УДК 636.09:616.98:599.731.1:578.82/.83:57.083.33

DOI: 10.31073/vet_biotech39-10

СИТЮК М.П., – д-р вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: snp1978@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОВНОГО ГЕНОМУ ЗРАЗКІВ ДНК ЦИРКОВІРУСУ ДРУГОГО ТИПУ, ВИДІЛЕНИХ ВІД ДИКИХ СВИНЕЙ В УКРАЇНІ

В статті наведені результати наукових досліджень щодо секвенування повного геному 23 ізолятів цирковірусу свиней другого типу. Для детекції ДНК цирковірусу свиней другого типу використовували особисто розроблені праймери: ЦВС 2 F – GCCACAGCCCTAACCTATGA, ЦВС 2 R – TCAGCCAAAGCTGATTCCTT, ЦВС 2 P FAM – СТАТСТСТСССГССАТАСАА – ВНQ1. Секвенування геному проводили у Національному ветеринарному інституті м. Пулави, Польща за двома фрагментами праймерами СВВ1-СВВ2 і CSZ2-СВВ3. Виявлено належність ізолятів цирковірусу другого типу до двох генотипів – першого й другого та груп 1A, 1B, 1C, 2D в межах цих двох генотипів.

Ключові слова: цирковірус другого типу, дикі свині, молекулярно-генетичні дослідження.

Вступ. Цирковірус свиней вперше був виявлений I. Tisher, N. Rasch и G. Tochtermann у 1974 році та згодом у 1982 році був охарактеризований як дрібний вірус свиней з кільцевою одноланцюговою ДНК [1]. Наразі відомо два типи цирковірусу свиней, які суттєво відрізняються нуклеотидною послідовністю геномів [2]. За даними закордонних авторів [3] штами цирковірусу свиней другого типу являються патогенними для свиней, а штами цирковірусу свиней першого типу – непатогенними, однак можуть викликати вроджені судоми.

В епізоотологічному відношенні цирковірусна інфекція поширена в Європі, Азії, Африці, Північній і Південній Америці [4].

Моніторингові молекулярно-генетичні дослідження збудника цирковірусної інфекції на території Європи показали, що ДНК цирковірусу другого типу була виявлена в патологічному матеріалі в стадах диких свиней: Угорщини у 20,5% досліджених зразків [5], Німеччини у 18,1% [6] та 63,1% [7], Румунії – 13,5% [8], Росії – 8,9% [2], Польщі – 75,6% [9]. Філогенетичний аналіз виділених ізолятів з території Польщі показав їх належність до двох генетичних кластерів ЦВС 2a і ЦВС 2b, де ідентичність між ними склала 88,9% та 89,9%, а в межах кластерів на рівні 99,1% – 99,6% та 99,1% – 100% відповідно [9].

В зв'язку з цим постає питання з'ясувати наявність циркуляції цирковірусної інфекції в стадах диких свиней України, що має наукове значення та несе загрозу для галузі свиначства.

Мета роботи – провести секвенування генетичних зразків цирковірусу свиней другого типу, виділених від диких свиней, та порівняти їх за філогенетичним аналізом з існуючими у світі ізолятами цього вірусу.

Матеріали і методи досліджень. Патологічний матеріал від відстріляних диких свиней, був відібраний впродовж сезонів полювання 2001–2013 рр., й за погодженням Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України був переданий від Державних регіональних лабораторій ветеринарної медицини та ДНДІЛДВСЕ до лабораторії вірусних хвороб свиней ІВМ НААН.

