

**НОВА КЛАСИФІКАЦІЯ ЕНТЕРОВІРУСІВ СВИНЕЙ:
СЕРОЛОГІЧНІ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ**

У зв'язку зі змінами сучасної класифікації і номенклатури пікорнавірусів, внесеними Міжнародним комітетом з таксономії вірусів, проведена генетична та серологічна рекласифікація 36 виробничих, типових та лабораторних штамів ентеровірусів свиней, виділених на території України. За результатами молекулярно-генетичних досліджень 34 штами віднесено до родини Picornaviridae, роду Teschovirus, виду Porcine teschovirus, 2 штами вірусів не вступали в полімеразну ланцюгову реакцію з видоспецифічними праймерами. У реакції нейтралізації вірусу встановлено, що 23 штами належать до тешовірусів свиней 1 серотипу, 4 штами – до РТВ-3, 1 – до РТВ-6, 1 штама – до сапеловірусів свиней, 3 штами мають міжтипові антигенні властивості, а 4 – відмінні від еталонних штамів тешовірусів, сапеловірусів свиней та ентеровірусів G.

К л ю ч о в і с л о в а: таксономія вірусів, рекласифікація вірусів, ентеровіруси G, тешовіруси свиней, сапеловіруси свиней.

Сучасна класифікація універсальна для всіх вірусів та є одним із найдинамічніших розділів вірусології. Таксономічне положення вірусів визначається на підставі вивчення властивостей віріону, організації і реплікації геному, антигенних і біологічних властивостей.

Встановлення нуклеотидного складу та структури геному ентеровірусів свиней (ЕВС) обумовило суттєві зміни у їх таксономії [11, 12, 14]. Так, за рішенням 11 Міжнародного конгресу з вірусології, який відбувся у Сідней у 1999 році, ЕВС 1-7, 11-13 серотипів віднесено в окремий рід *Teschovirus* до виду *Porcine teschovirus* (РТВ), який нараховує 11 серотипів. ЕВС 8 серотипу рекласифіковано як *Porcine enterovirus A*, а 9 та 10 серотипів – *Porcine enterovirus B*, які віднесені до роду *Enterovirus*. Пізніше, у 2009 році, Міжнародний комітет з таксономії вірусів рекласифікував вид *Porcine enterovirus A* в окремий рід *Sapelovirus* вид *Porcine sapelovirus* (PSV), а в 2012 році рекласифікував вид *Porcine enterovirus B* у вид *Enterovirus G* (EV-G) у межах роду *Enterovirus* [16].

Основним критерієм рекласифікації є структура геному. У тешовірусів виявлено ділянку геному L, яка кодує лідерний білок, що невластиве ентеровірусам. Між ентеровірусами G та сапеловірусами виявлено суттєві відмінності у послідовності нуклеотидів на ділянках геному VP2 і 3D та інших.

Другим критерієм перерозподілу є тип цитопатичної дії (ЦПД) вірусів у культурах клітин [13]. РТВ утворюють 1-й тип ЦПД, PSV – 2-й, а EVG – 3-й тип ЦПД, що не узгоджується з даними, отриманими Романенко В.П. з співавторами, які в культурі клітин СНЕВ та в первинній трипсинізованій культурі клітин ембріону свині різних типів ЦПД не відмічали [3, 4]. Крім того, за даними Knowles N. тешовірусам не притаманні фізико-хімічні властивості справжніх ентеровірусів, а саме: стабільність при широкому значенні рН середовища та стабілізація вірусів іонами двовалентних металів при прогріванні. Однак, за даними Романенка В.П. та Melnick J. стабілізація іонами двовалентних металів характеризує ікосаедричний тип симетрії та наявність РНК у складі нуклеокапсиду [3, 15].

Крім того, виявлено міжтипові антигенні зв'язки серед вірусів в середині роду як у реакції нейтралізації вірусу (РН), так і в реакції зв'язування комплементу, реакції імунофлюоресценції та імуноферментному аналізі [8, 9, 10, 13], що обумовлено спільними родовими антигенними детермінантами [17].

Відмічено деякі розбіжності між серологічною та генетичною класифікаціями. Так, за даними Kaku Y. et al. [12] штами SF16 та IP1 відповідно 4 і 6 серотипів ентеровірусів свиней за генетичною класифікацією віднесено до PSV, хоча інші представники цих серотипів – до РТВ.

