ЗМІНА КУЛЬТУРАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕНТЕРОВІРУСУ СВИНЕЙ ЗА ТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ

*О. М. Мельниченко¹, науковий співробітник,
А. Ю. Ющенко², науковий співробітник,
З. С. Клестова², д-р вет. наук, професор,
О. М. Дерябін², завідуючий відділом,
О. С. Ватліцова², канд. біол. наук,
А. М. Головка², д-р вет. наук, професор, академік НААН*

¹Інститут ветеринарної медицини НААН,
вул. Донецька, 30, Київ, 03151, Україна,
ivm_naam@ukr.net

²Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів
вул. Донецька, 30, Київ, 03151, Україна
zinaklestova@gmail.com

Ентеровірусні інфекції залишаються однією з актуальних проблем в сучасній інфекційній патології та є предметом численних публікацій вітчизняних і зарубіжних дослідників, в тому числі і в галузі ветеринарної вірусології. Збудникам ентеровірусних інфекцій вірусної етіології (ентеровірусам) властива відносна стабільність до несприятливих умов навколишнього середовища, включаючи термічну стійкість, кислотну стійкість, стійкість до протеолітичних ферментів, що дозволяє їм виживати у довкіллі та полегшує їх передачу різними екологічними шляхами (водою, продуктами харчування, аерозолями, забрудненими предметами тощо). На меті даного дослідження було з'ясувати зміни інфекційних властивостей ентеровірусів свиней in vitro за умов довготривалого зберігання за температури мінус 32 °С. В ході даного дослідження було проведено процес рекультивування з подальшим адаптуванням двох варіантів: тешовірус свиней першого серотипу (Teschovirus A), штамп «Дніпровський 34» та Porcine sapelovirus 1 (ентеровірус свиней 8 серогрупи), референтний штамп V-13 до культур клітин ВНК-21/13 та до СНЕВ, у яких вони культивувались раніше, з метою визначення інфекційної активності після зберігання в умовах мінусових температур (за мінус 32°С) протягом двох та двадцяти років. На прикладі ентеровірусу свиней 8 серогрупи (збудника вірусного гастроентериту) доведено, що впродовж тривалого зберігання (20 років) за температури – 32 °С вірус не втратив інфекційних властивостей, хоча виявлена зміна цитопатогенних особливостей in vitro при рекультивуванні. Інфекційні властивості тешовірусу свиней першого серотипу також здатні до тривалого зберігання (2 роки) за умов витримування при температурі мінус 32 °С.

Ключові слова: ЕНТЕРОВІРУСИ, СВИНІ, ІНФЕКЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ, IN VITRO, ЗБЕРІГАННЯ.

THE CULTURAL PROPERTIES ALTERATIONS OF PORCINE ENTEROVIRUS DURING LONG-TERM STORAGE

*O. M. Melnichenko¹, A. Yu. Yushchenko², Z. S. Klestova², O. M. Deryabin²,
O. S. Vatlitsova², A. M. Golovko²*

¹Institute of Veterinary Medicine of NAAS
30, Donetska str., Kiev, 03151, Ukraine
ivm_naas@ukr.net

²State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms
30, Donetska str., Kiev, 03151, Ukraine
zinaklestova@gmail.com

Enterovirus infections remain one of the urgent problems in modern infectious pathology and are represented in numerous publications of domestic and foreign researchers, including publications in the field of veterinary virology. The causative agents of enterovirus infections of viral etiology (enteroviruses) are characterized by relative resistance to adverse environmental conditions, including thermal stability, acid resistance, resistance to proteolytic enzymes, which allows them to survive in the environment and facilitates their transmission by various ecological routes (water, food, aerosols, contaminated objects, etc.). The purpose of this study was to elucidate the changes in the infectious properties of porcine enteroviruses in vitro under conditions of long-term storage at a temperature of minus 32 °C. In the course of this study, a re-cultivation process was carried out with the subsequent adaptation of two variants of viruses: the porcine teschovirus of the first serotype (Teschovirus A), the “Dniprovsky 34” strain and Porcine sapelovirus 1 (porcine enterovirus of serogroup 8), the reference V-13 strain. The re-cultivation was performed on BHK-21 cell cultures / clone 13 and on SPEV, in which they were previously cultivated, in order to determine the infectious activity after storage under negative temperatures (minus 32 °C) for two and twenty years. On the example of porcine enterovirus of serogroup 8 (the causative agent of viral gastroenteritis), it was proved that during long-term storage (20 years) at a temperature of – 32 °C, the virus did not lose its infectious properties, although a change in the cytopathogenic effect in vitro during re-cultivation was found. The infectious properties of the porcine teshovirus of the first serotype are also capable of long-term storage (2 years) under conditions of minus 32 °C temperature.

Keywords: ENTEROVIRUS, SWINE, INFECTIOUS PROPERTIES, IN VITRO, STORAGE.

Збільшення концентрації населення у великих містах, ведення тваринництва на товарних фермах та прагнення підвищити їх продуктивність призводить до постійного зростання біологічного забруднення довкілля. Створюються умови для збереження й циркуляції вірусів в навколишньому середовищі, що, в свою чергу, сприяє поширенню вірусних інфекцій серед людей і тварин. Патогенні для людини і тварин кишкові та респіраторні віруси є одною з складових проблеми забруднення довкілля. Шляхи проникнення цих патогенів в організм, їх тропізм і шляхи виділення з організму є різноманітними.

Однією із сучасних глобальних проблем людства є неналежний стан водних ресурсів та навколишнього середовища, що головним чином впливає на здоров'я людини і тварин. На жаль, активна антропогенна діяльність часто призводить до негативних наслідків в цьому сенсі. Так, розвиток тваринницьких господарств, де на незначній площі утримується велика кількість тварин призводить не лише до проблем швидкого поширення інфекційних захворювань (при потраплянні небезпечного патогену у стадо), а і до гострої необхідності створення заходів запобігання забруднення водойм та навколишнього середовища відходами цих господарств та

неочищеними стічними водами. Загрозу водним об'єктам складає забруднення промисловими стоками та відходами сільськогосподарського виробництва.