Попередньо патологічний матеріал на предмет детекції ДНК ЦВС 2 було досліджено методом ПЛР-РЧ за допомогою комерційних тест-систем виробництва «Ветбіохім», (м. Москва, Росія) у ВНДІВВіМ, м. Покров Росія у відповідності до договору про наукову співпрацю. Для секвенування повного геному цирковірусу другого типу було відібрано 23 зразки (ДНК ЦВС 2) з максимальним охопленням території України, а саме: 7 зразків з трьох районів Полтавської (Великобагачанський – 5, Диканський – 1, Глобинський – 1), 2 зразки з двох районів Черкаської – (Чорнобаївський – 1, Звенигородський – 1), 1 зразок з Косівського району Івано-Франківської, 2 зразки з двох районів Луганської (Новоайдарський – 1, Станично-Луганський – 1), 1 зразок з Краснопільського району Сумської, 1 зразок з Сокирянського району Чернівецької, 2 зразки з двох районів Донецької (Первомайський – 1, Добропільський – 1), 1 зразок з Бердянського району Запорізької, 1 зразок з Варвинського району Чернігівської, 1 зразок з Покровського району Дніпропетровської, 2 зразки з двох районів Житомирської (Коростенський – 1, Лугинський – 1), 2 зразки з двох районів Львівської (Золочівський – 1, Сокальський – 1) областей. Секвенування геному 23-х ізолятів цирковірусу свиней другого типу проводили у Національному ветеринарному інституті м. Пулави, Польща за двома фрагментами праймерами *CBB1-CBB2* і *CSZ2-CBB3* [5]. Філогенетичний аналіз був виконаний на основі *DNAstar (Lasergene)* і *CLC ДНК Workbench (CLC bio)*.

Результати досліджень та їх обговорення. З урахуванням попередніх результатів молекулярно-генетичних моніторингових досліджень щодо виявлення ДНК цирковірусу другого типу нами були відібрані 23 позитивні генетичні зразки. Походження зразків генетичного матеріалу цирковірусу другого типу від диких свиней, наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

**Походження зразків генетичного матеріалу цирковірусу другого типу
від диких свиней, які передані для секвенування**

№ п /п	Походження зразків		Результати		
	Область	Район	ПЛР	Секвено вано	Назва ізоляту за філогенетичним деревом
1	Полтавська	Великобагачанський	позитивний	так	<i>PrVd_1wb UKR</i>
2	Полтавська	Великобагачанський	позитивний	так	<i>PrVd_2wb UKR</i>
3	Полтавська	Великобагачанський	позитивний	так	<i>PrVd_3wb UKR</i>
4	Полтавська	Великобагачанський	позитивний	так	<i>PrVd_4wb UKR</i>
5	Полтавська	Великобагачанський	позитивний	так	<i>PrVd_5wb UKR</i>
6	Полтавська	Глобинський	позитивний	так	<i>PrGd_wb UKR</i>
7	Полтавська	Диканський	позитивний	так	<i>PrDd_wb UKR</i>
8	Черкаська	Чорнобаївський	позитивний	так	<i>CrCd_wb UKR</i>
9	Черкаська	Звенигородський	позитивний	так	<i>CrZd_wb UKR</i>
10	Ів.-Франківська	Косівський	позитивний	так	<i>I.F.rKd_wb UKR</i>
11	Луганська	Новоайдарський	позитивний	так	<i>LrNd_wb UKR</i>
12	Луганська	Ст.-Луганський	позитивний	так	<i>LrVsl_wb UKR</i>
13	Сумська	Краснопільський	позитивний	так	<i>SrKd_wb UKR</i>
14	Чернівецька	Сокирянський	позитивний	так	<i>CrSd_wb UKR</i>
15	Донецька	Первомайський	позитивний	так	<i>DkrPd_wb UKR</i>
16	Донецька	Добропільський	позитивний	так	<i>DrDd_wb UKR</i>
17	Запорізька	Бердянський	позитивний	так	<i>ZrBd_wb UKR</i>
18	Чернігівська	Варвинський	позитивний	так	<i>CrVd_wb UKR</i>
19	Дніпропетров.	Покровський	позитивний	так	<i>DprPd_wb UKR</i>
20	Житомирська	Коростенський	позитивний	так	<i>ZrKd_wb UKR</i>
21	Житомирська	Лугинський	позитивний	так	<i>ZrLd_wb UKR</i>
22	Львівська	Золочівський	позитивний	так	<i>LrZd_wb UKR</i>
23	Львівська	Сокальський	позитивний	так	<i>LrSd_wb UKR</i>

Відповідно до таблиці генетичний матеріал цирковірусу свиней другого типу було відібрано від диких свиней з територій 18 районів 12 областей України та у відповідності до договору про наукову співпрацю між Інститутом ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України та Національним ветеринарним інститутом, Польща передано для повногеномного секвенування.