Не зважаючи на те, що сучасна міжнародна класифікація пікорнавірусів містить ряд невіршених протиріч, існує необхідність у рекласифікації штамів, виділених на території Украї-

ни, приведенні у відповідність до діючої номенклатури пікорнавірусів чинних інструкцій та нормативної документації на штами, вакцини й набори діагностиків.

Метою нашої роботи було визначення таксономічного положення штамів ентеровірусів свиней, виділених на території України, відповідно до нової класифікації.

Матеріали і методи. У роботі використано 20 еталонних штамів тешо-, ентеро- та сапеловірусів свиней 14 серотипів, які були люб'язно надані професором Dauber M. з колекції Інституту вірусної діагностики імені Ф. Леффлера Федерального центру вірусних хвороб тварин Німеччини (табл. 1) та гіперімунні кролячі сироватки крові до цих штамів, отримані за модифікованою нами схемою [6]. Досліджували також 36 штамів ентеровірусів свиней (згідно з тривіальною класифікацією Романенка В.П. з співав. [4]), виділених на території України, які зберігаються в колекції Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (табл. 4).

У дослідах використано перещеплювані лінії культур клітин нирки ембріону свині (СНЕВ) та нирки новонародженого сірійського хом'яка (ВНК-21). Культури клітин вирощували в плоских колбах та пробірках з живильним середовищем 199 або Ігла навпіл з 0,5 % розчином гідролізату лактатальбуміну та 10 % сироватки крові великої рогатої худоби з внесенням антибіотиків з розрахунку 100 ОД бензілпеніциліну натрієвої солі та 100 мкг стрептоміцину сульфату на 1 см³ середовища. Зняття клітин зі скла проводили за допомогою 0,02 % розчину Версену, підігрітого до 37 °С. Посівна концентрація клітин становила 60–150 тис. кл/см³. Як підтримуюче середовище для культивування вірусів та постановки серологічних тестів використовували ті ж самі живильні середовища, але без сироватки крові ВРХ.

Таблиця 1

Еталонні штами тешо-, ентеро- та сапеловірусів свиней

Рід	Вид	Серотип	Еталонні штами вірусів
<i>Teschovirus</i>	<i>Porcine teschovirus</i>	1	Talfan, Teschen 199, Tirol, DS1520/93
		2	T 80, O 3b
		3	O 2b
		4	PS 36
		5	F 26
		6	PS 37
		7	F 43
		8	UKG 173/74, DS 805/92
		9	VIR 2899/84
		10	VIR 460/88
		11	Dresden
<i>Sapelovirus</i>	<i>Porcine sapelovirus</i>	8	V13, Potsdam 5116
<i>Enterovirus</i>	<i>Enterovirus G</i>	9	UKG 410/73
		10	LP 54

Біологічну активності вірусу, стійкість до ліпідорозчинників (ефіру і хлороформу), протеклітичного ферменту (трипсину), середовищ з діапазоном значень рН від 2 до 11, терморезистентність у присутності 1 М розчину MgCl₂, дію інгібітору синтезу ДНК (5-бром-2-дезоксиринидину) вивчали згідно з загально визначеними вірусологічними методами [3, 4].

Морфологію вірусів вивчали в трансмісивних електронних мікроскопах EM-1(Україна) та Tesla DS-540 (Словакія) та GEM-1400 (Японія) при інструментальному збільшенні 20000–22000 і прискорюючій напрузі 60–75кВ. Проби контрастували 2 % розчином фосфорновольфрамної кислоти (рН 7,0) протягом 2 хв. негативного контрастування.

Типову належність вірусів визначали в реакції нейтралізації в культурі клітин за використання 100 ПЦД₅₀ вірусу та 10 нейтралізуючих доз гіперімунних кролячих сироваток крові до еталонних штамів РТВ, PSV та EV-G [5] та перехресній РН при використанні постійної дози сироватки та десятиразових розведень вірусу.

Молекулярно-генетичну ідентифікацію вірусів проводили в полімеразній ланцюговій реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ ПЛР) за використання розроблених нами нових штучно синтезованих, оригінальних, видоспецифічних олігонуклеотидних праймерів [2].