Майже 25 % населення світу (1,8 млрд. людей за даними 2012 р.) споживає воду, забруднену фекаліями. Ця вода може містити бактерії, найпростіші та віруси, які можуть спричинити різноманітні захворювання у людей та тварин: гастроентерити, гепатити та інші. Забруднена вода, недостатня санітарія та погана гігієна є причиною близько 90 % випадків смертей від діарейних захворювань у всьому світі (Aimee et al., 2015). Не дивно, що діарея є другою провідною причиною смерті дітей у віці до п'яти років (1,2 млн. смертей у 2012 році) (UNICEF, 2012). За оцінками Світового банку, окрім людських втрат, відсутність доступу до безпечної води та санітарії призводить до глобального економічного збитку у розмірі 260 мільярдів доларів щорічно.

Загальновідомо, що бактеріальна інфекція є основною причиною діареї, викликаной споживанням небезпечної питної води. Але не менш значущими патогенами є віруси, які також знаходяться в джерелах питної води та негативно впливають на здоров'я людини та тварин, серед яких знаходяться і ентеровіруси.

Віруси можуть виділятися з фекаліями у дуже високих кількостях, навіть при безсимптомному їх носійстві. Наприклад, в одному грамі фекалій може міститися до 10^{11} вірусних часточок (Hall, 2012).

Крім того, безоболонкові віруси (до яких належать ентеровіруси) можуть зберігатися у воді протягом тривалого періоду часу. Беручи до уваги ці характеристики, споживання неналежно очищеної питної води, може легко призвести до спалахів вірусного гастроентериту тощо.

Ентеровіруси (від грецького слова «enteron» – кишка) – рід вірусів *Enterovirus*, що входить до родини пікорнавірусів (*Picornaviridae*). Рід включає близько 100 серотипів вірусів. Більшість з них виділені із шлунково-кишкового тракту людини, а також від тварин – великої рогатої худоби, свиней, птахів, коней, собак, оленів, мишей, риб і комах. Ці дрібні (діаметром 22-30 нм) РНК-вмісні віруси не мають ліпідної оболонки, патогенні для людини і тварин, мають кубічний тип симетрії і нуклеокапсид у формі ікосаедра, односпіральну РНК (Voroshilova, 1975; Syurin, 1998; Zell et al., 2001; Vorobeve, & Byikova, 2003; Fauquet et al., 2005; Melnychenko et al., 2014; Andriushkova et al., 2016).

Їх виділяють в усіх країнах світу як від хворих, так і від клінічно здорових особин, а також з харчових продуктів, питної води і стічних вод (Shirobokov, 1974; Voroshilova, 1975; Seidel et al., 1983; Rotbart, 1995; Syurin, 1998; Zell et al., 2001; Ischanova, et al., 2006; Doan, 2010; Xu et al., 2012).

Результати різноманітних досліджень з проблем ентеровірусних інфекцій містяться в численних публікаціях вітчизняних та зарубіжних дослідників: (Romanenko, 1974; Shirobokov, 1974; Voroshilova, 1975; Seidel et al., 1983; Doan, 2006; Sereika et al., 2007; Doan, 2010).

Ентеровіруси небезпечні тим, що стійкі до дії природних факторів довкілля, добре зберігаються у ґрунті, у ґрунтових водах на глибині 60-90 метрів. Стійкі до дії ефіру, хлороформу, трипсину, жовчі й інших розчинників жирів. У замороженому стані вони зберігаються впродовж багатьох років, за температури 4 °С – декілька місяців, а за кімнатної температури - до 70 діб. Ентеровіруси витримують багатократне заморожування і відтаювання без втрати активності. Найкраще зберігаються у замороженому стані. У водопровідній воді виживають до 20 діб, у річковій – до 30 діб. Високі температури на ентеровіруси діють негативно: за температури вище 50 °С ентеровіруси втрачають активність за 10 хвилин, при 100 °С – миттєво. Інфекційна активність не змінюється в широкому діапазоні рН (2,0–9,5). Ентеровіруси швидко втрачають активність за умов впливу ультрафіолетового опромінення та під дією прямих сонячних променів. Дуже чутливі до окиснювачів, інактивуються 0,3–0,5 % розчином хлору, 0,15–0,3 % розчином формальдегіду. Швидко знешкоджує ентеровіруси розчин

йоду, етиловий спирт (70 ° і вище) може знешкодити ентеровіруси за умови 3-годинної експозиції (Sergeev, 1993; Romanenko et al., 1995; Syurin, 1998).

Проблема ентеровірусних інфекцій вже досить давно привертає до себе увагу вчених різних держав у медичній і ветеринарній практиці (Romanenko, 1974; Shirobokov, 1974; Voroshilova, 1975; Sergeev, 1993; Rotbart, 1995; Pallansch et al., 2001; Klestova & Tatska, 2002; Kehle et al., 2003; Bova et al., 2004; Sorokina et al., 2004; Bova et al., 2005; Fong et al., 2005; Doan, 2006; Ischanova, et al., 2006; Saeed et al., 2007; Kahn, 2010; Hall, 2012; Xu et al., 2012; Aimee et al., 2015; Dayaram et al., 2017). Набуває вона особливої актуальності і в наш час, коли Україна готується ввійти до складу Європейського регіону, як території вільної від "диких" поліовірусів. Ентеровіруси мають важливе значення в патології людини, тварин, птахів. Існує значна кількість серотипів ентеровірусів, які мають високу здатність до широкого діапазону еволюційних перетворень.

Ентеровірусні інфекції (англ. *Enteroviral Infections*) – група гострих інфекційних захворювань, які спричиняють віруси з роду *Enterovirus*, широко поширені у всіх країнах світу. Перебіг ентеровірусних інфекцій проявляється у різноманітні клінічних форм. Відомо, що одні і ті ж серотипи ентеровірусів можуть викликати різні клінічні форми захворювання. Це можуть бути як поодинокі випадки, так і великі епідемічні спалахи хвороб. Характеризуються поліморфізмом клінічних проявів від легких гарячкових форм і простого носійства до менінгоенцефалітів, міокардитів та інших тяжких уражень. До цієї групи інфекцій не входить поліомієліт, хоча його збудник належить до цієї родини вірусів. Поліомієліт через його велику соціальну значимість виділено в окрему нозологічну форму.

