

ТЕШОВИРУСНЫЙ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТ

РЕЗЮМЕ

Тешовирусный энцефаломиелит впервые был описан как чрезвычайно вирулентный энцефаломиелит свиней с высокими показателями смертности и ранее был известен как болезнь Тешена (или энтеровирусный энцефаломиелит). Эта болезнь вызывается штаммами серотипа 1 тешовируса свиней (ТВС-1), принадлежащего к роду тешовирусов (Teschovirus) семейства пикорнавирусов (Picornaviridae). Менее легкие формы болезни впервые были зафиксированы в Великобритании, где болезнь получила название болезни Тальфана, а также в континентальной Европе, где она была названа полиомиелитом шийт или доброкачественным энзоотическим парезом. Кроме штаммов ТВС-1 более легкие формы болезни могут вызываться другими серотипами ТВС, включая ТВС-2, -3, -4, -5, -6, -9 и -10.

Впервые болезнь была описана в городе Тешен в Чехословакии в 1929 году. В течение 1940-х и 1950-х годов она стала причиной серьезных потерь в странах Европы и распространилась на другие континенты. Относительно недавно вспышки этой болезни наблюдались на Гаити и в Доминиканской Республике. Несмотря на это, клиническая форма болезни встречается редко, и случаев ее развития в Западной Европе не отмечалось с 1980 года. Тем не менее, было получено серологическое доказательство того, что непатогенные варианты вируса и варианты вируса с низкой патогенностью циркулируют в популяциях свиней.

Идентификация возбудителя: *Вирус обладает афинностью к центральной нервной системе, и, по этой причине, суспензии головного и спинного мозга зараженных вирусом свиней используются в качестве инокулята при выделении вируса. Вирус успешно размножается на монослоях клеток ткани свиней, в частности, ткани почки. Штамм ТВС, в случае его наличия, вызывает специфическое цитопатическое действие, характеризующееся появлением округленных сокращающихся клеток. Для идентификации и серотипирования штаммов ТВС применяются соответствующие испытания с использованием специфических антисывороток или моноклональных антител к стандартным штаммам ТВС. Предпочтительными являются испытания методом нейтрализации вируса и методом непрямой реакции флюоресцирующих антител. Также возможно использование полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с амплификацией частей вирусного генома, однако до настоящего времени официально не было принято никаких специфических испытаний для диагностики.*

Серологические реакции: *Поскольку доминирование серотипа ТВС-1 в популяциях здоровых свиней в Центральной Европе может превышать 60%, а идентичные клинические симптомы могут вызываться и другими серотипами, включая другие серотипы ТВС, единственное серологическое испытание для обнаружения ТВС-1, дающее положительные результаты, не указывают на то, что наблюдающиеся неврологические симптомы фактически вызваны заражением ТВС-1. Четырехкратное повышение титра вместе с наличием типичных симптомов следует считать показателем того, что клиническая болезнь вызвана ТВС-1. Для проведения скрининга на наличие специфических антител в популяциях свиней рекомендуется использовать метод нейтрализации вируса на микротитрационных планшетах или метод твердофазного иммуноферментного анализа.*

Требования к вакцинам: Когда клиническая форма болезни была распространенной, вакцины были доступны и использовались, однако в настоящее время, когда болезнь является редкой, вакцины недоступны.

А. ВВЕДЕНИЕ

Тешовирусный энцефаломиелит (ранее называвшийся болезнью Тешена/болезнью Тальфана, а позже – энтеровирусным энцефаломиелитом) – это острое заболевание свиней, характеризующееся нарушениями центральной нервной системы (ЦНС). Тешен – это город в Чешской Республике, в котором данная болезнь была впервые зафиксирована в 1929 году (Klobouk, 1931; 1933). В 1950-х годах болезнь распространилась по всей Европе и привела к большим потерям в сфере свиноводства. Менее тяжелые формы болезни впервые были зафиксированы в Великобритании, где болезнь получила название болезни Тальфана, и в Дании, где она была названа полиомиелитом suum; эти формы относились к доброкачественным энзоотическим болезням свиней. Сообщений о заражении тешовирусным энцефаломиелитом в Западной Европе не поступало с 1980 года (Австрия), и в настоящее время эта болезнь считается редкой. За последние 20 лет (с 1996 года) сообщения о случаях развития болезни передавались в МЭБ следующими странами: Беларусь (в 1996, 1999 и 2005 годах), Япония (в 2002 году), Латвия (в 1997 году и в период с 2000 года по 2002 год), Мадагаскар (в период с 1996 года по 2000 год, в 2002 году и в период с 2004 года по 2005 год), Молдавия (в период с 2002 года по 2004 год), Румыния (в 2002 году), Россия (в 2004 году), Уганда (в 2001 году) и Украина (в период с 1996 года по 2005 год). В большинстве из этих случаев неизвестно, была ли болезнь диагностирована исключительно на основании клинических симптомов или в целях диагностики использовались также лабораторные испытания. Исключением является случай, зафиксированный в Японии в 2002 году (Yamada *et al.*, 2004).