Результати філогенетичного аналізу генетичного матеріалу цирковірусу свиней другого типу наведені на рисунку 1.

Рис. 1. Філогенетичне дерево, побудоване на основі послідовності повного геному 23 ізолятів цирковірусу другого типу, виділених від диких свиней з території України (позначені як ...UKR).

Філогенетичний аналіз 23 зразків генетичного матеріалу цирковірусу другого типу виділених від диких свиней, що мешкали на території України, показав їх належність до двох генотипів цього вірусу, де 16 послідовностей (секвенованих зразків) належать до групи 1A/1B, дві послідовності – до групи 1C, чотири послідовності до групи 2D. Таким чином кластерний розподіл секвенованих зразків від диких свиней показав їх наближеність та генетичну спорідненість з ізолятами цирковірусу другого типу, що виділені серед поголів'я свійських свиней в інших країнах світу.

Зокрема ізоляти, що виділені з територій: Первомайського та Добробільського районів Донецької області (*DkrPd_wb UKR*, *DrDd_wb UKR*), Лугинського та Коростенського районів Житомирської області (*ZrLd_wb UKR*, *ZrKd_wb UKR*), Чорнобаївського та Звенигородського районів Черкаської області (*CrCd_wb UKR*, *CrZd_wb UKR*), Краснопільського району Сумської області (*SrKd_wb UKR*), Станично-луганського та Новоайдарського районів Луганської області (*LrVsl_wb UKR*, *LrNd_wb UKR*), Варвинського району Чернігівської області (*CrVd_wb UKR*), Великобагачанського району Полтавської області (*PrVd_4wb UKR*, *PrVd_3wb UKR*, *PrVd_5wb UKR*, *PrVd_1wb UKR*, *PrVd_2wb UKR*), Косівського району Івано-Франківської області (*I.F.rKd_wb UKR*), входять до групи 1AB кластеру *PCV2b* та генетично наближені до ізолятів, що виділені на території Польщі, Китаю, В'єтнаму, Франції, Угорщини, Нідерландів у той час як ізоляти, що виділені з територій: Бердянського району Запорізької області (*ZrBd_wb UKR*) та Диканського району Полтавської області (*PrDd_wb UKR*) входять до групи 1C цього ж кластеру та генетично наближені до ізолятів, що виділені на території Данії, Китаю, Польщі, В'єтнаму, Нідерландів, Індії, Бельгії та Сербії.

Ізоляти, що виділені з території Золочівського та Сокальського районів Львівської області (*LrZd_wb UKR*, *LrSd_wb UKR*), Сокирянського району Чернівецької області (*CrSd_wb UKR*), Покровського району Дніпропетровської області (*DprPd_wb UKR*) входять до групи 2D кластеру *PCV2a* та генетично наближені до ізолятів, що виділені на території Франції, Канади, Угорщини, Польщі, Китаю. І лише 1 ізолят, що походив з території Глобинського району Полтавської області (*PrGd_wb UKR*) не був кластеризований.

Слід відмітити, що відомості щодо присутності цирковірусної інфекції свиней на території України, як і країн колишнього СРСР, відносяться на початку 2000 років [3]. З цього недавнього, в епізоотологічному відношенні, часу зазначена інфекція стрімко поширилася у свинарські господарства різних типів, в тому числі і до при приватного сектору, з проявом «синдрому мультисистемного виснаження». В сучасних умовах ведення свинарства

захворювання свиней на цирковіроз превалює більш ніж у 90% господарств України, а серопревалентність свійських свиней в господарствах окремих областей сягає 95,24% [10], а диких свиней – 31,51% [4, 11].