Незважаючи на те, що в останні роки вивченню ентеровірусів приділяється велика увага, причини формування високовірулентних варіантів ентеровірусів, закономірності їх циркуляції залишаються недостатньо розкритими. Ентеровірусні інфекції, як і інші інфекції, протягом певного відрізка часу зазнають змін внаслідок стимулюючої або пригнічуючої дії абіотичних, біотичних та антропогенних факторів.

Географія ентеровірусних хвороб охоплює всі континенти та країни світу. Джерелом інфекції є хворий або носій вірусу, у якого симптоми захворювання не проявлені. Вірус виділяється з носоглотки і кишкового тракту. Механізм передачі – фекально-оральний, аспіраційний (аерозольний). Шляхи передачі – водний, контактний-побутовий, харчовий, повітряно-краплинний. Збудники ентеровірусної інфекції надзвичайно стійкі в навколишньому середовищі та можуть протягом довгого часу зберігатись в стічних водах, відкритих водоймах, на предметах побуту, продуктах харчування (молочні продукти, овочі, фрукти, ягоди). В холодильнику вірус зберігається декілька тижнів, у замороженому вигляді – місяцями.

У 1948 р. Долддорф і Сайклс виділили перший ентеровірус – Коксакі з фекалій хворих людей з містечка Коксакі в США. Надалі подібні штами ізолювано від хворих на серозний менінгіт, епідемічну міальгію, міокардит, поліомієлітні захворювання.

Вперше ентеровіруси об'єднали в самостійну таксономічну одиницю у 1957 році, коли було запропоновано включити до їх складу чотирьох великих груп ентеровірусів: віруси поліомієліту, Коксакі А, Коксакі В і ЕСНО.

Віруси ЕСНО ізолювано майже одночасно в різних лабораторіях протягом 1951-1953 рр. з фекалій здорових дітей. Пізніше такі віруси почали виділяти від хворих на серозний менінгіт. Спочатку, коли ще не було повідомлень про зв'язок цих вірусів із захворюваннями людини, вони отримали назву вірусів-сиріт, яку потім було змінено на назву «віруси ЕСНО» (*Enteris Cytopathogenis Human Orphan*) – кишкові цитопатогенні віруси людини, «сирітські». Пізніше з'ясувалося, що віруси ЕСНО можуть бути причиною важких захворювань. У 1969-1972 рр. ізолювано ще 2 віруси, яким присвоєно порядкові номери 70 та 71 (Pallansch et al., 2001; Kahn, 2010). На сьогодні процес визначення типів ентеровірусів триває.

Ентеровіруси – одні з найпоширеніших збудників, які здатні викликати ряд клінічних симптомів різного ступеня тяжкості у людей – від легких лихоманкових форм до тяжких

захворювань, таких як ураження центральної нервової системи (Rotbart, 1995; Pallansch et al., 2001; Sorokina, 2004; Doan, 2006; Ischanova, et al., 2006; Demina et al., 2009; Doan, 2010; Martynova, 2014). Точна кількість випадків ентеровірусних інфекцій невідома. Восени 2004 року в США відбулася епідемія з тисячами хворих дітей, при якій спостерігалися численні смерті внаслідок поліомієлітоподібних паралічів і респіраторного дистрес-синдрому (Khetsuriani et al., 2006).

У багатьох країнах світу, в тому числі і в Україні, відмічається чітка тенденція до росту числа дітей з захворюваннями ентеровірусної етіології. Це надає велике значення ентеровірусним інфекціям як в структурі дитячих інфекційних захворювань, так і для клінічної медицини загалом (Rotbart, 1995; Bottner et al., 2002; Sorokina, 2004; Ischanova, et al., 2006; Xu et al., 2012; Martynova, 2014; Dayaram et al., 2017). В сучасних умовах особливе занепокоєння викликає Ентеровірус 71, який розглядається як один з найзначніших патогенів із числа ентеровірусів людини, що відрізняється високою нейропатогенністю та може викликати значні спалахи (Pallansch et al., 2001). Серед клінічних форм ентеровірусних інфекцій важливе місце займають форми з ураженням центральної нервової системи (серозні менінгіти), які є одними з найтяжчих форм даної етіології хвороби (Sorokina, 2004).

На інтенсивність циркуляції ентеровірусів впливає загальний імунний стан людини і тварин, що залежить від різного роду чинників – забруднення довкілля, міграційні процеси, стреси, погіршення соціальних умов, особливо в зоні проведення військових дій. Також відмічене підвищення вірулентності окремих штамів вірусу в результаті їх природної циркуляції. Щороку в Україні збільшується частота виявлення ентеровірусів у відкритих водоймах та стічних водах (Shirobokov, 1974; Doan, 2006).

Ентеровіруси тварин менш вивчені. Роль ентеровірусів у патології тварин (свиней) інтенсивно почали вивчати з середини 60-х років минулого століття, хоча вірусна природа деяких захворювань, викликаних ними була відома значно раніше. Перший випадок ентеровірусної інфекції свиней, який був зареєстрований в Центральній Європі в 1929-1930 рр. та опублікований, була хвороба Тешена - поліенцефаліт з високою летальністю серед свиней (у 1929 році у Чехословаччині, у містечку Ческі Тешін). L. Trefny вперше зареєстрував спалах цієї хвороби, а її вірусну етіологію встановив A. Klobouk. Він описав хворобу Тешена, яка ще отримала назву ензоотичний енцефаломієліт свиней, тешовірусний енцефаломієліт, хвороба Тальфана. Збудником хвороби Тешена є вірус 1-го серотипу, який належить до родини *Picornaviridae*, роду *Teschovirus*, виду *Porcine teschovirus* (Fauquet, 2005), відповідно до сучасної таксономії - *Teschovirus A*, який до певного часу відносили до ентеровірусів, а тепер виділили в окремий рід. Його вважають аналогом вірусу поліомієліту людини (Voroshilova, 1975; Rotbart, 1995).