Праймери створені за результатами аналізу геномів РТВ, EV-G та PSV за використання

програми Vector NTI Suite за використання алгоритму Align X і бази даних GenBank, EMBL, DDBJ. Розроблені для тешовірусів свиней праймери мали наступні послідовності:

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

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

Для ідентифікації ентеровірусів G були синтезовані наступні праймери:

Sense Primer: **Pev9F1 5'- GGATTGCGGTCAAGCACTTCTGTT**

Antisense Primer: **Pev9R1 5'-CGTGGTTAGGATTAGCCGCATTC**

Видоспецифічні праймери для сапеловірусів свиней мали наступну послідовність:

Sense Primer: **Pev8F6 5'-TGCCAAACTAAGAACGCCACTG**

Antisense Primer: **Pev8R6 5'-TCACCTTCTGCCATCCACAATC**

Для проведення ЗТ ПЛР використовували культуральні суспензії штамів вірусу. Екстракцію РНК досліджуваних зразків та зворотну транскрипцію проводили за допомогою комерційних наборів, рекомендованих до застосування в Україні згідно з настановами щодо застосування. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в ампліфікаторі, що має режим активного регулювання Терцик (Російська Федерація). Ампліфікацію проводили за програмою, поданою в табл. 2.

Аналіз продуктів ампліфікації проводили в агарозному гелі за допомогою комерційних наборів, рекомендованих до застосування в Україні у градієнті напруги 10 В/см.

Таблиця 2

Режим проведення ампліфікації

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95° С	5 хв	1
2	94° С	1 хв	5
	58° С	1 хв	
	74° С	1 хв	
3	94° С	0,5 хв	35
	58° С	0,5 хв	
	73° С	0,5 хв	
4	72° С	5 хв	1
5			

Фрагменти ДНК виявляли у транслюмінаторі при проходженні ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі 310 нм у вигляді світлих жовтогарячо-червоних смужок. Фотографування гелів проводили з використанням комп'ютерних систем із цифровими відеокамерами.

Антигенну спорідненість (R) штамів вірусів обраховували за формулою Archetti J. і Horsfall F. [7].

$$R = 100\sqrt{r_1 \times r_2}, \text{ де}$$

$$r_1 = \frac{\text{гетерологічний титр}}{\text{гомологічний титр}} \quad \text{для вірусу до штаму 1}$$

$$r_2 = \frac{\text{гетерологічний титр}}{\text{гомологічний титр}} \quad \text{для вірусу до штаму 2}$$

Статистичну обробку результатів проводили за методикою Ашмаріна Н.П. [1]. Усі розрахунки здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Office Excel 2007.

Результати та їх обговорення. Усі досліджувані штами вірусів, виділені в Україні, за фізико-хімічними та біологічними властивостями не відрізнялись від еталонних штамів РТВ, EV-G та PSV. У культурі клітин СНЕВ та ВНК-21 віруси проявляли цитопатичну дію впродовж 24–48 годин. Їх титри становили від 5,0 до 8,5 lg ТЦД₅₀/см³. Різних типів ЦПД як в культурі клітин СНЕВ, так і ВНК-21 ми не спостерігали.

Досліджувані віруси стійкі до ліпідорозчинників, що вказує на відсутність ліпидовмісної оболонки віріону, проявляли стійкість до протеолітичного ферменту трипсину та не втрачали інфекційної активності в діапазоні значень рН від 2 до 10, що свідчить про їх можливість перебування і репродукції в епітелії слизової оболонки кишечника. Вони стійкі до дії інгібітору синтезу ДНК 5-бром-2-дезоксиридину. Терморезистентні в присутності двохвалентного 1 М розчину $MgCl_2$.

За використання електронної мікроскопії встановлено, що вірусні частки досліджуваних штамів вірусів сферичної форми діаметром 28-30 нм (рис. 1). За морфологічними ознаками досліджувані штами вірусів також не відрізнялися від віріонів еталонних штамів PTV, EV-G та PSV.

