

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ім. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО

ДЕРЕВ'ЯНКО СТАНІСЛАВ ВАСИЛЬОВИЧ

УДК: 576.8.077:576.835.11/636.4

АНТИГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ЕНТЕРОВІРУСІВ СВИНЕЙ

03.00.06 - вірусологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 2001

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в лабораторії вірусології тварин Інституту сільськогосподарської мікробіології Української академії аграрних наук

Науковий керівник: доктор ветеринарних наук, академік УААН **Романенко Володимир Пилипович**, Інститут ветеринарної медицини УААН, завідувач лабораторії генетики та імунології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України **Дяченко Наталія Сергіївна**, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, завідувач відділу молекулярної біології вірусів

доктор медичних наук, старший науковий співробітник **Задорожна Вікторія Іванівна**, Інститут епідеміології та інфекційних захворювань ім. Л.В. Громашевського АМН України, завідувач лабораторії поліомієліту та інших ентеровірусних інфекцій

Провідна установа: Національний аграрний університет Кабінету Міністрів України, м. Київ

Захист відбудеться “23” травня 2001 р. о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої

вченої ради Д 26.233.01 в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за адресою: 03143 м. Київ, вул. Заболотного, 154.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України: 03143 м. Київ, вул. Заболотного, 154.

Автореферат розісланий 20 квітня 2001 р.

**Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради**

Л.М. Пуріш

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ентеровіруси свиней відносяться до родини *Picornaviridae* роду *Enterovirus*. Підвищена увага до вивчення ентеровірусів обумовлена їх особливим екологічним, соціальним та економічним значенням.

Широке розповсюдження у тваринницьких господарствах України мають ентеровіруси свиней, які є етіологічними агентами пневмоній, гастроентеритів і пневмоентеритів, а також інших інфекційних захворювань. Нерідко у їх виникненні значну роль відіграють й інші інфекційні агенти (віруси і бактерії). У більшості випадків за одними клініко-епізоотологічними та патолого-анатомічними характеристиками ентеровірусний пневмоентерит визначити не можливо. Вирішальне значення для постановки діагнозу мають лабораторні дослідження. До методів діагностики належать виділення вірусу та його ідентифікація в реакції нейтралізації, а також ретроспективний аналіз сироваток крові. Ускладнюючим фактором їх застосування є існування значної кількості серотипів ентеровірусів свиней (ЕВС), кожен із яких необхідно ідентифікувати окремо. Виділення і вивчення ентеровірусів свиней, які нейтралізуються сироватками крові до референтних штамів ЕВС декількох різних серологічних груп, відкриває перспективи розв'язання цієї проблеми. Використання ЕВС з міжтипovими антигенними властивостями для створення діагностичних наборів дозволить скоротити кількість діагностичних штамів вірусів та спростити постановку діагнозу.

Єдиної думки щодо причини міжтипovих антигенних зв'язків ЕВС не існує.

Відповідно, є об'єктивна потреба у виділенні ЕВС, вивченні їх антигенних властивостей та з'ясуванні причин міжтипovих серологічних реакцій.

Теоретико-методологічна та практична значимість цього питання визначає актуальність теми дослідження, його мету та завдання дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження, подані в дисертаційній роботі, виконувались як складова частина тематичних планів по завданнях 0198U004590 "Розробити засоби діагностики та системи профілактики ентеровірусних інфекцій свиней" і 0198U004591 "Провести таксономію ентеровірусів свиней, вивчити закономірності утворення рекомбінантних штамів ентеровірусів" НТП УААН N23 "Ветеринарне забезпечення", а також завдання "Створити рекомбінантні штами ентеровірусів і на їх основі розробити набори діагностикумів і вірусвакцини проти ентеровірусних хвороб свиней" НТП Державного комітету з питань науки, техніки і промислової політики "Захист сільськогосподарських тварин від захворювань та нові лікувально-профілактичні препарати для ветеринарії" (договір N2/738-97 від 12.08.1997 р.).

Мета і завдання досліджень. Метою дослідження є визначення міжтипovих антигенних зв'язків ЕВС та розробка компактного набору діагностикумів ентеровірусних пневмоентеритів свиней.

Для досягнення цієї мети в дисертаційній роботі поставлено для вирішення такі

завдання:

- виділити штами вірусів, які є етіологічними агентами гастроентериту, енцефаломієліту та респіраторних захворювань свиней;
- вивчити їх біологічні, фізико-хімічні та антигенні властивості;
- дослідити вплив білкових компонентів клітин хазяїна на антигенні властивості ЕВС;
- провести міжтипові схрещування ЕВС і вивчити біологічні та антигенні властивості одержаних рекомбінантів;
- розробити компактний набір діагностикумів ентеровірусних пневмоентеритів свиней на основі штамів ЕВС з міжтиповими антигенними властивостями.

Об'єктом дослідження є ентеровіруси свиней.

Предметом дослідження є антигенні властивості ентеровірусів свиней.

Наукова новизна одержаних результатів. До основних результатів дисертаційного дослідження, що визначають його наукову новизну, належать:

виявлено 4 штами ЕВС, антигенно відмінних від вірусів відомих серотипів, та 28 штамів ентеровірусів свиней з міжтиповими антигенними властивостями;

встановлено, що міжтипові антигенні властивості обумовлені спільними вірусними антигенними детермінантами і не залежать від біологічних систем їх репродукції та методів очищення вірусів;

вперше визначено, що штами з міжтиповими антигенними властивостями не аглютинують досліджені еритроцити (людини чотирьох груп крові, свині, барана, кроля, морської свинки, миші та курки), хоч мають антигенні зв'язки з референтними штамми ЕВС, в яких цю властивість виявлено;

вперше одержано рекомбінантні штами ентеровірусів свиней з міжтиповими антигенними властивостями в результаті культивування *in vitro* суміші штамів ЕВС різних серотипів.

Практичне значення одержаних результатів. Практична цінність роботи полягає в тому, що вивчення штамів ЕВС з міжтиповими антигенними властивостями дозволило забезпечити наукове обґрунтування створення компактних наборів діагностикумів хвороб свиней ентеровірусної етіології. На основі штамів ЕВС з міжтиповими антигенними властивостями створено "Набір діагностикумів ентеровірусних пневмоентеритів свиней", який має ряд переваг над існуючими аналогами. На набір розроблено науково-технічну документацію, до якої належать Технічні умови, Інструкція по виготовленню і контролю якості набору та Тимчасова настанова по його застосуванню. Набір пройшов комісійну перевірку та перебуває на стадії виробничих випробувань, що здійснюються на базі Центральної державної лабораторії ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України (м. Київ).

