;

2) повна геномна послідовність гена р54;

3) центральна варіабельна ділянка гена B602L.

У дослідження було включено як контроль тринадцять ізолятів ВАЧС генотипу II, отриманих від диких і домашніх свиней починаючи з 2007 р., які доступні в банку референс-лабораторії Євросоюзу (див. таблицю).

Три вірусних геномних сегменти, ампліфіковані ПЛР з ізоляту ВАЧС (названого як Ukr12/Zapo), були ідентичними до всіх вірусів уздовж 478 пн С-кінця гена р72 і 558 пн всієї довжини гена р54. Отримані нуклеотидні й амінокислотні послідовності було порівняно з гомологічними послідовностями, доступними в GenBank, щонайменше від 1 вірусу з кожного 22 (I–XXII) р72 описаних генотипів [5]. Філогенетичне дерево з коренем мінімальної еволюції було побудоване за програмою MEGA (v5.0) з використанням моделі р-відстані нуклеотидних замінів. На основі філогенетичного аналізу український ізолят ВАЧС можна віднести до генотипу II разом з кавказьким, мадагаскарським, мозамбіцьким і маврикійським ізолятами (рис. 2). Такий самий результат було отримано під час філогенетичного аналізу на основі гена р54.

Використання С-термінального кінця протеїну р72 і цілого гена р54 є достатнім для віднесення ізоляту ВАЧС до більшості попередньо визначених генотипів. Центральна варіабельна ділянка, яка характеризується присутністю тандемних повторів послідовностей, є найкращою ділянкою геному, коли потрібно визначити джерело й карту поширення близькоспоріднених вірусів. Для цього ДНК зі зразка було ампліфіковано з використанням набору праймерів CVR1/CVR2 й отримано ПЛР амплікон = 200 пн, який за вели-

чиною й послідовністю відповідає іншим ізолятам генотипу II. Подальшим секвенуванням було виявлено 10 копій тандемних повторів послідовностей (тип BNDNBDBNAA), унікальних для групи вірусів, які циркулюють у Кавказькому регіоні починаючи з 2007 р. [9].

ВИСНОВКИ

1. Присутність вірусу АЧС було підтверджено його ізоляцією з клінічного матеріалу зі спалаху хвороби в Запорізькій області в липні 2012 р.

2. Клінічні ознаки в уражених свиней характеризувалися швидкою загибеллю і лихоманкою з неспецифічними для АЧС пошкодженнями, що є типовим для гострої форми хвороби, викликані високовірулентними ізолятами вірусу АЧС.

3. Високий титр збудника в зразках разом з відсутністю специфічних антитіл в ексудаті з органів відповідає клінічним спостереженням, які підтверджують властивість високовірулентного вірусу, що викликав спалах хвороби. Невиявлення антитіл було найбільш вірогідне через загибель свиней до розвитку гуморальної імунної відповіді до детекуючого рівня.

4. Секвенування трьох незалежних ділянок геному вірусу АЧС [8] засвідчило, що ізолят вірусу АЧС був на 100 % гомологічний з ізолятами, які викликали спалахи хвороби в Східній Європі, починаючи із занесення збудника в Грузію в 2007 р., і дало можливість віднести штамп вірусу, який викликав хворобу, до генотипу II.

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

СПИСОК

ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Загребельний В.О.** Африканська чума свиней: ризики та загрози / В.О. Загребельний, О.М. Верхиховський, О.М. Неволько, В.А. Прискока // Здоров'я тварин і ліки. – 2012. – № 2. – С. 16–18.
2. **Каришева А.Ф.** Африканська чума свиней / А.Ф. Каришева // Спеціальна епізотологія. – 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. / І. Пустовіт, М. Бучанський // Ветеринарна медицина України. – 2007. – № 1. – С. 26–31, 41–45.
5. **Boshoff C.I.** Genetic characterization of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973–1999) / C.I. Boshoff, A.D. Bastos, L.J. Gerber, W. Voslo // Vet. Microbiol. – 2007. – Mar. 31; 121(1–2). – P. 45–55.
6. **Gallardo C.** Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB6021(CVR) genes / C. Gallardo, D.M. Mwaengo, J.M. Macharia, M. Arias, E.A. Taracha, A. Soler, E. Okoth, E. Martin, J. Kasiti, R.P. Bishop // Virus Genes. – 2009. – Feb.; 38(1). – P. 85–95.
7. **Gallardo C.** African swine fever virus p72 genotype IX in domestic pigs, Congo / C. Gallardo, R. Anhueto, V. Pelayo, F. Poudeyvigine, T. Leon et al // Emerg infect Dis. – 2011. – Aug.; 17(8). P. 1556–1558.
8. **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>.
9. **Rowlands R.S.** African swine fever virus isolate, Georgia, 2007 / R.S. Rowlands, V. Michaud, L. Heath, G. Hutchings, C. Oura, W. Vosloo // Emerg. Infect. Dis. – 2008. – 14. – P. 1870–1874.

Одержано 1.10.2012

Діагностика африканської чуми свиней.

О.М. Неволько

Представлені результати лабораторних досліджень при виникненні першого случая захворювання свиней африканської чумою свиней (АЧС) в с. Камышеватка Приморського району Запорізької області. Определена форма протекання захворювання. Проведено генотипування збудителя АЧС, визвавшого вспышку захворювання.

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. ◉