Возбудителем тешовирусного энцефаломиелита является серотип 1 тешовируса свиней (ТВС-1), который принадлежит к виду тешовирус А (*Teschovirus A*) рода тешовирусов (*Teschovirus*) семейства пикорнавирусов (*Picornaviridae*) (Betts, 1960; Klobouk, 1933; Knowles *et al.*, 2012). Изначально ТВС относили к роду энтеровирусов (*Enterovirus*), и 11 исходных серотипов энтеровируса свиней (ЭВС), от ЭВС-1 до ЭВС-11, были разбиты на три группы, I, II и III, на основании производимого ими цитопатического действия (ЦПД), серологических исследований и размножения в различных культурах клеток (Knowles *et al.*, 1979). Серотипы от ЭВС-1 до ЭВС-7 и от ЭВС-11 до ЭВС-13 были отнесены к группе I. На основании результатов анализа секвенирования нуклеиновой кислоты и филогенетического анализа вирусы ЭВС группы I были отнесены к роду тешовирусов. Серотипы с ЭВС-1 по ЭВС-7 были переименованы в ТВС-1 – ТВС-7, а серотипы ЭВС-11 – ЭВС-13 – в серотипы ТВС-8 – ТВС-10; также были описаны дополнительные виды, ТВС-11 – ТВС-13 (на основании разницы в нуклеотидной последовательности в ВС1) (Boros *et al.*, 2012; Cano-Gomez *et al.*, 2011; Krumbholz *et al.*, 2002). Группа II ЭВС включала в себя ЭВС-8, который также был переклассифицирован в сапеловирус (*sapelovirus*) свиней 1 вида *Sapelovirus A* рода *Sapelovirus*. В группу III входили ЭВС-9 и ЭВС-10, которые в настоящее время переклассифицированы в энтеровирусы G1 и G2 вида *Enterovirus G* рода энтеровирусов (*Enterovirus*).

Вспышки тяжелого тешовирусного энцефаломиелита у свиней отмечались на Гаити в феврале 2009 года, и ТВС-1 был выделен из образцов головного мозга больных свиней. На основании результатов филогенетического анализа гена полипротеина было установлено, что выделенный на Гаити вирус был тесно связан с другими штаммами ТВС-1, включая штамм Kopratice, выделенный в Чешской Республике из биоматериала, взятого у свиней с болезнью Тешена (Deng *et al.*, 2012). В результате мониторингового исследования было

установлено, что инфекция преобладала во множестве различных регионов на Гаити и в Доминиканской Республике.

Серотипы ТВС-2, -3, -4, -5, -6, -9 и -10 были выделены у свиней с более легкими формами болезни (Witte von *et al.*, 1994). Инфекции ТВС часто не имеют клинических симптомов. Серотипы могут быть дифференцированы методом нейтрализации вируса (НВ) (Betts, 1960; Knowles *et al.*, 1979), а также с помощью реакции связывания комплемента (Knowles & Buckley, 1980) или непрямой реакции флюоресцирующих антител (НРФА) (Auerbach *et al.*, 1994; Romanenko *et al.*, 1982).

Инфекции ТВС поражают только свиней (включая диких кабанов); какая-либо информация о чувствительности к вирусу других видов животных, включая людей, отсутствует.

Дифференциальная диагностика включает диагностику инфекционного бульбарного паралича (болезни Ауески) и классической чумы свиней (в острой форме). Кроме того, в отдельных случаях схожие клинические симптомы могут проявляться при японском энцефалите, при заражении бактерией *Streptococcus suis*, а также при гемагглютинирующем энцефаломиелите. Также необходимо учитывать возможность неинфекционной этиологии данных симптомов, в частности, связанной с токсическим воздействием.

ТВС может быть идентифицирован серологически с помощью стандартных антисывороток, приготовленных методом гипериммунизации морских свинок, кроликов или не получающих молозива поросят стандартными штаммами серотипов 1–11 ТВС; наличие этих реагентов для типов 12 и 13 неизвестно.

Вирус проникает в организм животных через ротовую или носовую полость. Период инкубации составляет около 14 дней. Основными признаками продромального периода являются температура до 41,5°C, утомление, анорексия и локомоторные нарушения. За этим этапом следует этап гиперчувствительности, тремора, клонических спазмов (судорог) ног, периферического паралича, опистотонуса и нистагма; у молодых свиней могут наблюдаться конвульсии. На последней клинической стадии паралич распространяется с задней части тела на переднюю часть тела через поясничный отдел. Паралич терморегуляторного центра приводит к гипотермии. В случае паралича дыхательных мышц животное умирает от удушья.

