

Висновки. Розроблено високочутливий метод мПЛР для експрес діагностики бактеріальних збудників інфекційних захворювань риб *Y. ruckeri*, *F. columnarum*, *A. salmonicida* та *A. hydrophila*. Запропонований метод мПЛР є високочутливим, специфічним та швидким, що дозволяє ідентифікувати чотири бактеріальних патогена упродовж одного дня.

Список літератури

1. Woo P.T.K., Bruno D.W. 2011. Fish Diseases and Disorders. Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI, 944 pp.
2. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. URL: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/>
3. Рудь Ю.П. Ідентифікація грамнегативних бактерій у риб методом ПЛР-ПДРФ гену 16S рРНК / Риборосподарська наука України. – 2013. – №1. – С. 80-86.
4. Panangala V.S., Shoemaker C.A., Santen V.L., Dybvig K., Klesius P.K. Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila* / Diseases of aquatic organisms. – 2007. – Vol. 74. – P. 199–208.
5. OIE Aquatic animal health code 12th Edition // World Organisation for Animal Health (www.oie.int). – 2009. – 288 p.
6. Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. – New York: Cold Spring Harbour, 2001.
7. Рудь Ю.П. Експрес-діагностика флавобактеріозу риб методом полімеразної ланцюгової реакції / Сільськогосподарська мікробіологія. – 2013. – Вип. 18. – С. 132-145.
8. Жук Л.В., Рудь Ю.П. Ідентифікація бактерій роду *Aeromonas* методом полімеразної ланцюгової реакції / Науковий вісник НУБіП України. Серія "Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва" – 2012. Вип. 172, Ч. 3. – С. 87-90.
9. Рудь Ю.П., Циганок І.О. Молекулярна діагностика *Yersinia ruckeri* / Риборосподарська наука України. – 2014. – №2. – С. 69-78.
10. Рудь Ю.П., Бучацький Л.П. Молекулярне визначення інфекційних захворювань риб / Тваринництво України. – 2016. - № 4-5. – С. 28-31.

RAPID IDENTIFICATION OF FOUR PATHOGENIC BACTERIA IN RAINBOW TROUT ONCHORHYNCHUS MYKISS

Rud Yu. P.^{1,2*}, Zaloilo O. V.^{1,2}, Buchatskiy L. P.²

¹Institute of Fisheries of the NAAS, Kyiv, Ukraine

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

The results of primers design targeting four pathogenic bacteria, isolated in rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*, and developing of multiplex polymerase chain reaction (mPCR) method to identify *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium columnarum*, *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila* are presented. The specificity of oligonucleotide primers and efficiency of mPCR to identify investigated bacteria collectively and each pathogen apart were shown. The advantages of the proposed method on bacteriological diagnosis of these pathogens are speed of obtaining results and high sensitivity.

Keywords: molecular diagnostics, mPCR, bacterial fish diseases

УДК 619: 616.98-07: 636.4 (477)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИЗАЦІЯ ІЗОЛЯТІВ ЦИРКОВІРУСУ ДРУГОГО ТИПУ, ВИДІЛЕНИХ ВІД СВІЙСЬКИХ СВИНЕЙ В УКРАЇНІ

Ситюк М. П.¹, Фурда І. Л.², Байдалюк В. А.¹, Подгорська К.³

¹ Інститут ветеринарної медицини НААН України, м. Київ, Україна, e-mail: snp1978@ukr.net

² Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна

³ Національний ветеринарний Інститут, м. Пулави, Республіка Польща

Проведено молекулярно-генетичні дослідження двох ізолятів цирковірусу другого типу, виділених від свійських свиней в Україні. За результатами секвенування повного геному побудовано філогенетичне древо з визначення місця та складу виділених ізолятів.

Ключові слова: цирковірус другого типу, ізоляти, свійські свині, секвенування

Цирковірусна інфекція свиней є емерджентною хворобою, яка знайдена в комерційних свинарських господарствах і може бути причиною виникнення клінічних або субклінічних інфекцій [5]. Вірус ДНК відноситься до родини *Circoviridae* [1].