Особистий внесок здобувача. Основні експериментальні дані здобувач одержав особисто. Робота виконана в лабораторії вірусології тварин Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН під керівництвом доктора ветеринарних наук, академіка УААН В.П.Романенка. Здобувачем проведено виділення вірусів з патологічного матеріалу, вивчення їх біологічних, фізико-хімічних та антигенних властивостей, концентрування та очищення вірусів, поставлено експерименти на тваринах. Літературний пошук, аналіз і узагальнення одержаних результатів, а також статистична обробка цифрового матеріалу виконані самостійно.

Апробація результатів дисертації. Основні матеріали дисертаційної роботи доповідалися на засіданнях Вченої ради Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН (1996-2000 рр.) та Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН (1996-1998 рр.); Міжнародній науково-практичній конференції

молодих вчених "Наукові досягнення в галузі ветеринарної медицини" (м. Харків, 1-2 квітня 1997 р.); Міжнародній науково-практичній конференції "Розвиток ветеринарної науки в Україні: здобутки та проблеми" (м. Харків, 24-26 вересня 1997 р.); Міжнародній науково-практичній конференції "Сучасні проблеми ветеринарної медицини зооінженерії та технології продуктів тваринництва" (м. Львів, 9-11 жовтня 1997 р.); Міжнародній науковій конференції "Проблемы инфекционной патологии сельскохозяйственных животных" (м. Владимир, 27-31 жовтня 1997 р.); II Міжнародній конференції "Біоресурси і віруси" (м.Київ, 7-10 вересня 1998 р.); Науково-практичній конференції молодих вчених аграріїв Чернігівщини "Наукове обґрунтування сталого розвитку агроекологічних систем Чернігівщини в ринкових умовах і обмеженого ресурсного забезпечення (м. Чернігів, 5-6 квітня 1999 р.); Науково-практичній конференції молодих вчених та спеціалістів "Стан та перспективи розвитку ветеринарної науки" (м.Харків, 5-6 жовтня 1999 р.); Установчій конференції паразитологів СНГ (м. Вітебськ, 23-24 вересня 1999 р.); Міжнародній науково-практичній конференції "Актуальные вопросы диагностики и профилактики наиболее распространенных болезней животных" (м. Ставрополь, 12-13 жовтня 1999р.); II науково-практичному семінарі молодих вчених і спеціалістів "Вчимося господарювати" (сmt.Чабани, 22-23 листопада 1999 р.); Міжнародній науковій конференції, присвяченій 100-річчю від дня народження С.З.Гжицького, (м. Львів, 5-7 травня 2000 р.), II (IX) Установчому з'їзді Українського мікробіологічного товариства (м. Чернігів, 11-13 вересня 2000 р.).

Публікації. За матеріалами досліджень опубліковано 16 наукових праць, з них 7 статей у фахових журналах та 9 - у інших виданнях.

Структура і обсяг дисертаційної роботи. Дисертаційна робота складається з вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Текст роботи викладений на 155 сторінках (з них 9 сторінок займають рисунки та таблиці). Робота містить 28 таблиць, 9 рисунків та 8 додатків. Список використаної літератури нараховує 219 джерел.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

РОЗДІЛ 1. Огляд літератури

Розділ 1 складається з шести підрозділів. У ньому надано огляд історичного розвитку та сучасного стану проблем, пов'язаних з антигенними властивостями ентеровірусів свиней. Висвітлено морфологічні, фізико-хімічні, біологічні та антигенні властивості ЕВС, проблеми серологічної класифікації ентеровірусів свиней. Наведено стислий аналіз етіологічної ролі різних серотипів ЕВС в захворюванні свиней та методів лабораторної діагностики цих хвороб. На підставі аналізу літературних джерел обґрунтовано актуальність теми, мету та завдання досліджень.

РОЗДІЛ 2. Об'єкти та методи досліджень

Штами вірусів, культури клітин та дослідні тварини. Для проведення дослідів використовували референтні штами ентеровірусів свиней 21-го серотипу, із яких 7 штамів (Konratice, F59, F34, F78, F12, F7 і V13, відповідно 1 - 6 та 8 серотипів) класифіковані Dunne H.W. з співавт. (1971), одержані в 1970 р. Романенком В.П. від Derbyshire J.V. (Велика Британія); 14 штамів (M2323, K9, K22, L90, M116, Ч73, Г95, Б111, Ч184, Д227, И249, П142, В151, И393, відповідно 10 - 23 серотипів) виділені та класифіковані Романенком В.П. з співавт. (1993), які захищені авторськими свідоцтвами і зберігаються в Інституті сільськогосподарської мікробіології УААН. Там же

зберігаються гіперімунні сироватки крові до них. Крім цього використовували 7 штамів ентеровірусів свиней, які мають міжтипові антигенні властивості (K422, P501, Ч756, Г681, Г705, И57, И59). В експериментах використані перещеплювані лінії культур клітин нирки ембріону свині (СНЕВ), нирки зеленої мавпи (Vero і Mark-145), а також 40 голів свиней, 48 кролів, 38 морських свинок і 42 білі миші.

Методи досліджень. Виділення ізолятів вірусів здійснювали із застосуванням методу послідовних пасажів в культурі клітин СНЕВ. Одержання чистих популяцій проводили триразовим клонуванням методом крайніх розведень з послідуочим триразовим клонуванням методом бляшок.

Інфекційну активність вірусів встановлювали в культурі клітин СНЕВ методом титрування і виражали в тканьових цитопатогених дозах (ТЦД₅₀/мл), обраховували за класичним методом Ріда і Менча, статистичну обробку здійснювали за методом Ашмаріна Н.П. (1965).

Біологічні та фізико-хімічні властивості ізолятів вірусів (чутливість до інгібіторів нуклеїнового обміну (актиноміцину Д та 5-бром-2-дезоксіуридину), ліпідорозчинників (ефіру та хлороформу), протеолітичних ферментів (трипсину), стійкість до прогрівання при температурі 50° С протягом 1 години в присутності 1 М розчину MgCl₂ та без нього, відношення до середовищ з різними значеннями рН (2-11) – досліджували із застосуванням загальноновизнаних методик.