Ензоотичний енцефаломієліт (хвороба Тешена) свиней – це контагіозне вірусне захворювання, яке супроводжується негнійним запаленням мозку та його оболонок, паралічами і парезами. До вірусу хвороби Тешена-Тальфана сприйнятливі тільки домашні та дикі свині. Вірус призводить до високої захворюваності і смертності у всіх вікових категоріях свиней. Але найбільш чутливі до тешовірусу поросята у 2-6-місячному віці, рідше свині 7-10-місячного віку. Клінічні ознаки хвороби у тварин старшого віку реєструвались в поодиноких випадках. Залежно від тривалості епізоотичного процесу, захворюваність свиней нервовою формою становила 14 – 90 %, а летальність – 75–90 % (Romanenko et al., 1995, 2007).

У період з 1929 р. по 1964 р. ензоотичний енцефаломієліт виявили у більшості країн Європи. В 1937-1957 рр. її реєстрували в США, Канаді, Японії, Австралії, Новій Зеландії. Пізніше повідомлялось про широке розповсюдження збудника серед свинопоголів'я в Кореї та Китаї. За останні 25 років за даними Міжнародного епізоотичного бюро спалахи хвороби були відмічені в Молдові (2002-2004 рр.), в Латвії (1997, 2000-2002 рр.), в Білорусії (1996, 1999, 2005 рр.), в Румунії (2002 р.), Японії (2002 р.), на о. Мадагаскар (1996-2000, 2002, 2004-2005 рр.) тощо (Romanenko, 1984; Yamada et al., 2004).

На території України ензоотичний енцефаломієліт свиней вперше у 1971 році діагностував В.П. Романенко в Закарпатській області, а в 1978 році – також раніше невідому хворобу свиней – ентеровірусний гастроентерит та ентеровірусну пневмонію свиней (Romanenko, 1974; Babkin, 2006).

Серед інфекційних захворювань свиней вірусної етіології, що реєструвались в Україні, частка хвороби Тешена становила 24 % (Romanenko et al., 2007). На даний час відомості відсутні.

Встановлено зв'язок між іншими ентеровірусами свиней з порушенням репродуктивних функцій (синдрому СМЕДІ), респіраторними захворюваннями, міокардитами, перикардитами, гастроентеритами у свиней, які спричинені представниками різних серогруп вірусу (Romanenko, 1974; Syurin, 1998; Zell et. al., 2001; Shevtsova et al., 2004; Sereika et al., 2007; Martynova, 2014).

Оскільки ентеровірусні інфекції завдають істотних економічних збитків свиначеству за рахунок високого рівня смертності, зниження приростів маси тіла, проведенням запобіжних щеплень, дезінфекційних заходів тощо, питання їх профілактики є вкрай важливим та вимагає недопущення потрапляння збудника до чутливих організмів, в тому числі – свиней. При цьому, важливу роль відіграє вивчення властивостей збудника, в тому числі і його здатність до тривалого зберігання за умов мінусових температур.

Профілактика та ліквідація ентеровірусних інфекцій залишаються як першочерговими науковими завданнями, так і задачами практичної ветеринарної медицини.

Мета – з'ясувати зміни інфекційних властивостей ентеровірусів свиней *in vitro* за умов довготривалого зберігання за температури мінус 32 °С.

Матеріали і методи. Віруси:

– тешовірус свиней першого серотипу, *Teschovirus A*, штам «Дніпровський 34», 3 пасаж від 12.11.2018 року з титром $10^{8.5}$ ТЦД_{50/см³, отриманий з колекції штамів ентеровірусів свиней Інституту сільськогосподарської мікробіології НААН (ІСМ НААН). Даний штам вірусу був виділений на території України з головного мозку 2-місячного поросяти, хворого на ензоотичний енцефаломієліт (хворобу Тешена) свиней. Задепонований в депозитарії Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ за № 486. Згідно з паспортними даними штаму, вірус накопичували у перещеплюваних лініях культур клітин нирки ембріона свині (СНЕВ) та нирки новонародженого сирійського хом'ячка ВНК-21, клон 13 (ВНК-21/13);}

– ентеровірус свиней 8 серогрупи (нині *Porcine sapelovirus 1*, вид *Sapelovirus A*) (Viruses Master Species List 2019), референтний штам V-13, один із найбільш розповсюджених в свиногосподацтвах України, етіологічно пов'язаний з ентеровірусним гастроентеритом свиней, культивований у перещеплюваній культурі клітин СНЕВ. Перед заморожуванням вірусутримуючої суспензії останній раз пасажували та титрували у 2000 р.

Зразки штамів дослідних вірусів перевірені в тесті щодо стійкості до жиророзчинників (10 % хлороформу) та методом електронної мікроскопії.

Культивування вірусів здійснювали інкубуванням за температури 37 °С з перевіркою інфікованих культур клітин, у порівнянні з контролем (через кожні 24 год).

Середовища та розчини:

– поживне середовище «DMEM High Glucose», w/L – Glutamine, w/o Sodium Pyruvate, Sterile Filtered; виробник Biowest, серія S17885L0102, придатне до 26.07.2019, для культивування культури клітин;

– фетальна сироватка крові великої рогатої худоби «Fetal Bovine Serum Premium», виробник Biowest, серія S14317S181B, придатна до 28.01.2021;

– трипсин «Trypsin 0,25 %», w/o Calcium, w/o Magnesium, w/o Phenol Red, Sterile Filtered; виробник Biowest серія S16067L0910, придатний до 27.04.2019.

– розчин версену 0,02 %, виробництва ДНКІБШМ, придатний до 27.05.2020;

– антибіотик «Гентаміцин», розчин для ін'єкцій 4 %; виробник ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», серія 10118, придатний до 01.2023.

