

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ДУДАР ЛЮДМИЛА ВАЛЕРІЇВНА

УДК: 575.86 + 578.832.1

ДИСЕРТАЦІЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА
ІЗОЛЯТІВ ЦИРКОВІРУСУ СВИНЕЙ 2 ТИПУ,
ІДЕНТИФІКОВАНИХ В УКРАЇНІ

03.00.06 – вірусологія
біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Дудар Л.В.

Науковий керівник: **Поліщук Валерій Петрович**, доктор біологічних наук,
професор

Київ 2019

АНОТАЦІЯ

Дудар Л.В. Молекулярно-біологічна характеристика ізолятів цирковірусу свиней 2 типу, ідентифікованих в Україні. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2019.

Дисертація присвячена ідентифікації цирковірусу свиней 2 типу в Україні, вивченню динаміки його розповсюдження та встановленню філогенетичних особливостей і еволюційних зв'язків між українськими ізолятами, виявленими у свиней з промислових господарств та серед диких тварин. Крім того, було розроблено метод комплексної діагностики для диференціації всіх ЦВС2-асоційованих захворювань свиней.

Вперше ідентифіковано цирковірус свиней 2 типу у 20 із 24 областей України та АР Крим. Проведена оцінка розповсюдження вірусу, дозволяє стверджувати, що рівень поширення ЦВС2 в Україні сягає 41%. З метою виявлення всіх потенційно можливих генотипів ЦВС2 була розроблена та апробована тест-система на основі ПЛР.

Філогенетичний аналіз українських ізолятів ЦВС2 показав належність вірусів до групи 1 (ЦВС2-1a\b), і до групи 2 (ЦВС2- 2b).

Встановлені еволюційні зв'язки між ізолятами, виділеними від свійських свиней та диких кабанів з однакових регіонів вказують на те, що більшість з них має різне походження і належать до різних підгруп. Однак ізоляти з Харківської області є високогомологічними, що може бути спричинено прямою передачею ЦВС2 між дикими та свійськими тваринами.

Розроблено підхід для комплексної діагностики всіх ЦВС-асоційованих синдромів, що поєднує результати, отримані на основі ПЛР в реальному часі з даними гістологічного та імуногістохімічного аналізу.

Ключові слова: цирковірус свиней 2 типу (ЦВС2), ідентифікація ЦВС2, поширення ЦВС2 в Україні, філогенетичний аналіз українських ізолятів ЦВС2, діагностика ЦВС2.

SUMMARY

Dudar L.V. Molecular and biological characteristics of porcine circovirus type 2 isolates identified in Ukraine. – Qualifying scientific work on the rights of manuscript.

The thesis for a candidate's degree in biological sciences (Doctor of Philosophy) by specialty 03.00.06 "Virology". – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation is devoted to the study, identification of porcine circovirus type 2 isolates in Ukraine, the dynamics of its spreading, as well as to the clarification of phylogenetic features and evolution connections between Ukrainian isolates, detected from swine in production herds and wild animals. Moreover, total diagnostics approach has been developed for differentiation of all PCV2-associated diseases of swine.

For the first time, Porcine Circovirus type 2 was identified in 20 of 24 regions of Ukraine and Crimea. The assessment of the spread of the virus has been carried out, which allows us to assert that the level of distribution of PCV2 in Ukraine reaches 41%. With the aim of detection of all expected genotypes of PCV2 strains, the new PCR-based test-system was developed and approved.

Phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of PCV2 showed the belonging of viruses to group 1 (PCV2-1a\|b) and group 2 (PCV2-2b).

The established evolutionary relationships between isolates, detected from pigs in swine herds and wild boars from the same regions of Ukraine indicate that most of them have different origins and belong to different subgroups. However, isolates from the Kharkiv oblast' are highly homologous, which may be due to the direct transfer of PCV2 between wild boars and farm animals.

An approach for the comprehensive diagnosis of all PCV2-associated diseases, which combines the results obtained by Real Time PCR with the data of histological and immunohistochemical analysis, is developed. For the reason of quick and routine laboratory detection of PCV2 in different tissues and pathological materials, effective and potential RT-PCR approach was developed and confirmed by trials. At the same time, huge histological investigations were used for differentiation of most PCV2-associated diseases, specific morphological and pathological changes were described that should be used for diagnosis confirmation. Moreover, this comprehensive approach has been added by immunohistochemistry tool for antigen presence visualization in cases when histological changes are absent. The developed approach covers all PCV2-associated diseases and can be implemented and used in diagnostics laboratory.

Key words: porcine circovirus type 2 (PCV2), identification of PCV2, distribution of PCV2 in Ukraine, phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of PCV2, diagnosis of PCV2.

Список наукових праць, опублікованих за темою дисертації.

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Дудар Л.В., Поліщук В.П. Гістологічні аспекти цирковірус-асоційованого синдрому свиней, уражених цирковірусом 2-го типу // Вісн. КНУ імені Тараса Шевченка. Серія Біологія. – 2016. – №73. – С. 77-79. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*

2. Дудар Л.В., Поліщук В.П. Молекулярно-біологічні та епізоотологічні особливості цирковірусу 2 типу як збудника емерджентного захворювання свиней в промислових господарствах України // Наукові записки НАУКМА– 2014. – №67. – С. 38-41.*(Здобувачем проаналізовані літературні джерела).*

3. Dudar L.V., Polischuk V.P., Budzanivska I.G., Balka G., Csagola A. Complete genome sequence of porcine circovirus type 2 Ukrainian isolates // Вісн.

КНУ імені Тараса Шевченка. Серія Біологія. – 2016. – №72. – С. 5-8. *(Здобувачем проведени експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*

*Статті у наукових фахових виданнях України,
які входять до міжнародних наукометричних баз даних*

4. Dudar L.V., Budzanivska I.G., Polishchuk V.P. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from wild boars detected in different regions of Ukraine // *Biopolym. Cell.* – 2018. – №34. – С. 41-48. *(Здобувачем проведени експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*

5. Dudar L.V., Polishchuk V.P., Sobko I.A., Budzanivska I.G. The nature of the spread of porcine circovirus type 2 as an emerging in Ukraine during the period from 2007 to 2012 // *ScienceRise. Biological Science.* – 2018. – №10. – С. 39-44. *(Здобувачем проведени експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*

6. Ivashchenko O.A., Dudar L.V., Polishchuk V.P. Detection of porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus using PCR and immunohistochemistry in the tissues of abortion fetuses // *Науковий вісник НУБіП.* – 2016. – №58. – С. 14. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*

Тези наукових доповідей:

1. Dudar L.V., Ivashchenko O.A. Prevalance of PRRSV and PCV2 associated abortions in Ukraine in 2007-2012 period // *Vth European symposium of porcine health management; Edinburg, UK:abstr.* – 2013. – p.132.

2. Дудар Л.В., Поліщук В.П. Характер поширення цирковірусу свиней 2 типу в Україні в період з 2007 по 2012 роки // *VII Міжнародна конференція «Біоресурси та віруси»: зб. тез.* – Київ, 2013. – С. 53.

3. Dudar L.V., Polishchuk V.P., Sobko I.A. The features of porcine circovirus type 2 as an emerging in Ukraine // The 23d International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Cancun, Mexico:abstr. – 2014, p. 549.

4. Dudar L.V., Polischuk V.P. Distribution of porcine circovirus type 2 among pigs with respiratory pathology in different geographical regions of Ukraine during 2014-2015 // The 24th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Dublin, Ireland:abstr. – 2016, p.1125.

5. Dudar L.V. Qualitative diagnosis and effective prevention of viral infection - Key factors for animal health // VIII Міжнародна конференція «Біоресурси та віруси». – Kyiv, 2016.

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	11
ВСТУП.....	12
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	19
1.1. Загальна характеристика цирковірусу свиней 2 типу.....	19
1.1.1. Таксономічне положення та філогенетичні зв'язки цирковірусу свиней 2 типу.....	20
1.1.2. Молекулярна організація та особливості функціонування геному ЦВС2.....	23
1.1.3. Будова ЦВС2 та функції окремих компонентів вірусу.....	24
1.2. Характеристика та особливості цирковірус-асоційованих синдромів свиней.....	26
1.2.1. Розповсюдження цирковірус-асоційованих синдромів свиней	27
1.2.2. Джерела та шляхи передачі цирковірусу свиней 2 типу.....	28
1.3. Патогенез цирковірус-асоційованих синдромів свиней.....	29
1.3.1. Вірус-залежні фактори розвитку ЦАСС.....	31
1.3.2. Хазяїн-залежні фактори розвитку ЦАСС.....	32
1.3.3. Вплив коінфекцій на розвиток окремих ЦАСС.....	33
1.3.4. Вплив імуномодуляції тварин на розвиток ЦАСС.....	35
1.4. Клінічна картина цирковірус-асоційованих синдромів свиней.....	35
1.4.1. Цирковірус-асоційована системна інфекція свиней.....	36
1.4.2. Цирковірус-асоційований синдром дерматито-нефропатії свиней..	38
1.4.3. Цирковірус-асоційовані респіраторні захворювання свиней.....	40
1.4.4. Цирковірус-асоційовані репродуктивні порушення та аборти.....	41
1.5. Особливості перебігу інфікування ЦВС2 в популяціях диких кабанів.....	43
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	45
2.1. Об'єкт дослідження та його характеристика.....	45

2.1.1.	Загальна характеристика об'єкту дослідження.....	45
2.1.2.	Аналіз морфолого-патологічного стану уражених свиней та відбір зразків для досліджень.....	46
2.2.	Реактиви, матеріали та обладнання, що були використані в роботі.	47
2.3.	Молекулярно-біологічні методи дослідження.....	49
2.3.1.	Конструювання і підбір праймерів та зондів для проведення ПЛР та ПЛР в реальному часі.....	49
2.3.2.	Виділення РНК та ДНК з патологічного матеріалу свиней.....	50
2.3.3.	Проведення полімеразної ланцюгової реакції.....	51
2.3.4.	Проведення ПЛР в режимі реального часу.....	52
2.3.5.	Проведення електрофоретичного аналізу продуктів реакцій в агарозному гелі.....	52
2.3.6.	Очищення продуктів ПЛР з агарозного гелю.....	53
2.3.7.	Аналіз і інтерпретація результатів отриманих при проведенні ПЛР в реальному часі.....	53
2.3.8.	Філогенетичний аналіз та побудова філогенетичних дерев.....	54
2.4.	Гістологічні методи дослідження.....	54
2.4.1.	Виготовлення гістологічних зразків.....	54
2.4.2.	Мікроскопіювання і аналіз.....	56
2.5.	Імуногістохімічний метод дослідження зразків тканин.....	56
2.5.1.	Підготовка тканин органів.....	56
2.5.2.	Проведення імуногістохімічної реакції.....	57
2.6.	Статистична обробка результатів.....	58
РОЗДІЛ 3 ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЦИРКОВІРУСУ СВИНЕЙ 2 ТИПУ В УКРАЇНІ.....		59
3.1.	Характеристика патолого-анатомічного стану тварин, відібраних для досліджень в період 2007-2012 рр.	59
3.2.	Молекулярно-генетичні дослідження патологічного матеріалу.....	62
3.2.1.	Характеристика праймерів, підібраних для проведення ПЛР.....	62
3.2.2.	Ідентифікація ЦВС2 у зразках, відібраних від свиней різних	

вікових груп та різних областей України.....	68
3.2.3. Виявлення ДНК цирковірусу свиней 2 типу у патологічному матеріалі окремих органів, відібраних від хворих свиней.....	72
3.2.4. Ефективність виявлення ДНК ЦВС2 методом ПЛР.....	75
3.2.5. Визначення специфічності експрес-методів виявлення ЦВС2, розроблених на основі ПЛР	76
РОЗДІЛ 4 ВИВЧЕННЯ ФІЛОГЕНЕТИЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ТА ПОШИРЕННЯ ЦИРКОВІРУСУ СВИНЕЙ 2 ТИПУ СЕРЕД СВІЙСЬКИХ ТА ДИКИХ ТВАРИН НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ.....	
4.1. Поширення цирковірусу свиней 2 типу в Україні в період 2007-2012 рр.....	78
4.2. Філогенетичний аналіз ізолятів ЦВС-2, ідентифікованих в Україні	83
4.2.1. Встановлення еволюційних зв'язків виділених ізолятів ЦВС2.....	84
4.2.2. Генетична характеристика цирковірусу свиней типу 2, детектованого від диких кабанів з різних регіонів України.....	88
РОЗДІЛ 5 РОЗРОБКА КОМПЛЕКСНОГО ПІДХОДУ ДО ДІАГНОСТИКИ ЦВС-АСОЦІЙОВАНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ.....	
5.1. Виявлення ЦВС2 в патологічному матеріалі свиней методом ПЛР в реальному часі.....	95
5.1.1. Характеристика праймерів та зондів, що були використані для проведення ПЛР в режимі реального часу.....	95
5.1.2. Виявлення ДНК цирковірусу свиней 2 типу в ліофілізованих сироватках крові від свиней.....	99
5.1.3. Ідентифікація ЦВС2 в зразках від свиней з респіраторною патологією в 2014-2015 роках	101
5.2. Гістологічні дослідження патологічного матеріалу.....	103
5.2.1. Гістологічний аналіз патологічних змін у тканинах уражених тварин.....	103
5.3. Диференційне виявлення ЦВС2 в зразках абортів плодів від свиней методом ПЛР та імуногістохімії за одночасного	

інфікування вірусом РРСС.....	110
РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	115
ВИСНОВКИ.....	126
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	128
ДОДАТОК А.....	152

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

PCV2	- Porcine Circovirus type 2, цирковірус свиней 2 типу;
PCV1	- Porcine Circovirus type 1, цирковірус свиней 1 типу;
PCVAD	- Porcine circovirus associated disease, цирковірус-асоційоване захворювання свиней;
PCVD	- Porcine circovirus disease, цирковірусне захворювання свиней;
PK-15	- Porcine kidney 15, клітинна лінія нирки свині;
PMWS.....	-Postweaning multisystemic wasting syndrome, синдром мультисистемного виснаження;
SPF	- specific pathogen free (безпатогенні лабораторні тварини);
а.к.з.	- амінокислотні залишки;
АГ	- антиген;
АТ	- антитіло;
ВРЗ	- відкрита рамка зчитування;
ДНК	- дизооксирибонуклеїнова кислота;
ЗТ	- зворотня транскрипція;
ЗТ-ПЛР	- зворотньоотранскрипційна ПЛР
ІФА	- імуноферментний аналіз;
ІГХ	- імуногістохімія;
п.о.	- пар основ;
ПЛР	- полімеразна ланцюгова реакція;
РНК	- рибонуклеїнова кислота;
РРСС	- репродуктивно респіраторний синдром свиней;
СДНС	- синдром дерматито-нефропатії свиней
ЦВС2	- цирковірус свиней 2 типу;
ЦАСС	- цирковірус-асоційовані синдроми свиней;
ЦАСІС	- цирковірус-асоційована системна інфекція свиней;
ЦАЗС	- цирковірус-асоційовані захворювання свиней.

ВСТУП

Актуальність теми. Цирковірус свиней 2 типу (ЦВС2), що був вперше ізольований в 1998 році [49], є найбільш поширеним та економічно значущим збудником захворювань свиней на глобальному рівні [130, 3]. Захворювання, спричинене інфікуванням ЦВС2 було вперше описано як синдром мультисистемного виснаження (PMWS) [35]. Згодом все більше і більше патологічних станів, таких як репродуктивні, ентерологічні і респіраторні розлади, було досліджено і пов'язано з інфекцією ЦВС2, а захворювання перейменовано як цирковірус-асоційоване захворювання свиней (PCVAD) у США і цирковірусне захворювання свиней (PCVD) в Європі [150, 173].

ЦВС2 – це найменший вірус, здатен інфікувати ссавців [129]. Не зважаючи на те, що він є ДНК-вмісним вірусом і, як очікувалось, мав би бути досить консервативним, сучасні ізоляти виявляють значні генетичні варіації що, безумовно пов'язано з інтенсивним промисловим вирощуванням свиней у всьому світі [207, 60, 188, 176]. Швидкість заміщення нуклеотидів для ЦВС2 оцінюється в порядку 1.2×10^{-3} заміни на сайт на рік, що є найбільшою зареєстрованою швидкістю заміщення для одноланцюгового ДНК-вірусу, дозволяючи ЦВС2 мати еволюційну динаміку подібну одноланцюговим РНК-вірусам [57, 88].

Цирковірус свиней 2 типу – це малий, безоболонковий, ізометричний вірус, що містить ковалентно замкнену, кільцеву, одноланцюгову молекулу ДНК [4, 141, 185] і належить до родини *Circoviridae*, роду *Circovirus* [21]. В межах роду *Circovirus* виокремлюють два основні види Цирковірус 1 типу та Цирковірус 2 типу [1]. В той час, коли ЦВС1 є не патогенним для свиней [1], ЦВС2 асоційований з багатьма захворюваннями цих тварин, включаючи системний, респіраторний та шлунково-кишковий синдроми [150]. Найбільш ранній ізолят ЦВС2 описано після сиквенування генетичного матеріалу вірусу, виділеного ретроспективно з депонованого матеріалу тканин свиней Північної Німеччини 1962 року [81]. Хоча, вперше ЦВС2 було ізольовано від свиней з

цирковірус-асоційованими синдромами і описано в Канаді у 1998 році як дуже стійкого до інактивації патогена свиней [49]. Оскільки вірус поширюється надзвичайно швидко за безпосереднього контакту тварин, разом із ороназальними виділеннями, фекаліями, сечею, спермою та кров'ю, при механічному зараженні через виробниче устаткування господарств і зберігається в біологічних рідинах інфікованих тварин впродовж 125 діб після інфікування, вже через 10 років його було виявлено практично у всіх країнах Європи та Азії [1, 4, 143]. Наразі, не лише факт встановлення наявності вірусу є важливим, а й визначення його приналежності до тієї чи іншої генетичної групи різними молекулярно-біологічними методами [202, 204]. Такий філогенетичний аналіз дозволяє встановити еволюційні зв'язки, поширення та шляхи потрапляння ізолятів вірусу в нові регіони. Виокремлюють декілька генотипових груп ЦВС2, до яких відносять ізоляти, виділені як від свійських тварин так і від диких кабанів [39, 204]. Тому вивчення вірусу в межах країни має включати дані з обох популяцій.

Особливою характеристикою захворювань, асоційованих з цирковірусом свиней 2 типу є те, що найчастіше розвиток синдромів відбувається за змішаної інфекції, викликаній ЦВС2 та іншими патогенами свиней (вірусом репродуктивно-респіраторного синдрому, вірусом грипу, парвовірусом свиней, та ін.) [2, 10, 86, 93, 146, 154]. Крім того, показано можливість розвитку згаданих синдромів при інфекції ЦВС2 та імуномодуляції тварин [10, 144]. А це в свою чергу значно ускладнює діагностику цирковірус-асоційованих синдромів, оскільки наявність вірусу не є визначальним діагностичним показником [149].

Таким чином, вивчення цирковірусу свиней 2 типу та синдромів, асоційованих зі згаданим збудником, має надзвичайно велике значення, оскільки щороку українським господарствам завдаються великі економічні збитки. Високий рівень контагіозності та смертності свиней за згаданого захворювання зумовлює необхідність розроблення та застосування експрес-

методів діагностики з метою як найшвидшої ідентифікації збудника у зразках та запровадження карантинних і профілактичних заходів [211].

Одним із підходів до вирішення даної проблеми є створення тест-систем на основі полімеразної ланцюгової реакції, що є найшвидшим методом виявлення ЦВС2 як за хронічного та персистентного перебігу захворювання, так і для диференційного виявлення згаданого вірусу від інших збудників захворювань свиней. Також лише за допомогою вказаного методичного підходу можливим є виявлення вірусоносійства, що необхідно для контролю за розповсюдженням захворювання [72, 78, 92]. Однак це не забезпечує діагностичний аналіз та диференціацію всіх можливих ЦВС2 асоційованих синдромів. Тому необхідним є комплексний підхід із застосуванням ПЛР та шляхом проведення гістологічного та імуногістохімічного аналізу, що дає можливість оцінювати характер патолого-морфологічних змін тканин органів та встановлювати зв'язок між наявністю вірусу та синдромом, що розвивається [32, 91, 102].

Крім того, відсутні дані щодо характеру поширення цирковірусу 2 типу в Україні, а особливо щодо характеру поширення ізолятів різних генотипових груп, що унеможлиблює оцінку епізоотологічної ситуації щодо згаданого збудника.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в межах технічного завдання держбюджетної теми №11БФ 036-02 «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо-, та віробіоти України з використанням біоінформаційних технологій» кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, № державної реєстрації 0111U004649.

Мета і завдання досліджень. Ідентифікувати ЦВС2 на території України, вивчити його молекулярно-біологічні особливості, дослідити поширеність та розробити підходи до диференційної діагностики даного патогену.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі **завдання**:

1) ідентифікувати ізоляти ЦВС2 у зразках патологічного матеріалу, отриманого від тварин з промислових господарств різних регіонів України та з'ясувати характер поширення вірусу (у тому числі ретроспективно);

2) розробити тест-систему для виявлення генетичного матеріалу ЦВС2 на основі полімеразної ланцюгової реакції;

3) визначити специфічність та ефективність розробленої тест-системи;

4) ідентифікувати ДНК цирковірусу свиней 2 типу у патологічному матеріалі, отриманому від тварин промислових господарств та диких кабанів;

5) сиквенувати нуклеотидні послідовності геномів ізолятів ЦВС2, ідентифікованих від свиней з промислових господарств різних регіонів України та диких кабанів, здійснити молекулярно-філогенетичний аналіз та з'ясувати їхні еволюційні зв'язки;

6) розробити комплексний діагностичний підхід для виявлення ЦВС2-асоційованих захворювань на основі ПЛР в реальному часі, гістологічного та імуногістохімічного аналізу.

Об'єкт дослідження – цирковірус свиней 2 типу та його діагностика.

Предмет дослідження – молекулярно-біологічна характеристика ізолятів ЦВС2, що циркулюють в Україні, захворюваність на цирковірус-асоційовані синдроми.

Методи дослідження – вірусологічні, серологічні, молекулярно-біологічні, гістологічні (патолого-формологічний аналіз та імуногістохімічне дослідження), філогенетичні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. У цій роботі вперше було ідентифіковано цирковірус свиней 2 типу в зразках від тварин, що утримувалися у промислових господарствах, в 20 з 24 областей України та АР Крим. Описано молекулярно-біологічні особливості ізолятів, виділених від свійських свиней та диких кабанів, здійснено їхній філогенетичний аналіз та встановлено еволюційні взаємозв'язки. Отримані результати створюють можливість відслідковування поширення ЦВС2 на території України в

майбутньому, встановлення шляхів його потрапляння, вдосконалення вже існуючої системи епідеміологічного та вірусологічного нагляду за ЦВС2, впровадження більш ефективних профілактичних та карантинних заходів. Окрім того, в перспективі є можливість виробництва діагностичних наборів на основі розроблених тест-систем ПЛР та ПЛР у реальному часі.

Також показано різницю у патогенезі на рівні тканин українських ізолятів ЦВС2. Запропонований комплексний підхід забезпечує можливість диференційного діагностування всіх існуючих ЦВС2-асоційованих синдромів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати молекулярно-біологічних особливостей ізолятів ЦВС2, що циркулюють в Україні, забезпечують необхідною інформацією для вдосконалення існуючих методів діагностики та впровадження комплексних підходів до профілактики захворювання. Це дозволить управлінським ветеринарним державним та приватним структурам більш ефективно реагувати на розповсюдження ЦВС2 в Україні та контролювати його шляхом вчасно проведених профілактичних заходів.

Розроблена тест-система на основі ПЛР може бути використана для ідентифікації ЦВС2 у матеріалі різних тканин та органів свиней, а також є інструментом отримання практично повногеномної нуклеотидної послідовності вірусу для подальшого секвенування та філогенетичного аналізу. Це дозволить відслідковувати поширення існуючих генотипних груп вірусу на території України та встановлювати появу нових. Крім того, під час апробації створеної тест-системи було з'ясовано який саме матеріал найефективніше відбирати для аналізу та у яких вікових груп, що є цінною інформацією для діагностичних лабораторій. Більш того, для рутинної лабораторної діагностики розроблено тест-систему на основі ПЛР в реальному часі, що значно пришвидшує отримання результатів і є більш ефективною для проведення масових скринінгових досліджень. Вказаний аспект є ключовим для можливості швидкого прийняття рішень, впровадження дієвих засобів

профілактики та заходів біобезпеки для контролю ЦВС2, що, своєю чергою, буде зумовлювати зменшення економічних втрат галузі.

Виявлено та описано характерні зміни в тканинах органів тварин, уражених ЦВС2, що створює можливість застосування гістологічного методу для диференційної діагностики ЦВС2, а запропонований метод імуногістохімічного аналізу доповнює розроблений нами комплексний підхід для підтвердження діагнозу всіх існуючих цирковірус-асоційованих захворювань. Такий підхід вже впроваджено в протокол роботи ТОВ «Центр ветеринарної діагностики» (м. Київ), в якому здійснюється діагностика вірусних та бактеріальних захворювань сільськогосподарських тварин та птиці з усієї України.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Розробка плану експерименту та її реалізація, отримання експериментальних даних, їхнє узагальнення, інтерпретація здійснена автором особисто під керівництвом д.б.н., проф. Поліщука В.П.

Розробку та апробацію тест-системи на основі ПЛР для виявлення ЦВС2 здійснено разом з завідуючим відділом молекулярної біології ДНКІБШМ, к.б.н. Дерябіним О.М.

Динаміку поширення ЦВС2 територією України у період 2007-2012рр. відслідковували з директором ТОВ «Центр ветеринарної діагностики» Собко І.О.

Сиквенування повногеномних послідовностей ЦВС2 здійснювали разом з Gyula Valka та Attila Csagola в Інституті Ветеринарної Медицини ім. Святого Іштвана, Будапешт, Угорщина.

Філогенетичний аналіз вірусів, що циркулюють в Україні, проведений автором особисто на кафедрі вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка за сприяння д.б.н., проф. Будзанівської І.Г.

Розробку тест-системи на основі полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі виконували разом із технічним спеціалістом ТОВ «АЛТ» Пігідою Д.С.

Гістологічні та імуногістохімічні дослідження були проведені у Центрі ветеринарної діагностики за участі завідувача відділу гістології, к.б.н. Іващенко О.А.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на засіданнях кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (щопівроку); VII Міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (Київ, Україна, 2013); V-ому Європейському симпозиуму здоров'я свиней (Единбург, Великобританія, 2013); 23-му Міжнародному конгресі Ветеринарної асоціації зі здоров'я свиней (Канкун, Мексика, 2014); VIII Міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (Київ, Україна, 2016); 24-му Міжнародному конгресі Ветеринарної асоціації зі здоров'я свиней (Дублін, Ірландія, 2016).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць, серед яких 6 статей у фахових наукових виданнях (3 мають індекс цитування) та 5 тез доповідей (3 з яких міжнародні).

Структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, 3-х розділів власних досліджень, узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаної літератури, що охоплює 214 джерел. Дисертаційна робота викладена на 153 сторінках друкованого тексту. Фактичний матеріал подано у вигляді 8 таблиць та 39 рисунків.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика цирковірусу свиней 2 типу.

Цирковірус свиней 2 типу (*Porcine Circovirus type 2, PCV2*) (ЦВС2) – це невеликий за розміром безоболонковий вірус, що містить одноланцюгову молекулу ДНК і належить до роду *Circovirus* родини *Circoviridae* [159, 160]. Раніше ідентифікований представник вказаного роду – цирковірус свиней 1 типу (*PCV1*), був описаний в 1974 році як контамінант клітинних ліній нирки свині *PK-15*, та вважається не патогенним [127, 137, 187]. Не зважаючи на те, що у 1986 році встановлено широке розповсюдження даного вірусу в популяції свійських свиней [186], щодних даних про розвиток пов'язаних з ним захворювань, ані в тварин, позбавлених молозива, ні в гнотобіонтних чи SPF свиней, отримано не було [7]. Тоді як з цирковірусом 2 типу, вперше описаним як варіантний штам цирковірусів свиней в 1998 році, пов'язують розвиток низки патологічних синдромів [53, 150]. Аналіз нуклеотидних послідовностей виявив, що рівень гомології між ЦВС1 та ЦВС2 складає лише 68% [49, 71, 126]. Моноклональні антитіла, отримані проти ЦВС1, не розпізнають ЦВС2 [5, 125], що вказує на те, що ці віруси генетично споріднені, але антигенно і фенотипово відрізняються.

Цирковірус свиней 2 типу є надзвичайно унікальним вірусом. По-перше, це найменший вірус тварин, здатний до незалежної реплікації. По-друге, він використовує стратегію реплікації за типом «кільця, що котиться», характерну для гемінівірусів та нановірусів рослин [63, 126, 134]. В інфікованих клітинах виявляють три основні вірусні білки: Rep- та Rep'-протеїн, задіяні у вірусній реплікації, та капсидний білок Cap. З огляду на таку малу кількість власних білків, збудник інтенсивно використовує ензими клітин хазяїна для власної реплікації та упакування [121]. Таким чином, під час реплікації вірусу, ЦВС2 взаємодіє з багатьма клітинними факторами хазяїна, що в свою чергу значно

впливає на модулювання імунної функції господаря та призводить до дисбалансу цитокінів, імуносупресії і розвитку захворювань [157]. Загалом, цирковірус 2 типу характеризується низкою специфічних ознак, які наразі мало вивчені, не зважаючи на те, що з моменту відкриття вірус інтенсивно досліджували. А тому, станом на 2019 рік він є одним з найбільш досліджуваних у всьому світі вірусом тварин.