Молекула ДНК геному цирковірусів односпіральна кільцевої форми, [6] з негативним зарядом, має довжину 1759 пар нуклеотидів для ЦВС-1 та 1768 – для ЦВС-2 [7].

До цього часу описано два типи вірусу: ЦВС-1 та ЦВС-2. ЦВС-1 вперше був виділений з перецеплюваної лінії нирок свиней (PK-15) і не був патогенним для свиней, в той час як ЦВС-2 пов'язаний з цілою низкою проявів хвороб (цирковірус-асоційованих захворювань свиней), в тому числі, синдром мультисистемного відлучення, комплексні респіраторні захворювання свиней, дерматит свиней і синдром нефропатії, пневмонія, діарея, репродуктивна недостатність [8].

Єдина номенклатура була запропонована для генотипів ЦВС-2 (PCV-2a, PCV-2b і PCV-2c). ЦВС-2 має два основних генотипи: PCV-2a, який далі було поділено на п'ять груп (2A-2E) і PCV-2b включає три основні групи (1A-1C). У 2009 році вони були визначені на основі аналізу 40 китайських послідовностей ЦВС-2, зібраних в період між 2004 і 2008 роками і 56 ЦВС-2 послідовностей, отриманих з Банку Генів. Подібні віруси були також виявлені в Північній Америці у 2012 році і в Південній Америці у 2014 році. Третій генотип (PCV-2c) був виявлений в Данії [1, 2]. Ідентичність нуклеотидних послідовностей геному ЦВС-1 та ЦВС-2 складає 72 %, а між штамми ЦВС-2 – не менше 95 % [8].

Філогенетичний аналіз, як відомо, у даний час є потужним інструментом для широкого використання в області дослідження еволюції вірусів [2].

Буває так, що фенотипічна зміна ознаки зумовлена мутацією єдиного нуклеотида у послідовності ДНК.

Завдяки молекулярно-генетичним методам дослідження можна розділити популяцію на носіїв і неносіїв, уможливити діагностику, вибракувати прихованих носіїв [4].

Цирковірусна інфекція серед поголів'я свиней на території України є досить поширеною хворобою і потребує поглибленого вивчення саме на рівні ізолятів, для того, щоб визначити ефективність вакцин, які використовуються проти цього захворювання. У даний час в Україні не проводяться регулярні дослідження циркуляції вірусу ЦВС-2, а дані про характер варіацій вірусних геномів є неповні.

Метою нашої роботи було виділення ДНК двох ізолятів цирковірусу свиней другого типу та їх повногеномне секвенування.

Матеріали та методи. Походження ізолятів: (ізолят № 1 «DP_UKR_2.16-5» з свинарського господарства Вільшанського району, Кіровоградської області; ізолят № 2 «DP_UKR_5.16-6» з присадибного господарства Ржищівського району, Київського області).