Для постановки гистологического диагноза собираются образцы тканей головного мозга, мозжечка, промежуточного мозга, продолговатого мозга, а также спинного мозга из шейного и поясничного отделов. Образцы фиксируются в формальдегиде, и срезы окрашиваются традиционными гистологическими методами. Вирус размножается в ЦНС, приводя к развитию негнойного полиоэнцефаломиелита с лимфоцитарными периваскулярными «манжетами», особенно, в спинном мозгу (Klobouk, 1931). Патологические изменения наблюдаются в сером веществе промежуточного мозга, мозжечка, продолговатого мозга и в передних рогах серого вещества спинного мозга, обязательно включая дорсальные корешковые ганглии и ганглии тройничного нерва (ганглионеврит), и, в меньшей степени, в полушариях головного мозга. У очень молодых животных очаги поражения могут охватывать задние рога спинного мозга. Дегенерация нейронов (набухание, хроматолиз, некроз, нейронофагия, аксональная дегенерация) и ее замещение микроглиозом (астроцитозом, астроглиозом) развиваются на последней стадии болезни (Cantile & Youssef, 2016).

Обнаружение антигенов тешовируса методом иммуногистохимического исследования на фиксированных и залитых парафином срезах тканей ЦНС является очень сложной процедурой, проведение которой возможно не во всех случаях. В случае наличия соответствующих специфических антисывороток или моноклональных антител, а также

специфических техник обнаружения, взаимосвязь патологических изменений с локализацией возбудителя может быть установлена на фиксированных и залитых парафином срезах тканей ЦНС.

Лабораторная диагностика болезни основана на идентификации вируса, находящегося в ЦНС зараженных свиней, а также на обнаружении специфических антител в крови выздоравливающих животных.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследований, применяемые для диагностики тешовирусного энцефаломиелиита и их целевое назначение

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением	Вклад в политику искоренения	Подтверждение клинических случаев	Надзор за распространением инфекции	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя¹						
Выделение вируса	-	+++	-	+++	+	-
Обнаружение антигена	-	-	-	++	++	-
ПЦР ОТ в реальном времени	-	+	-	++	++	-
Выявление иммунной реакции						
ИДАГ	-	-	-	+	-	-
РСК	-	-	-	++	-	-
Твердофазный ИФА	-	-	-	++	+	-
НВ	-	-	-	+++	+++	+++

Пояснение: +++ = рекомендованный метод, прошедший валидацию для применения в указанных целях; ++ = приемлемый метод, который, тем не менее, может нуждаться в последующей валидации; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но применение существенно ограничено стоимостью, достоверностью или другими факторами; – = не подходит для данной цели; нп = не применимо.

ПЦР ОТ = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ИДАГ = иммунодиффузия в агаровом геле;

РСК = реакция связывания комплемента; твердофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ;

НВ = нейтрализация вируса.

¹ Для анализа клинического образца рекомендуется использовать сочетание методов идентификации возбудителя.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Выделение вируса

Прогресс в методах диагностики тешовирусного энцефаломиелита и в производстве вакцин стал возможным благодаря размножению вируса в культуре клеток (Madr, 1959; Maug & Schwoebel, 1957).

Образцы тканей головного и спинного мозга собираются у свиней, забитых на ранней клинической стадии болезни. Если образцы не подвергаются обработке незамедлительно, их необходимо поместить в раствор, приготовленный из забуференного фосфатом изотонического солевого раствора (ФБР), рН 7,4, и глицерина в равных долях. Фрагменты ткани измельчаются для приготовления 10% (процентное соотношение массы и объема) суспензии в ФБР. Полученная суспензия центрифугируется с центробежным ускорением 800 *g* в течение 10 минут. Надосадочная жидкость используется для инокуляции культур клеток. Монослойные культуры, полученные из исходной почки свиньи, или сформированные (устойчивые) клеточные линии, полученные из ткани свиньи, подходят для выделения ТВС.

1.1.1. Методика

i) Для испытания используются пробирки или сосуды с монослойными культурами клеток тканей. Пробирки или сосуды наполняются питательной средой, после чего инокулируются 0,1 мл гомогената ткани, в отношении которой имеются подозрения.

ii) Инокулированные лабораторные пробирки помещаются в барабан для вращающихся пробирок или сосуды с культурой клеток ткани помещаются на подставку, после чего инкубируются в течение 1 часа при температуре 37°C.

iii) Инокулят выливается; пробирки или сосуды для культур клеток тканей промываются ФБР, после чего они заполняются 1–20 мл поддерживающей среды без телячьей сыворотки (в зависимости от типа используемого сосуда для культур клеток тканей).

iv) Пробирки ежедневно исследуются под микроскопом. Если образец содержит ТВС, характерное ЦПД будет заметно через 3–4 дня. ЦПД характеризуется наличием небольших очагов округленных сокращающихся клеток. После нескольких пассажей вирус растет лучше и производит полное ЦПД. Идентификация ТВС может быть подтверждена с помощью специфической антисыворотки или моноклональных антител. Больше всего для этой цели подходят методы НВ и НРФА. Если изолят серологически идентифицирован как ТВС, инокуляция поросят является единственным надежным способом определения патогенности данного изолята.