1.1.1. Таксономічне положення та філогенетичні звязки цирковірусу свиней 2 типу.

Родина *Circoviridae* представлена вірусами, що містять малі, кільцеві, одноланцюгові молекули ДНК (ssDNA), включаючи найменші відомі віруси тварин, класифіковані у два роди *Circovirus* та *Cyclovirus* [159], які відрізняються положенням походження реплікації відносно кодуєчих областей і довжиною міжгенних регіонів [20]. В межах кожного роду, поріг розмежування видів становить 80% ідентичності нуклеотидної послідовності в межах геному. Члени роду *Circovirus* були ідентифіковані тільки у хребетних, тоді як члени роду *Cyclovirus* були ідентифіковані як у хребетних, так і в безхребетних [160]. Типом видом для роду *Circovirus* є цирковірус свиней 1 типу, а роду *Cyclovirus* - асоційований з людиною цикловірус 8. До роду *Circovirus*, крім ЦВС2, належать цирковірус свиней 1 типу та цирковіруси птахів, а саме цирковірус папуг (Beak and Feather Disease Virus, BFDV), цирковірус гусей, голубів, зябликів та чайок (рис. 1.1) [38, 138]. Цирковіруси є видоспецифічними, оскільки здатні реплікуватись в клітинах свиней та птахів. Більшість з них – непатогенні, окрім цирковірусу свиней 2 типу, вірусу анемії курчат, цирковірусу папуг [20, 38].

Шляхом філогенетичного аналізу взаємозв'язків між цирковірусами свиней та птахів, гемінівірусами та нановірусами рослин, було з'ясовано, що цирковірус свиней 2 типу найбільш споріднений з цирковірусом качок та гусей [138]. Більше того, було показано, що спільний прашур цирковірусів

свиней та птахів походить від нановірусів рослин, які рекомбінували з РНК-вмісними вірусами хребетних, найвірогідніше каліцівірусами [63].

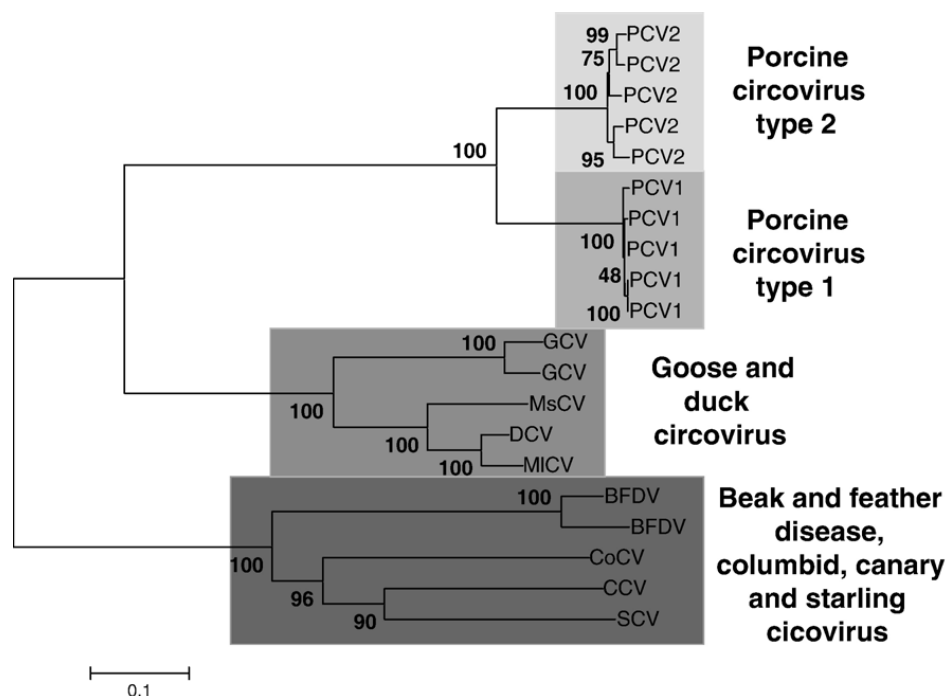


Рис. 1.1. Філогенетичні взаємозв'язки між вірусами роду *Circovirus* [141].

Наразі виділяють дві генотипні групи ізолятів цирковірусу свиней 2 типу – генотипна група 1 та генотипна група 2, які підрозділяються ще на три (1А, 1В, 1С) та п'ять (2А, 2В, 2С, 2D, 2Е) підгруп, відповідно (рис. 1.2). Найбільш поширеною за даними Olvera та співавт. [141] є генотипна група 1, до якої належить близько 65 % (95 з 145) усіх зареєстрованих до 2007 року ізолятів ЦВС2. Причому, до 1А підгрупи належать 49 % (71 з 145) ізолятів вказаного вірусу, серед яких ізоляти, вперше ідентифіковані в Китаї, Нідерландах, Франції та Австрії. До 1В підгрупи належать лише 5 % (7 з 145) ізолятів, виділених у Франції, Китаї та Нідерландах. 1С підгрупа представлена ізолятами виявленими у Китаї та Німеччині, що становлять 11,75 % (17 з 145).

До 2 генотипової групи належать 35 % (50 з 145) зареєстрованих ізолятів ЦВС2, при чому до 2А підгрупи належать 2 % (ізоляти, зареєстровані в Японії та Канаді), 2В – 3,5 % (Тайвань), 2С – 3,5 % (Угорщина, Іспанія), 2D – 9 % (ізоляти, виявлені у Франції, Австрії, Угорщині, Китаї, Канаді, США, Німеччині) та 2Е підгрупи – 17 % ізолятів, ідентифікованих в Китаї, США, південній Африці, Тайвані, Корей, Японії та Канаді [141].

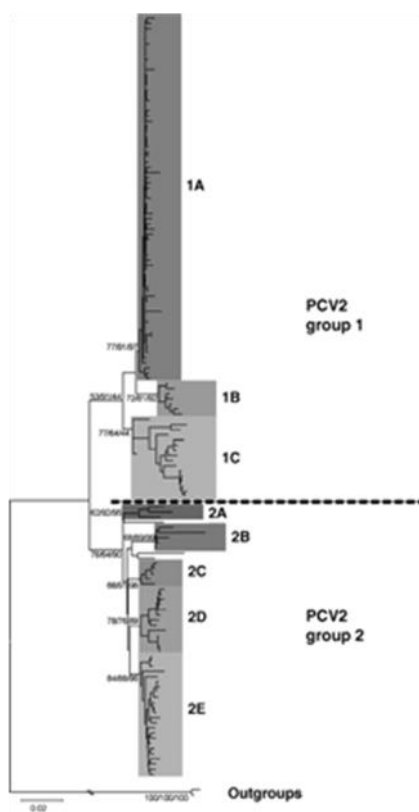


Рис. 1.2. Філодендрограма ізолятів цирковірусу свиней 2 типу, генотипові групи ЦВС2 [141].

ЦВС2 безперервно змінюється через точкові мутації і рекомбінацію геному [84, 87]. Так результати досліджень епідеміології вірусу в Китаї встановлено, що ЦВС2b був переважаючим генотипом з 2009 по 2010 рік, а ЦВС2b-1C був емерджентним переважаючим підтипом. П'ять виділених штамів (09HaiN-1, 09HaiN-2, 10AH, 10GX і 10QH) були класифіковані в новий кластер разом з двома основними генотипами ЦВС2a і ЦВС2b. Подальші аналізи показали, що цей новий кластер виник в результаті рекомбінації між PCV2a і PCV2b в гені ORF2. Крім того, пошук BLAST на сайті NCBI показав, що штами ЦВС2 нового кластера також з'явилися в Таїланді, Індонезії та Лаосі, що свідчить про те, що новий кластер ЦВС2 циркулює в деяких інших азіатських країнах. Таким чином, було показано виявлення кластеру штамів ЦВС2, що походять від одного генотипного попередника в результаті рекомбінаційних процесів [24, 25, 27, 70]. У результаті багатьох досліджень упродовж більш ніж 10 років було встановлено, що не існує кореляції між

генотипними групами вірусу та рівнем патогенності чи їх географічним поширенням [19, 28, 37, 52, 62, 108, 114].

1.1.2. Молекулярна організація та особливості функціонування геному ЦВС2.

Геном ЦВС2 представлений одноланцюговою ковалентно замкненою кільцевою амбісенсовою молекулою ДНК, розмір якої близько 1768 п.н [20]. Вона містить відкриті рамки зчитування (ORF) для 4-х генів. ORF1 кодує два білки, пов'язані з реплікацією, позначеною Rep та Rep' [30, 120], ORF2 кодує капсидний білок [136], ORF3 кодує білок, який, як вважають, грає роль в апоптозі [112] і ORF4 кодує ново виявлений білок, що має роль у інгібуванні каспазної активності і регуляції CD4 + і CD8 + Т-лімфоцитів [76].

Цикл реплікації цирковірусу свиней 2 типу розпочинається після приєднання Сар-білків до рецепторів чутливих клітин із подальшим проникненням у клітини хазяїна. Після цього відбувається поступове роздягання вірусу і потрапляння його генетичного матеріалу до ядра. Там замкнена кільцева молекула одноланцюгової ДНК спочатку конвертується у суперспіралізовану дволанцюгову ДНК за участі клітинних факторів [116]. Після чого, Rep чи/або Rep' зв'язується з специфічною петлею у ділянці початку реплікації та утворює нік всередині консервативної послідовності 5'-AGTATTAC – 3' міжгенного регіону, тим самим ініціюючи реплікацію за типом кільця, що котиться (Rolling Circle Replication, RCR). Далі фермент здійснює розщеплення молекули ДНК, що супроводжується вивільненням 3'-ОН кінця, який є праймером для клітинної ДНК-полімерази [31]. Полімераза синтезує (+)-ланцюг ДНК за RCR-механізмом. Цей ланцюг транскрибується з утворенням вірусних мРНК, які, в свою чергу, транслюються та модифікуються з утворенням вірусних протеїнів. Таким чином, після 1 раунду реплікації, у нуклеотидил-трансферазній реакції утворюється кільцева одноланцюгова молекула ДНК і відбувається термінація реплікації. Новосинтезовані молекули ДНК або конвертуються в дволанцюгові молекули

ДНК і слугують матрицями для наступної транскрипції і реплікації, або ж упаковуються в капсид, формуючи нові віріони, що вивільнюються з клітини [15, 23].

1.1.3. Будова ЦВС2 та функції окремих компонентів вірусу.

Віріони ЦВС2 – маленькі за розміром, округлої форми, без зовнішньої оболонки [14]. Діаметр віріонів близько 17 нм. Капсид вірусу характеризується специфічною ікосаедричною симетрією (T=1) і складається з 60 молекул капсидного білку, організованих в 12 пентамерних кластерів (рис. 1.3) [136]. Така структура капсиду дозволяє вірусу бути дуже стійким в оточуючому середовищі та резистентним до багатьох дезінфектантів, включаючи й детергенти [14].

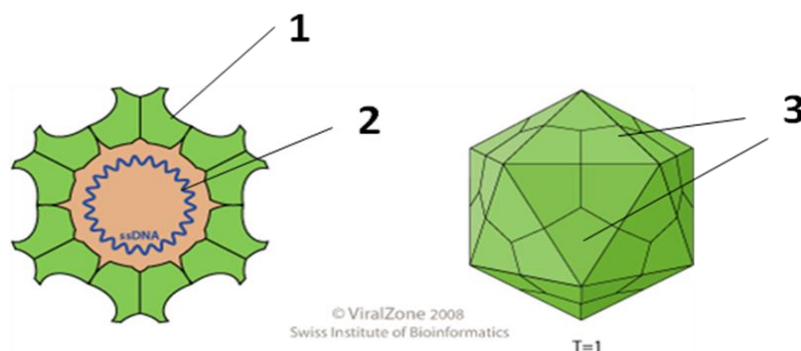


Рис. 1.3. Молекулярна організація віріону цирковірусу свиней 2 типу: 1 – кластери капсидного білку; 2 – геномна одноланцюгова молекула ДНК; 3 – структура капсиду вірусу з ікосаедричною симетрією [159].

Проста організація віріонів ЦВС2 доповнена полі функціональністю його основних структурних не структурних компонентів.

Сар-протеїн є єдиною антигенною детермінантою. Зрілий Сар-білок, молекулярною масою (ММ) 27.897 кДа, складається з 233 амінокислотних залишків. Сар-протеїн необхідний для ініціації адсорбції до гепаран-сульфат та хондроїтин-сульфат рецепторів клітин хазяїна [133]. Після прикріплення вірус проникає в клітину і просувається клатрин-, кавеол- та дінамін-незалежним, актин та Rho-GTP-ase-опосередкованим шляхом [132]. Таким

чином, Сар-протеїн ЦВС2 виконує функції взаємодії, приєднання та проникнення в клітини хазяїна [136].

Неструктурним компонентом вказаного вірусу є протеїн, що забезпечує його реплікацію – Rep-асоційований білок (АТФ-залежна хеліказа Rep, RepP) [29, 30, 31]. Цей білок має ММ 35.762 кДа та складається з 314 амінокислотних залишків. Наразі описано 8 ізоформ вказаного ензиму, що утворюються внаслідок використання альтернативних промоторів під час синтезу мРНК та внаслідок альтернативного сплайсингу [31]. Так, ізоформа Rep вважається канонічною формою згаданого ферменту, що утворюється внаслідок використання альтернативного промотора. Ізоформа Rep' утворена шляхом альтернативного сплайсингу ізоформи Rep (відсутні послідовності між амінокислотами у положенні 123 і 178 та 179 і 314). Ізоформи NS0, NS515 та NS672 значно відрізняються від Rep та утворені внаслідок використання альтернативних промоторів. Ізоформи Rep3A, Rep3B та Rep3C утворені шляхом альтернативного сплайсингу [29]. У структурі усіх ізоформ Rep-протеїну виділяють 3 функціональні домени: ДНК-зв'язуючий домен, метал-зв'язуючий домен та домен, необхідний для розщеплення фосфодиефірних зв'язків та ініціації реплікації [23]. Вказані ферменти належать до родини нановірусно-цирковірусних реплікаційно-асоційованих білків та є мультифункціональними ензимами, що характеризуються АТФ-азною, ендонуклеазною, хеліказною, гідролазною, нуклеазною, нуклеотиділтрансферазною і трансферазною активностями [23, 30].

У геномі ЦВС2 також закодовано третій, невеликий за розміром невіріонний білок, що складається з 104 амінокислотних залишків, молекулярною масою 11.879 кДа. Спектр функцій згаданого білку й досі чітко не з'ясовано. Наразі відомо лише, що цей протеїн залучений до ініціації апоптозу клітин хазяїна та не є необхідним для реплікації вірусу [111].

Геном ЦВС2 містить 1766–1768 п.н з щонайменше чотирма рамками зчитування (ORF). ORF1 кодує два білки, пов'язані з реплікацією, позначні Rep та Rep'; ORF2 – капсидний білок; ORF3 – білок, який, як вважають,

індукує апоптоз; ORF4 кодує ефекторний протеїн, що інгібує каспазну активність і регуляцію CD^{4+} і CD^{8+} [31, 111].

Таким чином, особливості організації і функціонування окремих компонентів ЦВС2 є дуже специфічними, проте досі недостатньо вивченими.

1.2. Характеристика та особливості цирковірус-асоційованих синдромів свиней.

Цирковірус-асоційовані синдроми свиней (ЦАСС) – це висококонтагіозні захворювання, що характеризуються гострим перебігом з дуже швидким настанням смерті, хронічним – з послідовним проявом основних симптомів або субклінічним та безсимптомним – серед окремих груп свиней [9, 12, 40, 101].

Вперше захворювання, асоційоване з цирковірусом свиней 2 типу було описано у 1997 році і названо синдромом мультисистемного виснаження поросят (**P**orcine **M**ultisystemic **W**asting **S**yndrome, PMWS) [36, 66]. Однак, наявність збудника в матеріалі тварин не обов'язково свідчить про розвиток клінічних проявів [180]. Тому, для встановлення діагнозу як цирковірус-асоційованого синдрому необхідним є підтвердження таких критеріїв: наявності специфічних клінічних ознак (втрата ваги, виснаження, респіраторні проблеми), мікроскопічних уражень, пов'язаних з ЦВС2 (виснаження лімфоїдної тканини, і\або заміна лімфоцитів сполучною тканиною) та антигену ЦВС2 за імуногістохімічного дослідження або ДНК вірусу за молекулярно-генетичного дослідження [180].

Проте, невдовзі стало відомо, що описаний синдром мультисистемного виснаження характеризує лише один із цирковірус-асоційованих синдромів й не включає усі патологічні зміни, що розвиваються за інфікування свиней ЦВС2 [169].

Тому наразі описано 10 цирковірус-асоційованих синдромів свиней, а саме: гостра системна цирковірус-асоційована інфекція (**P**ostweaning

Multisystemic **W**asting **S**ndrome, PMWS); синдром дерматито-нефропатії свиней (**P**orcine **D**ermatitis and **N**europathy **S**ndrome, PDNS); синдром цирковірус-асоційованого лімфоїдного виснаження (**P**CV2-**A**ssociated **L**ymphoid **D**epletion, PALD); синдром цирковірус-асоційованого комплексного респіраторного захворювання свиней (**P**orcine **R**espiratory **D**isease **C**omplex, PRDC); синдром цирковірус-асоційованих ентеритів свиней (**P**CV2-**A**ssociated **E**nteritis, PAE); цирковірус-асоційованих гепатитів свиней (**P**CV2-**A**ssociated **H**epatitis, PAH); цирковірус-асоційованих міокардитів свиней (**P**CV2-**A**ssociated **M**uocarditis, PAM); цирковірус-асоційованих ексудативних дерматитів свиней (**P**CV2-**A**ssociated **E**xudative **D**ermatitis, PAED); цирковірус-асоційованих уражень ЦНС свиней (**P**CV2- **A**ssociated **C**NS **D**isease, PACD); цирковірус-асоційованих репродуктивних проблеми та абортів свиней (**P**CV2-**A**ssociated **A**bortions and **R**eproductive **F**ailure, PAARF) [6, 68, 91, 104, 105, 131, 139].

Таким чином, визначення захворювання як цирковірус-асоційований синдром свиней може бути здійснене за субклінічного перебігу, коли в матеріалі виявлено збудника та характерні патологічні змін або за клінічного перебігу при таких проявах як мультисистемне захворювання з втратою ваги, високий рівень смертності, респіраторні дисфункції, дерматити, нефропатії, кишкові розлади та проблеми репродукції (абортів, муміфікація плодів, народження нежиттєздатного потомства) [180].

При чому в окремих випадках серед різних тварин однієї групи можуть бути зареєстровані різні прояви ЦВС2-асоційованих захворювань та встановлені різні синдроми.

1.2.1. Розповсюдження цирковірус-асоційованих синдромів свиней.

Незважаючи на те, що ЦВС2 було вперше виявлено наприкінці 1990-х років, а захворювання, що він викликає було описано ще пізніше, ретроспективні дослідження поширення цирковірус-асоційованих синдромів

свиней свідчать про їх появу ще з 1960-х років, зокрема в Великобританії [67]. Так, антитіла до білків ЦВС2 виявили у всіх архівних зразках сироваток крові свиней з господарств Великобританії (50 зразків 1969 року, 50 зразків 1975 року та 50 зразків 2000 року) [67].

А морфолого-патологічні прояви синдрому мультисистемного виснаження було виявлено шляхом аналізу архівних зразків зафіксованих формаліном тканин від свиней з господарств Англії, відібраних у період з 1970 до 1997 років. Крім того, нуклеїнові кислоти (НК) ЦВС2 були ідентифіковані у 32 % зразків 1970 років, 31 % зразків 1980-х років та 41 % зразків 1990-х років від свиней з господарств Іспанії [119, 158]. Порівняльне сиквенування НК, виявлених в зразках 1970-х років та НК від ізолятів вірусів, що наразі циркулюють серед популяцій свиней Іспанії, засвідчує високий рівень гомології досліджених штамів [158]. Це може бути доказом поширення вказаного збудника серед популяцій тварин протягом значного проміжку часу.

Наразі, синдроми, асоційовані з цирковірусом 2 типу, описано серед свиней усіх без виключення країн світу, де здійснюють промислове вирощування цих тварин. В той же час, найбільше вірус поширений в Німеччині, Пн. Ірландії, Данії, Швеції, Швейцарії, а також в Пн. Америці, Канаді, Китаї, Індії [75, 81, 109, 115, 117, 191].

Причому не виявлено кореляції між розвитком тих чи інших клінічних синдромів та географічними особливостями поширення вказаного збудника. За сучасними даними в країнах Азії розповсюджуються нові ізоляти ЦВС2, що демонструють різний рівень патогенності та генетичні особливості яких не корелюють з захворюваннями, які вони викликають [197].

1.2.2. Джерела та шляхи передачі цирковірусу свиней 2 типу.

Передача ЦВС2 відбувається за безпосереднього контакту між інфікованою та не інфікованою тваринами через ороназальні рідини, фекалії та сечу [20, 118]. Так, прямий контакт між поросятами, інфікованими у віці 42

днів та поросятами-гнотобіонтами призводить до інфікування усіх гнотобіонтних тварин [20]. Генетичний матеріал цирковірусу свиней 2 типу виявляється методом ПЛР у змивах з носа, фекаліях, крові та сироватці крові вже через 24 години після зараження. Водночас, в орофарінгеальних змивах ДНК ЦВС2 детектується лише через 7 днів після інфікування [178].

У мигдалинках, носових та трахеобронхіальних змивах, а також в сечі та фекаліях наявність значної кількості ДНК ЦВС2 підтверджено методом кількісної ПЛР [113]. При чому, значно більша кількість ДНК вірусу наявна в зразках патологічного матеріалу від тварин, що мали значні зовнішні прояви прояви ЦАСС ніж від тварин без клінічних симптомів. Таким чином, було підтверджено респіраторний та фекально-оральний шляхи передачі збудника як від клінічно хворих, так і здорових тварин [170, 205].

Вертикальний шлях передачі ЦВС2 було продемонстровано і підтверджено на багатьох тваринах в експериментальних [13, 16, 83] та польових дослідженнях [105, 139]. Зокрема, трансплацентарна передача вірусу призводить до народження персистентно інфікованих поросят або поросят з віремією [201]. Крім того, у низці досліджень було показано, що передача ЦВС2 може здійснюватись через заражену сперму. ДНК вірусу виявлено у зразках сперми деяких із піддослідних тварин вже через 5 днів після інфікування, а у всіх інших – на протязі 47 днів [96, 97, 107]. Також показано, що переважно ДНК ЦВС2 ідентифіковано у сім'яній рідині, а наявність вірусу в спермі жодним чином не впливає на морфологічні показники та кількість нормальних живих сперміїв [122].

1.3. Патогенез цирковірус-асоційованих синдромів свиней.

Механізми патогенезу ЦАСС та більшість клітин, в яких може реплікуватися вірус вивчено не достатньо. Проте, виснаження лімфоїдної тканини та лімфопенія у периферичній крові є стабільними ознаками розвитку цих клінічних синдромів [1].

У результаті імуногістохімічних досліджень та *in situ* гібридизації було показано наявність ЦВС2 та його НК у цитоплазмі макрофагів та дендритних клітин, що заміщають лімфоцити у виснажених фолікулах лімфоїдної тканини [1, 32, 180]. Проте, антиген ЦВС2 у лімфоцитах був наявний лише в деяких досліджених випадках [32]. Тому, ще й досі не з'ясовано чим саме викликане зменшення кількості лімфоцитів при ЦАСС: зменшенням їх утворення у кістковому мозку свиней, зниженням їх проліферації у вторинних лімфоїдних органах чи збільшенням їх втрати в кістковому мозку, периферичній крові та вторинних лімфоїдних тканинах через вірус-індукований некроз чи апоптоз [128, 130].

Незважаючи на наявність цирковірусу у макрофагах та дендритних клітинах, було встановлено, що клітини моноцитів не є первинними цільовими клітинами для його реплікації [64]. Реплікація вірусу в макрофагах не відбувається *in vitro*, проте він не деградує в цитоплазмі згаданих клітин. Також відсутні докази щодо реплікації ЦВС2 у дендритних клітинах, однак вірус дійсно зберігається в їх цитоплазмі без втрати вірулентності та не індукуючи їх загибель [190]. Однак, таким чином було з'ясовано, що дендритні клітини, враховуючи їх міграційну здатність, є основними клітинами, що переносять ЦВС2 до тканин різних систем органів свиней [190].

Роль цирковірусу свиней 2 типу як основного етіологічного агенту в патогенезі ЦАСС було підтверджено експериментально із застосуванням ДНК-клону даного вірусу [53]. Зокрема, було показано, що зараження згаданим інфекційним клоном свиней, вільних від специфічних патогенів, **Specific Pathogen Free, SPF**, призводило до розвитку ЦВС2-асоційованих лімфатичних уражень [50, 53, 54, 149]. Звідси зроблено висновки, що тропність вірусу до лімфоїдної тканини є основою патогенезу викликаних ним клінічних синдромів [53]. Водночас, *Grasland* та співавт. [65] продемонстрували розвиток системного ЦАСС при зараженні гнотобіонтних тварин клонованою геномною ДНК цирковірусу свиней 2 типу.

Таким чином, було з'ясовано, що ЦВС2 є основним етіологічним агентом цирковірус-асоційованих синдромів свиней. Проте у переважній більшості випадків, для розвитку всього спектру можливих клінічних проявів та уражень необхідним є вплив зовнішніх ко-факторів. Серед згаданих факторів виділяють: вірус-залежні, хазяїн-залежні, наявність ко-інфекцій та імуномодуляції тварин.

1.3.1. Вірус-залежні фактори розвитку ЦАСС.

Враховуючи той факт, що частина тварин, інфікованих цирковірусом, залишається клінічно здоровими, а у деяких розвиваються тяжкі захворювання, вченими багатьох країн було проведено дослідження з метою встановлення відмінностей між ізолятами вірусу, виділеними від хворих та здорових тварин. Однак, кореляції між здатністю викликати розвиток захворювання та генетичними особливостями окремих ізолятів встановлено не було. Натомість було підтверджено високий рівень гомології вказаних штамів, а саме 95,6 – 100 % [68]. Подальші генетичні дослідження та порівняльне секвенування ізолятів ЦВС2 не дозволили пояснити відмінності у клінічних проявах цирковірус-асоційованих синдромів, а навпаки підтвердили відсутність будь-яких молекулярних маркерів вірулентності згаданого вірусу [19, 34, 98].

Крім того, було показано, що ізолят ЦВС2, який упродовж 10 років перситував серед SPF-тварин в господарствах Швеції й не викликав розвитку жодних клінічних проявів цирковірус-асоційованих синдромів, виявляв здатність викликати розвиток системної інфекції в не гнотобіонтних тварин за експериментального інфікування [13]. Крім того, вірулентність вказаного штаму значно підвищувалась за одночасного інфікування парвовірусом [75, 93].

Також вірус-залежні фактори розвитку ЦАСС було описано в результаті досліджень химерних інфекційних клонів цирковірусів свиней 1 та 2 типів

[55]. Зокрема, такий химерний клон містив ген капсидного білку ЦВС2 у геномі непатогенного ЦВС1 і в експериментальних дослідженнях викликав утворення антитіл до капсидного білку цирковірусу 2 типу. Водночас було відмічено дуже незначні ураження тканин, низький рівень віремії та низький рівень вмісту антигену в лімфоїдній тканині піддослідних тварин. Таким чином, було зроблено висновки, що основним імуногенним білком ЦВС2 є капсидний білок і саме його доцільно використовувати для створення вакцин [55].

Незалежно від цього, Fenaux та співавт. [56] й Opriessnig та співавт. [149] встановили, що після 120 послідовних пасажів на культурі клітин РК-15, виникають 2 заміни амінокислот у послідовності капсидного білку ЦВС2. Водночас було показано, що такі заміни призводять до послаблення вірусу, що виявляється у значному зменшенні кількості копій геному ЦВС2 у сироватці крові тварин та відсутності уражень тканин, порівняно з такими, що виникали при інфікуванні піддослідних тварин не ослабленим вірусом. Це дозволяє припустити, що мінімальні зміни в геномі ізолятів ЦВС2 супроводжується зміною їх вірулентності [56].

1.3.2. Хазяїн-залежні фактори розвитку ЦАСС.

До інфекції ЦВС2 чутливі свині усіх порід. Так, клінічні прояви цирковірус-асоційованих синдромів спостерігали у тварин різних видів чистих та гібридних ліній. При чому, не було виявлено відмінностей у рівнях сероконверсії, захворюваності та смертності вказаних тварин [161]. Тим не менш, Lopez-Soria та співавт. [114] спостерігали підвищений рівень смертності при інфікуванні одним і тим же штамом ЦВС2 гібридної лінії «велика біла – дюрок» порівняно із тваринами інших ліній. У дослідженнях Opriessnig та співавт. [143] було зафіксовано вищий ступінь чутливості до ЦВС2 у свиней чистої лінії «ландрас», що проявлялось у розвитку більш тяжких цирковірус-

асоційованих клінічних ознак та морфолого-патологічних ураженнях тканин, порівняно з такими, що розвивались у досліджених тварин інших ліній.