Отже, окрім визначеної серопревалентності диких свиней України до цирковірусу свиней другого типу, проведеними нашими науковими дослідженнями підтверджено наявність циркуляції цього вірусу у цих представників дикої фауни.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Отже, результати проведених молекулярно-генетичних досліджень показали, що ізоляти цирковірусу другого типу, що виділені від диких свиней України за філогенетичним аналізом близькоспоріднені з ізолятами виділеними з інших країн.

Ізоляти, що виділені з територій Донецької (*DkrPd_wb UKR*, *DrDd_wb UKR*), Житомирської (*ZrLd_wb UKR*, *ZrKd_wb UKR*), Черкаської (*CrCd_wb UKR*, *CrZd_wb UKR*), Сумської (*SrKd_wb UKR*), Луганської (*LrVsl_wb UKR*, *LrNd_wb UKR*), Чернігівської (*CrVd_wb UKR*), Полтавської (*PrVd_4wb UKR*, *PrVd_3wb UKR*, *PrVd_5wb UKR*, *PrVd_1wb UKR*, *PrVd_2wb UKR*), Івано-Франківської (*I.F.rKd_wb UKR*) областей, генетично більш наближені до ізолятів групи 1AB кластеру *PCV2b*, що циркулюють серед поголів'я свійських свиней на території Польщі, Китаю, В'єтнаму, Франції, Угорщини, Нідерландів, а ізоляти, що виділені з територій Запорізької (*ZrBd_wb UKR*) та Полтавської (*PrDd_wb UKR*) областей генетично наближені до ізолятів групи 1C цього ж кластеру, що циркулюють на території Данії, Китаю, Польщі, В'єтнаму, Нідерландів, Індії, Бельгії та Сербії.

Решта ізолятів, що виділені з території Львівської (*LrZd_wb UKR*, *LrSd_wb UKR*), Чернівецької (*CrSd_wb UKR*), Дніпропетровської (*DprPd_wb UKR*) областей входять до групи 2D кластеру *PCV2a* та генетично наближені до ізолятів, що виділені на території Франції, Канади, Угорщини, Польщі, Китаю.

Враховуючи вищевикладені дані в перспективах подальшої наукової роботи необхідно зосередити особливу увагу на доведенні факту передачі ізолятів цирковірусу другого типу від свійських свиней до диких свиней і в зворотньому напрямку з залученням філогенетичного аналізу.

Автор статті висловлює глибоку вдячність дирекції Національного ветеринарного Інституту м. Пулави, Польща, та його співробітниці К. Подгорській за допомогу в проведенні секвенування ізолятів та їх філогенетичній оцінці.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Малоголовкин А.С. Проблема цирковирусных инфекций в патологии животных и человека / А.С. Малоголовкин // Веткорм. – 2008. – № 2. – С. 30–31.
2. Мониторинг инфекционных болезней среди диких кабанов / А.В. Щербаков, С.А. Кукушкін, Тюміна А.М. [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2007. – Т. 52, № 3. – С.29–33.
3. Орлянкин В.Н. Цирковирусная инфекция свиней / В.Н. Орлянкин, Т.И. Алипер, Е.А. Непоклонов // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2006. – № 12. – С. 17–21.
4. Ситюк М.П. Епізоотологічний моніторинг вірусних хвороб диких свиней в Україні: дис. ... д-ра вет наук : 16.00.03 / Ситюк Микола Петрович. – Київ, 2015. – 483 с.
5. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boar / A. Cságola, S. Kecskeméti, G. Kardos [et al.] // Archives of Virology. – 2006. – Vol. 151, Is. 3. – P. 495–507. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0639-1>.
6. Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 samples from German wild boar populations / S. Knell, H. Willems, B. Hertrampf [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2005. – Vol. 109. – P. 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.06.004>.
7. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in wild boars / G. Reiner, C. Fresen, S. Bronnert [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2009. – Vol. 136. – P. 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.023>.
8. Prevalence of porcine circoviruses in Transylvanian wild boars, detected by real-time PCR—Short communication / D. Cadar, A. Cságola, M. Spinu [et al.] // Acta Veterinaria Hungarica. – 2010. – Vol. 58. – P. 475–481. <https://doi.org/10.1556/AVet.58.2010.4.8>.
9. Prevalence of infection and genetic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) in wild boar (*Sus scrofa*) in Poland / Fabisiak M., A. Szczotka, K. Podgórska [et al.] // Journal of Wildlife Diseases. – 2012. – Vol. 48, Iss. 3. – P. 612–618. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.3.612>.
10. Аналіз результатів моніторингових серологічних досліджень свиней щодо цирковірусної інфекції на території України за період 2013–2015 років / Д.М. Масюк, А.В. Кокарев, С.Г. Коляда [та ін.] // Біологія тварин. – 2016. – Т. 18, № 4. – С. 58–65.
11. Ситюк М.П. Серопревалентність популяції диких кабанів до цирковірусу свиней другого типу / М.П. Ситюк // Тваринництво України. – 2014. – № 6. – С. 30–34.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛНОГО ГЕНОМА ОБРАЗЦОВ ДНК ЦИРКОВИРУСА ВТОРОГО ТИПА, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДИКИХ СВИНЕЙ В УКРАИНЕ / Ситюк М.П.