Культури клітин:

Перешеплювані культури клітин СНЕВ та ВНК-21 клон 13 (ВНК-21/13).

Пересіви культур клітин здійснювали з використанням: середовища DMEM, трипсину, розчину Версену, 10 % фетальної сироватки крові ВРХ, з додаванням антибіотика. Для отримання суспензії клітин та подальшого їх пересіву використовували суміш, що складалась з 0,02 % р-ну Версену та 0,25 % р-ну трипсину (1:5). Культури клітин були тестовані на відсутність контамінації мікроорганізмами у тіогліколевому середовищі та МПБ. Моношар клітин вирощували у скляних та пластикових культуральних флаконах, об'ємом 50 см³, у 96-лункових культуральних планшетах та у скляних пробірках. В якості підтримуючого середовища використовували аналогічне ростовому середовищу, але без додавання сироватки крові ВРХ. Титр вірусу – граничне його розведення, в якому спостерігали ураження моношару клітин не менше, ніж на 50 % в 50 % лунок.

Інфекційну активність визначали титруванням вірусу у культурах клітин за мікрометодом та розраховували за методикою Ріда та Менча, виражали в тканинних цитопатогенних дозах в 1,0 см³ (ТЦД₅₀/см³).

Результати й обговорення. Оскільки до родини вірусів *Picornaviridae* відносяться багато вірусів, патогенних для людини і тварин, нами вирішено визначити вплив мінусових температур за тривалого зберігання на інфекційні властивості ентеровірусів тварин, збудників інфекційних захворювань свиней, які є апатогенними для людини. Тому, нами було проведено процес рекультивування та подальше адаптування двох варіантів вищезначених збудників до культур клітин ВНК-21/13 та до СНЕВ, у яких вони раніше і культивувались, з метою визначення інфекційної активності після зберігання в умовах мінусових температур (за мінус 32 °С) протягом двох та двадцяти років.

Штам тешовірусу свиней «Дніпровський 34» після зберігання за мінус 32 °С протягом двох років був знову культивований протягом шести послідовних пасажів у культурі клітин ВНК-21/13. Вірус реплікувався у чутливій культурі клітин з вираженим характерним цитопатичним ефектом (рис. 1), починаючи з першого пасажу. Вигляд інтактної культури клітин, неінфікованої вірусом наведено на рис. 2.

Рис. 1. Ураження моношару культури клітин ВНК-21/13 тешовірусом, штам *Teschovirus A* «Дніпровський 34» (ЦПД вірусу) через 48 год. (Carl Zeiss Axiovert 40 Inverted Microscope, збільшення x 100)

Рис. 2. Контроль культури клітин ВНК-21/13 через 48 год. (відсутність ЦПД).
(Carl Zeiss Axiovert 40 Inverted Microscope, збільшення x 100)

У першому пасажі при рекультивуванні цитопатична дія (ЦПД) вірусу проявлялась за 53 год культивування на 75 %, у другому – за 51 год – на 80 %, у третьому-шостому пасажі на 100 % за 48 год культивування (табл. 1). Отриману вірусовмісну рідину відокремлювали від клітинного детриту шляхом центрифугування (3000 об/хв) протягом 15 хв., підготовлений вірусний матеріал третього пасажу у культурі клітин ВНК-21/13 титрували у 96-лункових планшетах методом десятикратних розведень, по 0,1 см³/лунка. Ми констатували, що вірус, після зберігання за мінус 32 °С за умов «освіження» протягом трьох пасажів у чутливій біологічній системі, зберігав свої інфекційні властивості і титр вірусу був таким як і до зберігання – 8,5 lg ТЦД₅₀/см³ (табл. 1).

Таблиця 1

**Пасажування тешовірусу свиней першого серотипу штаму «Дніпровський 34»
у перешеплюваній культурі клітин ВНК-21/13 після зберігання за – 32 °С протягом 2 років**

№ пасажу	Культура клітин	Наявність ЦПД	Час прояву ЦПД, год	Ступінь цитопатичної дії, %	Титр вірусу lg ТЦД ₅₀ /см ³
1	ВНК-21/13	+	53	75	н/д
2		+	51	80	н/д
3		+	48	100	8,5
6		+	48	100	8,5
Початковий титр (до зберігання)	ВНК-21	+	24-72	100	8,5

Примітка: н/д – не досліджували

Вихідний штам тешовірусу свиней тривало зберігався за мінусової температури (мінус 32 °С), що могло вплинути на його інфекційні властивості. Тому, процедура пасажування мала на меті відновити інфекційні властивості вірусу, чого ми і досягли, отримавши вірус з високим титром інфекційної активності – 10^{8,5} ТЦД₅₀/см³.

Другий досліджуваний ентеровірус свиней 8-ї серогрупи, референтний штам V-13 після 20 років зберігання за мінус 32 °С, після «освіження» у чутливій культурі клітин СНЕВ викликав ЦПД через 24 - 48 год (в залежності від пасажу), вигляд якої змінився в порівнянні з тим, який був до зберігання 20 років тому. Характер ЦПД цього штаму ентеровірусу після тривалого зберігання представлено на рис. 3, контроль культури клітин СНЕВ – на рис. 4. До зберігання – вигляд ЦПД цього збудника представлено на рис. 5.

Рис. 3. ЦПД ентеровірусу свиней 8-ї серогрупи референтного штаму V-13 в культурі клітин СНЕВ після тривалого зберігання за мінус 32 °С через 24 год. культивування (ZEISS Primovert, збільшення x200)

Рис. 4. Контроль культури клітин СНЕВ 24 год. культивування (ZEISS Primovert, збільшення x200)

А

Б

Рис. 5. А - ЦПД ентеровірусу свиней 8 серотипу у культурі клітин СНЕВ через 18 год. після інфікування (x 12,5 x 20). Б – контроль (через 18 год).

Також досліджували ентеровірус свиней 8-го серотипу з використанням електронномікроскопічних досліджень. На рисунках 6, 7 представлені електронно мікроскопічні зображення скупчення ентеровірусу свиней в інфікованій клітині.