Загалом, дослідження чутливості до ЦВС2 певних ліній свиней потребують продовження, оскільки наразі не можливо однозначно встановити роль хазяїн-залежних факторів у розвитку ЦАСС [128].

1.3.3. Вплив ко-інфекцій на розвиток окремих ЦАСС.

Впродовж останніх років було встановлено, що одночасна інфекція ЦВС2 та інших вірусів, таких як парвовірус свиней (ПВС) [2, 11, 78, 86, 89, 90] та вірус репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (ВРРС) [68 43, 175, 177], а також бактерій, наприклад, *Mycoplasma hyopneumoniae* [151], призводить до збільшення кількості ЦВС2 в тканинах організму та розвитку більш тяжких цирковірус-асоційованих синдромів.

Ефект посилення ко-інфекцією реплікації ЦВС2 та захворювання, яке він викликає, було показано на гнотобіонтних тваринах. Так, при зараженні таких свиней матеріалом лімфатичної тканини від тварин з гострими проявами ЦАСС, спостерігали розвиток аналогічних клінічних симптомів [50]. Проте, при дослідженні відібраних для інфікування матеріалів було виявлено не лише ЦВС2, але й парвовірус свиней. У подальшому було підтверджено наявність змішаної інфекції ЦВС2 та ПВС у свиней з цирковірус-асоційованою системною інфекцією та цирковірус-асоційованими репродуктивними проблемами [2, 11, 50].

У дослідженні Pallare та співавт. [154] класичний прояв цирковірус-асоційованої системної інфекції спостерігали у 484 випадках у США у 2002 році. Однак, у зразках від досліджених тварин окрім ЦВС2 було виявлено вірус РРС у 52 % випадків, *Mycoplasma hyopneumoniae* – в 36 %, збудників бактеріальної септицемії і/або пневмонії у 22 % випадків, вірус грипу свиней(ВГС) в 5,4 % і ЦВС2 як моноінфекцію лише у 2 % випадків. Таким

чином, було підтверджено ключову роль ко-інфекцій для розвитку вказаного клінічного синдрому.

Крім того, дуже цікавими, але водночас складними для вивчення і розуміння є патологічні процеси, викликані одночасним інфікуванням тварин ЦВС2 та ВРРСС [135]. По-перше, це пов'язано з тим, що для вказаних вірусів спільними є цільові клітини, які вони вражають і в яких реплікуються. В макрофагах, лімфоцитах та дендритних клітинах взаємодія збудників відбувається на молекулярному рівні, що призводить посилення вірулентності обох. По-друге, названі клітини-мішені належать до імунної системи, а тому їх враження збудниками з різними механізмами впливу призводить до хаотичного порушення розвитку нормальної імунної відповіді і на ці віруси і інших потенційних патогенів. Крім того, відомим є той факт, що при ко-інфекції ЦВС2 – ВРРСС порушується очікуване формування імунітету на вакцинації, що було підтверджено в багатьох дослідках і встановлено, що адекватна гуморальна імунна відповідь не розвивається на вакцини, що містять живі штами вірусу РРСС при активному інфікуванні цирковірусом свиней 2 типу [148, 175]. А проведення таких вакцинацій призводить до ускладнення клінічних проявів і неконтрольованого перебігу захворювання викликаного вказаними патогенами [148].

Окрім описаних вище вірусних та бактеріальних агентів, одночасно з ЦВС2 виявляли таких збудників захворювань свиней як: ентеровіруси свиней типів 1, 2, 3, респіраторний коронавірус свиней, вірус трансмісивного гастроентериту свиней, герпесвірус типу 1, ендемічний ретровірус та ін. [156].

Таким чином, було встановлено, що не можливо виокремити єдиного агенту ко-інфекції, наявність якого була б однозначно необхідною для розвитку ЦАСС. Натомість, найбільш вірогідною є гіпотеза, що пусковим механізмом у розвитку цирковірус-асоційованих синдромів свиней є ко-інфекція ЦВС2 з різними високо або низькопатогенними інфекційними агентами.

1.3.4. Вплив імуномодуляції тварин на розвиток ЦАСС.

В дослідженнях Allan та співавт. [10] та Krakowka та співавт. [100], а також інших авторів показано, що розвиток цирковірус-асоційованих синдромів свиней може бути спровокованим діями, спрямованими на імуномодуляцію тварин (імуностимуляцію [104] та імунодепресію [85]). Так, Krakowka та співавт. [100] встановили, що імуностимуляція може викликати прогресію інфекції ЦВС2 до клінічних проявів і уражень, характерних для цирковірус-асоційованих синдромів свиней. Автори відтворили симптоми ЦАСС у поросят-гнотобіонтів, інфікованих ЦВС2 шляхом введення гемоціаніну. Невдовзі було встановлено, що за певних умов вакцинування тварин може викликати розвиток ЦАСС і що важливим при цьому є тип використовуваних вакцин, тип ад'юванту та вік тварини [10, 73, 103, 153]. Також було з'ясовано, що речовини, які використовуються як ад'юванти в комерційних вакцинах, здатні провокувати посилення реплікації ЦВС2 й тяжкість проявів ЦАСС, однак існують відмінності між ад'ювантами різних типів. Таким чином, було встановлено, що у тварин при щепленні вакцинами з водно-олійними ад'ювантами спостерігається більш довший період віремії ЦВС2, збільшена кількість вірусу в сироватці крові та тканинах, а також більш сильне лімфоїдне виснаження, порівняно з тваринами, щепленими вакцинами з водними та алюмінію гідроксидними ад'ювантами [77, 145]. Аналогічні дані було отримано при дослідженні ад'ювантів, що містять мінеральні олії та показано їх здатність стимулювати реплікацію ЦВС2 та посилювати його патогенний вплив [145].

1.4. Клінічна картина цирковірус-асоційованих синдромів свиней.

Цирковірус-асоційовані синдроми свиней можуть проявлятися як на рівні окремих особин, так і на рівні всієї групи тварин. Для встановлення діагнозу цирковірус-асоційованого синдрому в окремих особин групи враховують характерні патолого-морфологічні зміни та концентрацію

антигену ЦВС2 [91, 142]. На рівні групи ЦАСС встановлюють у випадку зростання загального рівня смертності у більш ніж 50 %, порівняно з попередніми показниками, та при наявності ЦААС у більше 50 % представлених зразків від окремих особин групи [142]. За відсутності вказаних умов, випадки встановлених цирковірус-асоційованих синдромів свиней вважають спорадичними.

Цирковірус-асоційована інфекція може проявлятися субклінічно, тому наявність вірусу в організмі тварини не обов'язково призводить до розвитку морфологічних уражень. Експериментально було підтверджено, що інфекція ЦВС2 може розповсюджуватись лише на декілька лімфатичних вузлів, викликаючи некротичний лімфадентит, без виникнення будь-яких інших клінічних ознак [91, 147]. Також було встановлено, що субклінічний прояв ЦАСС може бути пов'язаний зі зменшенням ефективності вакцин [148, 150].

1.4.1. Цирковірус-асоційована системна інфекція свиней.

Основні клінічні ознаки цирковірус-асоційованої системної інфекції свиней (ЦАСІС) або синдрому мультисистемного виснаження (СМВ) включають: втрату ваги або зменшення показника набору ваги тварин підчас відгодівлі, блідість та іктеричність (жовтушність) шкірних покривів, загальне виснаження, відставання в рості та розвитку (рис.1.4).

Системність вказаного синдрому полягає у лімфогістіоцитарному та гранулематозному запаленні лімфатичної тканини, а також тканин легень, нирок, печінки, серця, кишечника [53, 91]. При гістологічному аналізі тканини лімфатичного вузла від свиней з ЦАСІС відмічають заміщення лімфатичної тканини сполучною тканиною, гранулематозний лімфадентит, наявність специфічних тілець-включень в лімфоцитах та макрофагах, а також об'єднання лімфоцитів в багатоядерні гігантські синцитії (рис.1.5).

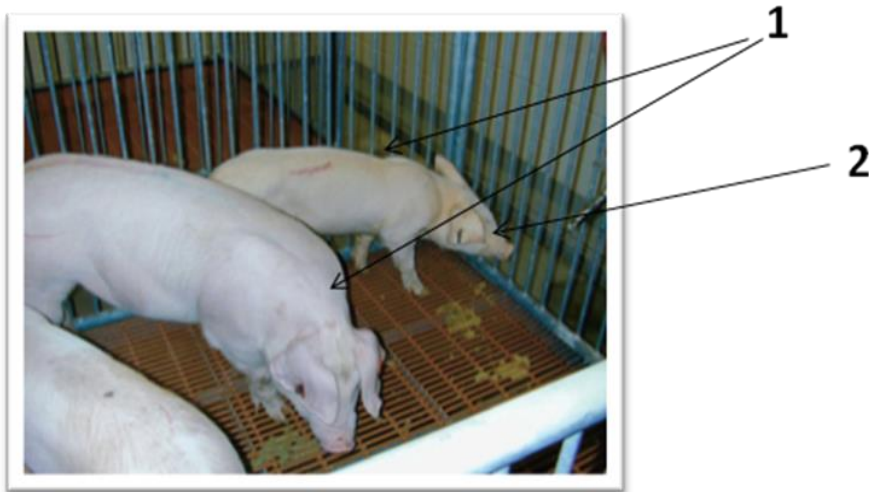


Рис. 1.4. Зовнішні клінічні ознаки ЦАСІС: 1 - відставання в рості, втрата ваги; 2 - жовтушність шкіри [150].

В інфікованих свиней також можуть спостерігатися ускладнене дихання, кашель, діарея з фекаліями темного кольору [150]. При патолого-анатомічному аналізі вражених свиней фіксують збільшення або некроз пахових, мезентеріальних, печінкових, підщелепних та інших лімфатичних вузлів. Також наявні ураження середнього або важкого ступеня легень з петехіальними крововиливами, набряк інтерстиції, жовтушність всіх внутрішніх органів, а особливо печінки. За хронічного перебігу в нирках можуть бути виявлені смуги чи плями білого кольору. Рідше відмічають виразки шлунку [151].

Для встановлення діагнозу системної ЦАІС необхідним є виявлення характерних морфологічних змін у більше ніж одній лімфатичній тканині (лімфатичних вузлах і мигдалинах, селезінці) і як мінімум в одному іншому органі (легенях, печінці, нирках, кишечнику). Якщо велика кількість антигену ЦВС2 або специфічні ураження виявлені лише в певній системі органів, захворювання класифікується як цирковірус-асоційоване респіраторне захворювання, цирковірус-асоційований ентерит, гепатит, міокардит, цирковірус-асоційовані репродуктивні проблеми, а не як цирковірус-асоційована системна інфекція [82, 95, 205].

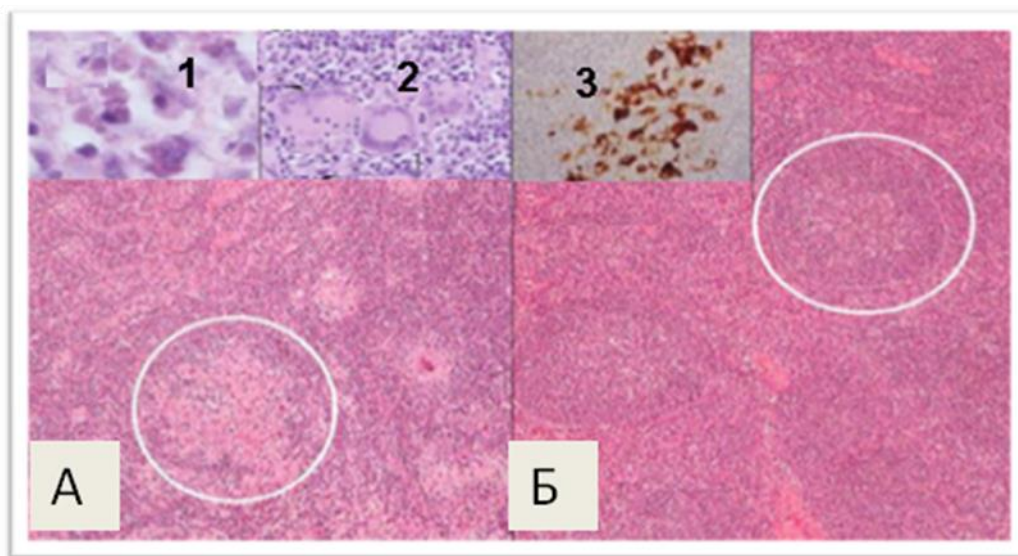


Рис. 1.5. Морфолого-патологічні зміни лімфатичної тканини при ЦАСІС (А) в порівнянні з структурою нормального лімфатичного вузла (Б): 1 – тільця включення в лімфоцитах, 2 – гігантські мультіядерні клітини, 3 – антиген ЦВС2 [154].

Про хронічний перебіг ЦАСІС свідчать яскраво виражені клінічні симптоми за низької концентрації антигену при імуногістохімічному дослідженні або низької концентрації ампліфікованих нуклеїнових кислот при дослідженні методом ПЛР [18, 22, 32, 35]. Крім того, може бути відмічено різний рівень розповсюдження інфікування за хронічного та гострого перебігу в різних групах тварин, а також одночасну наявність обох типів проявів у різних особин однієї групи.

1.4.2. Цирковірус-асоційований синдром дерматито-нефропатії свиней.

Рідкісним за частотою проявів, але тяжким за клінічним перебігом є синдром дерматито-нефропатії свиней (СДНС) [183]. Клінічно він проявляється як гостре ураження шкіри (випуклі фіолетові ділянки шкіри, що прогресують до багатофокальних фіолетових папул з чорним центром) (рис.1.6), що супроводжується некрозом вух та вульви, втратою ваги,

анорексією, лихоманкою і закінчується смертю тварин [6, 33].

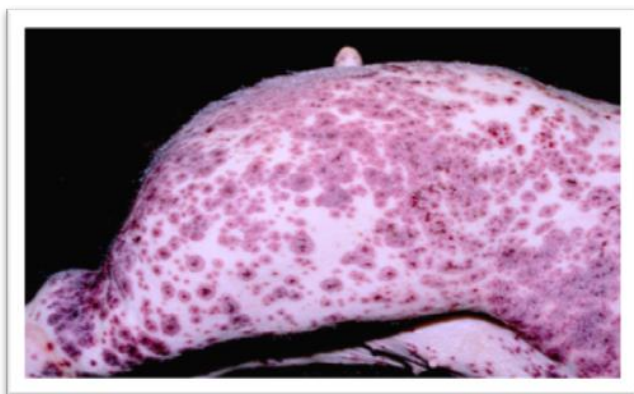


Рис. 1.6. Геморагічні папули на шкірі свиней з синдромом дерматито-нефропатії [6].

При патолого-анатомічному аналізі трупів загиблих тварин окрім наявності геморагічних папул відмічають значне за grubіння шкіри зі зміною кольору на жовто-коричневий та потужну гіперемію нирок з петехіальними крововиливами [182, 192].

До морфолого-патологічних змін при СДНС належать епідермальний некроз шкіри з системним мультилокусним васкулітом і некротичний фібринозний гломерулонефрит з випотіванням гіаліну у ниркові канальці (рис.1.7) [6, 192].

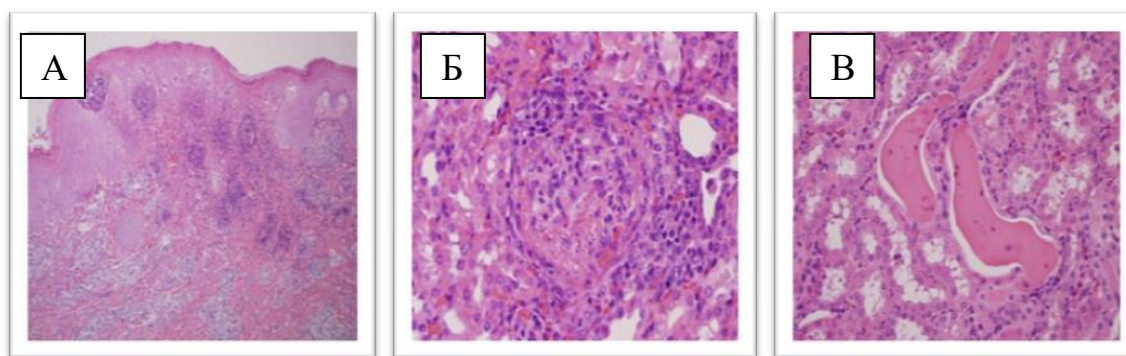


Рис. 1.7. Морфолого-патологічні зміни шкіри та нирок тварин з синдромом дерматито-нефропатії свиней: А – некроз епідермісу, мультифокальний васкуліт, Б – некротичний гломерулонефрит, В – гіалін в ниркових канальцях [150].

Інші клінічні ознаки СДНС можуть розвиватись при ускладненні цирковірусної інфекції іншими патогенами свиней, такими як *Pasteurella*

multocida, Streptococcus suis тип 1 и 2, Escherichia coli, Proteus sp., Haemophilus parasuis, Actinobacillus pleuropneumoniae, Bordetella bronchiseptica, Arcanobacterium pyogenes, Staphylococcus aureus та Salmonella sp. [106, 183].

1.4.3. Цирковірус-асоційовані респіраторні захворювання свиней.

Експериментальні дослідження та аналіз клінічних випадків вказують на те, що інфікування цирковірусом свиней 2 типу відіграє значну роль в розвитку комплексного респіраторного захворювання свиней [35, 45, 94]. Комплексне респіраторне захворювання свиней – це стан, що спостерігається у тварин, віком від 8 до 26 тижнів і пов'язаний з рядом патогенних мікроорганізмами, включаючи вірус репродуктивно-респіраторного синдрому свиней, вірус грипу свиней та Mycoplasma hyopneumoniae. Серед клінічних ознак можуть бути відставання у рості тварин, анорексія, лихоманка, кашель та віддишка. Необхідно зазначити, що цирковірус-асоційована системна інфекція та цирковірус-асоційована пневмонія є подібними за клінічними проявами [49]. Саме наявність клінічно тяжких уражень респіраторного тракту тварин з гранулематозною бронхоінтерстиціальною пневмонією, капілярним бронхітом і бронхіолярним фіброзом пов'язують з цирковірус-асоційованим комплексним респіраторним захворюваннями свиней [49, 94]. При гістологічному дослідженні виявляють лімфогістіоцитарну гранулематозну інтерстиціальну пневмонію, перибронхіальну фіброплазію з тяжким некротичним та виразковим капілярним бронхітом (рис.1.8) [118].

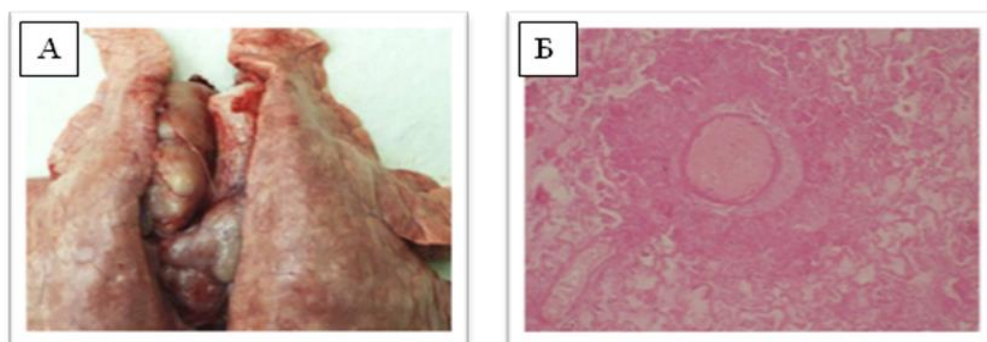


Рис. 1.8. Характерні патолого-анатомічні (А) та морфолого-патологічні (Б) ураження свиней з цирковірус-асоційованими пневмоніями [118].

Ураження, спричинені цирковірус-асоційованим виразковим бронхітом можуть нагадувати ураження, що викликає вірус грипу свиней та респіраторний коронавірус свиней [162]. Тому важливим є підтвердження наявності саме ЦВС2 в матеріалі методами ПЛР або ІГХ [22].

Характерні прояви інтерстиціальної бронхопневмонії було відтворено експериментально при зараженні тварин ЦВС2 та ВРРСС або ЦВС2 та *M.hyorpneumoniae* [20]. Тоді як помірні прояви уражень дихального тракту та багатофокальну інтерстиціальну пневмонію було експериментально відтворено серед тварин, що не отримували молозива і були заражені тільки ЦВС2 [16, 118]. В той же час, помірну інтерстиціальну пневмонію та лімфоплазматичний риніт спостерігали серед звичайних тварин, заражених ЦВС2 [162], а помірну грануломатозну інтерстиціальну бронхопневмонію було викликано серед здорових тварин, інфікованих ДНК-клоном цирковірусу свиней 2 типу [53, 186].

1.4.4. Цирковірус-асоційовані репродуктивні порушення та аборти свиней.

Перші випадки цирковірус-асоційованих порушень репродукції свиней були зареєстрованих в Канаді в 1999 році [201]. Клінічними проявами таких порушень є підвищений рівень абортів плодів, народження мертвих поросят [105, 139] та ембріональна муміфікація на різних етапах розвитку (рис. 1.6, В) [139]. При морфолого-патологічному аналізі основною ознакою ЦВС2-асоційованих уражень є негнійний некротичний або фіброзний міокардит у мертворождалих та ослаблених новонароджених поросят (рис. 1.6, А). Етіологію такого міокардиту було підтверджено високою концентрацією антигену ЦВС2 при імуногістохімічному аналізі (рис. 1.6, Б) [139].

Перші випадки, асоційованих з цирковірусом свиней 2 типу та ВРРСС, порушень репродукції у свиней були зареєстровані в Канаді у 1999 році [201]. При цьому описували підвищені рівні абортів плодів, народження

мертвих поросят та ембріональну муміфікацію на різних етапах розвитку [131, 201].

При морфолого-патологічному аналізі основною ознакою ЦВС2-асоційованих уражень, як вже зазначено, є негнійний некротичний або фіброзний міокардит у мертвнонароджених та ослаблених новонароджених поросят. Тоді як при патології, спричиненій дією ВРРСС спостерігають абортівання зовні нормально розвинених плодів протягом останнього триместру, а також гіперемію селезінки, тимусу та легень при їх розтині.

При одночасному інфікуванні парвовірусом свиней та цирковірусом спостерігали всі можливі прояви репродуктивних порушень, включаючи ембріональну муміфікацію та розсмоктування плодів [89, 131].

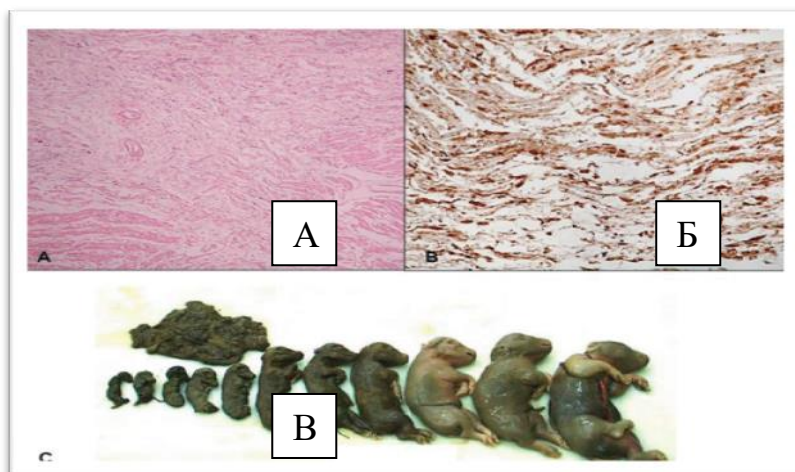


Рис. 1.9. Основні клінічні ознаки цирковірус-асоційованих репродуктивних порушень свиней: А – некротичний міокардит у мертвнонароджених поросят; В – імуногістохімічний аналіз наявності антигену ЦВС2 у серці мертвнонароджених поросят; С – муміфікація плодів на різних етапах ембріонального розвитку [95].

При експериментальному інфікуванні плодів цирковірусом свиней 2 типу було описано потужне накопичення вірусу в їх тканинах і встановлено, що серце є первинним органом для його реплікації [190, 201]. При внутрішньоматковому введенні вірусу на 57, 75 та 92 дні супоросності, було виявлено, що рівень реплікації вірусу у плодів інфікованих на 57 день значно вищий, ніж у інфікованих на 75 та 92 дні. А при дослідженні тканин цих плодів через 21 день після інфікування було встановлено, що ураження

(набряк, гіперемія печінки та інших органів) спостерігались лише серед плодів, інфікованих на 57 день [201]. Проте в дослідженнях Johnson та співавт. [83] було показано, що з 37 досліджених плодів від 3 тварин, що були інфіковані на 86, 92 та 93 дні поросності, 24 були без патології, 7 – муміфіковані, а 6 – народились мертвими. А це свідчить про те, що інфікування плодів ЦВС2 можливе і в останні дні супоросності і що це теж призводить до виникнення репродуктивних проблем [83]. В той же час, багатократними дослідженнями було підтверджено, що інфікування вірусом РРСС можливе на будь якому етапі поросності тварин і в усіх випадках це призводить до порушень розвитку плодів, проте з різного ступеню патологічними проявами [163].

1.5. Особливості перебігу інфікування ЦВС2 у популяціях диких кабанів.

Клінічні ознаки і ураження, знайдені у диких кабанів подібні до типових для ЦВС-асоційованих захворювань, включаючи синдром мульти-системного виснаження. У деяких випадках може спостерігатися ослаблення тварин, тварини депресивні, меншого розміру. На розтині спостерігають реакцію з боку лімфатичної системи: набряк та гіперемію всіх видимих лімфатичних вузлів, інколи гіперемія та патехіальні крововиливи, плями білого кольору на нирках. Виявлено доволі високу подібність вірусу виділеного від диких свиней з еталонним ізолятом ЦВС2 [24]. Вірусний антиген раніше не детектували у ендотеліальних клітинах, однак у диких кабанів його наявність у ендотелії шлунково-кишкового тракту залежить від стадії інфікування та шляху передачі інфекції. Ці клітини можуть бути цільовими для вірусної реплікації та подальшого поширення у організмі тварини внаслідок фекально-орального зараження [39].

Слід зазначити, що раніше не було відмічено випадків захворювання диких кабанів асоційованих з ЦВС2. На сьогодні трапляються випадки прояву інфекції у диких кабанів схрещених з свійськими популяціями свиней. Сучасні

основи менеджменту, такі як вакцинація, відлучення та змішання молодих свиней в перинатальний період, інтенсивні практики консервативного господарства сприяють підвищенню реплікації та зростанню патогенності польового вірусу ЦВС2, однак не є єдиними індукуючими факторами цього процесу [42, 122]. Відповідно до робіт вченого Sliz спалахи цирковірусної інфекції у диких кабанів на пряму корелюють з новою генетичною особливістю свиноматок, а саме, чутливістю до теплового стресу [179, 189]. Незалежно від особливостей менеджменту, на деяких господарствах у випадку наявності вихову свиноматок не виявлено впливу на підвищення рівня передачі цирковірусної інфекції новонародженим поросяткам [24]. Однак ситуація залежить від концентрації та патогенності польового вірусу.

Як і у свійських тварин, у диких кабанів наявні фактори, що можуть сприяти розвитку цирковірусної інфекції. До таких факторів слід віднести ураження вірусом репродуктивного і респіраторного синдрому свиней (ВРРС), мікоплазмозом, стрептококовою інфекцією (*S. suis*). Коінфекція вищевказаними патогенами у диких кабанів була показана неоднократно [26, 39]. Крім того ендемічна циркуляція парвовірусу свиней може призводити до ускладнення протікання інфікування ЦВС2 [179]. Фенотипові та генотипові відмінності між дикими кабанами та різними генетичними лініями свійських тварин не є лімітуючим фактором для передачі інфекції, однак дещо послаблюють її прояв. Насамперед, це пов'язано з більшою стійкістю диких тварин до несприятливих умов та збереженням природнього добору. Наразі походження ЦВС2 у диких кабанів залишається невизначеним. Існують дані, що вперше випадок ураження зафіксований на бекширських кабанах у ендемічних регіонах. Вірогідно ЦВС2 є давнім вірусом, що вже існував до одомашнення свиней [24, 42].

Таким чином, ЦВС2 може інфікувати різні роди і види родини свинячих, таких як бородавочники (*Phacochoerus*), кістьовухі свинки (*Potamochoerus spp.*) та інших, що виступають резервуаром інфекції для свійських свиней або навпаки [179, 189].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження та його характеристика

2.1.1. Загальна характеристика об'єкту дослідження.

Об'єктом дослідження були ізоляти цирковірусу свиней 2 типу, виділені зі зразків тканин та біологічних рідин свиней.

На першому етапі досліджень з 2007 по 2009 роки включно відбір матеріалу було проведено від тварин з підозрою на наявність ЦВС2-асоційованого захворювання з 22 областей України. Таким чином дослідили 108 зразків. Тоді як, на другому етапі досліджень, а саме з 2010 по 2012 роки включно дослідили ще 244 зразки вже з усіх областей України та АР Крим. Таким чином, для визначення поширення ЦВС2 в Україні, частоти його виявлення в різних тканинах від свиней різних вікових досліджено 352 зразки від свиней з промислових господарств всіх областей України. В цей період для виділення вірусу використовували матеріал тварин, віком від 35 до 120 днів, у яких було зареєстровано зовнішні ознаки цирковірус-асоційованих синдромів.