В статье приведены результаты научных исследований по секвенированию полного генома 23 изолятов цирковируса свиней второго типа. Для детекции ДНК цирковируса свиней второго типа использовали лично разработаны праймеры: ЦВС 2 F – GCCACAGCCCTAACCTATGA, ЦВС 2 R – TCAGCCAAAGCTGATTCCTT, ЦВС 2 P FAM – СТАТССТСССГССАТАСАА – ВНQ1. Секвенирование генома проводили в Национальном ветеринарном институте г. Пулавы, Польша, по двум фрагментам праймерами СВВ1-СВВ2 и CSZ2-СВВ3. Выявлено принадлежность изолятов цирковируса второго типа к двум генотипам – первому и второму и группам 1А, 1В, 1С, 2D в пределах этих двух генотипов.

Ключевые слова: цирковирус второго типа, дикие свиньи, молекулярно-генетические исследования.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE COMPLETE GENOME OF SECOND-TYPE CIRCOVIRUS DNA SAMPLES IDENTIFIED FROM WILD PIGS IN UKRAINE / Sytiuk M.

Introduction. *Circovirus infection of pigs is caused by circovirus of the second type, which in terms of epizootology is common on all continents of the world.*

The goal of the work. *To carry out sequencing of genetic samples of circovirus of pigs of the second type isolated from wild pigs and to compare them by phylogenetic analysis with the existing isolates of this virus.*

Materials and methods. *For sequencing of the complete genome of circovirus of the second type, 23 samples were selected with maximum coverage of the territory of Ukraine – 18 districts of 12 oblasts. Sequencing of the genome of 23 isolates of porcine circovirus of the second type was performed at the National Veterinary Institute in Pulawy, Poland on two fragments of primers CBB1-CBB2 and CSZ2-CBB3. Phylogenetic analysis was performed based on DNASTAR (Lasergene) and CLC DNA Workbench (CLC bio).*

Results of research and discussion. *According to the results of the research 23 samples genetic material were suitable for sequencing of the whole genome of circovirus of the second type.*

Phylogenetic analysis of 23 circovirus isolates of the second type showed that the strains isolated from Ukrainian wild pigs belong to both CVS 2 genotypes, where 16 sequences belong to group 1A/1B, two sequences to group 1C, four sequences to group 2D. Thus, the cluster distribution of sequenced samples from feral pigs showed their proximity and genetic affinity with circovirus isolates of the second type isolated in other countries. Thus, in addition to the determined seroprevalence of wild pigs of Ukraine to the circovirus of pigs of the second type, our scientific research also confirmed the presence of circulation of this virus in these representatives of wild fauna.