Рис. 6. «Кристаллоїд» ентеровірусу свиней в інфікованій клітині (збільшення $\times 90000$).

Рис. 7. Ентеровірус свиней референтного штаму V-13 при культивуванні в культурах клітин SHEV (збільшення $\times 270000$, негативне контрастування).

Найбільш характерною особливістю морфологічних змін клітин, інфікованих ентеровірусом є досить виражена гіпертрофія рибосомального апарату. Спостерігалась найбільша кількість як вільних, рибосом, що лежали в цитоплазматичному матриксі, так і тих, що були зв'язаними з мембранами гранулярної ендоплазматичної сітки. Згадані зміни ультраструктури клітин відмічались вже з 3–5 години після моменту зараження ентеровірусом свиней. Паралельно з цим проходило накопичення в цитоплазмі ендоплазматичних цистерн чи вакуолей завбільшки близько 300–600 нм. Ці цистерни вміщували гранулярний матеріал і дуже тонкі мікротрубочки, діаметр яких становив близько 1,5 нм. Цистерни обмежені мембраною. При збільшенні у 90000 разів і більше, чітко спостерігали фібрилярний компонент цитоплазматичного матриксу. Цистерни ендоплазматичної сітки гранулярного типу не виглядали гіпертрофованими і заповнені мікротрубочками діаметром близько 1,5 нм, але меншої електронної густини, ніж у вже згаданих вакуолях. І ті, і інші утворення розміщувались у зонах цитоплазми, де можна спостерігати так названі “кристалічні” скупчення, можливо капсидного білка вірусу. Безсумнівно, ці “кристаллоїдні скупчення” брали участь у формуванні віріонів ентеровірусу. Це дозволило вважати, що вони безпосередньо зв'язані з морфогенезом ентеровірусів.

В інфікованих клітинах часто зустрічались характерні структури, капсиди ентеровіріонів. На ранніх стадіях збірки вірусних часточок ці утворення знаходились у тісному зв'язку з мембранами ендоплазматичної сітки гранулярного типу. В подальшому такий зв'язок ставав менш очевидним. На основі аналізу багаточисельних ультратонких зрізів, інфікованих ентеровірусом клітин культури не виявили збільшення активності лізосомального апарату

клітин. Знаходили поодинокі лізосоми. Вони практично відсутні в клітинах на всіх етапах репродукції ентеровірусу. Заключні етапи взаємодії ентеровірусу з клітиною являли собою картину деградації цитоплазми.

Дані щодо прояву ЦПД та титру інфекційної активності ентеровірусу свиней 8-го серотипу референтного штаму V-13 представлено в таблиці 2.

Таблиця 2

Інфекційна активність, час прояву ЦПД ентеровірусу свиней 8-ї серогрупи, референтного штаму V-13 у перещеплюваній культурі клітин СНЕВ

Умови	Час прояву ЦПД (год)	Ступінь прояву ЦПД (%)	Титр вірусу (lg ТЦД ₅₀ /см ³)
до зберігання	24	100	9,5
1-й пасаж після зберігання за -32 °С	48	100	н/д
2-й пасаж після зберігання за -32 °С	36-48	100	>7,5
3-й пасаж після зберігання за -32 °С	24	100	7,25

Примітка: н/д – не досліджували

Рекультивування ентеровірусу за умов процесу “освіження” після тривалого зберігання, здійсненого у перещеплюваній культурі клітин СНЕВ, виявило збереження його цитопатичних властивостей протягом трьох послідовних пасажів, які проявлялись через 24-48 годин культивування *in vitro* за 37 °С. Цікавим виявився факт зміни характеру цитопатичної дії після тривалого зберігання. Крім того, виявили і збереження інфекційних властивостей, оскільки вірус мав титр 7,25-7,5 lg ТЦД₅₀/см³, що на два порядки нижче, ніж до зберігання. Але, інфекційна здатність вірусу зберігалась.

Для підтвердження видової належності тешовірусу свиней (Teschovirus A) була проведена полімеразна ланцюгова реакція з використанням двох груп специфічних олігонуклеотидних праймерів :

$$\frac{\text{rev-1a}}{\text{rev-1e}} = 316 \text{ п. н.}; \quad \frac{\text{rev-1c}}{\text{rev-1d}} = 158 \text{ п. н.}$$

Для виділення РНК використовували набір «РИБО-сорб», для постановки реакції зворотньої транскрипції застосовували комерційний набір «High Capacity cDNA Reverse transcription kit», Applied Biosystems™ (США).

Таким чином, видова належність до Teschovirus A зразків 5-го та 6-го пасажу рекультивування була підтверджена з обома групами вищевказаних праймерів.

Аналізуючи сьогоденну ситуацію, слід зазначити, що всередині родини пікорнавірусів відбуваються зміни у класифікації не тільки з появою нових вірусів, але і при встановленні нових характеристик у представників родини. Наприклад, деякі попередні представники родини були перекласифіковані в межах роду *Enterovirus*, що і трапилось з ентеровірусами свиней, які викликали хворобу Тешена та наразі віднесені до тешовірусів свиней першого серотипу.

Ентеровірусам, як і більшості кишкових вірусів, властива відносна стабільність до несприятливих умов навколишнього середовища, включаючи термічну стійкість, кислотну стійкість, стійкість до дії радіації, а також до окиснювачів та протеолітичних ферментів, що дозволяє їм вижити в навколишньому середовищі та полегшує їх передачу різними екологічними шляхами (наприклад, водою, продуктами харчування, аерозолями, і забрудненими цими вірусами неживими предметами тощо). Тому, погано очищені стічні води, становлять значну загрозу для чутливих до ентеровірусів тварин. Більш того, нами доведена значна стійкість представників родини пікорновірусів до тривалих дій низьких температур, що

необхідно враховувати практичним працівникам ветеринарної медицини при забезпеченні умов біобезпеки на свинофермах.