Гемаглютинуючі властивості ЕВС вивчали методом прямої аглютинації еритроцитів людини чотирьох груп (0(I), А(II), В(III), АВ(IV)), еритроцитів барана, курей, морських свинок, мишей, свиней і кролів при різних значеннях рН від 5,3 до 7,5 і температурі 4, 18, 37° С.

Гіперімунні сироватки крові до ентеровірусів свиней одержували на кролях, морських свинках та білих мишах з застосуванням різних схем імунізації. Титр сироваток визначали в реакції нейтралізації вірусу в культурі клітин.

Типування виділених ізолятів проводили в реакції віруснейтралізації гіперімунними сироватками крові до референтних штамів 1-6, 8, 10-23 серотипів ЕВС з використанням постійної дози вірусу (100-1000 ТЦД₅₀/мл) і постійної дози сироватки - 20 нейтралізуючих одиниць (НО).

Антигенну спорідненість (R) виділених вірусів з референтними штамами ЕВС 21 серотипу визначали в перехресній реакції віруснейтралізації з використанням постійної дози сироватки (20 НО) та десятикратних розведень вірусу і обчислювали за формулою Archetti J. and Horsfall F. (1950).

Для звільнення штамів, які вступають в міжтипові серологічні реакції, від культурального антигену застосовували різні методи: послідовні пасажі вірусів у гетерогенних культурах клітин (Vero та Mark-145); послідовні пасажі вірусів через мозок поросят 2-3-місячного віку; очищення вірусів ультрацентрифугуванням у градієнті щільності сахарози (15-45 %) у присутності м'якого неіонного детергенту Twin-20; виснаження вірусвмістної культуральної суспензії сироваткою крові до гомологічної культури клітин.

Для вивчення морфології вірусних ізолятів та контролю за якістю очистки проводили електронно-мікроскопічні дослідження методом негативного контрастування.

Можливість одержання рекомбінантних штамів ЕВС зі зміненими антигенними властивостями вивчали шляхом культивування протягом 20 послідовних пасажів при високій множинності зараження 10-100 ТЦД₅₀ суміші штамів вірусів різних серотипів на 1 клітину та одноразової інокуляції суміші їх РНК в культурі клітин. У дослідгах використовували референтні штами ЕВС F78 та И249, відповідно, 4-го і 20-го

серотипів. Виділення РНК проводили гарячим фенольно-детергентним методом за Бішоп Дж. і Кох Г.К. (1972). Контроль за якістю одержаних РНК та їх сумішей проводили шляхом визначення репродуктивної активності в присутності РНК-ази та без неї в моношарі культури клітин, а також методом бляшок під агаровим покриттям. В реакції нейтралізації визначали антигенну спорідненість клонованих вірусів з вихідними (батьківськими) та референтними штамми ЕВС 21 серотипу. Подібним чином аналізували біологічні властивості нуклеїнових кислот та їх парних сумішей, виділених з референтного штаму Г95 16-го серотипу ЕВС та штамів И57, К422, Р501, Ч756 з міжтиповими антигенними властивостями.

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень

Виділення ізолятів вірусів і встановлення їх таксономічного положення. З метою оцінки розповсюдженості ентеровірусів на території України в 1995-1998 роках обстежено 20 свинарських господарств 7 областей України (Донецької, Київської, Одеської, Сумської, Харківської, Херсонської та Чернігівської). Від хворих, перехворілих та вимушено забитих свиней з симптомами пневмонії, гастроентериту, пневмоентериту та енцефаломієліту для вірусологічних досліджень відібрано 179 проб матеріалів (ректальні та назальні змиви, проби органів і тканин), а також 94 сироватки крові для серологічних досліджень.

У результаті дослідів виділено 47 ізолятів вірусів, що становить 26,3 % від загальної кількості відібраного матеріалу. Віруси проявили цитопатогенну дію в другому-шостому пасажах. Інфекційний титр вірусів коливався в межах 5,5 - 7,5 lg ТЦД₅₀/мл. Цитопатогенна дія вірусів характеризувалась дегенеративними змінами культури клітин СНЕВ, появою поодиноких округлих клітин, з подальшим зростанням їх кількості у вигляді вогнищ округлих клітин до повного руйнування моношару. Для одержання чистих популяцій штамів вірусів проведено їх триразове клонування методом крайніх розведень з послідовним триразовим клонуванням методом бляшок. Штами вірусів утворювали бляшки під агаровим покриттям у культурі клітин СНЕВ, які характерні для ентеровірусів свиней, а саме: круглої форми з рівними краями, прозорі, діаметр коливався в межах від 0,1 до 5,0 мм. .

Штами вірусів не знизили репродуктивної активності в культурі клітин СНЕВ у присутності інгібіторів ДНК (актиноміцину Д та 5-бром-2-дезоксіуридину), що свідчить про їх належність до РНК-геномних вірусів. Інфекційна активність вірусів не знизилася після обробки ліпідорозчинниками (ефіром, хлороформом) та протеолітичним ферментом трипсином, що вказує на відсутність ліпидовмісної оболонки та їх належність до кишкових вірусів. Віруси проявили стійкість як до кислого, так і до лужного середовища, характерну для ЕВС. Інфекційні титри вірусів знизились при прогріванні протягом 1 години на 1,0-1,5 lg ТЦД₅₀/мл, що вказує на їх

відносну термостійкість. Катіони Mg²⁺ сприяли стабілізації вірусів при прогріванні: їх титри в присутності 1 М розчину MgCl₂ не змінювались, що характерно для ЕВС.

У результаті вивчення типової належності 47 штамів вірусів встановлено, що 9 з них нейтралізувалися сироваткою крові до референтного штаму 1-го серотипу ЕВС, 2 штами – до 4-го серотипу, 4 штами належали до 6-го серотипу. У 28 штамів вірусів серотипова належність не визначена, так як їх нейтралізували сироватки крові до декількох (двох - вісімнадцяти) серотипів. Чотири штами (863, 878, 881 та 882) не нейтралізувалися жодною сироваткою крові до референтних штамів ЕВС 1-6, 8, 10-23 серотипів (табл.1).