1.2. Реакция нейтрализации вируса с целью идентификации тешовируса свиней

Вирус, полученный из культур клеток, разводится в поддерживающей среде для культур клеток с достижением степеней разведения, находящихся в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-6} , в десять этапов. Для серологического типирования тешовируса подготавливается 12 рядов каждого разведения; 50 мкл стандартных антисывороток к ТВС-1–11, разведенные в пропорции 1/10, добавляются в ряды 1–11, а 50 мкл отрицательной сыворотки добавляется в последний ряд; в случае наличия антисывороток к типам 12 и 13 необходим второй планшет. Смеси инкубируются в течение ночи при температуре 4°C или в течение 1 часа при температуре 37°C, после чего инокулируются в культуры, находящиеся во

вращающихся пробирках, или в лунки микротитрационных планшетов с культурами клеток в виде слившегося монослоя. Инокулированные культуры клеток инкубируются при температуре 37°C. Оценка производится через 72 часа и каждый последующий день до 10 дней в зависимости от того, когда наблюдалось ЦПД. Идентификация серотипа ТВС подтверждается в том случае, если титр выделенного вируса в присутствии данной антисыворотки как минимум на 10^3 ниже, чем титр вируса, инкубированного с отрицательной сывороткой.

1.3. Непрямая реакция флюоресцирующих антител для подтверждения наличия в клетках антигена тешовируса свиней

Испытание методом НРФА основано на реакции антигенов в инфицированных клетках со специфическими антителами в положительной сыворотке (Romanenko *et al.*, 1982). Данная реакция визуализируется антиглобулином, конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), с помощью микроскопа с источником ультрафиолетового или синего света. Антиген обнаруживается в клетках через 12 часов после заражения ТВС, т. е. перед развитием ЦПД. Поликлональные антисыворотки часто демонстрируют перекрестную реактивность (специфичность) с различными типами ТВС, что может служить препятствием для правильной интерпретации результатов.

1.3.1. Методика

- i) Монослои клеток почки свиньи на покровных стеклах инокулируются материалом, в отношении которого имеются подозрения. Положительные и отрицательные контрольные образцы должны обрабатываться параллельно с испытываемыми образцами.
- ii) После инкубации, продолжающейся в течение 12–16 часов, покровные стекла удаляются, дважды промываются в ФБР, высушиваются воздухом и фиксируются в холодном ацетоне в течение 5–15 минут.
- iii) Покровные стекла помещаются в коробку для влажных сред и заливаются гипериммунной антисывороткой кролика или свиньи к ТВС, разведенной ФБР в оптимальной пропорции 1/10, или ТВС-специфическим моноклональным антителом в рабочем разведении.
- iv) Коробка для влажных сред закрывается и инкубируется при температуре 37°C в течение 60 минут.
- v) Покровные стекла удаляются и трижды промываются в ФБР, после чего заливаются козьей антисывороткой к иммуноглобулину кролика или свиньи, конъюгированной с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) в предварительно оцененном рабочем разведении, и инкубируются при температуре 37°C в течение 30 минут.
- vi) После этого покровные стекла трижды промываются ФБР, высушиваются воздухом и помещаются в 0,1 моль Трис-глицеринового буфера, pH 8,6.

После обработки покровные стекла исследуются под микроскопом. Контрольные стекла исследуются в первую очередь для подтверждения того факта, что наблюдаемая флюоресценция является специфической. Флюоресценция имеет светло-зеленый цвет и наблюдается в цитоплазме и на периферии ядра клетки. Вместо покровных стекол могут использоваться также многоточечные стекла или многолуночные планшеты.

1.4. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ПЦР ОТ) представляет собой метод обнаружения и дифференциации специфических областей гена тешовируса свиней (Palmquist *et al.*, 2002; Zell *et al.*, 2000). Гнездовая ПЦР ОТ с комплектами специфичных праймеров использовалась для дифференциации ТВС и ЭВС (Zell *et al.*, 2000). ПЦР является более быстрым и менее трудоемким методом, чем выделение вируса культуральным методом и серотипирование. Тем не менее, использование ПЦР в настоящее время ограничено специализированными лабораториями.

2. Серологические реакции

Поскольку доминирование серотипа ТВС-1 в здоровой популяции свиней в некоторых странах Центральной Европы может превышать 60%, а идентичные клинические симптомы могут быть вызваны также другими вирусами, включая другие серотипы ТВС, единственное серологическое испытание на наличие ТВС-1, дающее положительные результаты, не является показателем того, что наблюдаемые неврологические симптомы фактически вызваны ТВС-1. Четырехкратное повышение титра вместе с типичными симптомами заражения вирусом должны рассматриваться как показатель того, что инфекция ТВС-1 стала причиной развития клинической болезни. Другой причиной того, что образцы парных сывороток необходимы для подтверждения значимости титров, являются зафиксированные случаи перекрестных реакций с орфанными тешовирусами.