В И С Н О В К И

1. На прикладі ентеровірусу свиней 8 серогрупи, референтного штаму V-13 (збудника вірусного гастроентериту) доведено, що впродовж тривалого зберігання (20 років) за температури мінус 32 °С вірус не втратив інфекційних властивостей, хоча виявлена зміна цитопатогенних особливостей *in vitro* при рекультивуванні. Інфекційні властивості тешовірусу свиней першого серотипу теж здатні тривало зберігатись (2 роки) за витримування при температурі мінус 32 °С.

2. Життєздатність пікорнавірусів, збудників інфекційних захворювань тварин (свиней), за умов тривалого зберігання поза чутливим організмом необхідно враховувати, як при дослідженні екології вірусів, так і спеціалістам ветеринарної медицини на практиці, для попередження можливих спалахів інфекцій свиней ентеровірусної етіології із резервуарів навколишнього середовища, що є важливою часткою проблеми охорони довкілля та біобезпеки.

Перспективи досліджень. Враховуючи складну епідеміологічну та епізоотичну ситуацію в світі щодо вірусних інфекцій людини та тварин, поширення патогенів на нові території та екологічні ніші залишається вкрай актуальним питанням щодо можливості патогенних вірусів до довгострокового збереження своїх інфекційних властивостей за різноманітних умов, в тому числі і за впливу різних температурних режимів. Подальші дослідження біологічних властивостей вірусів щодо їх стійкості до фізичних чинників сприятимуть поліпшенню стратегій превентивних заходів щодо поширення вірусних інфекційних захворювань.

References

Aimee, M., Gall Benito, J. Mariñas, Yi Lu, Joanna L. Shisler (2015). Waterborne Viruses: A Barrier to Safe Drinking Water, Published: June 25, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004867>.

Andriushkova, N.H., Turchyna, N.S., Dolinchuk, L.V., Poniatovskyi, V.A., Melnyk, V.V., Shyrobokov, V.P., Trepet, L.M. (2016). Genome of enteroviruses in the serum of patients with acute cerebrovascular disorders. *Medychni perspektyvy*, 21, 4, 33-38. <http://nbuv.gov.ua/UJRN/Mp> [in Ukrainian].

Babkin, M.V. (2006). Structural analysis of infectious diseases of pigs in Ukraine in modern conditions. *Veterinarna meditsina: Mizhvid.tem.nauk.zbirnyk*, 86, 25-30. [in Ukrainian].

Bova, T.O., Derevianko, S.V., Soroka, V.I., Bokun, A.O. (2004). Methodological approaches to creating a test system for the detection of antibodies to Teschen disease virus in pigs based on TIF. *Naukovyi visnyk Lvivskoi derzhavnoi akademii veterynarnoi medytsyny imeni S.Z. Hzhyskoho*, 6, 2, 3-9. [in Ukrainian].

Bova, T.O., Derevianko, S.V., Soroka, V.I. (2005). Optimization of solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for the indication of porcine teshoviruses *Silskohospodarska mikrobiologhiia: mizhvid. temat. nauk. Zbirnyk*, 1-2, 156-163. [in Ukrainian].

Bova, T.O., Derevianko, S.V., Soroka, V.I. (2005). Accelerated method of diagnosis of enzootic encephalomyelitis (Teschen disease) of pigs. *Mikrobiolohichniy zhurnal*, 67, 6, 49-56. [in Ukrainian].

Bottner, A., Daneschnejad, S., Handrick, W. et al. (2002). A season of aseptic meningitis in Germany: epidemiologic, clinical and diagnostic aspects. *Pediatr. Infect. Dis.*, 21, 12, 1126-1132.

- Dayaram, A., Franz, M., Schattschneider, A., Damiani Armando, M., Bischofberger, S., Osterrieder, N. & Greenwood, Alex D. (2017). Long term stability and infectivity of herpesviruses in water, 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep46559>.
- Demina, A.V., Shteynberg, A.V. (2009). Enteroviruses. Part 2. Enterovirus infections: variety of clinical manifestations. *Byulleten SO RAMN*, 6 (140), 116–125 [in Russian].
- Doan, S. I. (2010). Enterovirus infections. Kyiv.: DIA, 9–28 [in Ukrainian].
- Doan, S. I. (2006). Epidemiological analysis of the incidence of enterovirus infections, taking into account clinical manifestations, age and territorial distribution. *Zaporozhskyyi medytsynskyyi zhurnal*, 2, 62–67 [in Ukrainian].
- Fauquet, C.M. (2005). *Viruses Taxonomy: Eighth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses* New-York, San Diego: Academic Press, 657 – 673.
- Fong, T.T., Lipp, E.K. (2005). Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 69, 357–371. doi: [10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005](https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005).
- Hall, A.J. (2012). Noroviruses: the perfect human pathogens? *J Infect Dis* 205: 1622–1624. pmid:22573872. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis251>.
- International Committee on Taxonomy of Viruses Master Species List (2019), <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/9601>.
- Ischanova, I.Zh, Sagyinbaeva, B.A., Umarova, R.A. (2006). Modern clinical course of serous meningitis of enteroviral etiology. *Vestnik Yuzhno-Kazahstanskoy Meditsinskoy Akademii*, 2 (28), 58-59 [in Russian].
- Kahn, M. (2010). *The Merck Veterinary Manual*. Tenth Edition. Published by Merck &CO. inc. Whitenouse Station, N.J., U.S.A., 2945.
- Kehle, J., Roth, B., Metzger, C. et al. (2003). Molecular characterization of an Enterovirus 71 causing neurological disease in Germany. *J. Neurovirol*, 9, 1, 126-128. <https://doi.org/10.1080/13550280390173364>.
- Khetsuriani, N., La Monte-Fowlkes, A., M. Oberste, S., Pallansch Mark, A. (2006). Enterovirus Surveillance -- United States, 1970-2005, Surveillance Summaries, 1-20. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5508a1.htm>
- Klestova, Z.S. & Tatska, V.N. (2002). Ecological aspects of infectious mutagenesis of enterovirus etiology in swine genome pathology *Veterynarna medytsyna: Mizhvidomchyi tematychny naukovyi zbirnyk*, 82, 293 – 295. [in Ukrainian].
- Klestova, Z.S. & Tatska, V.N. (2003). The effect of enteroviruses on the genetic apparatus of porcine cells. *Animal biology*, 5, 1-2, 257- 263. [in Ukrainian].
- Martynova, G.P. (2014). Enterovirus (non-polio) infection in children. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie*, 3, 100–105 [in Russian].
- Melnychenko, O.M., Mushtuk, I.Iu., Marchenko, V., Tashuta, S., Dremukh, Yu.. Klestova. Z.S. (2014). Enteroviruses and their role in infectious pathology. *Veterynarna biotekhnolohiia*. 24, 105-114. http://nbuv.gov.ua/UJRN/vbtb_2014_24_22 [in Ukrainian].
- Pallansch, M.A., Roos, R.P. (2001). Enteroviruses, polioviruses, coxsackieviruses and newer enteroviruses. *Field Virology*, 723-775. <https://doi.org/10.1002/0470857285.ch6>.
- Romanenko, V.P. (1974). Enterovirus diseases of pigs and their diagnosis. *Veterynariia*, 39, 53 – 55 [in Ukrainian].
- Romanenko, V.F. (1984). Infectious gastrointestinal diseases of pigs: dovidnyk, 65–70 [in Russian].
- Romanenko, V.F., Soroka, V.Y. (1995). Features of the epizootology of enzootic encephalomyelitis (Teschen disease) of pigs. *General epizootology: immunological, ecological and methodological problems: collection of scientific works*, 92-95 [in Ukrainian].
- Romanenko, V.P., Biloshtan, V.B., Sokolianskyi, I.F. (2007). Controllability of the infectious process in swine enterovirus diseases, 7, 34–36 [in Ukrainian].