Для вивчення поширення ЦВС2 в період 2014-2015 років досліджували 69 зразків, відібраних від свиней у віці 45-145 днів з різних областей України.

Для розробки комплексного підходу діагностики ЦВС2-асоційованих захворювань дослідили 1156 зразків абортів матеріалу від свиней останнього триместру супоросності [168], а для гістологічного аналізу використали 54 набори органів тварин.

Як об'єкт порівняння використовували референс-штам ЦВС2, люб'язно наданий лабораторією молекулярних досліджень фармацевтичної компанії «Laboratorios Nipra» (Іспанія) код доступу якого в базі даних GenBank – AF201310.

2.1.2. Аналіз морфолого-патологічного стану уражених свиней та відбір зразків для досліджень.

Аналіз морфолого-патологічного стану відібраних для дослідження тварин проводили у лабораторії патолого-анатомії ТОВ «Центр Ветеринарної діагностики» з метою виявлення і опису зовнішніх ознак захворювання. Для цього проводили розтин трупів, аналіз, фіксування та фотографування патологічних змін органів та систем органів. За виявлення таких проявів, як: виснаження, жовтушність, ураження шкіри, порушення респіраторного, шлунково-кишкового тракту, збільшення будь-яких лімфатичних вузлів, проводили відбір патологічного матеріалу для подальших молекулярно-діагностичних, імуногістохімічних і гістологічних досліджень.

Для гістологічного дослідження відбирали зразки тканин без ознак автолізу й ті, що не підлягали замороженню [213]. Зокрема, відбирали зразки нирок, печінки, селезінки, легень, серця, мозку, трахеї, кишечника, лімфатичних вузлів. При відборі матеріалу для дослідження враховували мікроскопічну будову органів і тканин. Нирки розрізали перпендикулярно до поверхні так, щоб у досліджуваному зразку була наявна кіркова та мозкова речовина. Паренхіматозні органи (селезінку, печінку) відбирали з капсулою, стінки порожнистих органів отримували поперечними зрізами. Зразки з видимими патологічними змінами (пухлини, крововиливи, некроз, анемічність тканини) відбирали на межі з нормальними ділянками, щоб були захоплені здорові і змінені частини тканин. Розмір відібраних зразків становив 2-4 см. Відібрані зразки одразу переносили у контейнери з 10 % розчином формаліну.

Для молекулярно-діагностичних досліджень відбирали зразки легень, тонкого кишечника, пахових, мезентеріальних, печінкових та інших лімфатичних вузлів, які поміщали у пластикові чашки Петрі та заморожували за температури -20°C .

Для молекулярно-діагностичних досліджень абортивного матеріалу проводили відбір зразків легень, міокарду та тимусу. Зразки відібраного матеріалу нумерували та систематизували відповідно до місця забору.

2.2. Реактиви, матеріали та обладнання, що були використані в роботі.

Реактиви та матеріали:

- 0,5 М KMnO_4 (Sigma-Aldrich, США), 2,5 М HCl (Sigma, США), 2,5 М NaOH (Sigma, США);
- тест-система для виділення РНК та ДНК «Рибо-золь-А» (ІнтерЛабСервіс, Росія), до складу якої входять рибозоль (5,25 М гуанідинтіоціонат, 50 мМ TrisHCl , 20 мМ ЕДТА, 1 % тритон X-100, рН 6,4), розчин В (суміш фенолу та 8-оксихіноліну, 0,1 М β -меркаптоетанол, 1 М Tris-HCl , 0,1 М ЕДТА, рН 8,0), розчин С (суміш ізоамілового спирту та хлороформу у співвідношенні V/V-1:24), розчин для відмивання 3 (суміш ізопропілового спирту та ацетону у співвідношенні V/V-1:1), елюент (DEPC- H_2O);
- тест-система для виділення ДНК з тканин із застосуванням фільтраційних колонок «Tissue DNA» (Machery Nagel, Німеччина):
- набір реактивів та матеріалів для проведення ПЛР: суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (1,76 мМ dNTP-mix (Thermo Scientific, США), Taq –полімераза рекомбінантна (5 од ак/мкл) або DreamTaq-Green ДНК-полімераза (20 од ак/мкл) (Thermo Scientific, США), 2,5 мМ MgCl (Sigma, США).
- агароза для електрофорезу (Sigma, США) або агароза TopVision Agarose (Thermo Scientific, США), етідіум бромід (Sigma, США), барвник (0,25 % бромфеноловий синій, 0,25 % ксилолціанол, 30 % розчин гліцерину) (Sigma, США), маркер молекулярних мас «GeneRuler 100 bp» (Thermo Scientific, США) та «GeneRuler 50 bp Ladder» (Thermo Scientific, США);
- набір для виділення ДНК з агарозного гелю «mi-Gel Extraction Kit» (Metabion, Німеччина), до якого входять буфер для екстракції, буфер для відмивання, пластикові колонки із сорбентом;

- Формалін 37 % («АЧ», Росія), спирт 96 % «Сановет» (ВАТ НВП «Укрзооветпромпостач», Україна), О-ксилол (НВП «Альфарус», Україна), парафін - Paraffin type 6 (Richard-Allan Scientific, Німеччина);
- барвники еозин-Ү та гематоксилін (Richard-Allan Scientific, Німеччина), середовище для фіксування гістологічних зрізів – Mounting Medium Glue, що містить Toluene GAS#108-88-3 Acryloid resin (Richard-Allan Scientific, Німеччина), імерсійна рідина (Richard-Allan Scientific, Німеччина).

Буферні розчини:

- ПЛР-буфер для Taq полімерази рекомбінантної (Thermo Scientific, США): 75 мМ Tris-KCl, 20 мМ амоній сірчанокислий $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% (v/v) Твін-20, 1.5-4.0 мМ MgCl_2 , рН 8.8 при 25°C;
- ПЛР-буфер для DreamTaqGreen полімерази (Thermo Scientific, США): 20 мМ Tris-HCl, 1 мМ DTT, 0.1 мМ EDTA, 100 мМ KCl, 50% (v/v), glycerol, рН 8.0;
- 10X DreamTaq Green буфер: мМ Tris-KCl, амоній сірчанокислий $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та 20 мМ MgCl_2 ;
- трис-боратний буфер (ТБЕ, Sigma, США): 0,9 М трис основний, 0,9 М борна кислота, 10 мМ EDTA, рН 8,0.

Обладнання:

- ламінарний бокс 2 класу біологічної безпеки (Telstar, Іспанія); термостат для мікропробірок 25-100°C (Биоком, Росія); охолоджувач для мікропробірок -5 - 10 °C (Биоком, Росія); мікроцентрифуга «MiniSpin» (Eppendorf, Німеччина); центрифуга-вортекс (Биоком, Росія); термоциклер (ампліфікатор для ПЛР) (Eppendorf, Німеччина); термоциклер (ампліфікатор для ПЛР в реальному часі) 7500 FAST Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, США) камера для горизонтального електрофорезу S-100 (Helicon) та камера HU13 Midi, ультрафіолетовий транслюмінатор для перегляду гелів (Биоком, Росія);
- станція попередньої обробки тканин STP-120 (Microm, Німеччина), мікротом HM 340-E (Microm, Німеччина), станція транспортування зрізів (Microm, Німеччина), станція заливки EC-350 1 (Microm, Німеччина), криоблок EC350 2 (Microm, Німеччина), мікроскоп світловий люмінесцентний Axioskop

2 plus (Carl Zeiss, Німеччина), мікрохвильова піч (Samsung), цифровий фотоапарат (Cannon).

2.3. Молекулярно-біологічні методи дослідження.

2.3.1. Конструювання і підбір праймерів для проведення ПЛР та ПЛР в реальному часі.

Для виявлення генетичного матеріалу ЦВС2 методом ПЛР, проводили аналіз і оптимізацію існуючих олігонуклеотидних праймерів до консервативної ділянки Cap-гену (BP3 2), довжиною 502 п.н., рекомендованих в 2005 році Міжнародним епізоотичним бюро, (Office International des Epizooties - World Health Organization in Animal Health, OIE). А також, конструювання та оптимізацію нових унікальних олігонуклеотидних праймерів до послідовностей генів Cap- та Rep'-протеїнів ЦВС2 (BP3 1 та 2).

Крім того, проводили конструювання, розрахунок та біоінформатичний аналіз власних унікальних олігонуклеотидів та зондів для проведення ПЛР в реальному часі, а також порівняння такого підходу з існуючим та поширеним в світі, розробленим Blanchard та співав. в 2004 році [18].

Описаний аналіз виконували із використанням пакету програм Vector NTI Advanced 11 (Invitrogen, США) та програми для конфігурування олігонуклеотидів Primer3 v 4.0.0. доступної вільно за посиланням <http://bioinfo.ut.ee/primer3>. Розрахунок температур плавлення праймерів та зондів, враховуючи можливі концентрації хлориду магнію $MgCl^2$ в реакційній суміші, проводили із застосуванням відповідної програми, доступної вільно за посиланням

http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature/demo.php?primer.

Вирівнювання послідовностей, а також перевірку специфічності розроблених праймерів та зондів виконували із застосуванням всесвітньо валідованого сервісу, доступного вільно за посиланням

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS

[=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome.](#)

За допомогою вказаних комп'ютерних програм проводили аналіз та вирівнювання доступних у GenBank нуклеотидних послідовностей геномів ізолятів ЦВС2. Праймери підбирали до послідовностей вказаних генів, аналізуючи їх термодинамічні характеристики, здатність до утворення вторинних структур, а також положення та рівень гомології до матриці, для проведення полімеразної ланцюгової реакції та ПЛР в реальному часі [165].

2.3.2. Виділення РНК та ДНК з патологічного матеріалу свиней.

Для виділення РНК та ДНК із відібраних зразків використовували тест-систему «Рибо-золь-А». У пробірки з 450 мкл рибозолу вносили 100 мкл зразка і ретельно перемішували за 3500 g та прогрівали за температури 60 °C протягом 5 хвилин. Краплини осаджували центрифугуванням при 5000 g протягом 5 с. Після цього додавали по 110 мкл розчину В і перемішували за 3000 g протягом 1 хв, поки розчин не став білим й непрозорим, як молоко. На наступному етапі проводили охолодження отриманих розчинів протягом 5 хв за температури 2 - 6°C та центрифугували протягом 10 хв при 15000 g, для розділення рідини на дві фази: водну верхню та органічну нижню. Обережно переносили 450 мкл верхньої фази, не зачіпаючи проміжну фазу (інтерфазу), у пробірки з 75 мкл розчину С, перемішували за 3000 g та охолоджували 20 хв за температури -20 °C. Після цього пробірки центрифугували упродовж 10 хв за 16000 g. Обережно відбирали надосадову рідину, візуально відмічаючи положення осаду РНК та ДНК, із використанням вакуумного насоса з колбою-пасткою для рідини. Додавали розчин для відмивки 3 до осаду в об'ємі 100 мкл, перемішували та центрифугували 10 хв за 16000 g. Надосадову рідину відбирали таким чином, щоб не зачепити осад. Осад, що містив очищені РНК та ДНК, висушували за $t = + 55$ °C протягом 4-8 хв до повного випаровування рідини. Після цього додавали по 50 мкл елюента та ретельно перемішували за

3000 g протягом 2-3 хв. В результаті отримували зразки РНК та ДНК для проведення ПЛР.

2.3.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції.

Для проведення ПЛР готували суміш з двох фаз: нижньої та верхньої, розділених легкоплавким воском. До складу нижньої фази входили 1 мкл дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 мкл прямого та зворотнього праймерів та 3,5 мкл H₂O з розрахунку на один зразок. На суміш нижньої фази нашаровували 15 мкл легкоплавкого воску, попередньо розплавленого за $t = +94$ °C. До складу верхньої фази входили 5 мкл ПЛР-буферу, 1,5-2,5 мкл (залежно від умов проведення) хлориду магнію, 9 мкл H₂O та 0,5 мкл Taq-полімерази з розрахунку на один зразок. Готову суміш верхньої фази вносили на поверхню застиглому воску. До реакційної суміші вносили 3 мкл зразків ДНК. У випадку проведення ПЛР гніздового типу додатково проводили 2-й етап реакції, для якого готували аналогічну вищеописаній реакційну суміш, у якості зразків ДНК використовували амплікони, отримані на першому етапі реакції [178]. Крім того, замінювали праймери на необхідні. Програмували ампліфікатор згідно температурного режиму, наведеного у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Температурний режим для ампліфікації специфічних ділянок ДНК ЦВС2 із застосуванням діагностичних пар праймерів

Етапи	Кількість циклів	Температура, °C	Тривалість етапу, хв
Гарячий старт	1	94	4
Денатурація	35	94	0,5
Гібридизація		58, 60, 62 (залежно від реакції)	0,5
Елонгація		72	0,5

Кінцева елонгація	1	72	7
Збереження	-	10	Доки не досягне зазначеної температури

2.3.4. Проведення полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу.

ПЛР ампліфікацію у режимі реального часу проводили на приладі 7500 FAST Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, США). ПЛР суміш (20 мкл) містила 10 мкл VetMax - Plus qPCR Master Mix, 7 мкл DNase/RNase-free water; по 1 мкл прямого та зворотнього праймерів PCVLD_F та PCVLD_R, а також 1 мкл зонду PCVLD_probe1 або PCVLD_probe2. До реакційної суміші додавали по 5 мкл ДНК, отриманої на етапі виділення. Термоциклер програмували задаючи основні параметри реакції: початкова денатурація 95°C впродовж 7 хв, а далі температурний режим 15 с 95 °C/ 1 хв 60 °C (детекція) - 45 циклів. Детекція зонду ЦВС2 відбувалась по FAM, а ендogenous контролю бета-actin по VIC. Загальний ПЛР об'єм – 25 мкл.

2.3.5. Проведення електрофоретичного аналізу продуктів реакцій в агарозному гелі.

Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації та рестрикції проводили в 1,7 % агарозному гелі. До розчину агарози додавали 5 мкл розчину етідіум броміду. Відбирали 10 мкл ампліфікату, ресуспендували його з барвником і вносили на дно лунок агарозного гелю під буфер. Електрофорез проводили у градієнті напруги 10 В/см.

Після закінчення електрофорезу гелі розглядали і фотографували на транслюмінаторі під ультрафіолетовим світлом, довжиною хвилі 320 нм.

Після використання буфер і гелі, що містили розчин етідіум броміду дезактивували, додаючи 500 cm^3 $0,5 \text{ M KMnO}_4$ та 500 cm^3 $2,5 \text{ M HCl}$.

2.3.6. Очищення продуктів ПЛР з агарозного гелю

Для сиквенування продукт другого етапу ампліфікації очищували з агарозного гелю за допомогою набору реагентів «mi-Gel Extraction Kit». Для цього обраний зразок вирізали з гелю та поміщали у мікропробірку об'ємом 1,5 мл. В цю пробірку вносили 300 мкл буферу для екстракції та інкубували 5-10 хвилин за $65 \text{ }^\circ\text{C}$ до повного розчинення гелю. Далі вміст пробірок переносили у колонки із сорбентом та центрифугували протягом 1 хв за 13 тис. об/хв. Після цього відмивали колонки додаючи на сорбент 500 мкл буферу для відмивання та центрифугуючи протягом 1 хв за 13 тис. об/хв. Цю процедуру повторювали двічі. Потім проводили елюцію. Для цього в колонки додавали 30 мкл ДНК-буферу та центрифугували 1 хв при 13 тис. об/хв. Очищений зразок ДНК відбирали у пробірки та зберігали при $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.3.7. Аналіз і інтерпретація результатів отриманих при проведенні ПЛР в реальному часі.

Інтерпретували результати за допомогою програми Analysys (графіків) термоциклера. Результати враховували на основі наявності (або відсутності) перетину кривої флюоресценції з встановленою на відповідному рівні порогової лінії, що визначає наявність (або відсутність) значення порогового циклу ct для даної проби ДНК. У зразку було виявлено ДНК ЦВС, якщо для даної проби значення ct на каналі FAM/Green менше 45. У зразку не виявлено ДНК ЦВС2, якщо для даної проби по каналу FAM/Green немає кривої флюоресценції, а по каналу VIC/Yellow виявлена крива флюоресценції і значення ct не перевищує 45 (тобто внутрішній контроль виділення виявлено для даної проби). Результат аналізу вважали сумнівним, якщо для даної проби по каналу FAM/Green значення ct більше 45, а по каналу VIC/Yellow виявлена

крива флюоресценції і значення ct не перевищує 45. В такому випадку повторно проводили реакцію ампліфікації. Результат аналізу вважали не достовірним, якщо для даної проби по каналу FAM/Green не виявлено криву флюоресценції, а по каналу VIC/Yellow значення ct невизначене або перевищує 45. В такому випадку повторно проводили реакцію, починаючи з етапу виділення НК та ампліфікації. Після закінчення реакції результати фіксували за допомогою збереження файлу на диску.

2.3.8. Філогенетичний аналіз та побудова філогенетичних дерев.

Для проведення філогенетичного аналізу (встановлення філогенетичної спорідненості) ЦВС2, виділених в Україні, ми застосували підходи та методи молекулярної філогенії. Щоб визначити філогенетичні взаємовідносини між українськими ізолятами та референс-штамами, нами були побудовані філогенетичні дерева, що являють собою проекцію у двомірному просторі складних багатомірних співвідношень між послідовностями біологічних молекул [51, 88, 164].

Пошук та вибірку необхідних послідовностей проводили за допомогою BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Вирівнювання послідовностей проводили із застосуванням алгоритму ClustalW [51, 166].

Філогенетичні дерева будували у програмі MEGA 6.0 [181]. Еволюційні зміни досліджували методом аналізу дискретних ознак — Maximum Likelihood (ML) [164, 181]. Для вибору оптимальної моделі з 12 доступних користувались відповідною опцією в програмі MEGA 6.0.

2.4. Гістологічні методи дослідження

2.4.1. Приготування гістологічних зразків.

Фіксування досліджуваних зразків тканин органів проводили зануренням у 80 мл 10 % розчину формаліну та витриманням у

мікрохвильовій пічі впродовж 30 секунд за потужності 400 Вт з водним навантаженням 400 мл. Після фіксації проводили первинне зневоднення тканин шляхом занурення зразків у 80 мл 96 % етанолу та експозицією у мікрохвильовій печі протягом 10 хв за потужності 100 Вт [213]. Після цього зразки тканин нарізали (ширина зрізу становила не більше 1,5 см) з урахуванням особливостей будови кожного органу та наявності видимих патологічних змін й поміщали у пластикові касети Turboflowe. Після фіксування проводили попередню обробку досліджуваних тканин із використанням автоматизованої станції Microm STP-120. Тривалість попередньої обробки тканин та реактиви, які використовували для її здійснення, наведено у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Характеристика і тривалість етапів попередньої обробки зразків у автоматизованій станції STP-120.

Етап	Характеристика етапу	Тривалість етапу
1	Занурення патматеріалу у 50 % етанол	2 год
2	Занурення патматеріалу у 70 % етанол	2 год
3	Занурення патматеріалу у 96 % етанол	3 год
4	Занурення патматеріалу у 96 % етанол	3 год
5	Занурення патматеріалу у ксилол	3 год
6	Занурення патматеріалу у рідкий парафін	2 год
7	Занурення патматеріалу у рідкий парафін	2 год

Після закінчення процесу попередньої обробки зразки переносили у металеві форми, заливали рідким парафіном і накривали пластиковою касетою з розрахунку 6 мл парафіну на одну касету. Металеві форми зі шматочками органів переносили на кріоконсоль на 30 хв. Для заливки та охолодження зразків використовували станцію для заливки «Microm EC 350».

Приготування тонких зрізів із патологічного матеріалу залитого у парафін здійснювали із використанням мікротому «Microm HM 340-E» та ножів для гістологічних досліджень «Sec-130». Прирізку виконували

встановлюючи «крок» мікромому 50 мкм, а для виготовлення зразків тканин органів – 5 мкм. Зрізи тканин органів досліджуваних зразків переносили з водяної бані (температура води 39 °С) безпосередньо на скельця.

Виготовлені гістологічні зрізи витримували 1 - 2 години за температури +37 °С для підсушування. Фарбування гістологічних зрізів здійснювали розчинами еозину та гематоксиліну. Для цього попередньо зрізи послідовно занурювали на 5 хвилин у розчини ксилолу 99,85 %, етанолу 96 %, етанолу 70 % та дистильовану воду, а потім поміщали на 1 хв у розчин еозину. Після витримання у розчині еозину промивали протягом 3 хв у воді, після чого занурювали зріз у розчин гематоксиліну на 30 секунд та знову виконували відмивання зразків водою протягом 3 хв. По закінченню процесу фарбування зрізи витримували по 3 хв у етанолі різних концентрацій (70 % й 96 %) та у ксилолі 99,85 % [209].

2.4.2. Мікроскопіювання і аналіз.

Мікроскопіювання зразків для дослідження проводили за збільшення у 100 та 200 разів із застосуванням відповідних об'єктивів та збільшення в 1000 разів із використанням імерсійного об'єктиву мікроскопу Axioskop 2 plus (Carl Zeiss). Фотографування для подальшого аналізу зразків виконували за допомогою фотоапарату за чотирьохкратного оптичного збільшення, що дозволяло отримувати мікрофотографії з результуючим збільшенням від 400 до 4000 разів. Мікрофотографії, отримані таким чином маркували, зберігали в архіві та проводили аналіз і опис виявлених гістологічних змін.

2.5. Імуногістохімічний метод дослідження зразків тканин.

2.5.1. Підготовка тканин органів.

Секційний матеріал легень, лімфатичного вузла товщиною 1 см заморожували та прикріплювали до кріокасети за допомогою розчину для заморожування (Richard-Allan-Scientific) безпосередньо в кріомікромомі за

температури $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Із замороженого блоку виготовляли криозрізи товщиною 5-6 мкм. Зрізи фіксували протягом 5 хвилин 80% спиртовим розчином ацетону, попередньо охолодженим до $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, а потім відмивали в фосфатному буферному розчині тричі по 2 хвилини.

Для наступного порівняння ефективності використання розчинів для вивільнення ендогенної пероксидази використовували розчин 0,3 % пероксиду водню в 0,1% розчині азиду натрію.

Реакцію вивільнення пероксидази виконували в темному місці, протягом 10 хв, а потім відмивали в фосфатному буфері тричі. Для уникнення неспецифічного зв'язування моноклональних антитіл зразки інкубували в 10% розчині альбуміну сироватки бика [214].

2.5.2. Проведення імуногістохімічної реакції.

Для непрямого пофарбування зразків використовували наступні антитіла: первинні антитіла специфічні до капсидного білку ЦВС-2 PCV VP2INQ ORF2 (Ingenasa, Іспанія) у розведенні 1:50 (розведення проводили в 0,1% Tween фосфатному буфері). Зразки з первинними моноклональними антитілами інкубували в термостаті при температурі $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 2 годин. Надалі зразки тричі промивали в розчині 0,05% Tween у фосфатному буфері.

В якості вторинних моноклональних антитіл використовували анти-мишині антитіла (Sigma, USA) з пероксидажною міткою у розведенні 1:100 (розведення проводили в 0,1% Tween у фосфатному буфері). Зразки з вторинними моноклональними антитілами інкубували в термостаті при температурі $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 1 години. Після завершення інкубації зразки тричі промивали в розчині 0,05% Tween у фосфатному буфері.

Для візуалізації результату використовували пероксидазний кон'югат. Для проведення реакції спершу готували матричний розчин №1: розчиняли 3-аміно-9-етилкарбазол в n,n-диметил-формаїді у співвідношенні 1:6,66. Розчин №1 розводили в 0,05 М ацетатному буфері у співвідношенні 1:16,6 -

розчин 2, після чого до розчину №2 додавали пероксид водню у співвідношенні 1:0,0017.

Зразки інкубували з кон'югатом протягом 45 хвилин за кімнатної температури. Після завершення інкубації зразки тричі промивали в розчині 0,05% Tween у фосфатному буфері [214].

2.6. Статистична обробка результатів

Математичну обробку експериментальних даних (середнє значення, стандартне відхилення) здійснювали за допомогою MS Excel пакета OfficeXP. Для статистичного аналізу отриманих результатів користувались методами варіаційної статистики. Достовірність відмінностей між показниками визначали по t-критерію Стьюдента при $p=0,05$ [181].

РОЗДІЛ 3

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЦИРКОВІРУСУ СВИНЕЙ 2 ТИПУ В УКРАЇНІ

3.1. Характеристика патолого-анатомічного стану тварин, відібраних для досліджень в період 2007-2012 рр.

Впродовж виконання дослідження з метою виявлення цирковірусу 2 типу в зразках від хворих тварин, було проаналізовано і описано морфолого-патологічний та клінічний стан 352 свиней з 109 господарств 24 областей України та Автономної Республіки Крим. Матеріал для дослідження було відібрано від свиней, що загинули або були вимушено забиті. Крім того, дані тварини мали зовнішні та внутрішні патологічні зміни, характерні для цирковірус-асоційованих захворювань.

Отож, у відібраних для досліджень тварин нами було виявлено такі ознаки: анемічність та жовтушність шкірних покривів (42 %), не відповідність ваги та росту віку тварини (70 %), характерне викривлення хребта (12 %), геморагічний дерматит (2 %), некроз вух (2 %) (рис. 3.1).

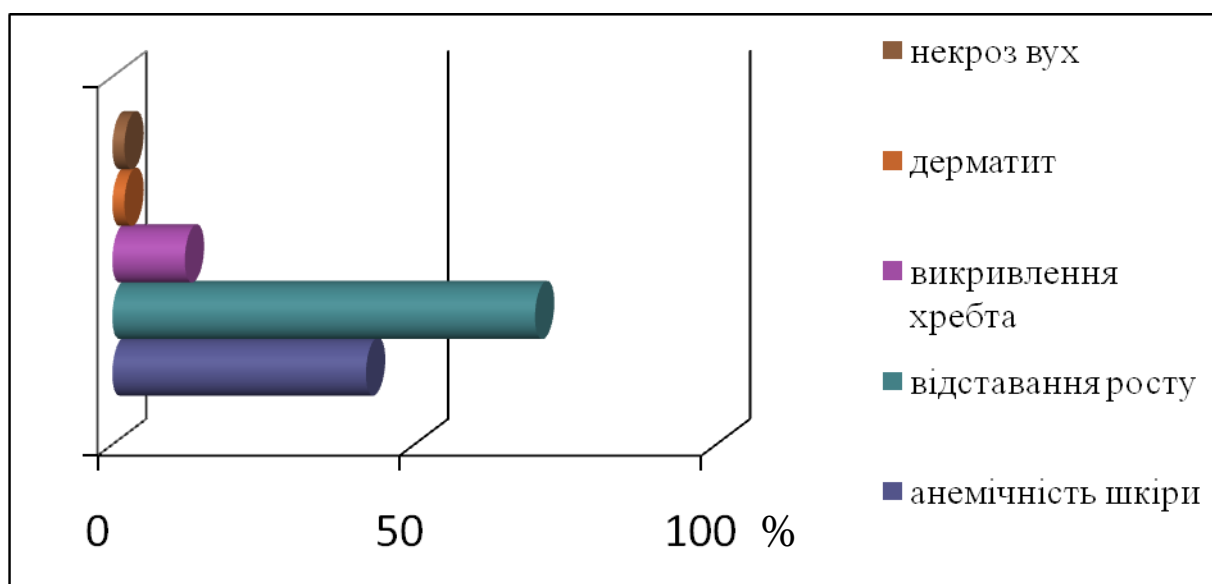


Рис. 3.1. Кількісне співвідношення зовнішніх клінічних ознак, виявлених у досліджених тварин.

При розтині згаданих тварин було зафіксовано низку патологічних змін, а саме інтерстиціальну пневмонію (70 %), катаральний не геморагічний

ентерит (41 %), перикардит (3 %), крововиливи у нирках (8 %), збільшення селезінки (11 %), збільшення пахових (78 %), мезентеріальних (52 %), перибронхіальних (24 %) та печінкових (22 %) лімфатичних вузлів (ЛВ), жовтушність внутрішніх органів (6%), виразка шлунку (2%) (рис. 3.2).

