

STUDY AND ANALYSIS OF CONTEMPORARY ETIOLOGICAL FACTORS
OF INFECTIOUS DISEASE OF PIGS WITH RESPIRATORY SYNDROME

Prokhoryatova O.V., Kolchuk O.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

The aim of this work was to study and analysis contemporary etiological factors of infectious disease of pigs with respiratory syndrome.

Materials and methods. We used epidemiological Virology, bacteriology and molecular genetic methods. Researched clinical (lavage from the mucous membranes of the nasopharynx, blood samples) and pathological materials, samples of feed, water and air in livestock buildings (microbiological) in accordance with the existing regulations.

The results of the research. According to the analysis of patterns of associations was found that the dominant bacterial species of infectious agents with MS in pigs during 2011–2012 were *Mycoplasma haemosuis* (pathogen eperthrozoosis), *Pasteurella multocida* serotypes from 21.4 % in 2011 to 70 % in 2013, 2014, respectively. Among dominant were conditionally pathogenic bacteria of the genus *Fusobacterium*, from 14,3 to 35.0 %. Among asientos appeared the following conditionally pathogenic microorganisms, the percentage of which in the consortia was great – *Naumanniella* spp. to 60.0 %, *Sphaerotilus* spp. – 32,1 %, *Leptotrichia* spp. – 17.9 %, *Leptotrix* spp. – 21,4 %.

Conclusion. In the structure of associations-causing organisms in pigs with respiratory disease syndrome, were identified and identifikovany several umove-pathogenic bacterial species that previously were not distinguished from biological materials animals with respiratory syndrome swine, namely *Naumanniella* spp. *Leptotrichia* spp., *Thiocapsa* spp. *Sphaerotilus* spp. *Fusobacterium* spp. Changes in the etiological structure of diseases of pigs with respiratory syndrome complicate treatment and recovery of households.

Keywords: pigs, respiratory syndrome, microbial consortia, *Naumanniella* spp., *Leptotrichia* spp., *Thiocapsa* spp., *Sphaerotilus* spp., *Fusobacterium* spp.

УДК 619:616.98:578.82/83[PCV2]:577.2.08:636.4

ПЕРСПЕКТИВИ РОЗРОБКИ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ПРАЙМЕРНИХ СИСТЕМ
ДЛЯ ГЕНОТИПУВАННЯ ЦИРКОВІРУСІВ СВИНЕЙ II ТИПУ МЕТОДОМ
ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Рудова Н.Г.*

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Цирковірусна інфекція свиней значно поширена в усіх країнах світу, де свинарство є профільюючою галуззю тваринництва. Збудник цирковірусної інфекції свиней належить до ДНК-вміщуючих вірусів родини *Circoviridae*, роду *Circovirus*, має виражений тропізм до клітин лімфоїдного ряду та характеризується різноманітністю клінічних проявів. Збитки від означеного захворювання складаються з масового (до 30 %) відходу молодняку, зниження конверсії корму, розладів системи репродукції у дорослих тварин (аборти, мертвонародження, непліддя). На сьогодні це основна проблема у промисловому свинарстві.

Наразі в літературних джерелах описано 3 геногрупи цирковірусів свиней, існування яких зумовлено безперервною еволюцією вірусу. Одночасне інфікування тварин декількома генотипами ЦВС-II може призводити до підвищення інтенсивності реплікації вірусу та розвитку більш важких клінічних проявів ЦВС.

Моніторинг розповсюженості генотипів серед інфікованих тварин проводять у багатьох країнах світу, де свинарство є однією з найбільш розвинених галузей тваринництва. Проведення таких досліджень в Україні є важливим, але до сьогодні не вирішеним завданням.

У статті наведені дані щодо перспектив розробки та застосування праймерних систем для генотипування цирковірусів свиней II типу методом полімеразної ланцюгової реакції. Робота виконана за використанням біоінформатичних і молекулярно-генетичних методів досліджень. Проведено аналіз літературних джерел і серію досліджень, спрямованих на оптимізацію протоколів ПЛР з попередньо розробленими, теоретично перевіреними та синтезованими праймерними системами. Встановлено, що класична ПЛР є малоприматною для генотипування ЦВС-II внаслідок її низької специфічності. Отже, ампліфікаційні методи із застосуванням ПЛР стандартного формату не можуть повною мірою замінити класичні підходи щодо генотипування з використанням секвенування геному збудника.