Типова належність виділених штамів вірусів

Штам вірусу	Типова належність вірусу	Кількість серотипів
1	2	3
P814	1	1
P815	1	1
P816	1	1
P817	1	1
B823	1	1
M828	1	1
M829	1	1
M830	1	1
M831	1	1
935	4	1
936	4	1
865	6	1
877	6	1
938	6	1
939	6	1
917	10, 23	2
928	1, 12	2
853	4, 12, 14, 17	4
833	1, 2, 5, 13, 17, 20, 22, 23	8

Продовження таблиці 1.

1	2	3
851	1, 4, 6, 10, 13, 18, 20, 23	8
822	1-3, 10-12, 14, 18, 23	9
824	1, 2, 10, 11, 13, 14, 18, 22, 23	9
835	1-3, 10, 11, 13, 14, 17, 23	9
836	1, 2, 4, 6, 10, 13, 14, 19, 20	9
K757	1, 3, 4, 6, 10, 14, 18, 20, 23	9
796	4, 6, 8, 10-12, 14, 16, 17, 20	10
826	1-3, 6, 11, 13, 14, 18, 20, 22	10
831	1, 2, 6, 11, 13, 14, 17, 20, 22, 23	10
823	1, 2, 4-6, 11, 13, 14, 18, 22, 23	11
834	1-4, 6, 10-14, 23	11
859	3, 4, 10-14, 17, 18, 22, 23	11
915	3, 4, 6, 10, 11, 13, 14, 16-18, 23	11
X803	1-4, 13, 14, 16-20	11
829	1, 2, 4, 6, 10, 11, 13, 17, 18, 20, 22, 23	12
854	1, 3, 5, 6, 10-14, 17, 20, 22	12
827	1-6, 10, 11, 13, 14, 18, 20, 23	13
846	1-4, 6, 10, 11, 13, 16, 18-22	14
847	1-3, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 16-18, 20, 21, 23	15
K759	1-6, 10, 11, 13, 14, 16-18, 20, 21, 23	16
804	1-6, 8, 10-14, 16-18, 20, 22-23	18
805	1-6, 8, 10-14, 16-18, 20, 22-23	18
845	1-6, 10-14, 16-21, 23	18
K756	1-6, 8, 10, 11, 13, 14, 16-21, 23	18

- 863 антигенно відмінний0
- 878 антигенно відмінний0
- 881 антигенно відмінний0
- 882 антигенно відмінний0

Для подальшого вивчення і встановлення таксономічного положення чотирьох штамів вірусів (863, 878, 881, 882), які не нейтралізувалися сироватками крові до референтних штамів ЕВС, одержані гіперімунні кролячі сироватки з титром віруснейтралізуючих антитіл 1:128 - 1:512. У перехресній реакції віруснейтралізації встановлено, що штам 863 є антигенним варіантом 5-го серотипу. Штами 878, 881 та 882 вступають у слабкі перехресні реакції з сироватками крові до референтних штамів ЕВС 10-ти серотипів, антигенна спорідненість яких не перевищує 37 %. Між собою штами антигенної спорідненості не мають, крім штамів вірусів 881 та 882, які антигенно ідентичні (табл.2).

Таблиця 2

Антигенна спорідненість (R) штамів вірусів з референтними штамми ЕВС 21-го серотипу (%)													
Серотип	1	2	3	4	5	6	8	10	11	12	13	14	
15													
Штам вірусу	Konratice		F 59	F 34	F 78	F 12	F 7	V 13	M 2323		K 9	K	
22	Л 90	М 116	Ч 73										
863	0	70	50	54	73	0	0	37	37	22	13	21	0
878	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0
881	0	0	0	37	0	0	0	0	0	8	25	28	20
882	0	0	0	37	0	0	0	0	0	8	25	28	20

Продовження табл. 2

Серотип	16	17	18	19	20	21	22	23	АВ	АВ	АВ
АВ											
Штам вірусу	Г 95	В 111	Ч 184	Д 227	И 249	П 142	В 151	И 393	863	878	881
882											
863	12	32	11	0	0	0	24	0	100	0	0
878	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
881	0	17	15	20	0	0	24	22	0	100	100
882	0	17	15	20	0	0	24	22	0	100	100

Примітка. “АВ” – штами ЕВС, антигенно відмінні від відомих серотипів.

Для вивчення морфологічних особливостей цих штамів проведено електронну мікроскопію. Вірусні частки мають сферичну форму, не містять зовнішньої ліпидовміщуючої оболонки. Діаметр віріонів становить 28 нм. За морфологічними ознаками штами 863, 878, 881, 882 відповідають класифікаційним ознакам ентеровірусів.

Таким чином, на підставі вивчення біологічних, фізико-хімічних та антигенних властивостей усі виділені штами вірусів віднесені до родини Picornaviridae роду

Enterovirus. Слід відмітити, що штами, які вступають в міжтипіві серологічні реакції, мають фізико-хімічні та біологічні властивості, притаманні ентеровірусам, і зберігають свої антигенні властивості після триразового клонування методом крайніх розведень з послідувачим триразовим клонуванням методом бляшок.

З метою виявлення віруснейтралізуючих антитіл до ЕВС проведено ретроспективний аналіз 55 сироваток крові, відібраних від хворих свиней з клінічними ознаками пневмоентериту, і 39 сироваток – з ознаками ураження центральної нервової системи. У результаті проведених досліджень у 9-ти сироватках крові, відібраних від свиней з симптомами пневмоентеритів, виявлено антитіла до 1-го, 5-го, 10-го, 12-го, 13-го, 14-го, 18-го, 19-го та 23-го серотипів у розведенні 1:32. Деякі сироватки містили антитіла одночасно до декількох референтних штамів ЕВС, що зумовлено циркуляцією вірусів з міжтипівими антигенними властивостями або циркуляцією в господарстві ентеровірусів різних серотипів. У сироватках крові, відібраних від хворих свиней з клінікою енцефаломієліту, містяться антитіла до першого серотипу в розведенні 1:32 і вище (табл.3).

Таблиця 3

Результати ретроспективного аналізу сироваток крові, відібраних від свиней в господарствах, неблагополучних щодо інфекційних хвороб

№ сироватки Клінічні ознаки хвороби Титр віруснейтралізуючих антитіл Виявлено антитіла до серотипів ЕВС

1	2	3	4
772	пневмоентерит	1:32	1, 12, 13 і 18
781	s " s	1:32	10 і 13
782	s " s	1:32	10, 13 і 23
842	s " s	1:32	12 і 14
843	s " s	1:32	12 і 14
883	s " s	1:32	19
884	s " s	1:32	19
890	s " s	1:32	19
885	s " s	1:32	5
788	енцефаломієліт	1:32	1
805	s " s	1:32	1
806	s " s	1:32	1

Продовження таблиці 3.