Свиньи, выздоровевшие после перенесенной болезни, или свиньи с бессимптомной болезнью производят специфичные антитела. Для их обнаружения существуют серологические методы, самым полезным среди которых является испытание методом НВ на микротитрационном планшете с использованием культур клеток ткани почки свиньи (Mayr & Vibrack, 1971). Также разработан метод твердофазного ИФА, являющийся более чувствительным и быстрым (Hubschle *et al.*, 1983).

Для диагностики с помощью серологических реакций необходимо иметь стандартные штаммы серотипов ТВС, размножавшихся в культурах клеток, и гипериммунную сыворотку, моноспецифичную для типов ТВС.

2.1. Стандартные штаммы тешовирусов свиней

2.1.1. Характеристики

На основании многолетнего опыта, штамм Zabreh, изолированный в Чехословакии в период пиковой заболеваемости, был выбран в качестве стандартного штамма, являющегося возбудителем тяжелой формы тешовирусного энцефаломиелита. Патогенность данного штамма поддерживается путем внутрицеребральных пассажей в организм здоровых поросят, не получающих молозива. Данный вирус вызывает типичные симптомы тешовирусного энцефаломиелита по завершении инкубационного периода, составляющего 5–7 дней. Для серологической диагностики следующие штаммы серотипов ТВС должны использоваться в качестве стандартных штаммов: тип 1: Talfan, тип 2: T80, тип 3: O2b, тип 4: PS36, тип 5: F26, тип 6: PS37, тип 7: F43, тип 8: UKG/173/74, тип 9: Ger-2899/84, тип 10: Ger-460/88, тип 11: Dresden, тип 12: CC25/SPA/2006, тип 13: wild boar/WB2C-TV/2011/HUN.

2.1.2. Сохраненные образцы вируса

Стандартные штаммы размножаются на монослоях культуры клеток, полученных либо из исходной свиньи почки, либо из свиных яичек, или на стабильной клеточной линии,

например РК-15. 10% суспензия в ФБР, рН 7,4, готовится из тканей головного и спинного мозга поросят, в целях эксперимента зараженных ТВС. Некоторые типы выделяются из экскрементов. Суспензия центрифугируется, и надосадочная жидкость используется для инокуляции культур клеток. Процедура выращивания ТВС в культурах клеток выполняется следующим образом:

Питательная среда удаляется из культуры клеток, и после промывания забуференным раствором клетки инокулируются суспензией вируса и инкубируются при температуре 37°C. Объем инокулята должен быть равен 10% объема питательной среды. По истечении 1 часа инкубации при температуре 37°C инокулят сливается, сосуд для культур клеток промывается забуференным раствором, и клетки покрываются соответствующим объемом среды без сыворотки с добавлением антибиотиков. ЦПД проявляется в течение 48 часов, и монослой распадается с большей или меньшей степенью полноты в течение следующих 48–72 часов. Во время последующих трех-пяти пассажей в культуру клеток развитие ЦПД ускоряется, и концентрация вирионов возрастает. Титрование вируса выполняется в культурах клеток в пробирках или на микротитрационных планшетах. Адаптированный к клетке штамм обычно достигает цитопатической дозы (ЦПДТ) 50% (инфицирующая доза 50% культуры клеток ткани) при титрах 10^6 – 10^7 на мл.

Собранная жидкость проверяется на специфичность с помощью известной специфической гипериммунной антисыворотки. Обработка 5% хлороформом и выращивание в культурах клеток тканей человека и коровы, а также в куриных эмбрионах используются для того, чтобы исключить заражение другими вирусами. ТВС устойчив к воздействию хлороформа и размножается только в культурах клеток тканей свиней. Метод иммуофлюоресцентного окрашивания антител используется для обнаружения возможных загрязнителей, которые также устойчивы к воздействию хлороформа и размножаются на клетках тканей свиньи (например, парвовирус) или которые не являются цитопатическими. Сохраненные образцы вируса должны делиться на небольшие аликвоты и сохраняться при температуре -60°C . Замороженный вирус сохраняет свои свойства на протяжении нескольких лет. Для сохраненного вируса, который должен использоваться в испытаниях методом нейтрализации, рекомендованной дозой является постоянная доза 100 ЦПДТ₅₀.

2.2. Специфическая гипериммунная сыворотка

Специфическая гипериммунная сыворотка получается посредством повторной иммунизации ТВС морских свинок, кроликов или не получающих молозива поросят. Хотя животные отбираются из пород, не имеющих специфического патогена, перед иммунизацией они, тем не менее, испытываются на отсутствие антител к ТВС. Необходимо использовать стандартные штаммы. Кролики иммунизируются либо путем внутривенного введения чистой вирусной суспензии, либо путем подкожного или внутрибрюшинного введения вирусной суспензии с 10% масляного адьюванта. Хорошие результаты могут быть получены при введении трех доз по 2 мл вирусной суспензии с добавлением 0,2 мл масляного адьюванта через 2-недельные интервалы. У кроликов кровь берется через 10 дней после последней иммунизации. Поросята иммунизируются аналогичным способом. Собранные образцы сыворотки очищаются центрифугированием и хранятся в форме небольших аликвот при температуре -20°C . Образцы сыворотки титруются с помощью испытания путем нейтрализации и постоянного антигена. Только сыворотки с титром антител не меньше 1/256 могут использоваться для идентификации вируса.