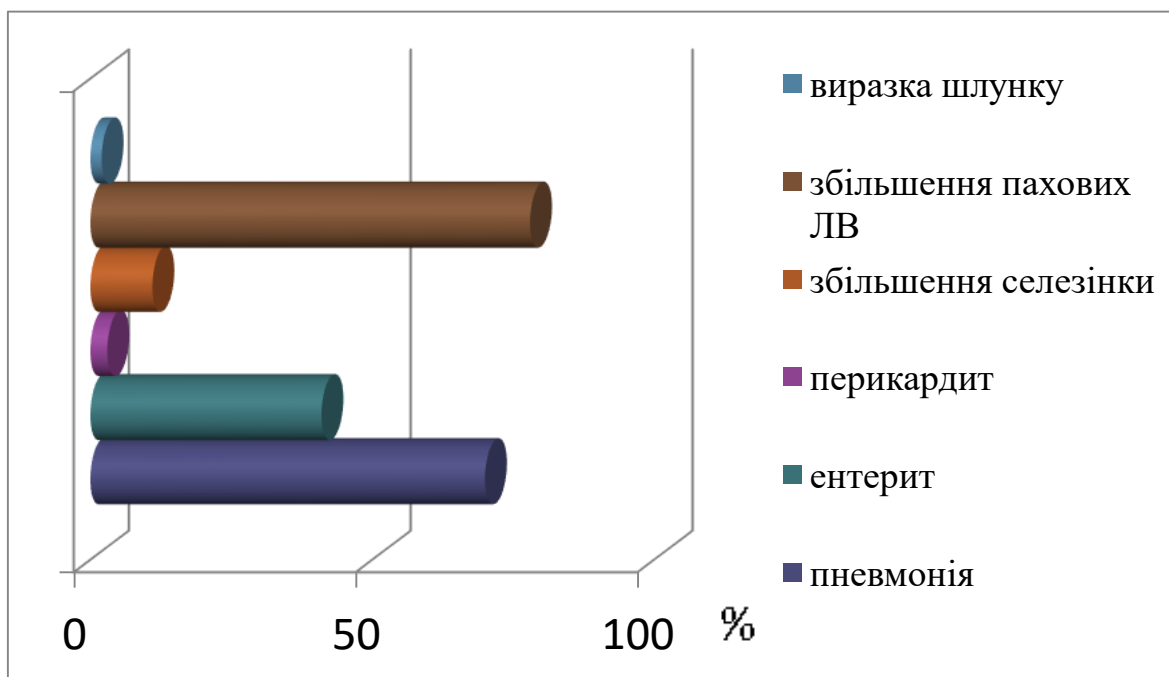


Рис. 3.2. Кількісне співвідношення внутрішніх патологічних ознак, виявлених у досліджених тварин.

Важливим є те, що серед поросят у віці до 5 тижнів зовнішні та внутрішні ознаки захворювання були практично відсутні, за виключенням кількох випадків, коли у них спостерігали схуднення та катаральний ентерит. Водночас, у поросят, віком від 5 до 16 тижнів, були наявні практично усі описані патолого-анатомічні ознаки цирковірус-асоційованих синдромів, а саме зовнішні ознаки (схуднення, анемічність шкіри), клінічні прояви респіраторної дисфункції (кашель, віддишка) та ураження шлунково-кишкового тракту (діарея).

Крім того, у тварин старшої вікової групи (17-28 тижнів) спостерігали значне відставання у рості, викривлення хребта, наявність хронічних респіраторних захворювань, що проявлялись кашлем та ускладненим диханням. Серед тварин репродуктивного віку (43-104 тижні), специфічних

зовнішніх ознак захворювання відмічено не було. Дані результати було описано та представлено на конференції [47].

Таким чином, нами було встановлено, що зовнішні ознаки цирковірус-асоційованих синдромів найбільше характерні для свиней середньої вікової групи (4-16 тижнів) та частково присутні у тварин молодшої та старшої вікових груп. Такий результат корелює з відомостями про те, що інфікування свиней цирковірусом 2 типу найчастіше відбувається після зниження рівня колострального імунітету у віці близько 6-7 тижнів (3-4 тижні після припинення вигодовування молоком) [20]. Проте, у випадку раннього інфікування (за відсутності материнського імунітету), або трансплацентарної передачі вірусу, зовнішні ознаки захворювання можуть розвиватись з перших днів життя і максимально проявлятись вже у 3-4 тижневих поросят.

Також було підтверджено, що серед зовнішніх ознак, переважає саме схуднення тварин. Загалом, усі відібрані для дослідження тварини відставали у вазі, характерної для певної вікової групи на 15-30 %, а у деяких випадках й на 50 %. Водночас, переважним морфолого-анатомічним порушенням, властивим цирковірус-асоційованим синдромам, ідентифікованим серед досліджених тварин було ураження лімфатичних вузлів, що виявлялось у їх значному збільшенні з обширними крововиливами та некрозом. Також серед значної кількості досліджених тварин виявляли інтерстиціальні пневмонії та ентерити. Важливо зазначити, що у багатьох випадках паралельно з виявленням порушень, характерних для інфікування ЦВС2, було виявлено патолого-анатомічні прояви інших вірусних та бактеріальних патологій. Однак їх до аналізу не включали. Серед таких ознак були загальна бактеріальна септицемія з нашаруванням фібринових тяжів в різних системах органів, а також різноманітні абсцеси, в тому числі в суглобах.

Необхідно підкреслити, що серед 352 відібраних для дослідження тварин, 283 загинули, а 69 – були вимушено забитими.

3.2. Молекулярно-генетичні дослідження патологічного матеріалу.

3.2.1. Характеристика праймерів, підібраних для проведення ПЛР.

З метою виявлення генетичного матеріалу цирковірусу свиней 2 типу у відібраних зразках було проведено підбір праймерів для ампліфікації фрагментів геному згаданого збудника на підставі повних нуклеотидних послідовностей ізолятів ЦВС2, доступних в GenBank. Також було встановлено положення цих праймерів на нуклеотидній послідовності геному референштаму ЦВС2 та визначено рівень гомології нуклеотидних послідовностей праймерів до матричної послідовності. Так, праймери CVSTL_1F та CVSTL_3R характеризувалися 100 % та 96,2 % рівнем гомології до нуклеотидної послідовності геному ізоляту AF117753, що належить до 2D генотипової групи, відповідно (рис. 3.3).

На нуклеотидній послідовності згаданого ізоляту праймери CVSTL_1F та CVSTL_3R розташовані таким чином, що ділянка геному, яка буде ампліфікуватись під час проведення ПЛР матиме довжину 1293 п.н. Праймери Cir_orf2_F та Cir_orf2_R характеризувалися 100 % рівнем гомології до послідовності Car-гену ізоляту AF117753 ЦВС2 (рис. 3.3). Згадані праймери розташовані на послідовності Car-гену вказаного ізоляту таким чином, що довжина ампліфікованих ділянок становитиме 502 п.н.

Також було визначено рівні гомології та положення підібраних праймерів до нуклеотидних послідовностей ізолятів усіх інших генотипових груп цирковірусу свиней 2 типу. Так, до нуклеотидної послідовності геному ізоляту ЦВС2, що належить до 1A генотипової групи, код доступу якого у базі даних GenBank – AY321997, рівень гомології прямого праймеру CVSTL_1F становить 100 %, зворотнього праймеру CVSTL_3R – 96,2 %. Тоді як рівні гомології іншої пари праймерів Cir_orf2_F та Cir_orf2_R становлять 96,8 % та 95,5 %, відповідно (рис. 3.4).

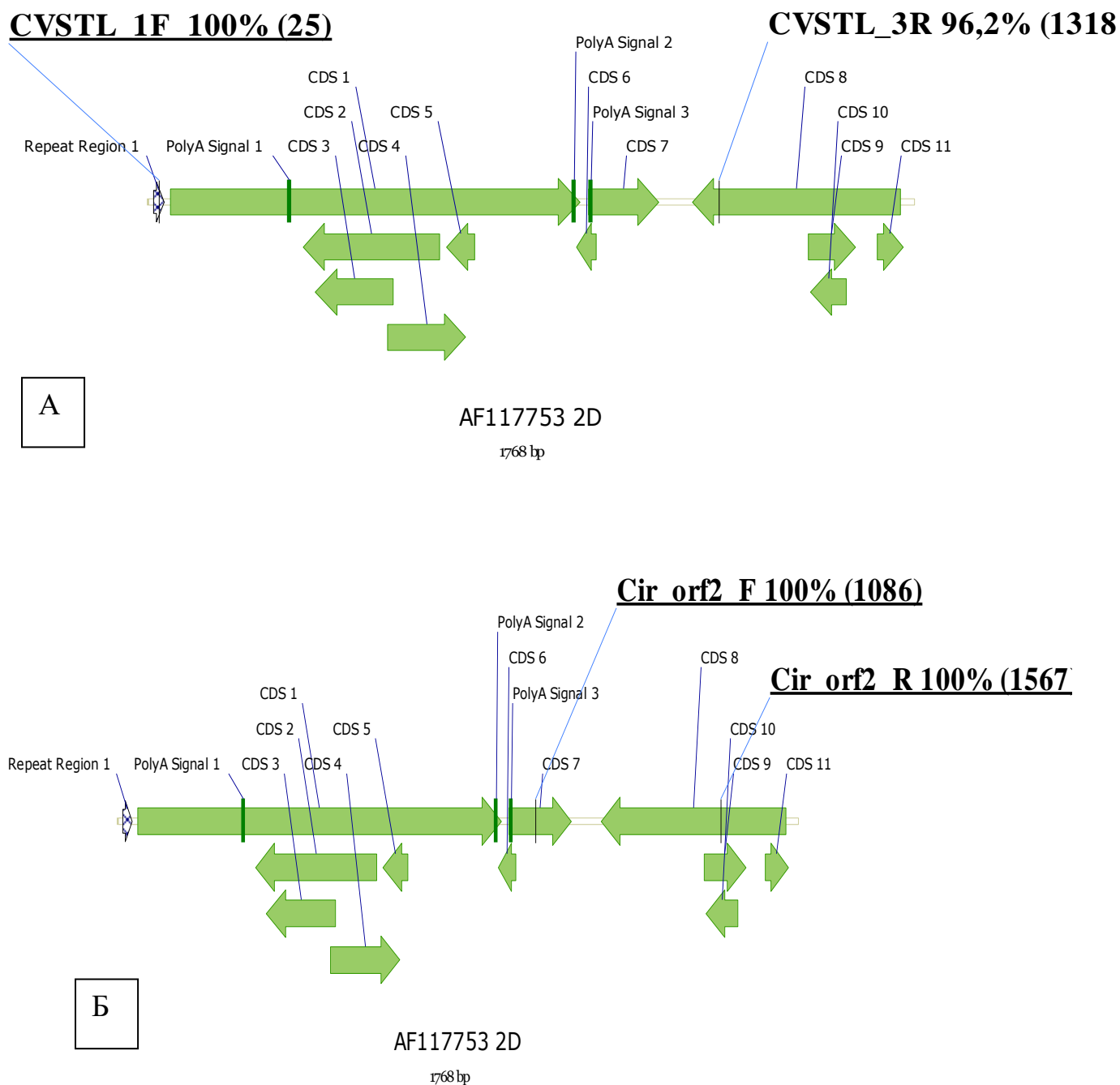


Рис. 3.3. Схема положення та рівень гомології праймерів, підібраних до геному ЦВС2 на підставі нуклеотидної послідовності референс-штаму, код доступу якого у базі даних GenBank – AF117753. А: до повного геному ЦВС2, Б: до послідовності Сар-гену.

Загалом, у роботі було використано 4 праймери, довжина яких коливалася від 19 до 24 п.н., з них 2 праймери прямої орієнтації, а 2 – зворотної. Характеристику використаних для проведення досліджень праймерів та їх нуклеотидні послідовності наведено у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Характеристика праймерів, використаних для проведення ПЛР

№ п/п	Праймер	Орієнтація праймеру	Нуклеотидна послідовність праймеру	Положення у геномі
1	CVSTL_1F	прямий	5'-CACCTCGGCAGCACCTC AG-3'	25-44
2	CVSTL_3R	зворотній	5'-CCACAGCCСТААССТАТ GACC-3'	1297-1318
3	Cir_orf2_F	прямий	5'-ATGGTTACACGGATATT GTAGTCC -3'	1086-1110
4	Cir_orf2_R	зворотній	5'- TCCCGCACCTTCGGATA ТАСТG -3'	1567-1588

Примітка: 1, 2 – праймери підібраті до нуклеотидної послідовності генів Rep- та Cap-протеїнів ЦВС2; 3, 4 – праймери, підібрані до нуклеотидної послідовності гену Cap-протеїну.

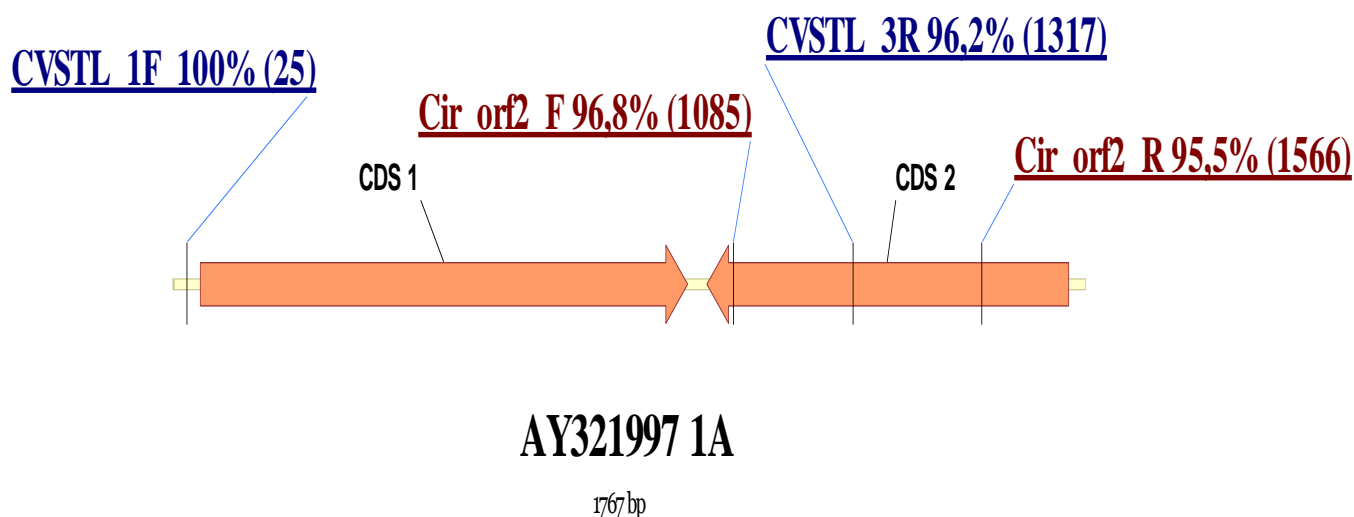


Рис. 3.4. Схема положення та рівень гомології праймерів, підібраних до геному ізолятів ЦВС2, що належать до 1А генотипової групи, на основі нуклеотидної послідовності референс-штаму, код доступу якого у базі даних GenBank – AY321997.

Рівень гомології праймерів CVSTL_1F, CVSTL_3R та Cir_orf2_F до нуклеотидної послідовності геному ізоляту ЦВС2, що належить до 1В

генотипової групи, код доступу якого в базі даних GenBank – AY484407, не відрізнявся від рівнів гомології цих праймерів до нуклеотидної послідовності ізоляту 1А генотипової групи і становив 100 %, 96,2 % та 96,8 %, відповідно (рис 3.5). Тоді як рівень гомології праймеру Cir_orf2_R становив 96,5 % Водночас, іншими є рівні гомології підібраних праймерів до послідовності ізоляту ЦВС2, що належить до 1С генотипової групи.

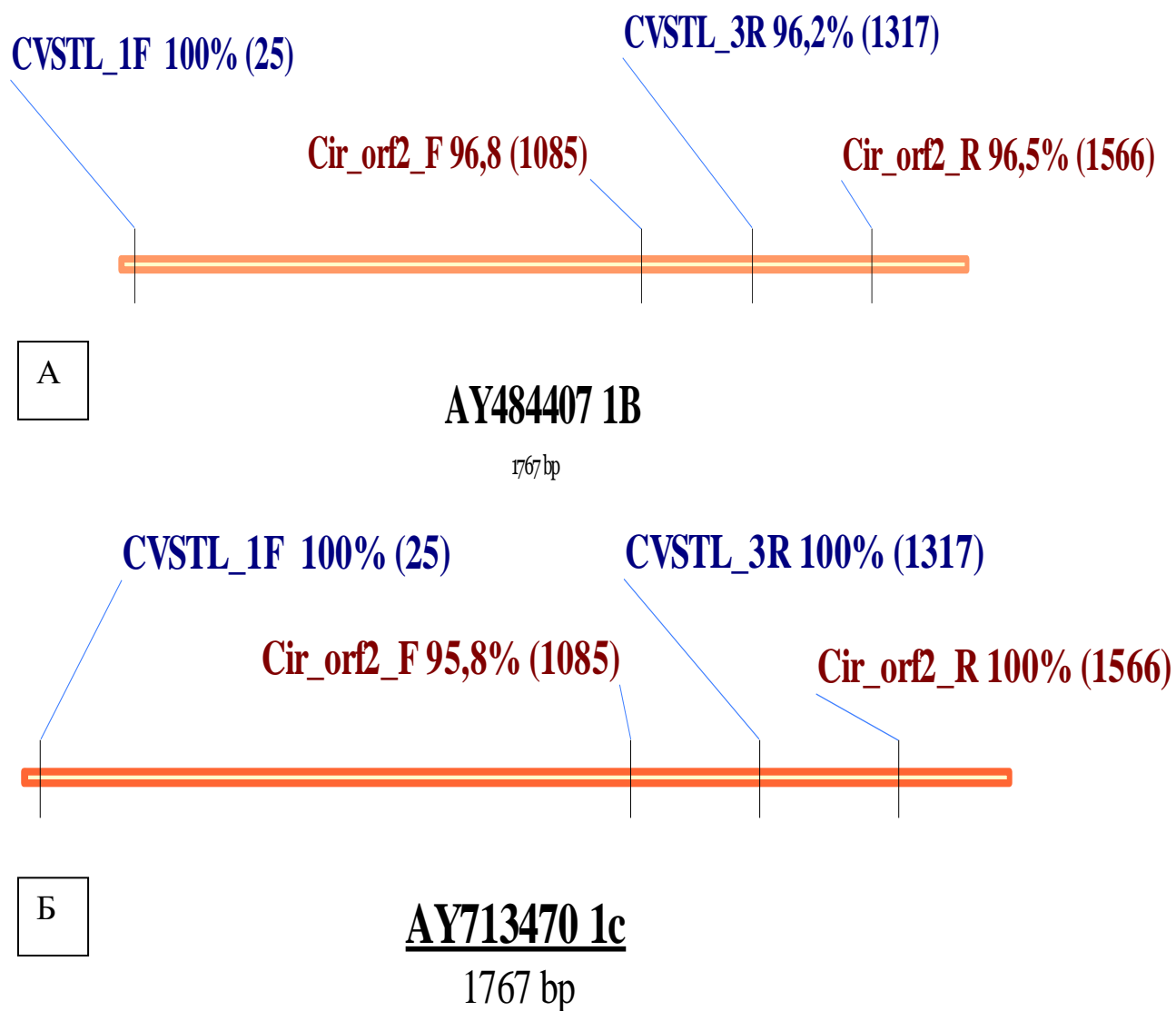


Рис. 3.5. Схема положення та рівень гомології праймерів, підібраних до геному ізолятів ЦВС2. А: що належать до 1В генотипової групи, на основі нуклеотидної послідовності референс-штаму, код доступу якого у базі даних GenBank – AY484407, Б: що належать до 1С генотипової групи, на основі нуклеотидної послідовності референс-штаму, код доступу якого в базі даних GenBank – AY713470.

Так, праймери CVSTL_1F, CVSTL_3R та Cir_orf2_R характеризувались 100 % рівнем гомології до нуклеотидної послідовності вказаного ізоляту, тоді як цей показник для праймеру Cir_orf2_F становив лише 95,8 % (рис. 3.5).

Крім того, надзвичайно важливим та показовим є те, що рівні гомології усіх підібраних праймерів CVSTL_1F, CVSTL_3R, Cir_orf2_F та Cir_orf2_R до нуклеотидних послідовностей ізолятів двох найбільш розповсюджених генотипових груп 2A та 2C становлять 100 % (рис. 3.6).

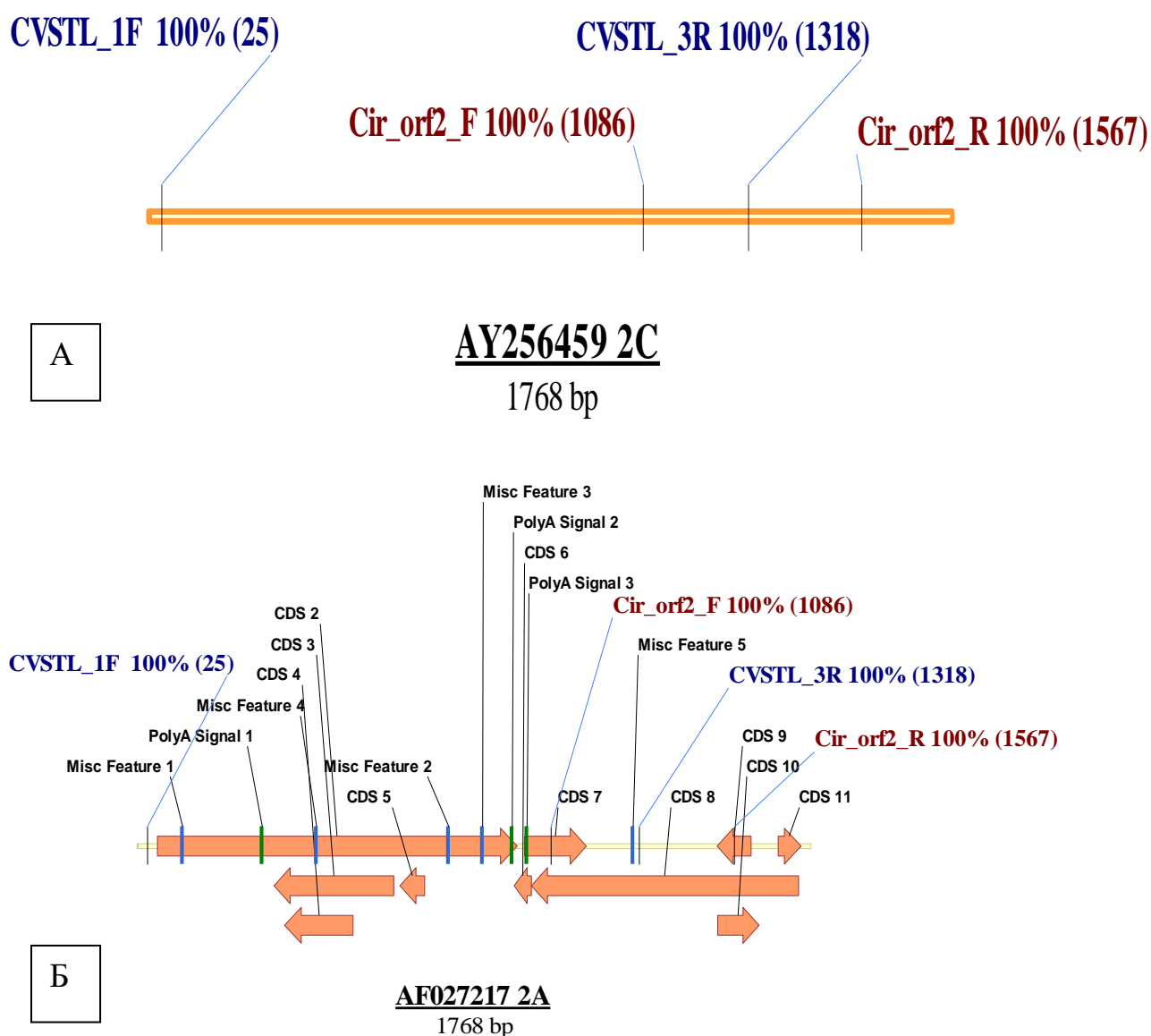


Рис. 3.6. Схема положення та рівень гомології праймерів, підібраних до геному ізолятів ЦВС2. А: що належать до 2С генотипової групи, на основі нуклеотидної послідовності референс-штаму, код доступу якого у базі даних GenBank – AY256459. Б: що належать до 2А генотипової групи, на основі

нуклеотидної послідовності референс-штаму, код доступу якого у базі даних GenBank – AF027217.

Втім, рівні гомології підібраних праймерів до послідовності ізоляту ЦВС2, що належить до 2В генотипової групи, були подібними до показників, притаманних 1С-генотиповій групі. Праймери CVSTL_1F, CVSTL_3R та Cir_orf2_R також характеризувались 100 % рівнем гомології до нуклеотидної послідовності вказаного ізоляту, тоді як цей показник для праймеру Cir_orf2_F становив 96,8% (рис. 3.7). До нуклеотидної послідовності геному ізоляту ЦВС2, що належить до 2Е генотипової групи (код доступу у базі даних GenBank – AF1180972), рівень гомології праймерів CVSTL_1F, Cir_orf2_F та Cir_orf2_R становив 100 %. Натомість для праймеру CVSTL_3R цей показник склав 90,5 %. (рис. 3.7). З вісьми досліджених випадків, таке значення гомології було найнижчим.

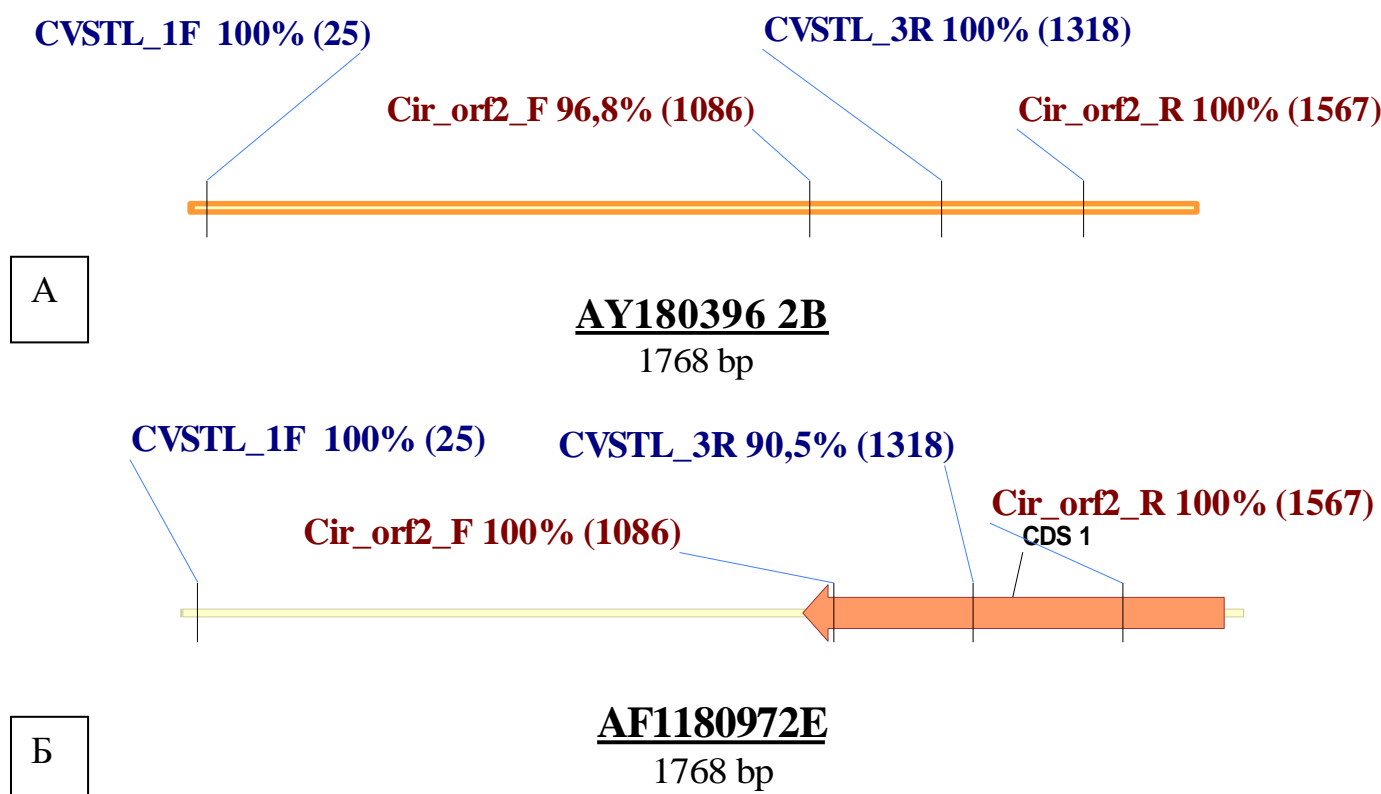


Рис. 3.7. Схема положення та рівень гомології праймерів, підібраних до геному ізолятів ЦВС2. А: що належать до 2В генотипової групи, на основі нуклеотидної послідовності референс-штаму, код доступу якого у базі даних GenBank – AY180396. Б: що належать до 2Е генотипової групи, на основі

нуклеотидної послідовності референс-штаму, код доступу якого у базі даних GenBank – AF1180972.

Таким чином, у результаті проведеної роботи було підібрано діагностичні пари праймерів до консервативних ділянок генів Rep- та Cap-протеїнів ЦВС2. Крім того, було встановлено і проаналізовано положення цих праймерів та визначено рівні їх гомології до нуклеотидних послідовностей ізолятів усіх генотипових груп цирковірусу свиней 2 типу. На підставі проведеного аналізу можна стверджувати, що описані пари праймерів характеризуються високими рівнями специфічності до нуклеотидних послідовностей усіх генотипових груп ЦВС2, оскільки рівень їхньої гомології переважно становив 100 %, а у деяких випадках варіював на рівні 90,5 %, 95,8 – 96,8 %. Це, в свою чергу, свідчить на користь того, що підібрані олігонуклеотиди можуть бути успішно використані для діагностичного виявлення усіх ізолятів ЦВС2.

Представлені результати опубліковані в статті [46].

3.2.2. Ідентифікація ЦВС2 у зразках, відібраних від свиней різних вікових груп та різних областей України.