1	2	3	4
810	s " s	1:32	1
811	s " s	1:32	1
812	s " s	1:32	1
818	s " s	1:256	1
819	s " s	1:128	1
820	s " s	1:512	1

Таким чином, виходячи з результатів вірусологічних досліджень та ретроспективного аналізу сироваток крові, у свинарських господарствах України широко розповсюджені ентеровіруси свиней з міжтипівими антигенними властивостями, що ускладнює їх ідентифікацію на рівні серотипу.

Гемаглютинуючі властивості ЕВС. Досліджено гемаглютинуючі властивості 58 штамів ентеровірусів свиней, з яких 33 вступають в міжтипіві серологічні реакції; 4

5	F12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	F7	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
8	V13	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
10	M2323+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	K9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	K22	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
13	Л90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	M116	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	Ч73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Г95	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
17	Б111	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Продовження таблиці 4.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
18	Ч184	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	Д227	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	И249	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	П142	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
22	В151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	И 393	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Контроль СНЕВ

-

Кількість серотипів 16 16 16 16 13 13 13 13 18 18 18

18

Примітки:

"*" - вихідна вірусмісна культуральна суспензія;

"***" - вірус, який пройшов 2-3 послідовні пасажі через головний мозок поросят;

"****" - вірус, очищений ультрацентрифуванням в градієнті щільності сахарози;

"*****" - вірусмісна культуральна суспензія, виснажена сироваткою крові до культури клітин СНЕВ.

Очищення від баластних білків і концентрування трьох штамів ЕВС К422, Р501, Ч756 з міжтипovими антигенними властивостями проводили диференційним центрифугуванням з послідуvчим ультрацентрифугуванням в ступінчастому градієнті щільності сахарози. Вірус розподілявся по всьому градієнту, на що вказує інфекційність усіх 8 відібраних фракцій. Виразений пік інфекційної активності вірусів, який становить 8,5 - 10,5 Іg ТЦД50/мл, виявлено у фракціях з вмістом сахарози 25%. В середньому пік інфекційної активності штамів вірусів, взятих у дослід, був на 0,5 Іg ТЦД50/мл нижчий інфекційної активності концентрованого вірусу, який наносили на градієнт, і на 1-2 Іg ТЦД50/мл більший вихідної вірусвмісної суспензії до концентрування.

Для контролю за якістю очищення вірусів проводили електронномікроскопічні дослідження препаратів, концентрованих ультра-центрифугуванням та очищених у градієнті щільності сахарози. У препаратах концентрованих вірусів виявлено нативні вірусні частки сферичної форми діаметром 28 нм без зовнішньої ліпидовмісної оболонки, віріони, які втратили цілісність і частково профарбовані контрастуючою речовиною ("порожні" вірусні частки), електронно доступні уламки зруйнованих віріонів меншого розміру неправильної форми (можливо, сегменти капсидів), поодинокі форми вірусу, які мають вигляд пустих віріонів з електронно-прозорим центром, відокремленим від периферичного кільця капсомерів ділянкою контрастуючої речовини ("дефектні" в інфекційному відношенні нуклеокапсида). Крім того, виявлено багато агрегатів повних і порожніх вірусних часток. Така морфологічна неоднорідність концентрованих препаратів зумовлює широкий профіль розподілу вірусу по всіх фракціях.

У препаратах вірусів, очищених в градієнті щільності сахарози (фракції з піком інфекційної активності), спостерігали поодинокі повні віріони та агрегати, утворені двома вірусними частками діаметром 28 нм.

Таким чином, при центрифугуванні в градієнті щільності сахарози відбувається очищення вірусів від баластних білків культури клітин, зруйнованих елементів вірусів, дефектних вірусних часток та великих агрегатів вірусів.

Усі фракції вірусів, відібрані після очищення в ступінчастому градієнті щільності сахарози, перевірялися на ідентичність в антигенному відношенні з вихідним і очищеним вірусом в реакції нейтралізації вірусу відповідними гомологічними специфічними сироватками. Встановлено, що в усіх фракціях інфекційність зумовлена вірусами з однаковими антигенними властивостями.

До очищених у градієнті щільності сахарози штамів вірусів одержали гіперімунні кролячі сироватки крові, які використовували для встановлення антигенної спорідненості очищених вірусів з вихідними та референтними штамми ЕВС. Згідно з результатами, наведеними в таблиці 4, очищені віруси зберегли свої антигенні властивості: штам вірусу К 422 залишився антигенно спорідненим 16 серотипам ЕВС, штам Р 501 – 13 серотипам і штам Ч 756 – 18 серотипам ЕВС.

Сироватка крові, одержана до культури клітин СНЕВ, не нейтралізувала як очищені віруси, так і вихідні віруси в культуральній суспензії. Після виснаження сироваткою крові титри вірусів не змінилися, а штами не втратили міжтипovих антигенних зв'язків (табл. 4).

Проведені дослідження свідчать про те, що антигени культури клітин СНЕВ не впливають на антигенні властивості ентеровірусів свиней. Міжтипovі антигенні зв'язки штамів вірусів зумовлені спільними антигенними детермінантами вірусного

походження.

Створення рекомбінантних штамів ЕВС з міжтипovими антигенними властивостями. При культивуванні суміші референтних штамів ЕВС F78 та И249 (відповідно, 4-го і 20-го серотипів) протягом 20 послідовних пасажів в перещеплюваній культурі клітин СНЕВ з високою множинністю інокуляції, інфекційні титри вірусів не змінилися. Інфекційна активність нуклеїнових кислот, виділених із вірусів цих штамів, виявилася на 4 - 4,5 Іg ТЦД₅₀/мл нижче активності нативних вірусів. У присутності РНК-ази нуклеїнові кислоти не проявили цитопатогеної активності, що свідчить про відсутність цілих віріонів в препаратах РНК. Діаметр бляшок, які утворювалися в моношарі культури клітин СНЕВ під агаровим покриттям після інокуляції нуклеїновими кислотами, був менший діаметру бляшок, утворених нативними вірусами. Інокуляція культури клітин сумішами вірусів та їх нуклеїнових кислот призводила до утворення бляшок значно більшого діаметру (табл. 5).