За результатами серологічного типування в реакції нейтралізації вірусу в культурі клітин СНЕВ з гіперімунними кролячими сироватками до еталонних штамів встановлено, що із 36 досліджених штамів 35 належить до тешовірусів свиней, 1 – до сапеловірусів, 4 штами (В 151, Т 3, Ч 863, Ч 878) – антигенно відмінні від існуючих серотипів (табл. 3, 4). Встановлено, що ці штами вірусів нейтралізуються лише гомологічною сироваткою крові. Отже, штами вірусів В 151, Т 3, Ч 863, Ч 878, антигенно відрізняються між собою і належать до нових серотипів (табл. 3).

Таблиця 3

Результати типування штамів вірусів у перехресній реакції нейтралізації

Вірус \ Антисироватка	Т-3	Ч-878	Ч-881	В 151
Т-3	100	0	0	0
Ч-878	0	100	0	0
Ч-881	0	0	100	0
В151	0	0	0	100

Із 35 штамів тешовірусів свиней 23 мають антигенні зв'язки з першим серотипом, 4 штами належать до 3, 1 – до 6 серотипу. Штами вірусів Г 31, Г 676, Л 2661 мають міжтипові антигенні властивості і нейтралізуються сироватками крові до еталонних штамів декількох серотипів (табл. 4).

Дослідженням в ЗТ ПЛІР підтверджена належність 34 вітчизняних штамів до тешовірусів свиней, 2 штами – генетично відмінні і в ЗТ ПЛІР за використання видоспецифічних праймерів до PTV, EV-G та PSV продукти ампліфікації не утворювали (табл. 4).

Таким чином, досліджені штами ентеровірусів свиней, виділені на території України, не відрізняються від еталонних штамів PTV, EV-G та PSV. Відповідно до сучасної класифікації і номенклатури проведена генетична та серологічна рекласифікація українських штамів вірусів. За результатами молекулярно-генетичних досліджень 34 штами віднесено до родини *Picornaviridae*, роду *Teschovirus*, виду *Porcine teschovirus*. 2 штами вірусів не вступали в ЗТ ПЛІР з видоспецифічними праймерами. Результати вивчення антигенних властивостей в РН свідчать, що 23 штами належать до PTV-1, 4 – до PTV-3, 1 – до PTV-6, 1 – до PSV-8, 3 штами мають міжтипові антигенні властивості, а 4 – антигенно відмінні від еталонних штамів і належать до нових серотипів.

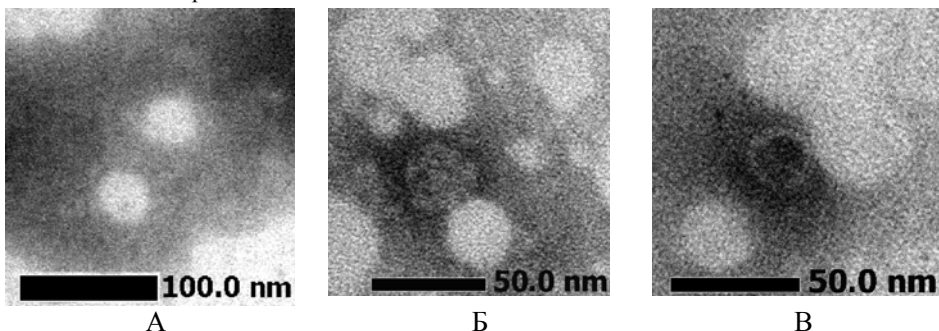


Рис. 1. Електронна фотографія: А – *Porcine teschovirus* штаму 878; Б – *Porcine sapelovirus* штаму V-13, В – *Enterovirus G* штаму UKG 410/73.