З метою встановлення залежності між наявністю збудника та віком тварин, а також для з'ясування географічного поширення згаданого вірусу, на першому етапі впродовж 2007-2009 років проводили дослідження за використання ДНК, виділеної з матеріалу, об'єднаного за місцем відбору та віковим критерієм. У цей час використовували пару праймерів Cir_orf2_F та Cir_orf2_R, що фланкують специфічну ділянку Cap-гену, довжиною 502 п.н., рекомендованих у 2005 році Міжнародним епізоотичним бюро (Office International des Epizooties - World Health Organization in Animal Health, OIE). Оптимізуючи умови ампліфікації та для забезпечення більшої специфічності реакції, температуру гібридизації праймерів встановлювали на рівні 60 °С, а кількість хлориду магнію - 1,7 мкл на зразок. У результаті

електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР було виявлено наявність специфічних продуктів реакції у 57 досліджених зразках від тварин усіх вікових груп та різних областей України. Відсутність продуктів реакції у зразках негативного контролю, засвідчує адекватність отриманих результатів (рис. 3.8). Таким чином, впродовж 2007-2009 років цирковірус свиней 2 типу було виявлено у зразках 57 з 108 обстежених тварин різних вікових груп з господарств 16 з 22 досліджених областей України. Причому, з 6 областей України, а саме Харківської, Кіровоградської, Волинської, Закарпатської, Херсонської та Тернопільської усі без виключення досліджені зразки були позитивними щодо ЦВС2. З 5 областей України: Донецької, Запорізької, Київської, Одеської та Сумської, більше, ніж 50 % зразків, були вірус позитивними. Серед зразків ще п'яти областей України: Вінницької, Дніпропетровської, Черкаської, Чернігівської та Полтавської цирковірус свиней 2 типу було виявлено у менше, ніж 50 % досліджених зразків. У зразках, відібраних від тварин Чернівецької, Хмельницької, Рівненської, Миколаївської, Луганської та Івано-Франківської областей вірус виявлено не було.

Дані зразки також було досліджено ретроспективно за допомогою розробленої нами тест-системи на основі підібраних діагностичних праймерів CVSTL_1F та CVSTL_3R (див. п.3.2.1). Аналогічно попередньо отриманим результатам, ЦВС2 було ідентифіковано в 57 з 108 досліджених зразків.

На другому етапі досліджень, а саме в період з 2009 до 2012 дослідили ще 244 зразки від свиней тих же вікових груп, але вже зі всіх областей України. Паралельно використовували дві описані пари праймерів, Cir_orf2_F та Cir_orf2_R, а також CVSTL_1F та CVSTL_3R, проводячи реакції за різних температурних режимів. Таким чином було отримано по 87 позитивних результатів з 244 досліджених за використання обох тест-систем. Дані результати засвідчили виявлення ЦВС2 ще в 4 областях України, які не досліджувались на першому етапі.

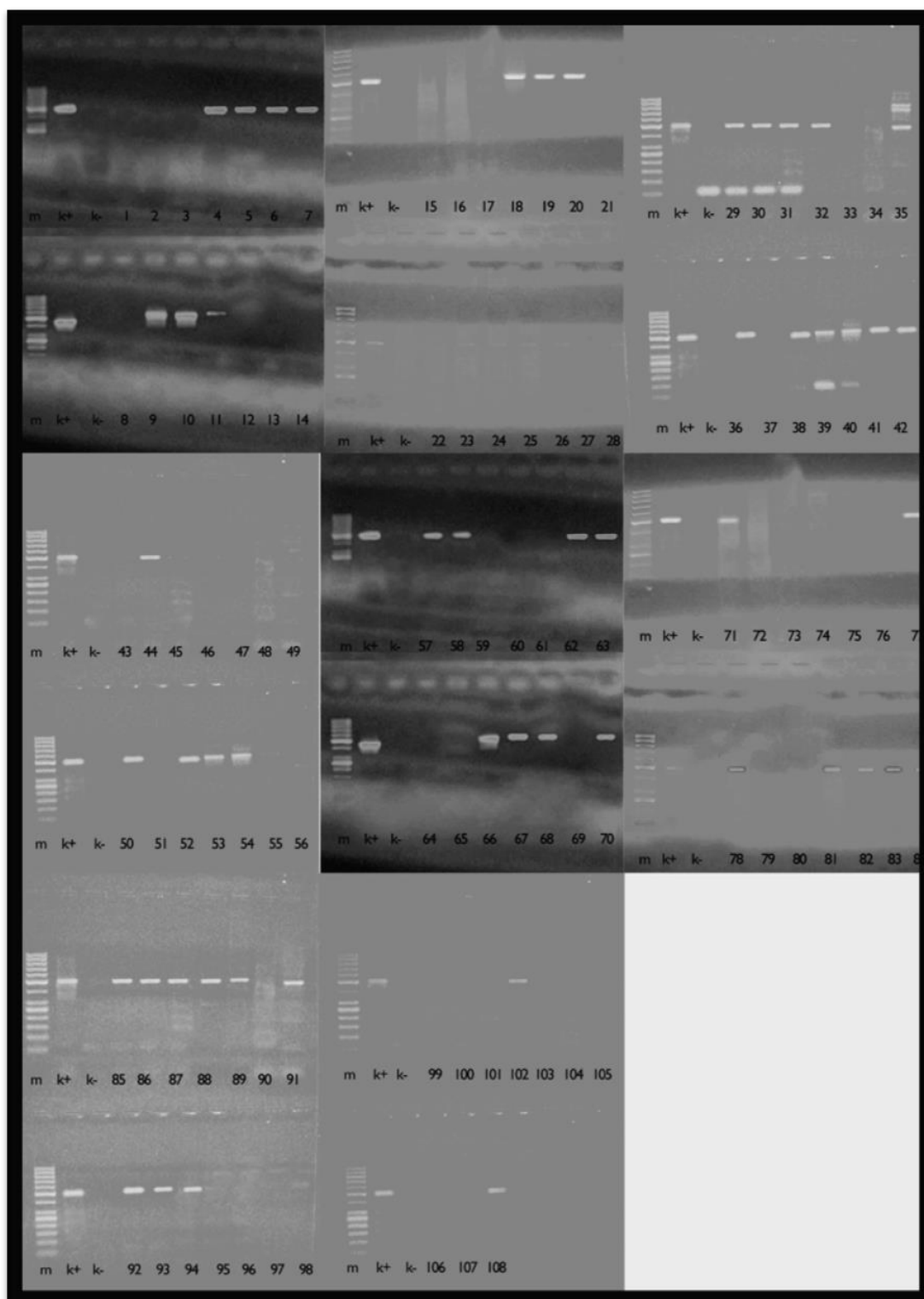


Рис. 3.8. Електрофореграми продуктів ПЛР з праймерами до консервативної ділянки Сар-гену, довжиною 502 п.н: 1-4 – зразки з Вінницької обл., 5-6 – зразки з Волинської обл., 7-22 – зразки з Дніпропетровської обл., 23-29 – зразки з Донецької обл., 30 – зразок із Закарпатської обл., 31-36 – зразки із Запорізької обл., 37 – зразок з Івано-Франківської обл., 38-62 – зразки з Київської обл., 63 – зразок з Кіровоградської обл., 64 – зразок з Луганської

обл., 65 - зразок з Миколаївської обл., 66-70 – зразки з Одеської обл., 71-75 – зразки з Полтавської обл., 76 – зразки з Рівненської обл., 77-81 – зразки з Сумської обл., 82-83 – зразки з Тернопільської обл., 84 – зразок з Харківської обл., 85-89 – зразки з Херсонської обл., 90 – зразок з Хмельницької обл., 91-99 – зразки з Черкаської обл., 101-108 – зразки з Чернігівської обл., К⁺ - позитивний контроль, К⁻ - негативний контроль, М – маркер молекулярних мас.

Таким чином, за весь період 2007 – 2012 років та при використанні 2 тест-систем, одна з яких рекомендована МЕБ, а інша розроблена нами, ЦВС2 було ідентифіковано в 144 з 352 досліджених зразків, відібраних від свиней усіх областей України та АР Крим.

Враховуючи той факт, що зразки було систематизовано не тільки за місцем відбору, а я за віком досліджуваних тварин, нами було проведено аналіз залежності частоти виявлення ЦВС2 від віку. Отож, у свиней, віком до 5 тижнів, наявність цирковірусу свиней 2 типу підтверджено у 15% досліджених зразків. Водночас, у тварин середньої вікової групи (5-16 тижнів) ЦВС2 ідентифікували у 60 % зразків. У старшій віковій групі (17-28 тижнів) ЦВС2 був наявний у 66,6 % зразків.

Натомість у зразках тварин репродуктивного віку (43-104 тижні) вірус було ідентифіковано 10 % випадків. Крім того, у роботі досліджували зразки тканин від абортів плодів. У зазначених зразках цирковірус свиней 2 типу було виявлено у 25 % випадків.

Таким чином, підсумовуючи отримані результати, можна стверджувати, що ЦВС2 був наявний усіх обстежених вікових груп, однак з різною частотою. Враховуючи це, очевидно більш доцільним для моніторингу наявності вірусу є відбір зразків від тварин середньої та старшої групи. Проте, цей факт не може бути використаний в окремих випадках, коли відбір матеріалу здійснюється відповідно до зовнішніх ознак захворювання. Крім того, у цьому дослідженні підтверджено можливість виявлення цирковірусу у тканинах

мертвонароджених чи абортіваних плодів, при наявності транс плацентарної передачі даного вірусу.

Отримані результати засвідчують, що існує залежність між місцем відбору та наявністю ЦВС2, однак прямої залежності між наявністю збудника та віком тварин виявлено не було.

3.2.3. Виявлення ДНК цирковірусу свиней 2 типу у патологічному матеріалі окремих органів, відібраних від хворих свиней.

Надзвичайно важливим для проведення успішної діагностики є відбір зразків цільових органів, або ж їх об'єднання з метою підвищення вірогідності ідентифікації вірусу у випадках його наявності, та зменшення ймовірності отримання хибно-негативних результатів. Даний аспект важливий для коректного використання розробленої тест-системи і має бути зазначений в рекомендаціях щодо відбору. Саме тому, наступним етапом нашої роботи було виявлення вірусу у зразках тварин, залежно від типу тканин та органу.

На цьому етапі проводили ПЛР з метою ампліфікації послідовності майже практично всього геному ЦВС2. Ми використали пару раніше підібраних діагностичних праймерів CVSTL_1F та CVSTL_3R (див. п.3.2.1), а параметри реакції встановили на рівні низької специфічності: температура гібридизації праймерів – 58 °С, кількість MgCl – 1,5 мкл на зразок. ДНК, використану для дослідження було виділено зі зразків окремих органів та груп органів від 108 тварин різних вікових груп з різних областей України (ретроспективний аналіз зразків, зібраних за період 2007-2009 років).

Окремо досліджували зразки тканин легень, кишечника, лімфатичних вузлів, крові та сперми, а також об'єднані зразки легень та кишечника; легень та лімфатичних вузлів; легень, кишечника та лімфатичних вузлів, а також, кишечника та лімфатичних вузлів. За допомогою електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР, специфічний продукт, довжиною 1234 п.н. було зареєстровано в 57 зразках з різних органів та об'єднаних зразках (рис. 3.9).

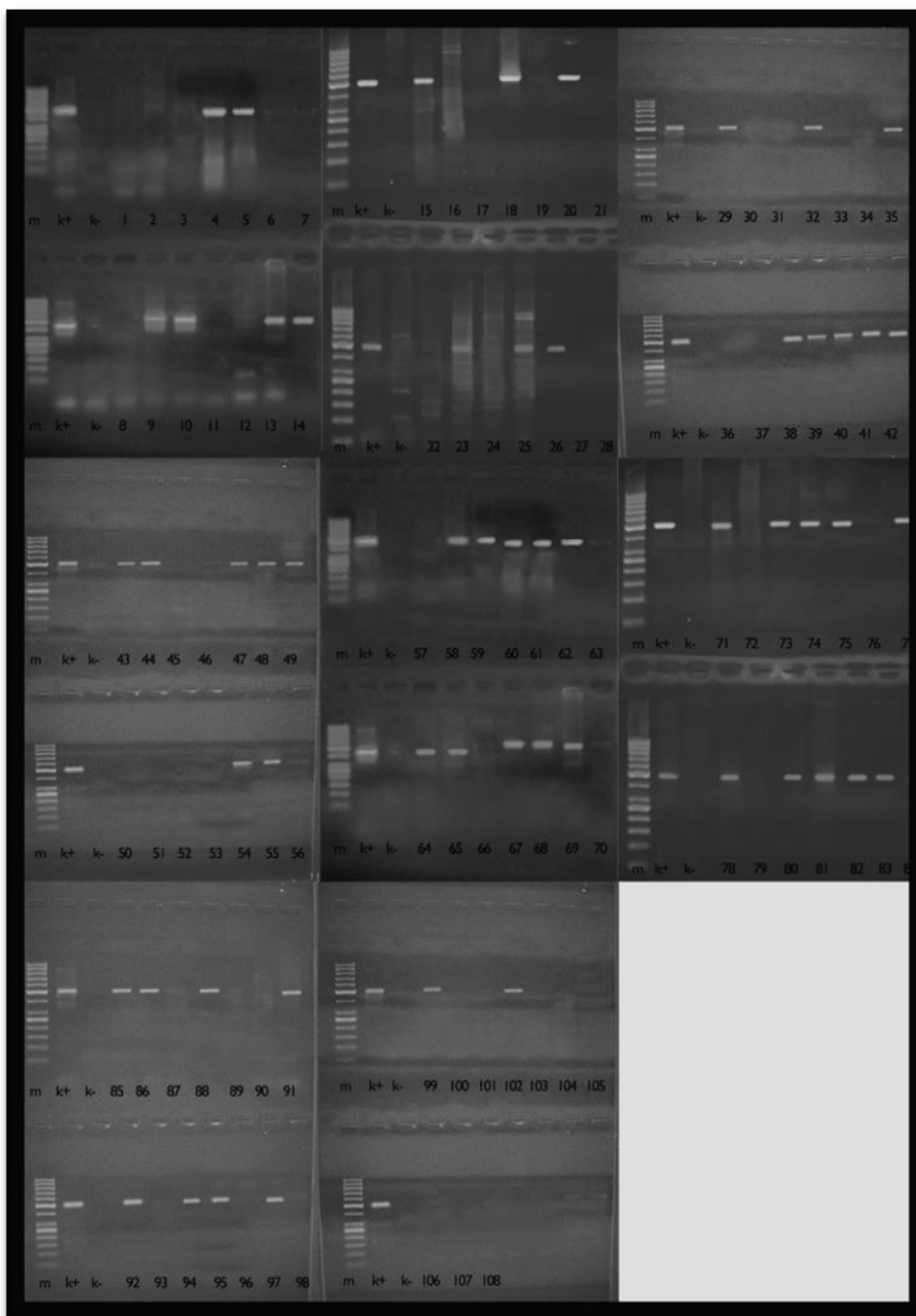


Рис. 3.9. Електрофореграми продуктів ПЛР з праймерами до ділянки геному ЦВС2, довжиною 1234 п.н: 1-37 – зразки тканини легень, 38-40 – зразки тканини кишечника, 40-44 – зразки тканини лімфатичних вузлів, 45-49 – зразки крові, 50-53 – зразки сперми, 54-56 – об'єднані зразки кишечника та лімфатичних вузлів, 57-61 – об'єднані зразки легень та кишечника, 62-76 – об'єднані зразки легень та лімфатичних вузлів, 9 – об'єднані зразки легень, кишечника та лімфатичних вузлів, K⁺ - позитивний контроль, K⁻ - негативний контроль, М – маркер молекулярних мас.

Отже, за результатами нашого дослідження ЦВС2 було виявлено у зразках тканини легень у 15 з 37 (40,5 %) випадків. Натомість у зразках кишечника та зразках лімфатичних вузлів вірус виявлено у 3 з 3 та 4 з 4 (100 %) досліджених випадків, відповідно. Втім, лише 3 з 5 (60 %) досліджених зразків крові були позитивними щодо ЦВС2. У 4 досліджених зразках сперми вірус взагалі виявлено не було.

Дані результати відповідають даним інших дослідників, які вказують на той факт, що частота виявлення ЦВС2 з різних органів та біологічних рідин значно відрізняються. Хоча, за відбору зразків в момент віремії – ДНК цирковірусу легко виявляється з абсолютно усіх тканин та органів.

У об'єднаних зразках кишечника та лімфатичних вузлів вірус було ідентифіковано у 66,6 % (2 з 3) випадків, а у об'єднаних зразках кишечника та легень – у 80 % (4 з 5) випадків. 10 з 15 (66,6 %) об'єднаних зразків легень та лімфатичних вузлів були позитивними щодо ЦВС2 та у 16 з 32 (50 %) об'єднаних зразків легень, кишечника та лімфатичних вузлів було виявлено згаданий вірус (рис. 3.10).

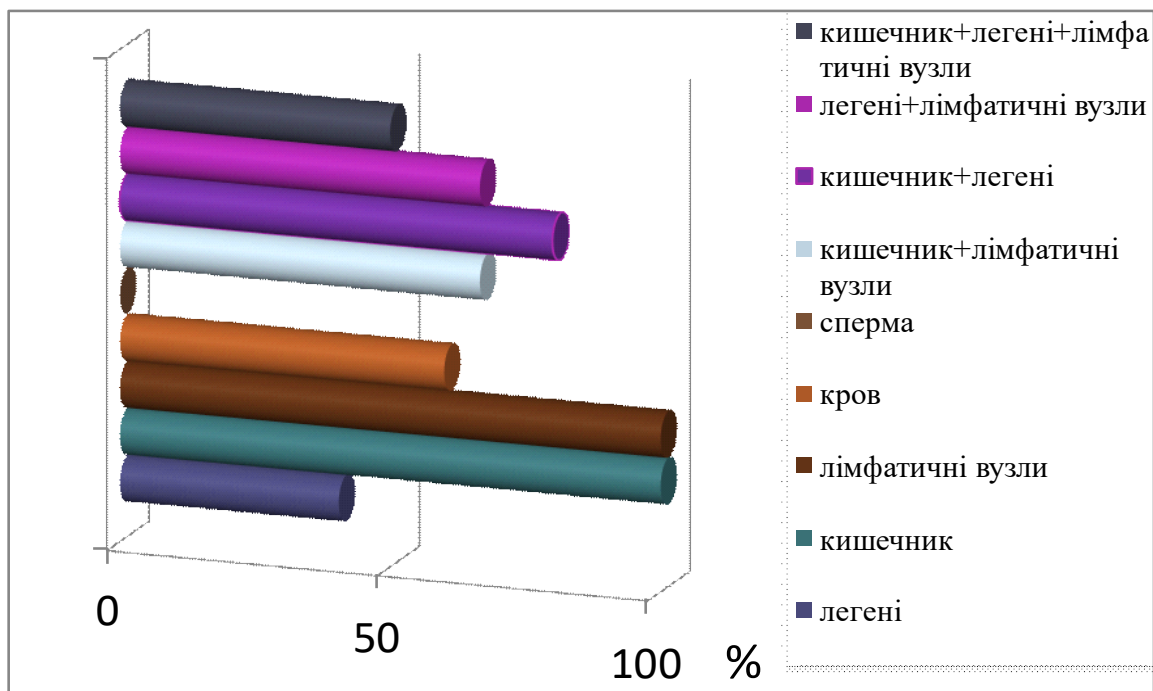


Рис. 3.10. Залежність виявлення цирковірусу свиней 2 типу від локалізації.

Таким чином, нами було показано, що для діагностики цирковірусу свиней 2 типу найбільш доцільно відбирати зразки лімфатичних вузлів та кишечника, або ж проводити діагностування об'єднаних зразків вказаних органів. Найменш доцільно відбирати лише зразки легенів. Крім того, можна припустити, що ідентифікація вірусу в спермі тварин є дещо ускладненою. Це може бути пов'язано з виділеннями збудника із зазначеною біологічною рідиною лише упродовж певного проміжку часу (періоду віремії, значного пригнічення імунітету). Отже цей матеріал не слід використовувати для діагностичних та моніторингових досліджень.

Отримані, результати досліджень вказують на можливість виявлення ЦВС2 методом ПЛР в усіх вказаних тканинах, проте з різною частотою. Хоча неможливо встановити однозначну залежність між наявністю вірусу та тканиною, що була досліджена. Описані результати опубліковано в статті [46].

3.2.4. Ефективність виявлення генетичного матеріалу ЦВС2 методом ПЛР.

Визначення ефективності розробленого методичного підходу для детекції цирковірусу свиней 2 типу було проведено шляхом порівняння даних, отриманих у всіх проведених нами незалежних реакціях із використанням 2-х окремих пар діагностичних праймерів. Так встановлено, що використання олігонуклеотидів Cir_orf2_F та Cir_orf2_R для ампліфікації ділянки гену Сар-білку забезпечує диференційне виявлення даного вірусу у 144 з 352 досліджених зразків матеріалу від свиней різного віку з різних областей України. Водночас, за використання праймерів CVSTL_1F та CVSTL_3R до послідовності практично всього геному ЦВС2, вірус було виявлено також у 144 з 352 зразків різних тканин та органів свиней.

Враховуючи вищевикладене, можна зробити висновки, що розроблений нами молекулярно-біологічний підхід із використанням праймерів CVSTL_1F та CVSTL_3R дозволяє виявляти цирковірус свиней 2 типу у матеріалі різних

тканин від свиней різного віку та різних областей України без хибно-позитивних та хибно-негативних результатів і забезпечує високий рівень ефективності. Нажаль, на даному етапі не було отримано більше позитивних зразків за використання розробленої нами тест-системи на основі праймерів CVSTL_1F та CVSTL_3R в порівнянні з тест-системою рекомендованою МЕБ на основі праймерів Cir_orf2_F та Cir_orf2_R, хоча на основі аналітичного порівняння такі очікування були.

3.2.5. Визначення специфічності експрес-методів виявлення ЦВС2, розроблених на основі ПЛР.

Специфічність тест-систем на основі ПЛР є важливим показником для можливості їх рутинного використання в діагностичній практиці. Тому нами було проведено визначення специфічності розроблених діагностичних підходів з попарним використанням 4-х підібраних праймерів Cir_orf2_F, Cir_orf2_R, CVSTL_1F та CVSTL_3R, а також за використання ДНК цирковірусу папуг (BFDV), цирковірусу свиней 1 типу та референс-штаму ЦВС2 (див. п.2.1.1).

Умови підібрані для даної реакції характеризувались високим рівнем специфічності, зокрема: температура гібридизації праймерів становила 62 °С, а кількість хлориду магнію – 1,5 мкл на зразок. При електрофоретичному аналізі продуктів ампліфікації було встановлено, що специфічні продукти реакції, довжиною 502 п.н. та 1234 п.н. були присутні лише в зразках референс-штаму ЦВС2 та були відсутні в зразках інших вірусів (рис. 3.11).

Отже, при проведенні ПЛР з праймерами Cir_orf2_F та Cir_orf2_R, а також CVSTL_1F та CVSTL_3R специфічні продукти реакції, довжиною 502 та 1234 п.н., відповідно, синтезувалися лише у випадку матеріалу ЦВС2, тоді як за використання ДНК цирковірусу папуг та цирковірусу свиней 1 типу – продукти реакції були відсутні.

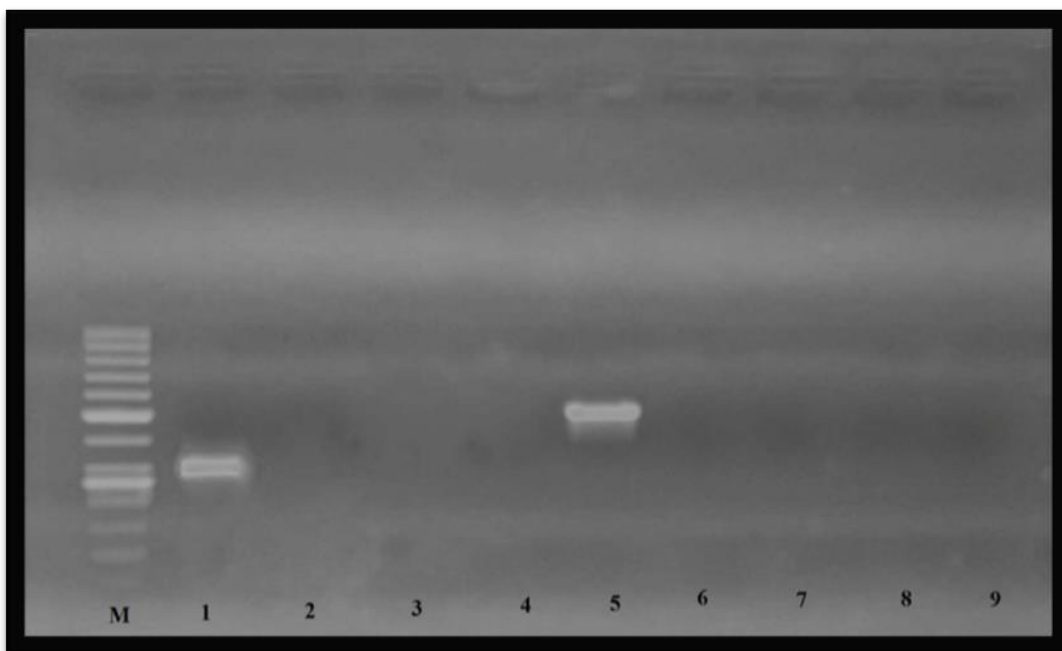


Рис.3.11. Електрофореграма продуктів ПЛР з двома парами діагностичних праймерів до специфічних ділянок геному ЦВС2. Довжина ампліконів у першій реакції – 502 п.н., у другій – 1234 п.н: 1, 5 – ДНК референс-штаму ЦВС2; 2, 6 – негативний контроль; 3, 7 – ДНК цирковірусу свиней 1 типу; 4, 8 – ДНК цирковірусу папуг; М – маркер молекулярних мас.

Звідси можна зробити висновки, що розроблені підходи для виявлення цирковірусу свиней 2 типу на основі ПЛР є високоспецифічними, оскільки забезпечують диференційне виявлення саме даного вірусу, навіть від таких близькоспоріднених вірусів як ЦВС1 та ВFDV, ступінь гомології між якими та ЦВС2 перевищує 70 %.

РОЗДІЛ 4

ВИВЧЕННЯ ФІЛОГЕНЕТИЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ТА ПОШИРЕННЯ ЦИРКОВІРУСУ СВИНЕЙ 2 ТИПУ СЕРЕД СВІЙСЬКИХ ТА ДИКИХ ТВАРИН НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

4.1. Поширення цирковірусу свиней 2 типу в Україні в 2007-2012 рр.

Україна вважається «гарячою точкою» для нових інфекційних хвороб свиней, тобто це країна з високим рівнем передачі нових патогенів. Вирощування свиней різко зросло в Україні протягом 2000-х років, і багато племінних тварин було завезено з різних країн, інфікованих різними вірусними та бактеріальними агентами. Цирковірус свиней 2 типу є широко розповсюдженим вірусом в світі і тому потрапляння його ізолятів різних генотипових груп було можливим в цей час. Далі шляхом горизонтальної передачі ЦВС2 поширився серед сприйнятливих тварин. Інші шляхи передачі включали згодовування сирого інфікованого м'яса та інших складових, тваринного походження. Отож, невдовзі ЦВС2 став поширеним вірусом серед свиней в Україні, як власне і у всьому світі, має певну генетичну мінливість і виявляється в популяціях свійських та диких свиней. Цей вірус є дуже стійким в навколишньому середовищі і стабільним навіть при високих температурах і при різних значеннях рН. ЦВС2 також стійкий проти багатьох поширених дезінфікуючих засобів, таких як йод, спирт, фенол і формальдегід. Він постійно циркулює серед тварин в промислових господарствах, і Україна не є виключенням. Клінічні ознаки цирковірусної інфекції свиней в Україні були описані з початку 2000-х років; однак інформація про виявлення ізолятів ЦВС2, їх характеристику та розподіл у різних регіонах опубліковано не було.

Тому на даному етапі досліджень, нами було вивчено динаміку розповсюдження та характер поширення ЦВС2 в інтерфейсі тваринництва в Україні. Оскільки починаючи з 2007 року в багатьох господарствах зафіксовано виникнення захворювання, що характеризувалось високим рівнем

смертності свиней та наявністю специфічних симптомів, притаманних цирковірус-асоційованим синдромам, нами було проведено дослідження з виявлення збудника зазначеного захворювання.

На першому етапі досліджень з 2007 по 2009 роки включно відбір матеріалу було проведено від тварин з підозрою на наявність ЦВС2-асоційованого захворювання з 22 областей України. Таким чином дослідили 108 зразків. Тоді як, на другому етапі досліджень, а саме з 2010 по 2012 роки включно дослідили ще 244 зразки вже з усіх областей України та АР Крим. Загалом досліджено 352 зразки від свиней з промислових господарств України.

У 2007 році було досліджено 19 зразків, з яких 42,1 % виявилися позитивними. Вірус було детектовано у Донецькій, Львівській, Херсонській та Київській областях (таблиця 4.1).

У 2008 році у результаті ПЛР дослідження матеріалу з Дніпропетровської області виявлено генетичний матеріал ЦВС2. До того ж у Полтавській і Чернігівській області на відміну від 2007 р. відмічено наявність позитивних зразків, що вказує на прогресію захворювання в цих регіонах. Середня частота виділення ЦВС2 у 2008 році по Україні склала 41,4 %.