Таблиця 5

Біологічні властивості сумішей штамів ЕВС та їх нуклеїнових кислот в культурі клітин СНЕВ

Варіант	Інфекційна активність варіантів (Іg ТЦД ₅₀ /мл)				Середній діаметр бляшок (мм)
	Без РНК-ази	В присутності РНК-ази			
F78	7,5	7,5	1,8 ± 0,50		
И249	8,0	8,5	0,84 ± 0,01		
РНК F78	3,5	0	0,5 ± 0,10		
РНК И249	3,5	0	0,5 ± 0,05		
Суміш вірусів F78+И249	7,5	7,5	6,1 ± 0,50		
Суміш РНК F78+И249	2,5	0	2,0 ± 0,10		

Антигенний аналіз показав, що рекомбінантні клони штамів, відібраних при культивуванні суміші вірусів, мають 100 % антигенну спорідненість з вихідними референтними штамами F78 та И249, а також виявлені слабкі антигенні зв'язки рекомбінантних клонів досліджуваних штамів з референтними штамами 6-ти - 13-ти серотипів. Антигенні властивості вірусів, одержаних з нуклеїнових кислот, не відрізнялися від властивостей вихідних штамів вірусів. При одноразовому зараженні культури клітин сумішшю РНК штамів F78 та И249 їх клоновані варіанти мали антигенні властивості одного із них або обох батьківських штамів, які до того ж вступали в серологічні реакції з сироватками крові до ЕВС 2-го, 18-го, та 22-го серотипів (табл. 6).

Таблиця 6

Атигенна спорідненість (R) штамів F78, И249 ЕВС та їх клонованих варіантів сумішей (%)							
Штами вірусів	F78	РНК F78	И249	РНК И249	Суміш F78 + И249	Суміш РНК F78+И249	
F78	100	100	24	11	100	100	
РНК F78	100	100	11	11	100	100	
И249	24	11	100	100	100	73	
РНК И249	11	11	100	100	100	73	
Суміш F78 + И249	100	100	100	100	100	100	
Суміш РНК F78+И249		100	100	73	73	100	100

Нуклеїнові кислоти штамів K422, P501, Ч756, які мають антигенні зв'язки з референтними штамами відповідно 16-ти, 13-ти та 18-ти серотипів ЕВС, володіють репродуктивними та бляшкоутворюючими властивостями, притаманними РНК

референтних штамів ЕВС. Антигенні властивості вірусів, отриманих з нуклеїнових кислот, були такими ж, як у вихідних штамів вірусів.

При вивченні морфології бляшок клонів вірусів (K422, P501, Ч756), одержаних з нуклеїнових кислот та їх сумішей, виявлено розбіжність в їх характеристиках: РНК, як і самі віруси, з яких вони виділені, утворювали бляшки круглі, прозорі з чіткими, рівними краями; суміші РНК цих вірусів утворювали прозорі бляшки неправильної форми з нерівними краями значно більшого діаметру. Поряд з бляшками, які мають змінену морфологію, спостерігали бляшки, характерні для РНК одного із штамів. Одержані результати свідчать, що нуклеїнові кислоти штамів ЕВС, які володіють міжтипovими антигенними властивостями, мають такі ж репродуктивні та бляшкоутворюючі властивості, як і нуклеїнові кислоти референтних штамів. Рекомбінантні штами ЕВС мали змінену морфологію бляшок, яка відрізнялася від бляшок вихідних штамів вірусів за формою та діаметром. Рекомбінантні штами вірусів, які одержані при культивуванні двох референтних штамів ентеровірусів свиней 4-го та 20-го серотипів та виділених із них нуклеїнових кислот, мали антигенні властивості обох вихідних штамів вірусів і нейтралізувалися сироватками крові до штамів інших серотипів ЕВС. В подальших дослідженнях властивості одержаних рекомбінантних штамів зберігалися. Міжтипovі схрещування є багатofакторними і вимагають більш глибоких досліджень біологічних властивостей одержаних рекомбінантних штамів та вивчення їх на молекулярному рівні.

Розробка набору діагностикумів. Виділення ентеровірусів свиней, які мають міжтипovі антигенні зв'язки, і вивчення їх біологічних, фізико-хімічних та антигенних властивостей стало науковою основою розробки компактного набору діагностикумів ентеровірусних пневмоентеритів свиней. Набір розроблено на основі двох штамів ЕВС (И59 та P501) з міжтипovими антигенними властивостями, кожен з яких антигенно споріднений з 13-тю серотипами ЕВС, що є збудниками пневмоній, гастроентеритів та пневмоентеритів свиней. До набору входять 2 штами И59 та P501 і специфічні сироватки крові до них. Набір дозволяє протягом 7 днів в реакції нейтралізації вірусу визначити належність збудника до ЕВС та встановити титри віруснейтралізуючих антитіл в сироватках крові хворих та перехворілих тварин.

Застосування штамів ЕВС з міжтипovими антигенними властивостями дозволяє скоротити кількість діагностичних штамів, що робить набір більш компактним, дешевим при виготовленні і зручним у застосуванні.

На набір розроблено науково-технічну документацію (Технічні умови, Інструкція по виготовленню і контролю якості набору і Тимчасова настанова по його застосуванню) та методику виробничих випробувань. Набір пройшов лабораторну перевірку і проходить виробничі випробування на базі Центральної державної лабораторії ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України (м. Київ).

РОЗДІЛ 4. Аналіз та узагальнення результатів дослідження

У розділі 4 оцінено повноту вирішення поставлених завдань і достовірність результатів дослідження та співставлено їх з даними літературних джерел.

У процесі наших досліджень не підтвердилось, що антигени культури клітин СНЕВ впливають на результати реакції нейтралізації ентеровірусів свиней. На наш погляд, міжтипovі антигенні зв'язки зумовлені спільними антигенними детермінантами вірусів. Однією з причин міжтипovих антигенних зв'язків може бути рекомбінація між вірусами різних серотипів, що підтверджується результатами проведених нами досліджень. Запропонований "Набір діагностикумів ентеровірусних пневмоентеритів свиней" має ряд переваг перед існуючими аналогами.