2.3. Реакция нейтрализации вируса на микротитрационных планшетах

Реакция проводится на плоскодонных микротитрационных планшетах для культур клеток с использованием в качестве материала почки свиньи с небольшим числом пассажей, клеток тканей яичек или клеточных линий, полученных из клеток тканей свиньи. Сохраненный вирус выращивается в монослоях клеток. Вирус, собранный в культурах клеток, очищается центрифугированием и хранится в форме аликвот при температуре – 70°C. Питательная среда для культур, такая как полная среда Игла или сбалансированный солевой раствор Хенка (СРХ) с дрожжевым экстрактом, молочным альбумином и антибиотиками, используется в качестве разбавителя. Вирус, собранный в культурах клеток, очищается центрифугированием и хранится в форме аликвот при температуре – 70°C или в форме смеси с глицерином в пропорции 50/50, которая может храниться при температуре –20°C.

2.3.1. Методика

- i) Инактивируйте сыворотки свиньи в течение 30 минут при температуре 56°C.
- ii) Сыворотки, подлежащие испытанию, разводятся в питательной среде для клеточных культур в два этапа в пропорциях от 1/2 до 1/64; на одно разведение приходится четыре лунки при объеме 50 мкл на лунку.
- iii) Методы контроля включают в себя использование положительных и отрицательных сывороток, а также контроль клеток и контроль среды.
- iv) Добавьте в каждую лунку по 50 мкл сохраненного вируса, предварительно разведенного в питательной среде до получения 100 ЦПДТ₅₀.
- v) Инкубируйте в течение 1 часа при температуре 37°C на закрытых планшетах. Остаток сохраненного вируса также подвергаются инкубации.
- vi) Выполните обратное титрование остатка сохраненного вируса в четыре этапа с десятикратным разведением по 50 мкл на лунку и с использованием четырех лунок на одно разведение.
- vii) Добавьте 50 мкл суспензии клеток почки свиньи концентрацией 5×10^5 клеток на мл.
- viii) После последующего перемешивания на планшеты кладутся крышки, и планшеты инкубируются при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение 2–3 дней или в течение более продолжительного времени, максимум – в течение 8 дней.
- ix) Исследуйте планшеты под микроскопом на наличие ЦПД. Метод испытания должен быть валидирован путем проверки результатов обратного титрования вируса и титрования положительной контрольной сыворотки. Вирус должен демонстрировать результат, составляющий 100 ЦПДТ₅₀ при допустимом диапазоне 30–300. Стандартная положительная сыворотка должна демонстрировать титр в пределах 0,3 log₁₀ единиц от предварительно установленного среднего значения. Отрицательная сыворотка не должна демонстрировать нейтрализации при самой низкой испытанной пропорции разведения, например, 1/2.
- x) Результаты НВ определяются методом Спирмена–Кербера как разведение сыворотки, нейтрализующей вирус, в 50% лунок.

xi) Титры нейтрализации вируса относятся к положительным, если соответствующая сыворотка нейтрализует вирус при изначальном разведении сыворотки, составляющем 1/8 или выше.

2.4. Твердофазный иммуноферментный анализ

Альтернативным методом обнаружения и титрования специфичных антител к ТВС является метод твердофазного ИФА (Hubschle *et al.*, 1983). Это испытание выполняется на микротитрационных планшетах с использованием в качестве антигена ТВС, выращенного на культурах клеток. Это испытание может выполняться в соответствии со следующими этапами.

2.4.1. Приготовление антигена

i) Вирус размножается на монослоях культуры клеток, полученных либо из исходной почки или яичек свиньи, либо из постоянной клеточной линии, например РК-15. Питательная среда удаляется из культуры клеток, и, после промывания забуференным физиологическим раствором, клетки инокулируются вирусной суспензией с низким показателем множественного заражения. Через 30 минут инкубации при температуре 37°C клетки покрываются соответствующим объемом среды без сыворотки с добавлением антибиотиков. Инкубация при температуре 37°C продолжается вместе с ежедневными исследованиями под микроскопом. ЦПД должно проявиться в течение 48 часов, а распад монослоя большей или меньшей степени полноты – в течение последующих 48–72 часов. Адаптированный к клетке штамм обычно достигает цитопатической дозы (ЦПДТ) 50% (инфицирующая доза 50% культуры клеток ткани) при титрах 10^6 – 10^7 на мл.

ii) Собранный вирус очищается центрифугированием с центробежным ускорением 200 g в течение 15 минут, после чего он выделяется в осадок с окончательным 50% насыщением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в течение 120 минут при температуре 4°C.