Ключові слова: цирковірус свиней II типу, молекулярна діагностика, генотипування, праймерні системи.

* Науковий керівник Герілович А. П., док. вет. наук, ст. наук. співр.

Значна поширеність цирковірусу свиней другого серотипу (ЦВС-II) серед свинопоголів'я як в Україні, так і за кордоном та його незаперечне значення в розвитку різноманітних синдромів, у т.ч., синдрому післявідлучного мультисистемного виснаження (СПМВ), поліорганність патологій, що викликаються його персистенцією в організмі хворої тварини, представляє серйозну загрозу для економічного розвитку свинарства в Україні. Це зумовлює необхідність впровадження молекулярно-генетичного скринінгу ЦВС-II, який дозволить діагностувати субклінічні та латентні форми інфекції, своєчасно виявляти групи ризику та ефективно запобігати занесенню вірусу на територію нашої держави.

Збудник цирковірусної інфекції свиней належить до ДНК-вміщуючих вірусів родини *Circoviridae*, роду *Circovirus* [1]. Генوم ЦВС-II є відносно стабільним, проте спостерігається генетична мінливість ізолятів, виділених з різних географічних регіонів світу [2]. Хоча ЦВС-II був детектований у більшості досліджуваних тварин, специфічність клінічного прояву СПМВ дозволяє припустити, що різні геногрупи цирковірусу свиней II серотипу можуть відрізнятися за вірулентністю та інтенсивністю реплікації в організмі сприйнятливих тварин. На сьогоднішній день ідентифіковано 3 геногрупи

ЦВС-II [3]. Дослідження Hesse R. та ін. свідчать про те, що свині в польових умовах можуть бути інфіковані декількома генотипами ЦВС-II [4], а одночасне інфікування тварин обома генотипами ЦВС-II може призводити до підвищення інтенсивності реплікації вірусу всередині їх організму, що призводить до суперінфекції та руйнування захисних механізмів імунної системи по відношенню до інших інфекційних агентів [5]. Співіснування різних генотипів ЦВС-II у організмі зараженої тварини може сприяти розвитку більш важких клінічних проявів ЦВІС. Крім того, інфікування декількома генотипами ЦВС-II є одним з потенційних факторів, що сприяє персистенції вірусу всередині організму тварини і призводить до негативного прогнозу щодо ефективності терапії хворих тварин [5, 6].

Моніторинг розповсюдженості генотипів серед інфікованих тварин проводять у багатьох країнах світу, де свинарство є однією з найбільш розвинених галузей тваринництва. Проведення таких досліджень в Україні є важливим, але до сьогодні не вирішеним завданням. У зв'язку з цим велике науково-практичне значення має генотипування, вивчення поширення генотипів ЦВС-II серед свинопоголів'я господарств України та їх значення у виникненні різноманітності клінічних проявів цирковірусної інфекції.

Метою наших досліджень була розробка та впровадження у виробництво мультиплекс-ПЛР з одночасним виявленням і генотипуванням ЦВС-II у клінічних зразках різного біологічного матеріалу, що склало б достовірну та економічно менш витратну альтернативу секвенуванню.

Матеріали та методи. Дослідження зразків клінічного матеріалу зі свиного господарств різних областей згідно з методиками, адаптованими у лабораторії молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ» [7]. Робота виконана з використанням біоінформатичних та молекулярно-генетичних методів досліджень. Напрацювання специфічних фрагментів ДНК цирковірусу II серотипу та оптимізацію протоколів проводили з використанням комерційних наборів «ДНК-сорб-В» виробництва «Центрального науково-дослідного інституту епідеміології» (Російська Федерація), «PCR-Core» виробництва фірми IsoGene (Російська Федерація) та спецустаткування із залученням раніше розроблених праймерних систем PCV 2_1, PCV 2.2, PCV 2.3.

Результати досліджень. Попередньо, на підставі біоінформатичного аналізу нами було встановлено придатність до практичного використання трьох пар праймерів для генотипування цирковірусу свиней II типу (Табл. 1) [8].