Вже у 2009 року зафіксовано випадки інфікування ЦВС2 у Донецькій, Миколаївській, Одеській, Чернівецькій областях. До того ж у цьому році за весь період дослідження виявлено найвищу частоту виділення позитивних зразків, яка складала 81,3 %. Даний факт вказує на наявність ендемічних регіонів по даному захворюванню у нашій країні. Особливо високим є тиск вірусу у Донецькій, Київській, Дніпропетровській, Полтавській та Черкаській областях, в яких з року в рік детектували тварин інфікованих ЦВС2.

У 2010 році наявність позитивних зразків вперше відмічено у Житомирській, Запорізькій, Закарпатській, Кіровоградській, Харківській та Черкаській областях. Однак найбільшу частоту виділення вірусу виявлено у північній, центральній та східній Україні. Відповідна тенденція зберіглася і в наступних роках. Можна припустити, що така ситуація у цих регіонах

пов'язана з локалізацією крупних промислових ферм, що слугують джерелом розповсюдження інфекції. Крім того, у разі скупчення надмірної кількості особин сприйнятливих до інфекції, її виникнення майже не можливо зупинити. Раніше позитивні області залишаються під тиском збудника, кількість інфікованих тварин навіть зростає, наприклад, у Донецькій і Київській області у майже 2 рази порівняно з 2009 роком (таблиця 4.1).

Таблиця 4.1.

Динаміка розповсюдження випадків захворювання ЦВС2 на території
України протягом 2007-2012 років

Область	Кількість досліджуваних зразків протягом 2007-2012 рр.											
	2007		2008		2009		2010		2011		2012	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
АР Крим	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1	0	1	0
Вінницька	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0	1	2	1	6	4
Волинська	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1	2
Дніпропетровська	н.д.	н.д.	2	0	1	0	2	4	6	7	4	3
Донецька	5	3	0	11	3	0	5	2	2	2	5	3
Житомирська	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0	2	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Закарпаття	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1	0	н.д.	н.д.	0	1
Запорізька	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1	2	0	4	1	0
Івано-Франківська	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0	1	0	1	н.д.	н.д.
Київська	1	2	0	1	3	0	5	8	8	6	14	34
Кіровоградська	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1	0	1	0	1	4
Луганська	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1	0	0	1
Львівська	1	2	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0	2	1	2
Миколаївська	н.д.	н.д.	0	3	1	0	н.д.	н.д.	0	1	5	0
Одеська	н.д.	н.д.	0	1	1	0	2	2	н.д.	н.д.	4	4
Полтавська	0	3	4	1	2	1	0	1	4	2	2	8
Рівненська	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0	2
Сумська	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0	2	4	2
Тернопільська	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	3	1	1	0
Харківська	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1	0	0	1	1	5
Херсонська	1	0	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2	0	н.д.	н.д.	2	7
Хмельницька	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0	3
Черкаська	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1	2	0	5	6	12
Чернівецька	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1	0	0	1	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Чернігівська	0	1	6	0	1	2	0	13	2	2	3	3
Total	8	11	12	17	13	3	21	38	30	37	62	100

«н.д.» - не досліджували; «+» - позитивний зразок; «-» - негативний зразок

Дослідження динаміки поширення ЦВС2 в Україні за весь досліджений період з 2007 по 2012 рік, вказують на те, що з тривалістю дослідження зростає виявлення кількості випадків. Так, у 2007 році в Донецькій області ЦВС2 виявлено у 5 із 8 зразків, проте протягом періоду з 2009 по 2012 рік вірус виявлено в 20 з 41 зразка. З 3 зразків з Київської області ЦВС2 був виявлений лише у 1 зразку в 2007 році, але в період з 2007 по 2010 рік вже в 10 з 21, а з 2010 по 2012 рік у 31 з 81 зразка. В зразках з Одеської та Вінницької областей, які не вивчалися в 2007 році, в період з 2007 по 2011 рр. ЦВС2 було виявлено у 3 з 5 та 2 з 4 зразків відповідно. Проте впродовж 2012 року в Одеській та Вінницькій областях ЦВС2 було виявлено у 7 із 14 та 8 з 14 проб; які показують високий рівень поширення в цих регіонах. В той же час, у Миколаївській та Черкаській областях рівень поширення ЦВС2 дещо нижчий: протягом періоду з 2007 по 2012 рік вірус ідентифіковано в 4 з 10 зразків та 7 з 26 зразків, відповідно, тоді як в 2007-2010 роках виявлено лише один випадок. З таких областей як Закарпатська область, даних замало - у період з 2007 по 2012 рік у цьому регіоні ЦВС2 було знайдено лише в 1 з 2 зразків; отже, не можна з упевненістю сказати про поширеність вірусу (рис.4.1).

Отже, під час цього дослідження було вивчено матеріал з свиней з 24 областей України та Криму. Більшість зразків, а саме 81, вивчалися з Київської області. Так 31 зразок був позитивним для наявності ЦВС2, а інші 50 були негативними, отже частота розподілу вірусу в цій області становить близько 38%. З 29 зразків з Дніпропетровської області ЦВС2 було виявлено у 15 зразках, що становить 52%; з 26 зразків з Черкаської області ЦВС2 було виявлено в 7, що становить 27%; у зразках з Донецької області виявлено вірус у 20 з 41, і це становить 49% досліджуваного матеріалу. Також ЦВС2 було ідентифіковано у 7 з 14, а саме 50% зразків з Одеської області; 4 з 8 зразків (50%) Сумської області та 12 з 33 зразків (36%) Чернігівської області. Однакова поширеність ЦВС2 спостерігалася в Полтавській та Вінницькій областях, де вірус був виявлений у 12 із 28 проб, та у 6 з 14 зразків, відповідно, що становило 43%. В той же час, у Запорізькій та Херсонській

областях ЦВС2 був ідентифікований у 25% та 42% зразків, а саме у 2 з 8 проб і відповідно до 5 із 12. Більш низька поширеність ЦВС2 була характерна для Львівської та Харківської областей, де лише у 2 з 6 та 2 з 8 проб, ідентифіковано ЦВС2, що відповідало 33% та 25%. В Миколаївській області вірус ідентифіковано у 4 з 6 зразків, що становить 67%, а з Тернопільщини 4 з 5 (80%) зразків були позитивними, це доволі високі показники, хоча кількість проаналізованих зразків – менше середньої. Отримані результати представлено в тезах доповіді [212].

Наша оцінка розподілу вірусу свідчить про те, що поширеність ЦВС2 на території України становить близько 41%, оскільки вірус виявлено у 144 з 352 зразків (рис. 4.1). Вказаний рівень усереднений і характеризує регіони, де вивчали від 16 до 30 зразків. Такий індекс поширення ЦВС2 співвідноситься з даними, отриманими дослідниками в інших європейських країнах.



Рис. 4.1. Поширення ЦВС2 територією України впродовж 2007-2012 рр.

Незважаючи на те, що в Криму ЦВС2 було ідентифіковано в 100% зразків, неможливо чітко встановити поширеність вірусу на зазначеній території, оскільки було розглянуто лише 2 зразки з одної ферми в цій області. Також доволі мало зразків було досліджено з Волинської (1 з 2 позитивний,

що становить 50%), Кіровоградської (3 з 5 зразків позитивні, 60%), Чернівецької (1 з 2, 50%), Закарпатської (1 з 2, 50%), Луганської (1 з 2, 50%) областей. В Хмельницькій, Рівненській, Житомирській, Івано-Франківській областях ЦВС2 ідентифіковано не було. Однак не можна робити висновки про відсутність досліджуваного вірусу на вказаних територіях, так як було досліджено тільки з 2 до 4 зразків.

Підсумовуючи дані описаних довготермінових і великомасштабних досліджень, можна констатувати, що ЦВС2 є надзвичайно поширеним вірусом на всій території України. Вперше ідентифіковано цирковірус свиней 2 типу у 20 із 24 областей України та АР Крим. Таким чином, ЦВС2 є поширеним на всій території України, окрім Хмельницької Рівненської, Житомирської та Івано-Франківської областей, що можливо пов'язано з відсутністю великих промислових комплексів у вищевказаних адміністративних зонах, а також незначною кількістю досліджуваних зразків. Найбільшу кількість випадків захворювання зафіксовано у Дніпропетровській, Донецькій, Київській, Полтавській, Черкаській та Чернігівській областях, в яких частота виділення у період з 2007 по 2012 рік коливалась від 26,9 до 51,7%. Отримані результати опубліковано в статті [46].

4.2. Філогенетичний аналіз ізолятів ЦВС-2, ідентифікованих в Україні.

ЦВС2 є найменшим ДНК-вмісним вірусом і, як очікувалось, мав би бути досить консервативним. Однак сучасні ізоляти виявляють значні генетичні варіації що, безумовно пов'язано з інтенсивним промисловим вирощуванням свиней у всьому світі та профілактичними заходами [60, 188, 207]. Швидкість заміщення нуклеотидів для ЦВС2 оцінюється в порядку 1.2×10^{-3} заміни на сайт на рік, що є найбільшою зареєстрованою швидкістю заміщення для одноланцюгового ДНК-вірусу, дозволяючи ЦВС2 мати еволюційну динаміку подібну одноланцюговим РНК-вірусам [57, 88].

При вивченні ізолятів, поширених в межах країни необхідно встановлювати не лише факт наявності вірусу, а й визначати його приналежність до тієї чи іншої генетичної групи [202, 204]. Проведення філогенетичного аналізу дозволяє встановити еволюційні зв'язки, поширення та шляхи потрапляння ізолятів вірусу. Виокремлюють декілька генотипових груп ЦВС2, до яких відносять ізоляти, виділені як від свійських тварин так і від диких кабанів [39, 204]. Тому вивчення вірусу в межах країни має включати дані з обох популяцій.

4.2.1. Встановлення еволюційних зав'язків виділених українських ізолятів ЦВС2.

Популяція свійських тварин в Україні розповсюджена не рівномірно і сконцентрована в найбільших промислових господарствах. Враховуючи інтенсивний розвиток напрямку свинарства та відсутність власного селекційного потенціалу, в Україну було завезено велику кількість порід з різних куточків світу, а найбільше з Канади, Данії, Голландії, Франції, Німеччини. В той же час, в багатьох господарствах змішували тварин різного походження. Тому, на момент проведення дослідження, жодних припущень з приводу штамового різноманіття ЦВС2 в місцях відбору матеріалу не було. І на цьому етапі основним завданням було оцінити біорізноманіття ЦВС2 в спорадично обраних віддалених регіонах України. Нами проведено повногеномне секвенування 4 ізолятів вірусу виділених з 4 регіонів України, а саме з Черкаської, Харківської, Чернігівської та Запорізької областей. Всі послідовності ЦВС2 у цьому дослідженні мали довжину геному 1768 нт та виявлені ідентичності нуклеотидів в межах 95 - 100% (табл. 4.2), що вказує на наявність певних відмінностей між генотипами виділених ізолятів ЦВС2. Геном ЦВС2 представлений одноланцюговою ковалентно замкненою кільцевою амбісенсовою молекулою ДНК, розмір якої близько 1766-1768 п.н [71, 126].

Таблиця 4.2.

Порівняння українських ізолятів (амінокислотних та нуклеотидних послідовностей повного геному) з референс-штами ЦВС2.

Isolate PCV2	subgroup	АК, %	NT, %
swine_Chernigiv	1A/B	100	100
swine_Zaporigga	1A/B	100	100
swine_Cherkasy	2	87,1	95,2
swine_Kharkiv	2	87,1	94,9
PCV2_Uy_2_Cap	1A/B	91,9	96
PT-15152-03_cap	1A/B	92,7	97,1
NL_Control_1_capsid_protein	1A/B	91,1	96
FJFQ0511_cap	1A/B	91,1	95,7
YZ_cap_protein	1A/B	91,1	95,7
HN1-5_cap	1A/B	91,1	95,7
IL_capsid_protein	1A/B	91,9	96,3
09JX_Cap	1A/B	90,3	95,5
CHST_cap	1A/B	91,1	95,7
09GD_Cap	1A/B	91,9	96,3
C7201-1_capsid_protein	1A/B	90,3	95,2
CH3_capsid_protein	1A/B	100	99,5
PT-34765-06_cap	1A/B	100	99,5
NIVS-5_putative_capsid_protein	1A/B	100	99,5
WB-H-1_capsid_protein	1A/B	100	99,5
ZHZ1_cap_protein	1A/B	100	99,7
DK442case_capsid_protein	1A/B	99,2	99,5
Fd1_capsid	1A/B	100	99,5
AUT5_capsid_protein	1A/B	100	99,7
NL_Control_3_capsid_protein	1A/B	99,2	99,2
Henan_cap_protein	1A/B	100	99,5
SXTY14_ORF2	1A/B	100	99,7
ZHZ1_pig_gi1033208412	1A/B	100	99,7
AUT5_gi37791490	1A/B	100	99,7
SXTY_PCV_gi1031916872	1A/B	100	99,7
1397/2011_Vicenza_36_07/07/2011_	1A/B	100	99,7
SNUVR000463_gi573463974	1A/B	100	99,7
DK558control_gi156193221	1A/B	100	99,7

1C-China	1C	91,1	96,3
PCV2_Gen2-_Hungary	2	89,5	96

Вирівнювання послідовностей було здійснено за допомогою MEGA6 [181] з іншими доступними штамми в базі даних GenBank. Українські ізоляти з Чернігівської та Запорізької областей мають 100% ідентичність один з одним та високу ідентичність (від 95% до 99,7%) з штамми підгрупи 1А /В. Українські ізоляти з Черкаської та Харківської областей мають близько 100% ідентичності один з одним та високу тотожність (від 94% до 96%) з штамми підгрупи 2.

Філогенетичний аналіз реконструйований з 4 послідовностей [99] Черкаської, Харківської, Чернігівської, Запорізької областей України та послідовностей, опублікованих в базі GenBank, щАо представляють різні генотипи ЦВС2, показані на рис.4.2.

Як видно з рисунку, два українські ізоляти ЦВС2 належали до генотипу 1 (ЦВС2-1b), і два належали до генотипу 2 (ЦВС2-2a) відповідно до класифікації, запропонованої Grau-Roma та ін. [66] та Segales та ін. [172]. На підставі підгрупової класифікації, описаної раніше Olvera та ін. [141], було проведено порівняння та класифікацію нуклеотидів в діапазоні 262-267 та амінокислот 88-89 послідовності ORF2. Нуклеотидні послідовності "CCCCGC", "CCCCTC" та "AAAATC" є унікальними мотивами, характерними для ЦВС2 підгрупи 1А/В, 1С та ЦВС2-2а, відповідно. Амінокислота "PR" була виявлена тільки в підгрупі 1А/В, тоді як PL і KI були пов'язані з підгрупою 1С та ЦВС2-2а [28]. Проведений філогенетичний аналіз не показав жодних доказів рекомбінації, як це повідомлялося для ЦВС2, виділених у Гонконгу, Кореї та США [24, 61, 70, 88]. Також не було виявлено нових модифікованих вірус подібних варіантів та делетованих мутантів, що протягом останніх років часто виявляли в Азії [193, 194, 195, 196, 198, 199].

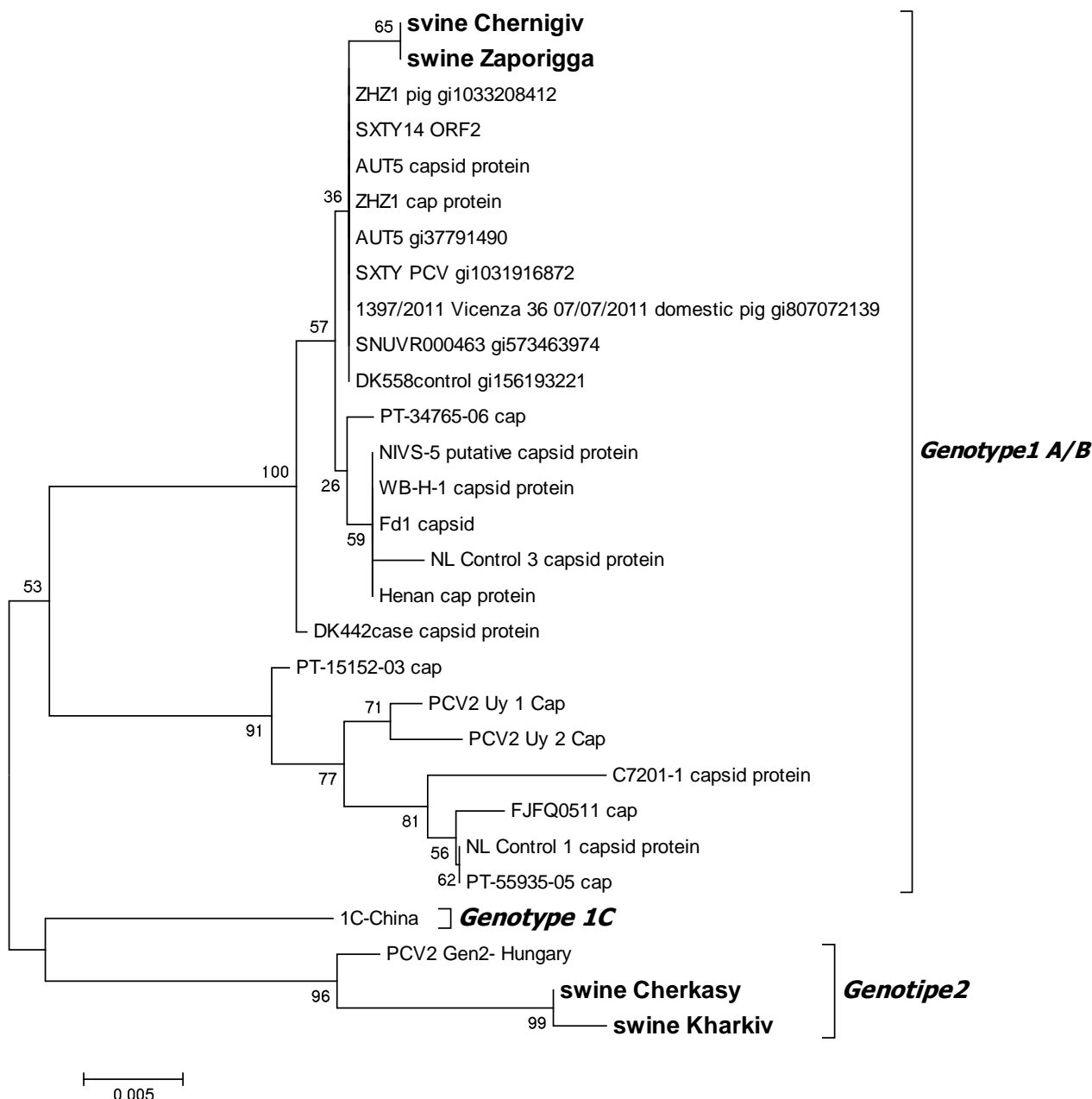


Рис. 4.2. Еволюційні зв'язки ЦВС2.

Однак ми спостерігали декілька амінокислотних замін в послідовностях українських ізолятів, що не було описано раніше. Дані результати можуть бути пов'язані з високою частотою мутацій ЦВС2, у порівнянні з іншими одноланцюговими ДНК-вірусами, що була оцінена на рівні $1,2 \times 10^{-3}$ замін /сайт /рік за даними Firth та ін. [58]. Тому виникнення будь-якого нового генотипу ЦВС2 можливе в майбутньому. Зразки в цьому дослідженні були зібрані з великих господарств з високою щільністю тварин, а отримані результати демонструють принаймні 2 джерела можливого завезення ЦВС2 в Україну

(Північна Америка і Європа). Як і у всьому світі, нами було підтверджено, що завезення генетичного селекційного матеріалу (свиноматок та сперми) являють собою основний шлях передачі різних генотипових груп вірусу між континентами. Дані результати було описано та опубліковано [44].

4.2.2. Генетична характеристика цирковірусу свиней 2 типу від диких кабанів з різних регіонів України.

Враховуючи той факт, що поширення цирковірусу свиней 2 типу найбільше описано для популяції свійських тварин, і зовсім мало даних щодо його розповсюдження серед диких кабанів [189], наступним етапом нашої роботи було встановлення генетичних особливостей ізолятів ЦВС2, виділених від диких кабанів і порівняння їх ізолятами з інших країн.

Також було досліджено рівень генетичного різноманіття ізолятів ЦВС2, поширених на рівні обох популяцій свиней в Україні. Дана інформація може бути використана для з'ясування еволюційних зав'язків ізолятів вірусу між вказаними групами. В роботі проведено виділення ДНК та сиквенування нуклеотидних послідовностей геномів ЦВС2, ізольованих від диких кабанів з чотирьох регіонів України. А також порівняння їх з сиквенсами ізолятів, виділених від свійських свиней в тих же регіонах.

Всі 4 послідовності українських ізолятів ЦВС2 від диких кабанів, мали довжину геному 1768 нт та рівень гомології нуклеотидних послідовностей між собою в межах 96-100%. В той же час, рівень гомології послідовностей українських ізолятів з послідовностями від диких кабанів з інших країн становив 91,5 - 99% (табл. 4.3), що свідчить про істотні відмінності між генотипами ЦВС2, ізольованих від диких кабанів з різних країн світу.

При порівнянні дерев, побудованих на основі нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, було встановлено подібність топології, що підтверджує обґрунтованість наших висновків (рис.4.3).

Таблиця 4.3.

Порівняння ізолятів ЦВС2 (амінокислотні та нуклеотидні послідовності повного геному), виділених від диких кабанів України та інших країн світу

	wb_Chernigiv_ UA_16		wb_Cherkasy_ UA_16		wb_Charkiv_ UA_16		wb_Zaporigga_ UA_16	
	NK	AK	NK	AK	NK	AK	NK	AK
P_circovirus_2_BJ0402	98,7	97,2	99	97	96	91,5	99,7	99,4
wild_boar_Germ	95,7	91,1	96	91,3	95,7	90,4	95,9	90,9
wild_boar_Croatia_09	96,2	91,8	96,4	92	99,7	99,1	96,2	91,5
wild_boar_Brazil_12	98,8	97,8	99	98	96,5	92,9	98,6	96,7
wild_boar_72/12_52_Brazil_12	98,5	96,5	98,6	96,3	95,9	90,9	99,4	98,7
wild_boar_72/12_49_Br	98,5	96,5	98,6	96,3	95,9	90,9	99,4	98,7
wild_boar_72/12_36_Br	98,4	96,5	98,5	96,3	95,8	90,9	99,4	98,7
wild_boar_72/12_35_Br	98,5	96,5	98,6	96,3	95,9	90,9	99,4	98,7
wild_boar_72/12_34_Br	98,4	96,3	98,6	96,1	95,8	90,7	99,4	98,5
wild_boar_BRA_JAV2_2008	98,7	97,2	98,8	97	96,1	91,5	99,7	99,4

Українські ізоляти з Чернігівської, Черкаської та Запорізької областей є найбільш подібними з ізолятами з Бразилії та Німеччини. В той же час, ізолят з Харківської області є найбільш подібним з ізолятом з Хорватії, вперше описаним у 2009 році.

Таким чином можна припустити, що ізоляти ЦВС2, виділені від диких кабанів в Україні, не є характерно автентичними для даної популяції.

Порівняння циркулюючих ізолятів від диких та свійських тварин в Україні показало, що більшість з них є досить різними і належать до різних підгруп. Така ж ситуація була описана і в інших європейських країнах. Але штами, виділені від свійських свиней з Запорізької та Чернігівської областей, мають спільне походження з штамом, виділеним від диких кабанів у Запорізькій області.

Крім того, штами, виділені від свиней з Черкаської та Харківської областей, мають спільне походження з штамми, виділеними від диких кабанів з Харківської області (рис.4.4).

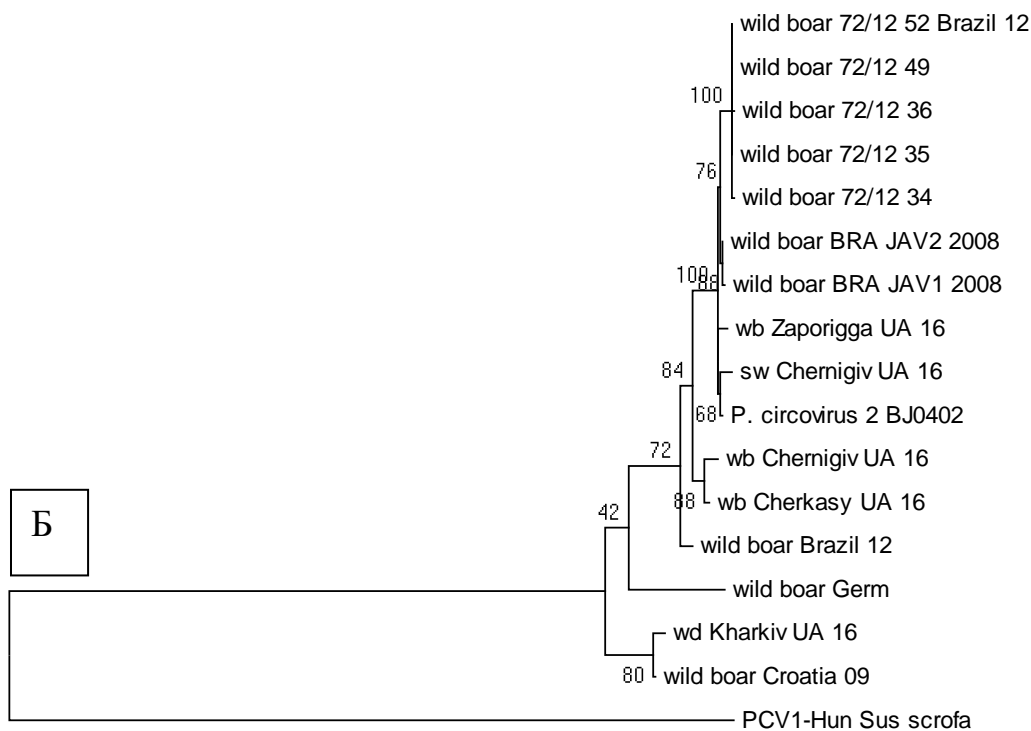


Рис. 4.3. Молекулярний філогенетичний аналіз послідовностей ЦВС2, виділених від диких кабанів України та світу. А: аналіз амінокислотних послідовностей; Б: аналіз нуклеотидних послідовностей.

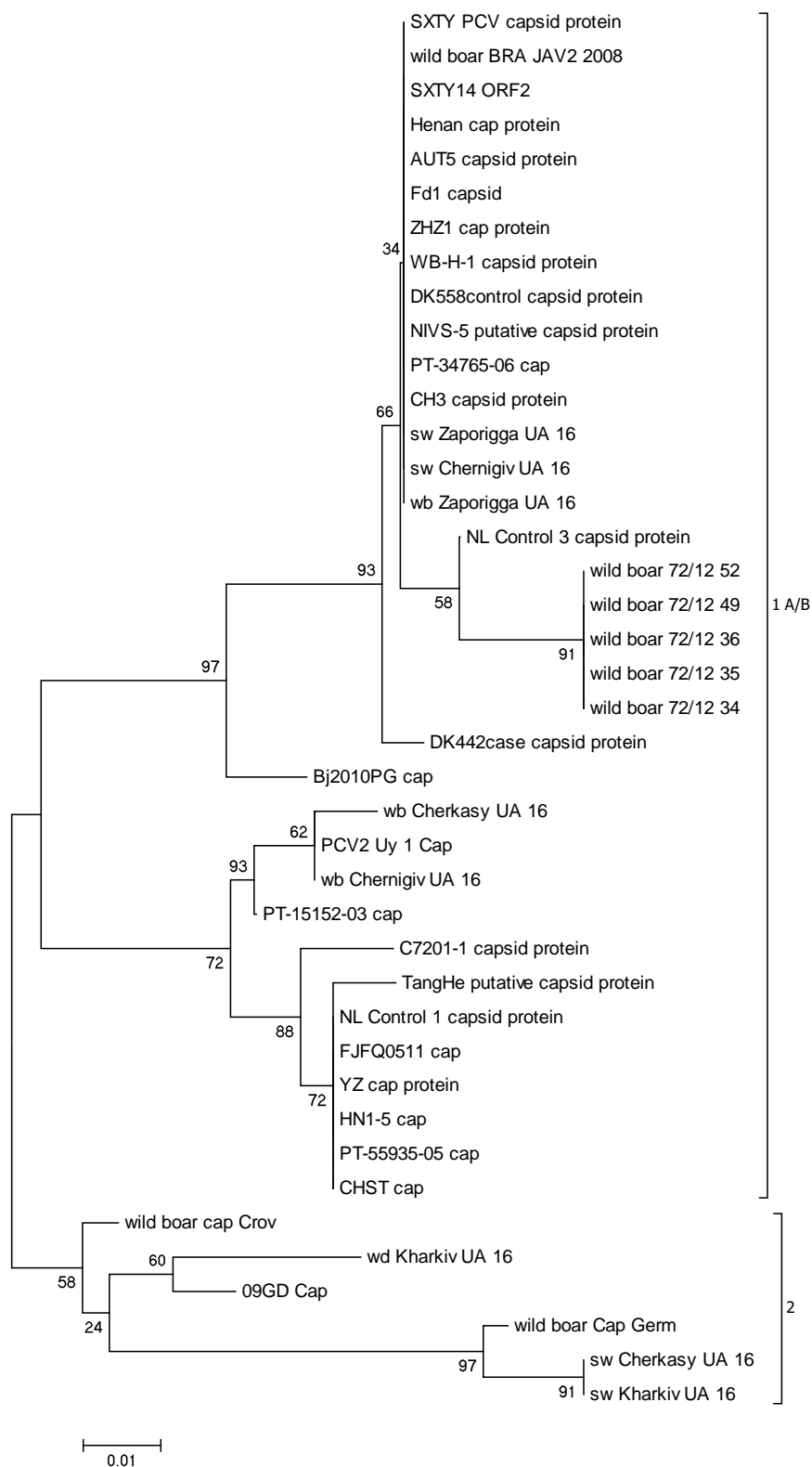


Рис.4.4. Еволюційні зв'язки ізолятів ЦВС2, виділених від диких кабанів та свійських свиней.