Рекласифікація штамів ентеровірусів свиней, виділених на території України

Штам вірусу	Типова належність за тривіальною класифікацією	Призначення	Таксономічне положення згідно з сучасною класифікацією	
			Типова належність за результатами РН	Видова належність за результатами ЗТ ПЛР
П 642	1	Вакцинний	РТV-1	РТV
Д 34	1	Вакцинний	РТV-1	РТV
Г 31	П	Вакцинний	РТV-1, 10, 11	РТV
Ч 2372	1	Контрольний	РТV-1	РТV
Б 652	1	Діагностичний	РТV-1	РТV
И 59	П	Діагностичний	РТV-1	РТV
Р 501	П	Діагностичний	РТV-1	РТV
М 2323	10	Типовий	РТV-1	РТV
К 9	11	Типовий	РТV-3	РТV
К 22	12	Типовий	РТV-1	РТV
Л 90	13	Типовий	РТV-1	РТV
М 116	14	Типовий	РТV-1	РТV
Ч 73	15	Типовий	РТV-3	РТV
Г 95	16	Типовий	РТV-1	РТV
Б 111	17	Типовий	РТV-1	РТV
Ч 184	18	Типовий	РТV-1	РТV
Д 227	19	Типовий	РТV-1	РТV
И 249	20	Типовий	РТV-1	РТV
П 142	21	Типовий	РТV-6	РТV
В 151	22	Типовий	Новий серотип	РТV
И 393	23	Типовий	РТV-1	РТV
Д 32	1	Лабораторний	РТV-1	РТV
Д 33	1	Лабораторний	РТV-1	РТV
И 57	П	Лабораторний	РТV-1	РТV
И 23	П	Лабораторний	РТV-1	РТV
К 422	П	Лабораторний	РТV-3	РТV
Р 507	П	Лабораторний	РТV-3	РТV
Г 676	П	Лабораторний	РТV-1, 3, 6, 10	РТV
Г 680	П	Лабораторний	РТV-1	РТV
Л 2661	П	Лабораторний	РТV-3,6,10	РТV
Р 218	П	Лабораторний	РТV-1	РТV
Ч 756	П	Лабораторний	РТV-1	Генетично відмінний
Ч 881	Новий серотип	Лабораторний	PSV-8	Генетично відмінний
Т 3	Новий серотип	Лабораторний	Новий серотип	РТV
Ч 863	Новий серотип	Лабораторний	Новий серотип	РТV
Ч 878	Новий серотип	Лабораторний	Новий серотип	РТV

П р и м і т к а. «П» – штамп вірусу з міжтипovими антигенними властивостями (нейтралізується сироватками крові до вірусів декількох серотипів).

НОВАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ЭНТЕРОВИРУСОВ СВИНЕЙ: СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Резюме

В связи с изменениями современной классификации и номенклатуры пикорнавирусов, внесенными Международным комитетом по таксономии вирусов, проведена генетическая и серологическая реклассификация 36 производственных, типовых и лабораторных штаммов энтеровирусов свиней, выделенных на территории Украины. По результатам молекулярно-генетических исследований 34 штамма отнесены к семье *Picornaviridae*, рода *Teschovirus*, вида *Porcine teschovirus*, 2 штамма вирусов не вступали в полимеразную цепную реакцию с видоспецифичными праймерами. В реакции нейтрализации вируса установлено, что 23 штамма относятся к *Porcine teschovirus* 1 серотипа, 4 штамма – к РТВ-3, 1 – к РТВ-6, 1 штам – к *Porcine sapelovirus*, 3 штамма имеют межтипные антигенные свойства, а 4 – антигенно отличные от эталонных штаммов тешовирусов, энтеровирусов и сапеловирус свиней.

К л ю ч е в ы е с л о в а: таксономия вирусов, реклассификация вирусов, энтеровирусы G, тешовирусы свиней, сапеловирусы свиней.

S.V. Derevianko

*Institute of Agricultural Microbiology and Agro-industrial Manufacture,
Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Chernihiv*

NEW CLASSIFICATION OF ENTEROVIRUSES PIGS: SEROLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC ASPECTS

Summary

Due to changes in modern classification and nomenclature family *Picornaviridae* made by the International Committee of Taxonomy of Viruses, conducted genetic and serological reclassification of 36 industrial, typical and laboratory strains porcine enteroviruses isolated in Ukraine. The results of molecular genetic studies of 34 strains assigned to the family *Picornaviridae*, genus *Teschovirus*, species *Porcine teschovirus*, 2 strains of virus did not engage in polymerase chain reaction with species specific primer. In the neutralization reaction of the virus revealed that 23 strains belonging to 1 serotype *Porcine teschovirus*, 4 strain – PTV-3, 1 – to PTV-6, 1 strain – to *Porcine sapelovirus*, three strains have between typical antigenic properties, and 4 strains – antigenically different from reference strains *Porcine teschovirus*, *Enterovirus G* and *Porcine sapelovirus*.