Таблиця 1 – Праймерні системи для ідентифікації генотипів ЦВС-II

№	Праймер	Послідовність праймеру 5' → 3'	Довжина амплікону (п.н.)
1	PCV 2_1	For:AGTCTCAGCCACAGCTGATTC Rev:CCGATCACCCAGGGTGACA	233
2	PCV 2.2	For:AGGAGAAGGGTTGGGGATTG Rev:TTGAATTCTGGCCTGCTCC	159
3	PCV 2.3	For:CCATTGACTGTAGAGACTAAAGG Rev:CCCCACTTAACCCTAAGTGA	300

Обрані пари праймерів були синтезовані для використання у експериментах з розробки мультиплексної ПЛР з одночасним виявленням та генотипуванням збудника цирковірусної інфекції свиней.

Попередньо була проведена теоретична перевірка якості розроблених олігонуклеотидних пар, яка показала відсутність вироджених та паліндромних ділянок та ознак формування вторинних структур за низьких енергетичних впливів. Різниця температур плавлення для розрахованих пар праймерів не перевищувала 2 °С. Також теоретично розраховані пари праймерів були на 100 % комплементарними до ДНК-матриць цирковірусів таргетних груп та мали відповідність у парі не вищу 65–70 % та індивідуальну не вищу 75 % стосовно подібних та гетерологічних матриць [7].

Після замовлення та синтезу праймерних пар PCV 2_1, PCV 2.2, PCV 2.3., нами був проведений комплекс досліджень, спрямований на оптимізацію протоколів ПЛР з метою подальшого створення методики мультиплексної ПЛР з одночасного виявлення та генотипування збудника ЦВІС.

Оптимізацію протоколу зазвичай проводять за такими параметрами, як температура відпалу праймерів (теоретична та фактична) та концентрація основних компонентів реакційної суміші та об'єм проби, що вноситься [8].

З метою розробки методики на першому етапі нашої роботи було напрацьовано специфічний фрагмент ДНК цирковірусу свиней II типу, для чого зразки різного клінічного матеріалу з господарств Запорізької, Харківської, Сумської, Дніпропетровської, Луганської, Донецької, Волинської, Херсонської та Одеської областей (матеріал люб'язно наданий лабораторією вивчення хвороб

свиней ННЦ «ІЕКВМ») були досліджені згідно з методиками, адаптованими у лабораторії молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ» [7]. Зразки, що виявилися позитивними щодо наявності генетичного матеріалу збудника ЦВІС за результатами перевірки шляхом електрофоретичного аналізу (рис. 1), були заморожені за температури мінус 70 °С для проведення подальших досліджень.

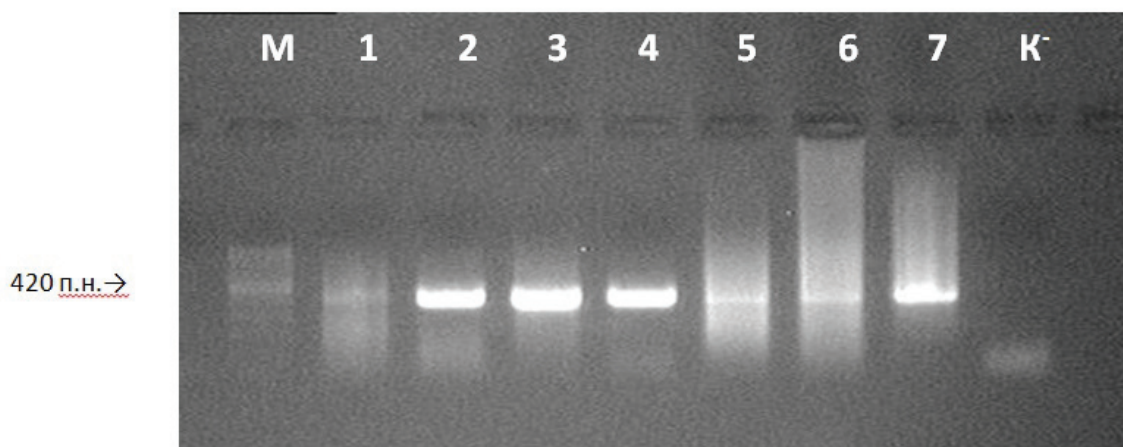


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами PCV2_F/R (М – маркер довжини фрагментів ДНК; 1–7 – зразки біологічного матеріалу, позитивні щодо наявності специфічного фрагменту ДНК ЦВІС-II; К – негативний контроль)

На другому етапі наших досліджень з напрацьованими зразками ДНК цирковірусу свиней II типу проведено серію ПЛР з застосуванням трьох пар праймерів (PCV 2_1, PCV 2.2, PCV 2.3.) при підборі оптимальної температури їх відпалу. На цьому етапі досліджень завідомо позитивні зразки були досліджені у 40-цикловій ПЛР за температури відпалу від 52 до 62 °С.