ВИСНОВКИ

1. Серед свинопоголів'я в Україні циркулюють ентеровіруси відомих серотипів, а також віруси, антигенно відмінні від них, та віруси, які мають міжтипові антигенні властивості.
2. Міжтипova антигенна спорідненість досліджених ЕВС зберігається після триразового клонування вірусів методом крайніх розведень з наступним триразовим клонуванням методом бляшок, не залежить від біологічних систем репродукції та методів очищення вірусів, що вказує на їх зв'язок із спільними антигенними детермінантами вірусів.
3. Штами з міжтипovими антигенними властивостями не аглютинують еритроцити людини чотирьох груп крові, свині, барана, кроля, морської свинки, миші та курки, хоч мають антигенні зв'язки з референтними штамми ЕВС, в яких цю властивість виявлено.
4. У результаті міжтипovого схрещування одержано рекомбінантні штамми ентеровірусів свиней з міжтипovими антигенними властивостями.
5. На основі штамів ЕВС з міжтипovими антигенними властивостями розроблено і рекомендовано виробництву компактний набір діагностикумів ентеровірусних пневмоентеритів свиней, який має ряд переваг перед існуючими аналогами. Застосування вірусів з міжтипovими антигенними властивостями дозволяє зменшити кількість діагностичних штамів, робить набір більш компактним, дешевим при виготовленні і зручним у застосуванні.
6. З метою впровадження у виробництво наборів діагностикумів ентеровірусних пневмоентеритів свиней розроблено відповідну науково-технічну документацію: Технічні умови, Інструкцію по виготовленню і контролю якості набору та Тимчасову настанову по його застосуванню.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Дерев'янку С.В. Поліантигенні властивості штамів ентеровірусів свиней // Ветеринарна медицина України. - 1998. - N4. - С. 21.
2. Романенко В.П., Прусс О.Г., Полевик О.І., Бабіч Н.В., Дерев'янку С.В. Компактний набір препаратів для діагностики ентеровірусних пневмоентеритів свиней // Аграрна наука виробництва. - 1998. - N 4. - С.20. (Розробка набору діагностикумів, аналіз і узагальнення результатів, підготовка статті до друку).
3. Романенко В.П., Дерев'янку С.В., Полевик О.І., Прусс О.Г. Вивчення антигенних властивостей ентеровірусів свиней біологічними методами // Бюлетень Інституту сільськогосподарської мікробіології. - 1998. - N 3. - С.30-32. (Проведення експериментів, узагальнення результатів, підготовка до друку).
4. Дерев'янку С.В., Полевик О.І., Бова Т.О., Демченко А.М. Синтез та перевірка противірусної активності похідних 4-аміноантипірину *in vitro* // Ветеринарна медицина. - 1999. - N 76. - С. 35-37. (Перевірка антивірусної активності речовин, аналіз і узагальнення результатів, підготовка до друку).
5. Сорока В.І., Полевик О.І., Бабіч Н.В., Дерев'янку С.В., Романенко В.П. Розробка набору діагностикумів ентеровірусних пневмоентеритів свиней на основі штамів вірусів з поліантигенними властивостями // Науковий вісник Львівської державної академії ветеринарної медицини імені С.З. Гжицького. - 2000. - Т.2. - Ч.1. - С.166-168. (Обґрунтування розробки, написання статті).
6. Романенко В.П., Дерев'янку С.В., Полевик О.І. Концентрування та очистка поліантигенних штамів ентеровірусів свиней // Вісник аграрної науки. - 2000. - N 5. - С.

38-41. (Очищення і концентрування вірусів, антигенний аналіз, узагальнення результатів, підготовка матеріалу до друку).

7. Дерев'янку С.В., Романенко В.П., Сорока В.І. Гемаглютинуючі властивості ентеровірусів свиней // Бюлетень Інституту сільськогосподарської мікробіології. - 2000. - № 7. - С.40-41. (Проведення досліджень, аналіз і узагальнення одержаних результатів, написання статті).

8. Дерев'янку С.В. Одержання гіперімунних сироваток крові до ентеровірусів свиней, звільнених від культурального антигену // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених "Наукові досягнення в галузі ветеринарної медицини". - Харків.- 1-2 квітня 1997. - С. 21-22.

9. Дерев'янку С.В., Романенко В.П., Полевик О.І. До питання природи поліантигенності ентеровірусів свиней //Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції "Розвиток ветеринарної науки в Україні: здобутки та проблеми". - Харків. - 24-26 вересня 1997. - С.183. (Виділення РНК, аналіз біологічних та антигенних властивостей, підготовка до друку).

10. Дерев'янку С.В., Романенко В.П. Вплив культури клітин СНЕВ на антигенні властивості ентеровірусів свиней // Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції "Сучасні проблеми ветеринарної медицини, зооінженерії та технології продуктів тваринництва". - Львів. - 9-11 жовтня 1997.- С. 170-172. (Експерименти на тваринах, лабораторні дослідження, аналіз і узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку).

11. Дерев'янку С.В., Полевик Е.И., Романенко В.Ф. Антигенные свойства клонированных штаммов энтеровирусов свиней, полученных из РНК // Материалы международной научной конференции "Проблемы инфекционной патологии сельскохозяйственных животных". - Владимир. - 27-31 октября 1997. - С. 132. (Проведення досліджень, узагальнення результатів, підготовка до друку).

12. Романенко В.П., Дерев'янку С.В. Антигенні властивості ентеровірусів свиней // Матеріали II міжнародної конференції "Біоресурси і віруси".- Київ. - 7-10 вересня 1998. - С. 39. (Проведення досліджень, підготовка до друку).

13. Дерев'янку С.В., Полевик О.І., Сорока В.І. Рекомбінація і її значення в еволюції ентеровірусів свиней // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених аграріїв Чернігівщини "Наукове обґрунтування сталого розвитку агроекологічних систем Чернігівщини в ринкових умовах і обмеженого ресурсного забезпечення".- Чернігів. - 5-6 квітня 1999. - С. 32-35. (Проведення досліджень, узагальнення результатів, підготовка до друку).

14. Дерев'янку С.В., Полевик Е.И., Бабич Н.В., Романенко В.Ф. Смешанное культивирование энтеровирусов и их нуклеиновых кислот // Материалы учредительной конференции паразитологов СНГ. - Витебск.- 23-24 сентября 1999. - С.82-83. (Виділення нуклеїнових кислот, антигенний аналіз варіантів вірусів, підготовка до друку).