Conclusions and prospects for further research. *Thus, the results of molecular genetic studies showed that isolates of circovirus of the second type isolated from wild pigs of Ukraine by phylogenetic analysis are closely related to isolates isolated from Canada, Japan, China, Vietnam, Taiwan, France, Hungary, Poland, the Netherlands, Serbia.*

Given the above data, in the perspective of further scientific work it is necessary to focus on proving the fact of transmission of circovirus isolates of the second type from domestic pigs to feral pigs and vice versa with the involvement of phylogenetic analysis.

Keywords: *circovirus type 2, wild boars, molecular genetic studies.*

REFERENCES

1. Maloholovkyn, A.S. (2008). Problema tsirkovirusnykh infektsii v patolohii zhivotnykh i cheloveka [The problem of circovirus infections in animal and human pathology]. *Vetkorm – Veterinary Feeding*, 2, 30-31 [in Russian].
2. Shcherbakov, A.V., Kukushkyn, S.A., Tymyna, A.M., Baibikov, T.Z., Kovalyshyn, V.F., Kanshyna, A.V., et al. (2007). Monitorinh infektsionnykh boleznei sredi dikikh kabanov [Monitoring of infectious diseases among wild boars]. *Voprosy virusologii – Problems of Virology*, 52, 3, 29-33 [in Russian].
3. Orliankin, B.H., Aliper, T.I., & Nepoklonov, E.A. (2006). Tsirkovirusnaia infektsiia svinei [Circovirus infection of pigs]. *Veterinariia selskokhoziaistvennykh zhivotnykh – Veterinary of farm animals*, 12, 17-21 [in Russian].

4. Sytiuk, M.P. (2015) Epizootologichnyi monitorynh virusnykh khvorob dykykh svynei v Ukraini [Epizootological monitoring of viral diseases of wild pigs in Ukraine]. *Extended abstract of Doctor's thesis*. Kyiv [in Ukrainian].
5. Cságola, A., Kecskeméti, S., Kardos, G., Kiss, I., & Tuboly, T. (2006). Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boar. *Archives of Virology*, 151, 3, 495-507. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0639-1>.
6. Knell, S., Willems, H., Hertrampf, B., & Reiner, G. (2005). Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 samples from German wild boar populations. *Veterinary Microbiology*, 109, 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.06.004>.
7. Reiner, G., Fresen, C., Bronnert, S., & Willems, H. (2009). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in wild boars. *Veterinary Microbiology*, 136, 250-258. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.023>.
8. Cadar, D., Cságola, A., Spinu, M., Dán, Á., Ursu, K., Lőrincz, M., et al. (2010). Prevalence of porcine circoviruses in Transylvanian wild boars, detected by real-time PCR—Short communication. *Acta Veterinaria Hungarica*, 58, 475-481. <https://doi.org/10.1556/AVet.58.2010.4.8>.
9. Fabisiak, M., Szczotka, A., Podgórska, K., & Stadejek, T. (2012). Prevalence of infection and genetic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) in wild boar (*Sus scrofa*) in Poland. *Journal of Wildlife Diseases*, 48, 3, 612-618. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.3.612>.
10. Masiuk, D.M., Kokariev, A.V., Koliada, S.H., Furda, I.L., Baidaliuk, V.A., & Sytiuk, M.P. (2016). Analiz rezultativ monitorynhovykh serolohichnykh doslidzen svynei shchodo tsyrkovirusnoi infektsii na terytorii Ukrainy za period 2013-2015 rokiv [Analysis of the results of monitoring serological tests of pigs for circovirus infection in Ukraine for the period 2013-2015]. *Biologhiia tvaryn – The Animal Biology*, 18,4, 58-65 [in Ukrainian].
11. Sytiuk, M.P. (2014). Seroprevalentnist populiatsii dykykh kabaniv do tsyrkovirusu svyneo druhoho typu [Seroprevalence of wild boar population to porcine circovirus of the second type]. *Tvarynnytstvo Ukrayiny – Livestock of Ukraine*, 6, 30-34 [in Ukrainian].