При постановці реакції з праймерами PCV 2_1 було встановлено відсутність необхідної матриці ДНК цирковірусів першого генотипу в досліджуваних зразках.

При постановці реакції з праймерами PCV 2.2 була встановлена наявність неспецифічних смуг у діапазоні температур відпалу від 52 до 62 °С, при цьому теоретично розрахована температура 57 °С також виявилася неоптимальною (рис. 2). Зважаючи на це, нами була проведена серія додаткових досліджень, спрямована на коригування кількості циклів (30-, 35-, 40-, 45-), концентрації робочого розчину праймерів, кількості проби, що вноситься. Проте в усіх досліджуваних зразках при постановці електрофоретичного аналізу спостерігалася наявність неспецифічних смужок різної довжини.

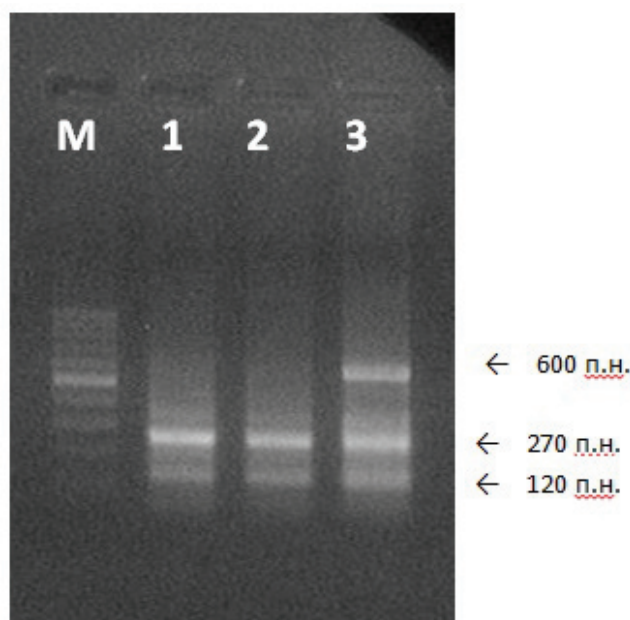


Рис. 2. Результати ампліфікації за різних температур відпалу системи праймерів PCV 2.2 (М – маркер довжини фрагментів ДНК. Температури відпалу: 1 – 53 °С; 2 – 55 °С; 3 – 60 °С)

При постановці реакції з праймерами PCV 2.3. було з'ясовано, що продукти специфічної довжини (300 п.н.) утворюються після ампліфікації зразків ДНК за температурах відпалу (53–55 °С), а найбільш оптимальною виявилася температура, яка дорівнювала теоретично розрахованій, тобто – 53 °С, та забезпечувала утворення максимально контрастного специфічного амплікону.

Згодом, нами було проведено повторне дослідження теоретичної якості праймерів з використанням інтернет-ресурсу GenBank, база якого постійно поповнюється новими послідовностями різноманітного генетичного матеріалу. Зважаючи на це, біоінформатичний аналіз олігонуклеотидних пар (PCV 2_1 та PCV 2.2) показав їх низьку специфічність через теоретичну гібридизацію з матрицею ДНК людини (рис. 3).

```

product length = 21
Reverse primer 1 CCGATCACCCAGGGTGACA 19
Template 24429 GT.G.....T..... 24411

Reverse primer 1 CCGATCACCCAGGGTGACA 19
Template 24409 TATG.....C..... 24427

>AC011750.8 Homo sapiens BAC clone RP11-458C9 from 2, complete sequence

product length = 21
Reverse primer 1 CCGATCACCCAGGGTGACA 19
Template 92373 AGT.....T..... 92355

Reverse primer 1 CCGATCACCCAGGGTGACA 19
Template 92353 GATG.....T..... 92371

>AC026437.5 Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2251O21, complete sequence

product length = 21
Reverse primer 1 CCGATCACCCAGGGTGACA 19
Template 56779 T.TG.....G..... 56761

Reverse primer 1 CCGATCACCCAGGGTGACA 19
Template 56759 TACG.....T..... 56777

>AC005863.1 Homo sapiens chromosome 17, clone hRPK.786_O_4, complete sequence

product length = 21
Reverse primer 1 CCGATCACCCAGGGTGACA 19
Template 121467 TGTG.....T..... 121449

Reverse primer 1 CCGATCACCCAGGGTGACA 19
Template 121447 .AAG.....T..... 121465

>EF445044.1 Homo sapiens ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2 (USP2) gene, complete
cds, alternatively spliced

product length = 21
Reverse primer 1 CCGATCACCCAGGGTGACA 19
Template 489 TGTG.....G..... 471

Reverse primer 1 CCGATCACCCAGGGTGACA 19
Template 469 A.TC.....T..... 487
    
```