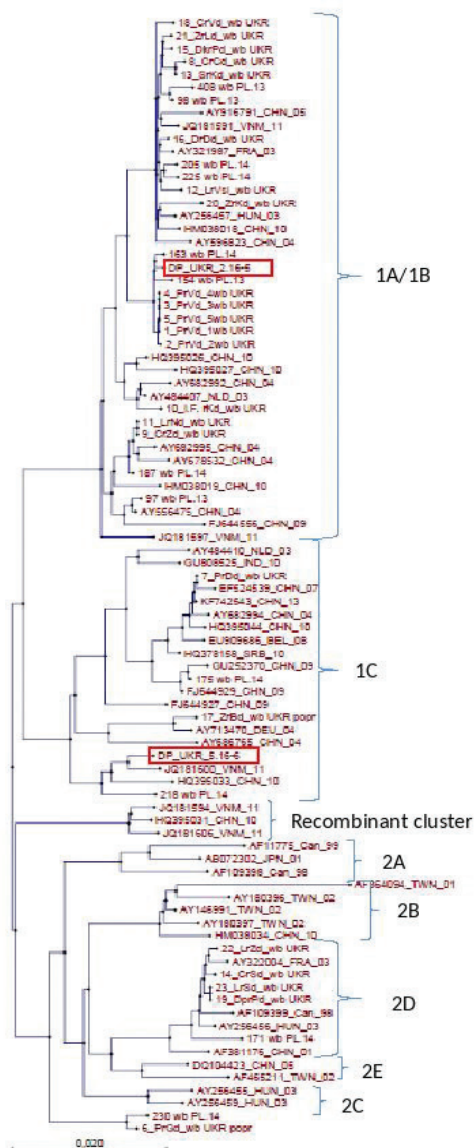


Рис. 1. Філогенетичне дерево, побудоване на основі послідовностей повного геному 2 ізолятів цирковірусу другого типу, виділених від свійських свиней на території України (відзначені як «DP_UKR_2.16-5 та DP_UKR_5.16-6»)

Виділення ДНК цирковірусу свиней другого типу проводили за валідованою методикою (СОП-В.11.03-03.01-14) «Визначення ДНК збудника цирковірусної інфекції свиней 2 типу методом ПЛР (формат *FRT*)», яку розглянуто та затверджено Вченою Радою ІВМ НААН протокол № 6 від 30.07.2014 року Інституту ветеринарної медицини НААН. Секвенування повного геному двох ізолятів цирковірусу свиней другого типу проводили в Національному ветеринарному Інституті м. Пулави (Республіка Польща).

Результати досліджень. В Інституті ветеринарної медицини НААН було виділено 2 ізоляти цирковірусу другого типу власне розробленою методикою полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу.

За результатами повногеномного секвенування та аналізу нуклеотидних та амінокислотних послідовностей було побудовано філогенетичне дерево (рис. 1).

За даними рисунку 1 ізолят № 1 «DP_UKR_2.16-5» віднесений до кластеру 1A/1B, до якого входять ізоляти з: України, Польщі, Франції, Угорщини, Нідерландів, Китаю, В'єтнаму; а ізолят № 2 «DP_UKR_5.16-6» віднесений до кластеру 1C, до якого входять ізоляти з: України, Нідерландів, Бельгії, Данії, Сербії, Індії, Китаю, В'єтнаму.

Отже, за результатами проведених молекулярно-генетичних досліджень встановлено, що українські ізоляти, виділені від свійських свиней, генетично подібні до ізолятів з територій як європейських так і азійських країн.

Висновки. У результаті проведення наукових досліджень виділено 2 ізоляти від свійських свиней.

Молекулярно-генетичними дослідженнями встановлено, що ізолят № 1 «DP_UKR_2.16-5» віднесений до кластеру 1A/1B, а ізолят № 2 «DP_UKR_5.16-6» віднесений до кластеру 1C, які генетично подібні до ізолятів з територій як Європейських країн, так і віддалених держав (Індії, Китаю, В'єтнаму), що вказує про їх циркуляцію та поширеність у світі.

Перспективи подальших досліджень. Доцільно проводити постійний моніторинг циркулюючих вірусів цирковірусу свиней 2 типу, порівнювати їх з вакцинними штамами та розробляти нові експрес-методи їх діагностики.

Подяка. Автори висловлюють щирю подяку професору З. Пейсаку та К. Подгорській за сприяння у проведеній науковій роботі.