15. Романенко В.Ф., Прусс О.Г., Сорока В.И., Полевик Е. И., Дерев'янку С.В., Бабич Н.В. Диагностика энтеровирусных пневмоэнтеритов свиней // Сборник статей Ставропольского НИИЖК. Материалы Международной научно-практической конференции "Актуальные вопросы диагностики и профилактики наиболее распространенных болезней животных". - 12-13 октября 1999. - Ставрополь, 1999. - С.116-119. (Обґрунтування розробки набору діагностикумів, узагальнення результатів, написання статті).

16. Дерев'янку С.В. Антигенна характеристика ізолятів ентеровірусів свиней, виділених в господарствах України // Матеріали науково-практичного семінару

молодих вчених та спеціалістів "Вчимося господарювати". - 22-23 листопада 1999. - С.292-293.

АНОТАЦІЯ

Дерев'янка С.В. Антигенні властивості ентеровірусів свиней. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія. – Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, 2001.

Виділено і вивчено біологічні, фізико-хімічні та антигенні властивості 47 штамів ентеровірусів свиней (ЕВС), з яких: 9 віднесено до ЕВС 1-го серотипу, 2 – 4-го, 4 – 6-го та 4 штами не належать до відомих серотипів ЕВС. Типова належність 28 виділених штамів не визначена, так як вони мають антигенні зв'язки з референтними штамми ЕВС декількох серотипів. Встановлено, що міжтипові антигенні властивості ЕВС обумовлені спільними антигенними детермінантами вірусного походження. У результаті міжтипового схрещування референтних штамів ЕВС одержано клони з проміжними антигенними властивостями. На підставі вивчення штамів ЕВС з міжтиповими антигенними властивостями створено “Набір діагностикумів ентеровірусних пневмоентеритів свиней”.

Ключові слова: ентеровіруси свиней, штами, антигенні властивості, реакція нейтралізації вірусу, серотип, набір діагностикумів.

АНОТАЦІЯ

Дерев'янка С.В. Антигенные свойства энтеровирусов свиней. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.06 – вирусология. – Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, 2001.

Пневмония, гастроэнтерит и пневмоэнтерит относятся к наиболее распространенным болезням свиней. Энтеровирусы занимают особое место среди возбудителей этих болезней. Они широко распространены среди здорового свиного поголовья, и любые нарушения в содержании и кормлении животных могут привести к повышенной чувствительности к этой группе патогенов. Нередко в возникновении заболеваний значительную роль играют и другие инфекционные агенты (вирусы и бактерии). Решающее значение для постановки диагноза имеют лабораторные исследования. Усложняющим фактором применения существующих методов является наличие большого количества серотипов энтеровирусов свиней, каждый из которых необходимо идентифицировать отдельно. Выделение и изучение энтеровирусов свиней, вступающих в реакции с сыворотками к энтеровирусам нескольких разных серологических групп, открывает перспективы решения этой проблемы.

Диссертационная работа посвящена изучению антигенных свойств энтеровирусов свиней (ЭВС) и разработке наборов диагностикумов с использованием штаммов ЭВС с межтиповыми антигенными свойствами.

Выделены и изучены биологические, физико-химические и антигенные свойства 47 штаммов ЭВС, из которых: 9 отнесены к ЭВС 1-го серотипа, 2 – 4-го, 4 – 6-го и 4 штамма не принадлежат к известным серотипам ЭВС. Типовая принадлежность 28 выделенных штаммов не определена, так как они имеют антигенные связи с референтными штаммами ЭВС нескольких серотипов.

Штаммы, которые вступают в межтиповые серологические реакции, имеют

биологические и физико-химические свойства, характерные для энтеровирусов свиней. Установлено, что межтипковые свойства штаммы сохраняют после трехкратного клонирования методом предельных разведений с последующим трехкратным клонированием методом бляшек. Их антигенные свойства не изменились после 2-3 последовательных пассажей через головной мозг поросят, очистки в ступенчатом градиенте плотности сахарозы, истощения гиперимунной сывороткой против культуры клеток хозяина. Таким образом, межтипковые антигенные связи обусловлены общими вирусными антигенными детерминантами и не зависят от биологических систем их репродукции и методов очистки вирусов.

В результате культивирования смеси референтных штаммов ЭВС разных серотипов и их нуклеиновых кислот в системе *in vitro* отобраны клоны, антигенно родственные обоим исходным штаммам и вступающие в серологические реакции с референтными штаммами других серотипов.

На основе штаммов ЭВС с межтипковыми антигенными свойствами разработан "Набор диагностикумов энтеровирусных пневмоэнтеритов свиней" в реакции нейтрализации вируса. Использование энтеровирусов с межтипковыми свойствами позволяет сократить количество диагностических штаммов, что делает его компактным, дешевым при изготовлении и удобным в применении. На набор разработана научно-техническая документация (Технические условия, Инструкция по изготовлению и контролю качества, Временная инструкция по применению). Набор прошел лабораторные испытания и проходит производственную проверку.

Ключевые слова: энтеровирусы свиней, штаммы, антигенные свойства, реакция нейтрализации вируса, серотип, набор диагностикумов.

А B S T R A C T

Derevyanko S.V. Antigenic Properties of Porcine Enteroviruses. – Manuscript.

Thesis for a candidate's degree in biological sciences degree by speciality 03.00.06 – virology. Zabolotny Institute of microbiology and virology of Ukrainian National Academy of Science, Kyiv, 2001.

47 Porcine Enteroviruses (PEV) strains were isolated and their biological, physico-chemical and antigenic properties were investigated. 9 of these strains were referred to PEV of 1-th serotype, 2 – to PEV-4, 4 – to PEV-6, and 4 strains do not belong to PEV serotypes which are known. Typical fitting of 28 strains which were isolated is not determined, because they have the antigenic connections with PEV reference strains of the several serotypes. As it is established the intertypical antigenic properties of PEV are stipulated by common antigenic virus determinates. Clones with intermediate antigenic properties were received as a result of intertypical cross-breeding of the PEV reference strains. The Diagnostic set of porcine enterovirus pneumoenteritis was developed on the basis of studying of the PEV strains with intertypical antigenic properties.

Key words: porcine enterovirus, strains, antigenic properties, virusneutralisation test, serotype, diagnostic set.