Рис. 3. Діалогове вікно програми Primer-BLAST з результатами on-line перевірки специфічності системи праймерів PCV 2.2 для індикації генетичного матеріалу збудника ЦВС-II та його подальшого генотипування

Практично це було доведено при постановці ПЛР з використанням системи праймерів PCV 2.2 та серії зразків, які містили різні гетерологічні матриці ДНК. Для проведення експериментального аналізу нами було використано зразок буферу для елюції ДНК та бідистильовану воду в якості негативного контролю. Візуалізацією продуктів ампліфікації при проведенні електрофоретичного аналізу, нами було встановлено наявність неспецифічних смужок різної довжини в усіх дослідних зразках, крім негативного контролю, що свідчило про відсутність утворення димерів та шпильок між праймерами в реакційній суміші при ПЛР аналізі.

Тому, з урахуванням цих обставин, була встановлена непридатність праймерних систем для їх подальшого застосування в зв'язку з виникненням перехресної контамінації генетичним матеріалом людини та неможливістю її уникнення на всіх етапах пробопідготовки та проведення ПЛР-аналізу.

Також нами були проаналізовані з використанням біоінформатичних методів праймерні системи, розроблені дослідниками Dongsheng He та ін. [9] у 2011 р. для генотипування ЦВС-II. Не викликає сумніву достовірність отриманих ними результатів, проте, на сьогоднішній день ці праймерні системи показали низьку специфічність щодо генотипування ЦВС-II. На нашу думку, це може бути пов'язано з тим, що бази даних GenBank постійно поповнюються новими послідовностями циркувірусу свиней II типу, існування та виникнення яких зумовлена генетичною мінливістю та безперервною еволюцією самого вірусу.

Висновки. Таким чином, нами було встановлено, що у зв'язку з безперервною еволюцією вірусу та хоч і незначними змінами всередині геному збудника, класична ПЛР є малоприматною для його генотипування внаслідок низької специфічності. Отже, ампліфікаційні методи з застосуванням ПЛР стандартного формату не можуть повною мірою замінити класичні підходи щодо генотипування з використанням секвенування геному збудника.

Перспективи подальших досліджень. Для вирішення поставленої мети необхідний метод, який був би більш чутливим та специфічним, а тому – більш придатним для генотипування збудника без застосування методу секвенування. Наразі дослідження тривають.

Список літератури

1. Рудова, Н.Г Сучасні методи індикації та ідентифікації циркувірусу свиней II типу [Текст] / Н.Г. Рудова //Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб.- X., 2010. – Вип.94.- С.91-93
2. Celer, V. First Evidence of Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2) Infection of Pigs in the Czech Republic by Semi-Nested PCR [Text] / V. Jr Celer, P.Carasova //J.Vet. Med.-2002.- Vol. 49.-P. 155–159.
3. Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China [Text]/ Zhai S.L [et al.] // Virol J. – 2011.- Vol.8.- P.517.