Список літератури:

1. Leila Sabrina Ullmann. PCR and qPCR for detection of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) in captive collared (Pecari tajacu) and white-lipped (Tayassu pecari) peccaries from Southern Brazil [Text] / Leila Sabrina Ullmann and other // Semina: Ciências Agrárias, Londrina. - 2016. - n. 6, v. 37. - pp. 4167-4170.
2. Xiao CT. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d [Text] / Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T // J Gen Virol. - 2015. - pp:1830-41.
3. Shen HG. Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA [Text] / Shen HG, Halbur PG, Opriessnig T // J Gen Virol. - 2012.
4. Семенов В. И. Цирковірусные болезни свиней (ЦВБС) / В. И. Семенов [и др.] // Ветеринария Кубани. - 2009. - № 5. - С. 8-10.
5. Малоголовкин А. С. Выделение цирковірусу свиней 2-го типа от поросят с синдромом мультисистемного истощения отъемышей / А. С. Малоголовкин, Г. А. Надточей, Д. В. Колбасов // Ветеринарный врач. - 2009. - № 2. - С. 27-30.
6. Widi Nugroho. Complete Genome Characteristics of Porcine circovirus Type 2 (PCV2) Isolates from Papuan Pigs, Indonesia [Text] / Widi Nugroho, Farhid Hemmatzadeh, Sidna Artanto, Michael P. Reichel // International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology. - 2016. - v. 5, issue 1. - pp: 239-247.
7. Орлянкин Б. Г. Цирковірусная инфекция свиней / Б. Г. Орлянкин, Т. И. Алипер, Е. А. Непоклонов // Ветеринария. - 2002. - № 11. - С. 48-51.
8. Герілович А. П. Експериментальне і теоретичне обґрунтування та розробка засобів епізоотологічного моніторингу, діагностики вірусних хвороб тварин та молекулярно-генетичного типування їх збудників (ортоміксо-, параміксо-, герпес-, цирко- та пестівірусна інфекції) : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д ра вет. наук : спец. 16.00.03 "Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія" / А. П. Герілович. - Харків, 2011. - 42 с.
9. Guo L. J. Porcine circovirus type 2 (PCV2): Genetic variation and newly emerging genotypes in China / [Text] // Guo L. J. [et al.] // Virology Journal. - 2010. - v. 7. - P. 273.

MOLECULAR GENETIC CHARACTERIZATION OF ISOLATES PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2, IDENTIFIED FROM DOMESTIC PIGS IN UKRAINE

Sytiuk M. P.¹, Furda I. L.², Baydalyuk V. A.¹, Podhorska K.³

¹ Institute of Veterinary Medicine of Ukraine NAAS, Kyiv, Ukraine

² National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³ National Veterinary Institute, Pulawy, Poland

The aim of the article is to identify of two isolates DNA porcine circovirus type 2 and their full genom sequencing.

Materials and methods. Origin of isolates: (isolate number 1 «DP_UKR_2.16-5» from farm in Vilshanskiy district, Kirovohrad region, isolate number 2 «DP_UKR_5.16-6» from subsistence farming in Rzhyschivskiy district, Kyiv region).

DNA isolation porcine circovirus type 2 was carried out by using the validated method (SOP-V.11.03-03.01-14) «Determination of DNA pathogen infection porcine circovirus type 2 by PCR (format FRT)», which is considered and approved by the Academic Council NAAS IVM, protocol number 6 from 30.07.2014, Institute of Veterinary Medicine, the Academy of Agricultural Sciences. Sequencing of the complete genome of two isolates of porcine circovirus type 2 was conducted at the National Veterinary Institute, Pulawy, Poland.

Results. In the institute of the Veterinary Medicine NAAS was identified 2 isolates porcine circovirus type 2 by using a developed technique of polymerase chain reaction in real time.

For results of full genom sequencing and analysis of nucleotide and aminoacid sequences a phylogenetic tree were constructed. Reported as: DP_UKR_2.16-5 and DP_UKR_5.16-6.

Conclusions. As a result of scientific research selected 2 isolates from domestic pigs. Molecular genetic studies have established that isolate No. 1 «DP_UKR_2.16-5» assigned to cluster 1A/1B and isolate No. 2 «DP_UKR_5.16-6» assigned to the cluster 1C, which are genetically similar isolates from the territories of European countries and distant countries (India, China, Vietnam) that indicates on their circulation and prevalence in the world.

Keywords: porcine circovirus type 2, isolates, domestic swine, sequencing