iii) После центрифугирования с центробежным ускорением 2000 g полученный осадок взвешивается (суспендируется) в Трис-гидроксиметилметиламиновом буфере (ТЕН-буфере) [0,01 моль], этилен-диамин-тетрауксусная кислота (ЭДТК) [1 ммоль] и NaCl [0,15 моль], pH 7,4, до 1/100 от изначального объема.

iv) Концентрированная вирусная суспензия экстрагируется путем перемешивания с фреоном в пропорции 3/1 в течение 10 минут при температуре 4°C.

v) После последующего центрифугирования надосадочная жидкость разделяется на две отдельные фазы. Верхняя водная фаза, содержащая вирусный антиген, опресняется посредством пропускания через цилиндр 2,5 × 40 см, заполненный сефадексом G 25.

vi) Наконец, раствор вируса концентрируется путем ультрацентрифугирования с центробежным ускорением 160 000 g в течение 3 часов.

vii) Осадок суспендируется в ТЕН-буфере, pH 7,4; при этом объем вируса составляет приблизительно 1/1000 от изначального объема вируса.

viii) Нерастворимые белки сепарируются путем легкого центрифугирования, и надосадочная жидкость используется в качестве положительного антигена в твердофазном ИФА.

2.4.2. Методика

i) Планшеты активируются антигеном, предварительно разбавленным в фосфатно-буферном растворе (ФБР), рН 7,2, путем добавления 100 мкл в каждую лунку. Адсорбция антигена в поверхность планшета происходит в течение ночи при температуре 4°C. Параллельные ряды планшета должны быть обработаны отрицательным антигеном.

ii) Планшет пять раз промывается в ФБР с целью удаления избыточного количества антигена.

iii) Тест-сыворотки разводятся в пропорции 1/20 с ФБРТ (раствором ФБР, содержащим 0,05% полисорбата Твин 20). 50 мкл разведенных сывороток помещается в каждую из двух лунок с положительным антигеном и в две лунки с отрицательным антигеном. (Отрицательный антиген готовится способом, описанным выше, за исключением того, что культура клеток ткани не инокулируется вирусом, и клетки разрушаются заморозкой.) Планшет инкубируется в течение 1 часа при температуре 37°C.

iv) Планшеты пять раз промываются ФБРТ.

v) Предварительно установленное разведение пероксидазы хрена, конъюгированной с антигеном к иммуноглобулину свиней, производимым в организме кроликов, в объеме 50 мкл добавляется в каждую лунку. После этого планшеты инкубируются еще в течение 1 часа при комнатной температуре.

vi) Планшеты пять раз промываются в ФБР.

vii) Раствор субстрата (0,1% ортофенилэндиамин с 0,03% перекиси водорода в ФБР, рН 6,0) добавляется в количестве 100 мкл в каждую лунку.

viii) После добавления субстрата положительные образцы меняют цвет на темно-коричневый. Когда цветная реакция наблюдается в лунках с известными положительными сыворотками с достаточной степенью интенсивности, реакция останавливается путем добавления 50 мкл из 2 моль серной кислоты в каждую лунку. Абсорбция лунок измеряется на длине волны 492 нм, предпочтительно с использованием автоматического многоканального спектрофотометра с механизмом распечатки. Положительные и отрицательные сыворотки и неинфицированные клетки должны использоваться в качестве контрольных образцов параллельно с испытываемыми образцами.

ix) Абсорбция сыворотки – это среднее значение абсорбции двух лунок с положительным антигеном за вычетом среднего значения абсорбции двух лунок с отрицательным антигеном. Значения абсорбции тест-сывороток, более чем вдвое превышающие среднее значение абсорбции стандартных отрицательных сывороток, считаются положительными.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Вакцины против тешовирусного энцефаломиелита

В течение периода наибольшей активности болезни в центральной Европе и на Мадагаскаре активная иммунопрофилактика была важным средством контроля этой инфекции (Traub, 1942). Поскольку тяжелые клинические формы болезни в значительной

степени исчезли, вакцинация была прекращена, и вакцина больше не производится и не используется ни в одной стране мира.

ЛИТЕРАТУРА

AUERBACH J., PRAGER D., NEUHAUS S., LOSS U. & WITTE K.H. (1994). Grouping of porcine enteroviruses by indirect immunofluorescence and description of new serotypes. *J. Vet. Med. [B]*, **41**, 277–282.

BETTS A.O. (1960). Studies on enteroviruses of the pig. VI. The relationship of the T 80 strain of a swine polioencephalomyelitis virus to some other viruses as shown by neutralization tests in tissue cultures. *Res. Vet. Sci.*, **1**, 296–300.

BOROS A., NEMES C., PANKOVICS P., KAPUSINSZKY B., DELWART E. & REUTER G. (2012). Porcine teschovirus in wild boars in Hungary. *Arch. Virol.* **157**, 1573–1578.