4. Hesse, R, Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field [Text] / R.Hesse, M.Kerrigan, RR. Rowland // Virus Res.-2008.- Vol. 132.- P.201-207
5. Association of concurrent porcine circovirus (PCV) 2a and 2b infection with PCV associated disease in vaccinated pigs [Text] / P.F.Gerber [et al.] // Res Vet Sci. – 2013.- Vol. 95.- P.775-781.
6. Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs [Text] / J.C. Harding, J.A. Ellis, K.A. McIntosh, S.Krakovka // Vet Microbiol. - 2010.-Vol. 145. – P.209-219.
7. Герілович, А.П. Біоінформативна розробка праймерів для типування цирковірусів свиней II типу методом полімеразної ланцюгової реакції. [Текст] / А.П. Герілович, Н.Г. Рудова // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. - 2012.- № 96.- С. 87-89.
8. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях [Текст] / під ред. Б. Т. Стегній. // – Х.: ННЦ «ІЕКВМ», 2010. - 258 с.
9. He, D, Development of PCR for the Identification of Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2) Genotype PCV-2a and PCV-2b [Text] / Dongsheng He [et al.] // Journal of Animal and Veterinary Advance.-2011.- V. 10.- Issue: 18. - P. 2398-2401

PROSPECTS FOR THE DEVELOPMENT AND USE OF PRIMER SYSTEMS FOR GENOTYPING PORCINE CIRCOVIRUSES TYPE II BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Rudova N.G.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

Porcine circovirus infection is widespread throughout the world where the pig-breeding is main branch of livestock. The etiological agent of porcine circovirus infection is a DNA virus, which is related to the Circoviridae family, Circovirus genus. PCV has an expressed tropism for lymph cells and characterized by a variety clinical manifestations. Losses from this disease consist of the mass (30 %) of young decease, decreased feed conversion, reproductive system disorders in adult animals (abortion, stillbirth, infertility). Today it is the main problem in the industrial pig farming.

At this point in the literature described 3 genogroup of circoviruses, which existence is due of the continuous virus evolution. Simultaneous infection of animals with multiple PCV-II genotypes may increase the intensity of viral replication and development of the more severe clinical manifestations of the PCV-associated diseases.

Monitoring of the genotypes prevalence among infected animals is carried out in many countries where pig farming is one of the most developed livestock industries. Such investigations in Ukraine is an important, but still is not the solving problem.

The article presents data of the prospects for the primer systems development and application for genotyping porcine circovirus type II by polymerase chain reaction. Work performed using bioinformatics and molecular genetic research methods. The analysis of the literature data and a series of studies aimed at optimizing PCR protocols with previously developed, theoretically proven and synthesized primer systems held. It was found that the classical PCR is unsuitable to use for genotyping PCV-II due to its low specificity. So amplification methods using PCR standard format can't fully replace the classic approaches to genotyping.

Keywords: porcine circovirus type II, molecular diagnostics, genotyping, primer systems.

УДК 619:616.98:578.831.11:616-084

ВИДІЛЕННЯ ТА ВИВЧЕННЯ ОСНОВНИХ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕПІЗООТИЧНОГО ВІРУСУ ХВОРОБИ ГАМБОРО «ХАРКІВ-2012»

**Стегній Б.Т., Рула О.М., Музика Д.В., Стегній А.Б.,
Потрясаєва О.О., Ткаченко С.В., Кошелєв В.В.**

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: alex.ru75@inbox.ru*

У статті наведені дані лабораторних досліджень (серологічні, вірусологічні, молекулярно-генетичні) біологічного матеріалу (кров, внутрішні органи) молодняка птиці з неблагополучного птахогосподарства Харківської області до збудника інфекційної бурсальної хвороби (хвороба Гамборо). У результаті проведеної роботи був виділений новий епізоотичний вірус інфекційної бурсальної хвороби (ІБХ) «Харків-2012» і встановлена динаміка приросту антитіл до даного збудника серед поголів'я птиці.

Ключові слова: епізоотична ситуація, курчата, імунодефіцит, імуносупресія, інфекційна бурсальна хвороба, хвороба Гамборо.

Резистентність птиці до інфекційних захворювань залежить від функціонального стану органів імунної системи та різних імунодепресивних факторів, що постійно діють на організм [1, 2]. Дія різних чинників спричиняє виснаження імунітету. Серед збудників інфекційних хвороб птиці імунну систему найбільш виражено уражає вірус інфекційної бурсальної хвороби (ІБХ) або хвороба Гамборо. Він проявляє тропізм до лімфоїдних клітин, викликає їх руйнування і блокує імунну відповідь [5]. Ураження системи імунітету спричиняє стан імунодефіциту і знижує резистентність організму птиці до дії збудників інших інфекційних