The paper is presented in Ukrainian

Key words: virus taxonomy, reclassification of viruses, *Enterovirus G*, *Porcine teschovirus* and *Porcine sapelovirus*.

The author's address: S.V. Derevianko, Institute of Agricultural Microbiology and Agro-industrial Manufacture, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences: 97 Shevchenko St., Chernihiv, 14027, Ukraine

1. Ашмарин Н.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.:»Медицинская литература», 1965. – 240 с.
2. Головка А.М., Дерев'яно С.В., Бова Т.О., Сорока В.І., Кацимон В.В. Конструювання видоспецифічних праймерів для молекулярно-генетичної ідентифікації тешовірусів та ентеровірусів А і В Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Чернігів: ЦНТЕІ, 2009. – Вип. 10. – С.156–165.
3. Романенко В.П., Пінчук І.М. Генетичні маркери ентеровірусів, виділених з легень свиней, хворих на пневмонію // Вісник сільськогосподарської науки. – 1982. – № 10. – С.47–49.
4. Романенко В.Ф., Прусс О.Г., Бабич Н.В., Полевик Е.І., Бокун А.А., Пінчук І.Н. Классификация энтеровирусов свиней // Вісник аграрної науки. – 1993. – № 1. – С.94–101.

5. Сорока В.І., Бокун А.О., Дерев'яно С.В., Божок Л.В., Бова Т.О. Рекомендації з діагностики, профілактики та ліквідації тешо- та ентеровірусних енцефаломієлітів свиней / [Укладачі]. – Чернівці: Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН, 2006. – 28 с.
6. Пат. 58734 Україна, МПК G01N 33/53 (2006.01). Спосіб одержання гіперімунної сироватки крові до вірусів тварин і рослин / Бова Т.О., Волкова І.В., Дерев'яно С.В. – Опубл. 26.04.2011, Бюл. № 8.
7. Archetti J., Horsfall F.L. Persistent-antigenic variation of influenza A virus after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum // *Journal of Experimental Medicine*. – 1950. – V.92, № 5. – P. 441 – 462.
8. Auerbach J. Serologische Klassifizierung porziner Enterovirus Feldisolate aus Schweinen mit zentralnervösen Störungen mittels Neutralisationstest und indirekter Immunfluoreszenz und Beschreibung von zwei neuen Serotypen (PEV12 und PEV13) // *Fachbereich Veterinarmedizin, Justus-Liebig-Universität - Giessen - (Germany)*. – 1993. – P.12.
9. Dauber M. Identification of group I porcine enteroviruses by monoclonal antibodies in cell culture// *Veterinary Microbiology*. – 1999–.V.67. – P.1–12.
10. Dunne H.W., Wang T.J., Ammermann E.H. Classification of North American porcine Enteroviruses: a comparison with European and Japanese strains // *Infection and Immunity*. – 1971. – V.4, № 5. – P. 619–631.
11. Fauquet C.M., Mayo M.A, Maniloff J., Desselberger U and Ball L.A. *Virus Taxonomy* //Academik Press, 1162 pp (2005) Elsevier. – 2005 P.1–11.
12. Kaku Y, Sarai A and Mukarami Y. Genetic reclassification of porcine enteroviruses// *Journal of General Virology*. – 2001. – V.82. – P.417–424.
13. Knowless N.J., Buckley L.S., Pereira H.G. Classification of porcine enteroviruses by antigenic analysis and cytopathic effects in tissue culture: description of 3 new serotypes // *Archives of Virology*. – 1979. – V. 62, № 3. – P. 201–208.
14. Pringle C.R. *Virus Taxonomy* // *Archives of Virology*. – 1999. – V.144. – P. 421–429.
15. Melnick J., Wallis C. Cationic stabilization - A new property of enteroviruses // *Virology*. – 1961. – V. 14. – P. 74– 82.
16. *Virus Taxonomy: 2012 Release (current)* [Електронний ресурс] : Офіційний сайт Міжнародного комітету з таксономії вірусів. – Режим доступу: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
17. Zell R., Dauber M., Krumbholz A., Henke A., Birch-Hirschfeld E., Stelzner A., Prager D., Wurm R. Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects // *Journal of Virology*. – 2001. – V. 75, February. – 1620–1631.

Отримано 26.09.2013