- Rotbart, H.A. (1995). Meningitis and encephalitis. Human Enterovirus Infections. Washington: ASM Press, 271-289.
- Saeed, M., Zaidi, S., Naeem, A. et al. (2007). Epidemiology and clinical findings associated with enteroviral acute flaccid paralysis in Pakistan. BMC Infect. Dis., 7. doi: [10.1186/1471-2334-7-6](https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-6).
- Seidel, K.M., Goyal, S. M. Reo, V.Ch., Melnick, J.T. (1983). Concentration of rotavirus and enterovirus from blue crabs (*Callinectes sapidus*). Appl. and Environ. Microbiol, 6, 1283-1286.
- Sereika, V. (2007). Seroprevalence of Antibodies against porcine teschovirus 1 in Lithuania. Acta Vet.Brno, 76, 231-236. DOI: [10.2754/avb200776020231](https://doi.org/10.2754/avb200776020231).
- Sereika, V., Lelesius, R., Zienius, D. (2007). Seroprevalence of Antibodies against porcine teschovirus 1 in Lithuania. Acta Vet. Brno, 76, 231-236. <https://doi.org/10.2754/avb200776020231>.
- Sergeev, V.A. (1993). Viral vaccines, 315 – 316. [in Ukrainian].
- Shevtsova, N.P. & Golubeva M.V. (2004). Neurological manifestations of enterovirus infection. Children's infections, 3, 49-52. [in Ukrainian].
- Shirobokov, V.P. (1974). The use of bentonite for the concentration of enteroviruses. Vaktsiny i syivorotki., 8, 27-33. [in Russian].
- Sorokina, M.N. & Skripnichenko, N.V. (2004). Viral Encephalitis and Meningitis in Children: A Guide for Physicians. [in Ukrainian].
- Starcheus, A.P. (1987). Sensitivity of cell cultures of various origins to porcine enteroviruses. Increasing the efficiency of veterinary support for industrial pig breeding: mater. nauchno-prakt. respubl. konf., 78 –79. [in Russian].
- Starcheus, A.P., Bondarenko, V.Y., Blotskaia, O.F., Zadorozhnaia, V.Y., Popovych, H.H., Vabyshevych, F.S. (1988). Study of the antigenic relationship of human and animal intestinal enteroviruses. Kishchnyye infektsii: Respubl. mezhvedomstv. Sbornik, 20, 25-27 [in Ukrainian].
- Syurin, V.N. (1998). Virusnyye bolezni zhivotnykh. Enterovirusnaya infektsiya sviney – M.: VNITIBP, 501 – 509. [in Russian].
- Tatska, V.N. (2004). Diseases of pigs with viral gastroenteritis in modern conditions. Veternarna biotekhnolohiia: biul., 5, 143 –152. [in Ukrainian].
- UNICEF (2012) Pneumonia and diarrhoea: Tackling the deadliest diseases for the world's poorest children. New York, NY: Statistics and Monitoring Section- Division of Policy and Strategy.
- Vorobeva, A.A. & Byikova, A.S. (2003). Atlas po meditsinskoy mikrobiologii, virusologii i immunologii. Moskva, Meditsinskoe inform. Aгенstvo. 117 – 120 [in Russian].
- Voroshilova, M.K. (1975). Enterovirusnyye infektsii cheloveka. M.: Meditsina: dovidnyk. [in Russian].
- Xu, W., Liu, CF., Yan, L. et al. (2012). Distribution of enteroviruses in hospitalized children with hand, foot and mouth disease and relationship between pathogens and nervous system complications, Virol J., 9, 8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-8>.
- Yamada, M., Kozakura, R., Ikegami, R., Nakamura, K., Kaku, Y., Yoshii, M. & Haritani, M. (2004). Enterovirus encephalomyelitis in pigs in Japan caused by porcine teschovirus. Vet. Rec., 155, 304–306 in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 8th Edition (2018), 1-3, 1618-1619. doi: [10.1136/vr.155.10.304](https://doi.org/10.1136/vr.155.10.304).
- Zell, R. (2001). Porcine teschovirus comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. J. Virol., 75,4, 1620 – 1631. doi: [10.1128/JVI.75.4.1620-1631.2001](https://doi.org/10.1128/JVI.75.4.1620-1631.2001).