CANO-GOMEZ C., PALERO F., BUITRAGO M.D., GARCIA-CASADO M.A., FERNANDEZ-PINERO J., FERNANDEZ-PACHECO P., AGUERO M., GOMEZ-TEJEDOR C. & JIMENEZ-CLAVERO M.A. (2011). Analyzing the genetic diversity of teschoviruses in Spanish pig populations using complete VP1 sequences. *Infect. Genet. Evol.*, **11**, 2144–2150.

CANTILE C. & YOUSSEF S. (2016). Nervous System. In: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals, Grant Maxie M., eds. Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, 372–373.

DENG M.Y., MILLEN M., JACQUES-SIMON R., FLANAGAN J.K., BRACHT A. J., CARRILLO C., BARRETTE R. W., FABIAN A., MOHAMED F., MORAN K., ROWLAND J., SWENSON S. L., JENKINS-MOORE M., KOSTER L., THOMAS B. V., MAYR G., PYBURN D., MORALES P., SHAW J., BURRAGE T., WHITE W., MCINTOSH M. & METWALLY S. (2012). Diagnosis of porcine teschovirus encephalomyelitis in the Republic of Haiti. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24**, 671–678.

HUBSCHLE O.J.B., RAJOANARISON J., KOKO M., RAKOTONDRAMARY E. & RASOLFOMANANA P. (1983). ELISA for detection of Teschen virus antibodies in swine serum samples. *Dtsch Tierarztl. Wochenschr.*, **90**, 86–88.

KLOBOUK A. (1931). Encephalomyelitis enzootica suum. *Zverolekarsky obzor*, **24**, 436–480.

KLOBOUK A. (1933). Aetiology of the so-called Teschen disease – Encephalomyelitis enzootica suum. *Zverolekarske rozpravy*, **8**, 85–96.

KNOWLES N.J. & BUCKLEY L.S. (1980). Differentiation of porcine enterovirus serotypes by complement fixation. *Res. Vet. Sci.*, **29**, 113–115.

KNOWLES N.J., BUCKLEY L.S. & PEREIRA H.G. (1979). Classification of porcine enteroviruses by antigenic analysis and cytopathic effects in tissue culture: description of 3 new serotypes. *Arch. Virol.*, **62**, 201–208.

KNOWLES N.J., HOVI T, HYYPIÄ T., KING A.M.Q., LINDBERG A.M., PALLANSCH M.A., PALMENBERG A.C., SIMMONDS P., SKERN T., STANWAY G., YAMASHITA T. & ZELL R. (2012). Picornaviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth*

Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier, San Diego, USA, 855–880.

KRUMBHOLZ A., DAUBER M., HENKE A., BIRCH-HIRSCHFELD E., KNOWLES N.J., STELZNER A. & ZELL R. (2002). Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups. *J. Virol.*, **76**, 5813–5821.

MADR V. (1959). Propagation of the Teschen disease virus in cell cultures. *Veterinarstvi*, **IX**, 298–301.

MAYR A. & BIBRACK B. (1971). Demonstration of Teschen Talfan infection using a micromodification of neutralization test. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **18**, 657–664.

MAYR A. & SCHWOEBEL W. (1957). Propagation of the Teschen disease virus in porcine kidney cell cultures and properties of the cultured virus. 1.2.3. part. *Zentralbl. Bakteriologie. [I. Orig.]*, **168**, 329–359.

PALMQUIST J., MUNIR S., TAKU A., KAPUR V. & GOYAL S.M. (2002). Detection of porcine teschovirus and enterovirus type II by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **14**, 476–480.

ROMANENKO V.F., PRUSS O.G., BELYI YU.A. & KUPNOVSKAYA L.V. (1982). Immunofluorescent diagnosis of porcine encephalomyelitis. *Veterinariia*, **4**, 69–72.

TRAUB E. (1942). Active immunization against Teschen disease using vaccines adsorbed on aluminium hydroxide. *Arch. Tierheilkd.*, **77**, 52–66.

WITTE VON K.H., AUERBACH J., LOSS K.U., NEUHAUS S. & PRAGER D. (1994). Typisierung von 17 porzinen Enterovirusisolaten aus Polioenzephalomyelitisfällen der Jahre 1983–1991. *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, **101**, 453–492.

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.

ZELL R., DAUBER M., KRUMBHOLZ A., HENKE A., BIRCH-HIRSCHFELD E., STELZNER A., PRAGER D. & WURM R. (2001). Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. *J. Virol.*, **75**, 1620–1631.

ZELL R., KRUMBHOLZ A., HENKE A., BIRCH-HIRSCHFELD E., STELZNER A., DOHERTY M., HOEY E., DAUBER M., PRAGER D. & WURM R. (2000). Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of CPE groups I–III with specific primer sets. *J. Virol. Methods*, **88**, 205–218.

* * *

NB: Первая версия документа принята в 1991 году как «Болезнь Тешена». Самые последние версии приняты в 2017 году.