Цей факт демонструє загальне походження описаних ізолятів і може бути спричинений прямою передачею ЦВС2 між кабанями та

сільськогосподарськими тваринами, що не допускається політикою біозахисту. Аналіз філогенетичного дерева (рис.4.4.) дозволяє класифікувати досліджені ізоляти у дві підгрупи відповідно до класифікації, запропонованої Grau-Roma та ін. [66]. Ізоляти, виділені від диких кабанів із Запорізької, Чернігівської та Черкаської області знаходяться в кластері ізолятів 1A/V підгрупи разом з ізолятами ЦВС2 від кабанів з Бразилії та Німеччини. В той же час, ізоляти із Харківської області були розділені на 2 субкластери, однак належать до одного кластеру ізолятів підгрупи 2 разом з послідовністю ЦВС2 від диких кабанів з Хорватії.

Генетичні особливості українських ізолятів ЦВС2 показали високий рівень різноманітності. Як було описано, виявлені ізоляти належать до обох підгруп (1A\B і 2) штамів ЦВС2. Окрім забезпечення цікавої моделі, яка може бути застосована до інших захворювань людини та тварин, це викликає інтерес до постійного моніторингу вірусної епідеміології, особливо для вірусів, що швидко розвиваються шляхом мутацій, таких як ЦВС2, та необхідності поділитися відповідною інформацією, щоб запобігти або негайно діяти у відповідь на потенційну виникнення фактичних мутантів, що уникають вакцинного імунітету [24, 193, 199].

Отже, в результаті дослідження було показано що ізоляти з Чернігівської, Запорізької, Черкаської та Харківської областей відносяться до різних субгруп ЦВС2 та мають різне походження. Крім того, встановлено досить високий рівень подібності з ізолятами з Хорватії та Бразилії. В той же час, показано подібність ізолятів, виділених від диких кабанів з Запорізької та Чернігівської областей з такими, що були виділені від свиней з промислових господарств. А отже, в Україні доведено факт, прямої передачі цирковірусу свиней 2 типу між дикими кабанями та свійськими тваринами, що значним чином ускладнює можливості передбачення епізоотологічної ситуації та потенційних спалахів ЦВС2 в обох популяціях.

Проте, за таких результатів, не можливо чітко стверджувати який вектор передачі був присутнім. З одного боку, найбільш вірогідним є припущення,

що вказані ізоляти ЦВС2 були завезені з інших країн світу та передались від свійських свиней до диких кабанів. Шляхи такої передачі можуть бути різними, в тому числі при безпосередньому контакті та аліментарно. Однак, не можливо виключити той факт, що популяція диких кабанів є природнім резервуаром для ЦВС2 і передача могла бути й зворотною, від диких кабанів до свійських свиней. Особливо це стосується ізоляту, виділено від диких кабанів з Харківської області, який не має близькоспоріднених ізолятів, виділених від свійських свиней, а лише ізоляти виділені від свійських свиней тієї ж області. Описати шляхи такої передачі важко, особливо враховуючи той факт, що наразі не відомо жодного можливого спільного вектору для ЦВС2. Тим не менше, отримані результати є важливими для аналізу еволюції вказаного вірусу і розкривають епізоотологічні особливості Українських ізолятів. Дані результати описано та опубліковано [42].

РОЗДІЛ 5

РОЗРОБКА КОМПЛЕКСНОГО ПІДХОДУ ДО ДІАГНОСТИКИ ЦВС2-АСОЦІЙОВАНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Щороку українським господарствам завдаються великі економічні збитки, зумовлені інфікуванням свиней цирковірусом свиней 2 типу та розвитком у них захворювань, що він викликає. Особливою характеристикою захворювань, асоційованих з цирковірусом свиней 2 типу є те, що найчастіше розвиток синдромів відбувається за змішаної інфекції, викликаній ЦВС2 та іншими патогенами свиней як вірусної етіології, наприклад, вірус репродуктивно-респіраторного синдрому, вірус грипу, парвовірус свиней [2, 10, 86, 93, 146, 154], так і бактеріальної: *Mycoplasma hyopneumonia*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*. Крім того, показано можливість розвитку згаданих синдромів при інфекції ЦВС2 та імуномодуляції тварин [10, 74, 144]. А це в свою чергу значно ускладнює діагностику цирковірус-асоційованих синдромів. Крім того, в польових та лабораторних дослідженнях із використанням гнотобіонтних тварин неодноразово було продемонстровано, що тільки наявність генетичного матеріалу вірусу в тканинах тварини не є визначальним діагностичним показником [149].

З одного боку, високий рівень контагіозності та смертності свиней за згаданого захворювання зумовлює необхідність розроблення та застосування експрес-методів діагностики з метою як найшвидшої ідентифікації збудника у зразках та запровадження карантинних і профілактичних заходів. Таким методом може бути створення тест-систем на основі полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, що є найшвидшим методом виявлення ЦВС2 як за хронічного та персистентного перебігу захворювання, так і для диференційного виявлення згаданого вірусу від інших збудників захворювань свиней. Також лише за допомогою вказаного методичного підходу можливим є виявлення вірусоносійства, що необхідно для контролю за розповсюдженням

інфікування [72, 78, 92]. Однак це не забезпечує діагностичний аналіз наявності саме тих патолого-морфологічних змін, що викликані ЦВС2, а не іншими патогенами, а також диференціацію всіх можливих ЦВС2-асоційованих синдромів між собою. Саме тому, для найбільш точної діагностики ЦВС2-асоційованих захворювань, необхідним є комплексний підхід із застосуванням ПЛР та шляхом проведення гістологічного та імуногістохімічного аналізу, що дає можливість оцінювати характер патолого-морфологічних змін тканин органів та встановлювати зв'язок між наявністю вірусу та синдромом, що розвивається [32, 91, 102].

5.1. Виявлення ЦВС2 в патологічному матеріалі свиней методом ПЛР в реальному часі.

5.1.1. Характеристика праймерів та зондів, що були використані для проведення ПЛР в режимі реального часу.

В результаті вивчення поширення та філогенетичного аналізу українських ізолятів ЦВС2, нами було зроблено висновки про їх високий рівень генетичної різноманітності. Крім того, постійний розвиток свинарства та завезення тварин з різних куточків світу, створюють умови для появи нових ізолятів, що не були поширені досі. Тому для діагностичної тест-системи з метою виявлення генетичного матеріалу цирковірусу свиней 2 типу у відібраних зразках методом ПЛР в реальному часі, нами було розроблено праймери та зонди, які б характеризувались якомога вищим рівнем універсальності, повною унікальністю та рядом переваг порівняно з уже існуючими та описаними.

Для цього було проведено аналіз повних нуклеотидних послідовностей ізолятів ЦВС2, доступних в GenBank, що належать до різних генотипових груп та були виділені в різних країнах світу. Таким чином, до аналізованої групи ввійшли такі ізоляти: Porcine circovirus 2 P0404c/03, Porcine circovirus 2

R0255/209/03, Porcine circovirus 2 S0255/210/03, Porcine circovirus 2 strain HB1, Porcine circovirus 2 strain HB2, Porcine circovirus 2 strain Jiangsu/2010, Porcine circovirus 2 strain SD3, Porcine circovirus 2 strain SD5, Porcine circovirus 2 strain SD6, Porcine circovirus 2 T0181c/03, виділений в Бразилії; Porcine circovirus 2 U0168/03, Porcine circovirus 2 Z0161b/03, Porcine circovirus type 2-B, Porcine circovirus type 2-C, Porcine circovirus type 2-D, Porcine circovirus type 2-E.

За допомогою програми Vector NTI 11 було проведено вирівнювання нуклеотидних послідовностей вказаних 16 ізолятів та пошук максимально консервативних ділянок, специфічних для всіх ізолятів. Таку послідовність було ідентифіковано між 588 та 706 нуклеотидами гену полімерази (BP3-1): AAAAGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCGGAAACCACATACTGGA AACACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAAGTGGT TGTATTGATGACTTTTATGG. З 16 аналізованих послідовностей заміна в позиції 633 була характерна лише для ізоляту Porcine circovirus 2 T0181c/03, виділеного в Бразилії (код доступу якого в базі даних GenBankEU057186.1): AAAAGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCGGAAACCACATATTGGA AACACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAAGTGGT TGTATTGATGACTTTTATGG.

Таким чином, було зроблено висновки, про необхідність уникнення даного нуклеотиду при конфігуруванні послідовностей праймерів та зондів. З урахуванням послідовності виявленої консервативної ділянки, довжиною 119 нуклеотидів, розмір цільової послідовності, яку б фланкували розроблені прямий та зворотній праймери встановлювали на рівні 90-110 нуклеотидів. Для розрахунку праймерів було використано наступні параметри, які задавали в програмі Primer3 v 4.0.0 (таблиця 5.1).

Проаналізувавши всі можливі варіанти було обрано прямий та зворотній праймери, а також 2 можливі варіанти олігонуклеотидних зондів, які максимально відповідали заданим параметрам. А також, за допомогою сервісу розрахунку температур плавлення та гібридизації (http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature/demo.php?primer),

урахуванням концентрації хлориду магнію на рівні 2,5 мМ було встановлено їх значення для підібраних олігонуклеотидів (Таблиця 5.2).

Таблиця 5.1

Характеристика параметрів, використаних при конфігуруванні праймерів та зондів для проведення ПЛР в режимі реального часу

Параметр	Мінімальне значення	Оптимальне значення	Максимальне значення
Розмір цільової ділянки, нуклеотидів	90	100	110
Довжина прямого та зворотнього праймерів, нуклеотидів	19	22	25
Температура гібридизації прямого та зворотнього праймерів, °С	60	62	64
Довжина олігонуклеотидного зонду, нуклеотидів	22	25	28
Температура гібридизації олігонуклеотидного зонду, °С	65	67	69

Таблиця 5.2

Характеристика прямого та зворотнього праймерів та олігонуклеотидних зондів, розроблених для виявлення генетичного матеріалу цирковірусу свиней 2 типу методом ПЛР в режимі реального часу

Назва олігонуклеотиду	Нуклеотидна послідовність	Розмір, н.о.	Температура гібридизації, °С
PCVLD_F	5'- СТААТТТТГСА	22	60,4

	GACCCGGAAAC- 3'		
PCVLD_R	5'- TCAATAACAAC CACTTCTTCAC CA -3'	24	60,8
PCVLD_ probe1	5'- GAAACAAGTGG TGGGATGGTTA CCA -3'	25	65,4
PCVLD_ probe2	5'- CACCTAGAAAC AAGTGGTGGGA T GG -3'	25	65,5

Розмір ділянки, яку фланкують вказані прямий та зворотній праймери становить 91 н.о. Далі, використовуючи сервіс BLAST NCBI, запропонований Міжнародним центром біоінформаційних технологій, США, що доступний за посиланням: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome, виконали перевірку аналітичної специфічності розроблених унікальних праймерів та зондів.

В результаті чого було встановлено, що нуклеотидна послідовність прямого праймеру PCVLD_F 5'-СТААТТТТGCAGACCCGGAAAC-3' характерна виключно для штамів та ізолятів цирковірусу свиней 2 типу (Strain-s & Isolate-s Porcine circovirus 2). Аналогічно, послідовність зворотнього праймеру PCVLD_R 5'-TCAATAACAACCACTTCTTCACCA -3', також характерна лише для штамів та ізолятів ЦВС-2 (Strain-s & Isolate-s Porcine circovirus 2). В

той же час, послідовності обох олігонуклеотидних зондів PCVLD_probe1: 5'-GAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCA -3' та PCVLD_probe2: 5'-CACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGG -3' є характерними для штамів та ізолятів цирковірусу свиней 2 типу (Strain-s & Isolate-s Porcine circovirus 2), а також для некласифікованого делетованого штаму цирковірусу свиней NH2-3 (Porcine circovirus isolate HN2-3 truncated), код доступу якого в базі даних GenBank KC415247.1, що був вперше ідентифікований та описаний в квітні 2013 в Китаї [200]. Отже, обидва розроблені олігонуклеотидні зонди володіють умовно однаковими показниками специфічності. Проте, враховуючи особливості положення вказаних зондів на нуклеотидній послідовності для діагностичної системи було обрано зонд PCVLD_probe1, не зважаючи на те, що зворотній праймер гібридується на наступному нуклеотиді після зонду.

Таким чином, можемо зробити висновки, про абсолютну унікальність та 100% аналітичну специфічність розроблених праймерів та зондів, які, крім того, характеризуються високими термодинамічними та реакційними показниками.

5.1.2. Виявлення ДНК цирковірусу свиней 2 типу в ліофілізованих сироватках крові від свиней.

З метою перевірки універсальності та відтворюваності розробленої нами тест-системи на основі праймерів та зондів, що були описані вище, до виявлення різних ізолятів ЦВС2, було проведено «сліпі» дослідження з використанням ліофілізованих сироваток крові свиней, що містили різну кількість генетичного матеріалу ЦВС2. Дані зразки було придбано у міжнародного центру «GD animal health» в рамках участі у кругових випробуваннях «PCV2 PCR ring trial».

Отож, в результаті проведеного тестування нами було отримано відтворювані результати по 24 зразкам з 8 стандартизованих сироваток крові

у 3-х розведеннях. В якості внутрішнього контролю були використані праймери та зонд до послідовності бета-актину.

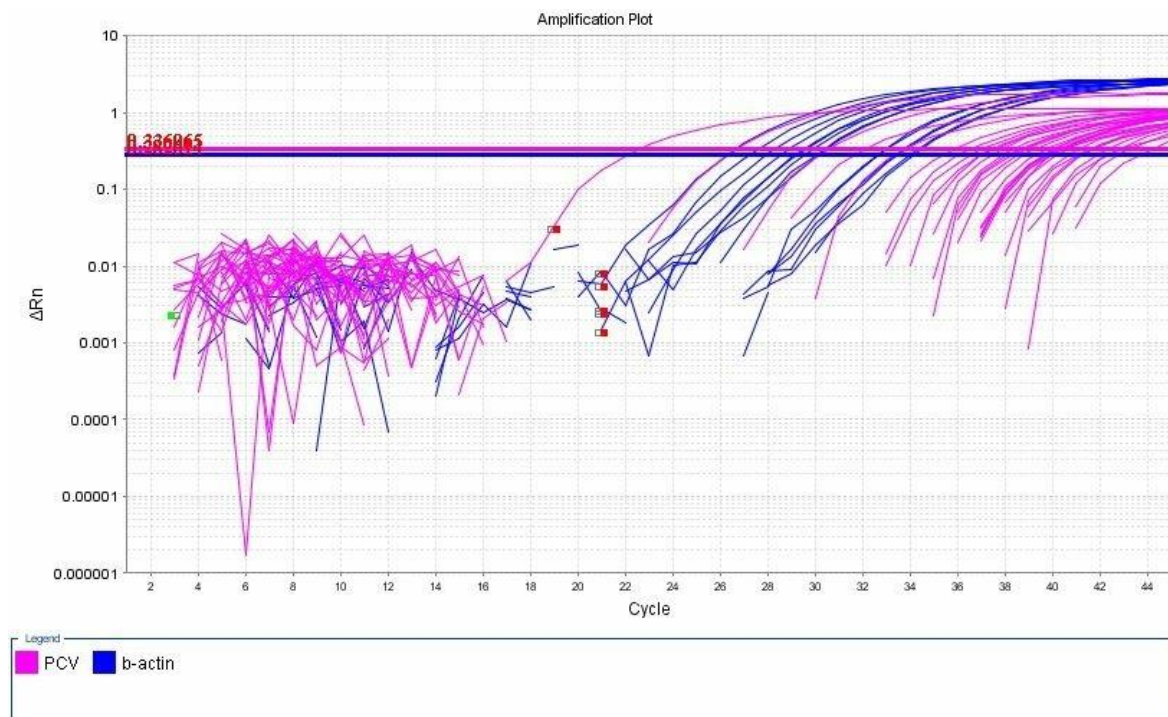


Рис. 5.1. Результати ПЛР в реальному часі: криві ампліфікації.

Таким чином, з досліджених нами зразків було отримано позитивний результат у 7 з 8 сироваток крові в 3 розведеннях. При чому, вихідна концентрація ЦВС2 в них варіювала в діапазоні від $1:10^2$ до $1:10^7$. Дані результати відображали 100% рівень чутливості, оскільки саме 7 з 8 вихідних зразків були позитивними, а 1 з 8 – негативним. Варто відмітити, що деякі учасники не детектували розведення вище $1:10^5$, тоді як за допомогою розробленої та адаптованої нами тест-системи, детектували абсолютно всі розведення ЦВС2, у всіх зразках де містилась ДНК цього вірусу. Крім того, отримані нами значення C_t задовольняли очікувані діапазони і відповідали вихідним значенням.

В результаті проведених досліджень було сформовано протокол участі та надіслано для перевірки в міжнародний центр «GD», який в свою чергу проаналізував наші дані, та надіслав нам загальний протокол даних кругових досліджень «Report of the 2016 International Proficiency Testing Scheme (PTS) for porcine circovirus type 2 (PCV-2) DNA detection in serum samples», а також

сертифікат відповідності, що затверджував можливість використання нашої тест-системи для лабораторних досліджень матеріалу свиней з метою виявлення ЦВС2 методом ПЛР в реальному часі. Таким чином проведена апробація розробленої нами тест-системи задовольнила внутрішні вимоги лабораторії та дозволила впровадити її в рутинне діагностичне користування.

5.1.3. Ідентифікація ЦВС2 в зразках від свиней з респіраторною патологією в 2014-2015 роках.

Україна є державою високого ризику для поширення нових інфекційних захворювань свиней. І, як було показано нами вище, в період з 2007-2012 років ЦВС2 був одним з найбільш поширених патогенів свиней в державі. Однак, у зв'язку з масово впровадженою вакцинопрофілактикою в промислових господарствах України, змінився характер протікання захворювання в окремих локусах, і, можливо, міг змінитися характер поширення серед різних областей України. Раніше нами було показано, що найчастіше ЦВС2 виявляли у Північній, Центральній та Східній частинах України, а найменше - у Південній та Західній Україні. Однак, враховуючи швидку тенденцію зміни епізоотичної ситуації, доцільним є визначення географічної залежності виявлення ЦВС2 та його асоціації з розвитком респіраторних патологій свиней у 2014-2015рр., як найбільш поширеним ЦВС2-асоційованим синдромом [94].

Проаналізований матеріал включав зразки легені та лімфатичних вузлів з 69 свиней у віці від 45 до 145 днів. Ці зразки було відібрано з різних регіонів України.. У результаті ПЛР в реальному часі, проведеного з використанням розробленої нами тест-системи було встановлено, що ДНК ЦВС2 виявлено у 33 (48%) зразках. Дані результати у розрізі областей, засвідчують наявність циркуляції у 10 з 17 областей (Центральна, Східна та Західна частини України) (рис. 5.2). Протягом останніх 10 років була проведена інтенсивна вакцинація ЦВС2 у всьому світі. Те ж саме відбувалося в Україні, але

інтенсивність розподілу залишається високою. Це пов'язано з розвитком низки патологічних синдромів; один з них - складне захворювання органів дихання. Це означає, що застосування вакцинації має лише частковий ефект і не сприяє зменшенню циркуляції вірусу або елімінації його з популяції свиней. Отже наразі існує потреба в пошуку додаткових методів впливу на його циркуляцію, включаючи біотехнологію.

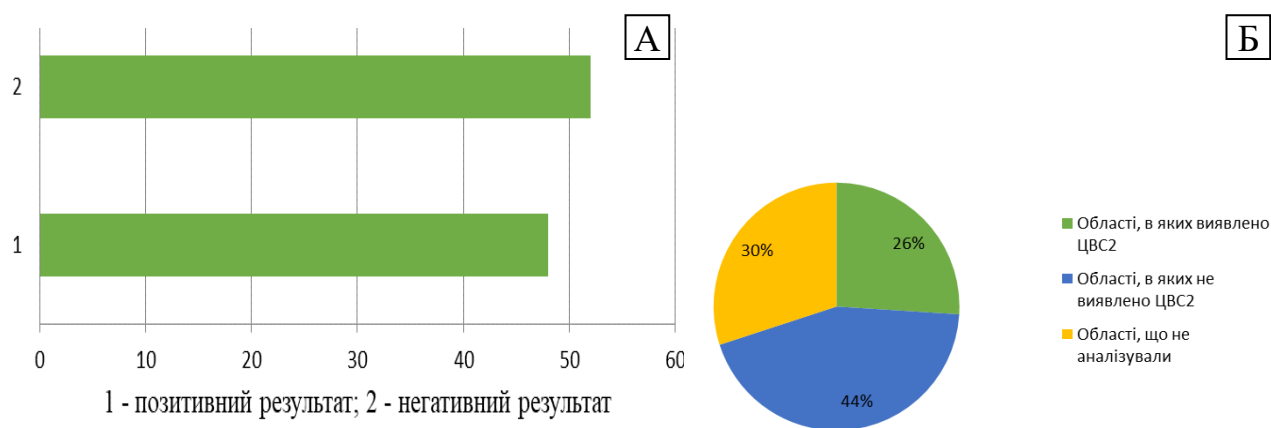


Рис. 5.2. Частота виявлення ЦВС2 в тканинах свиней з респіраторною патологією (А) та у розрізі областей України (Б).

Крім дослідження описаних вище епізоотологічних та діагностичних завдань, важливо було провести апробацію розробленої нами тест-системи для рутинних діагностичних досліджень. Тому результати, отримані в ході проведення даних досліджень за допомогою розробленої нами тест-системи на основі ПЛР в реальному часі детально аналізували та порівнювали з такими, що були отримані методом звичайної ПЛР.

Таким чином, розроблений молекулярно-біологічний підхід із використанням праймерів PCVLD_F і PCVLD_R та ДНК-зондів PCVLD_probe1 й PCVLD_probe2 дозволяє достовірно виявляти цирковірус свиней 2 типу у матеріалі тканин від свиней різного віку і забезпечує високий рівень ефективності.

5.2. Гістологічні дослідження патологічного матеріалу.

5.2.1. Гістологічний аналіз патологічних змін у тканинах уражених тварин.

Для встановлення ЦВС2-асоційованих синдромів і підтвердження діагнозу, лише виявлення генетичного матеріалу вірусу методом ПЛР не достатньо, оскільки факт циркуляції даного вірусу можливий без видимих симптомів. Саме тому, важливим є виявлення патолого-морфологічних змін на рівні тканин, що дозволяє діагностувати та відокремити різні ЦВС2-асоційовані синдроми, оцінити ступінь розвитку патології.

Гістологічний аналіз патолого-морфологічних змін проводили в тканинах органів, відібраних від 69 свиней, у зразках від яких було виявлено цирковірус свиней 2 типу методом ПЛР.

У результаті аналізу було встановлено, що у переважної більшості обстежених тварин (37 з 54) спостерігаються патологічні зміни у лімфатичних вузлах. Втім у 17 тварин структура зазначеного органу була збережена (рис. 5.3).

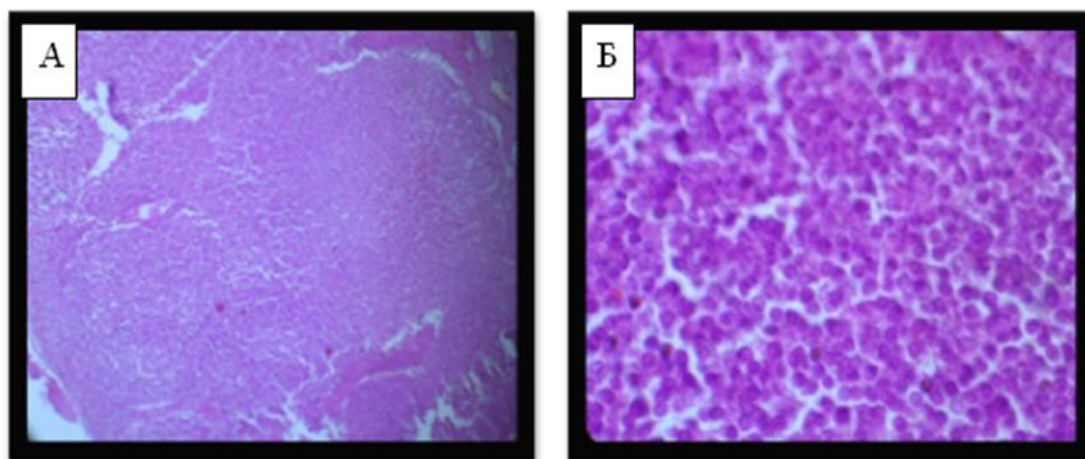


Рис. 5.3. Структура лімфатичного вузла свиней у нормі: А – збільшення в 400 разів, Б – збільшенн в 4000 разів.

Водночас, серед патологічних змін, що були відмічені в різних лімфатичних вузлах, у 2-х випадках спостерігали часткове виснаження фолікулів, що становило близько 10 % від норми (рис. 5.4). У 12 зразках

пахових, перибронхіальних та мезентеріальних лімфатичних вузлів, виснаження фолікулів становило близько 20 %, а також було відмічено зони некрозу лімфоїної тканини (рис. 5.4, В). Водночас, виснаження фолікулів лімфовузла на рівні 40% було виявлено у 10 досліджених випадках, а також встановлено наявність значних ділянок некрозу лімфоцитів та сполучнотканинного заміщення уражених зон (рис. 5.4, Г).

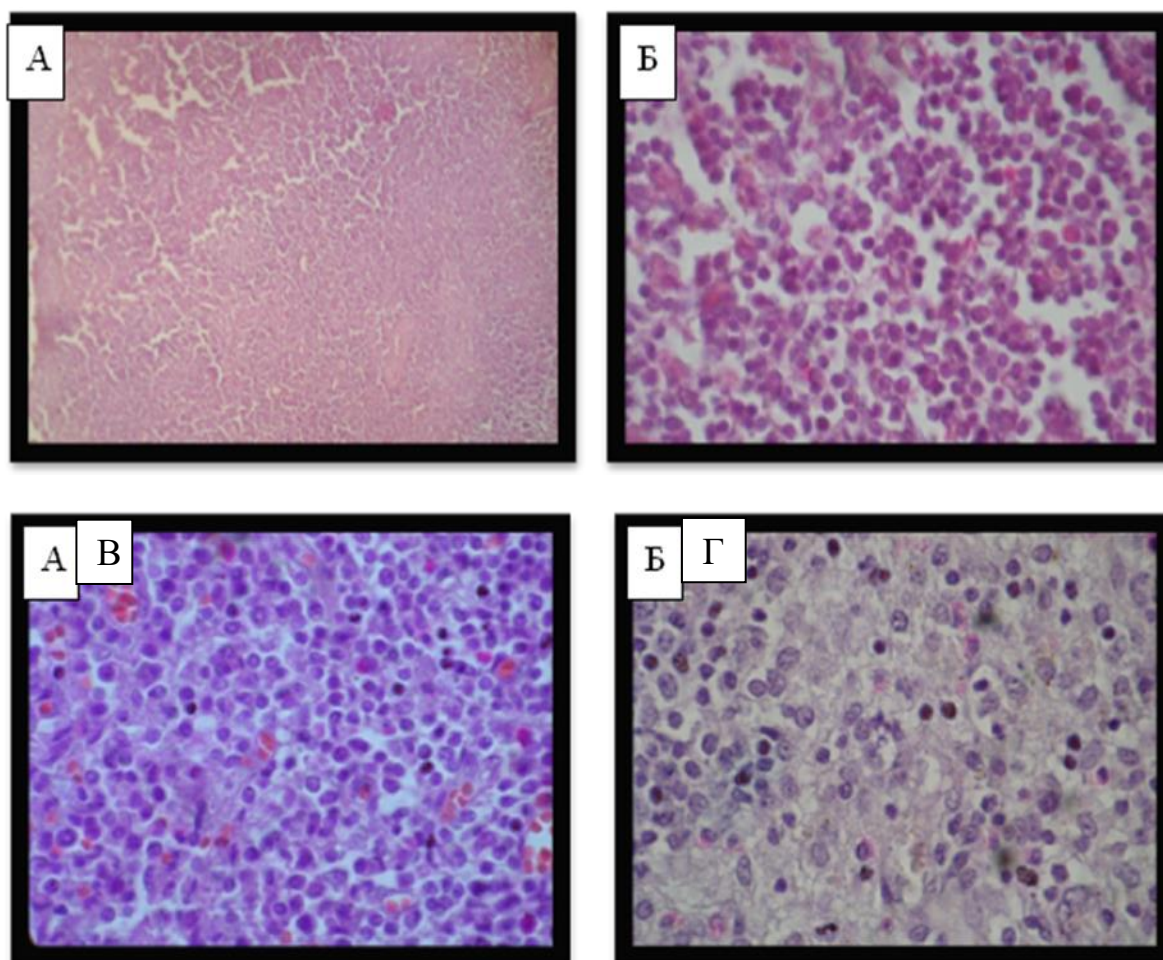


Рис. 5.4. Виснаження фолікулів лімфатичного вузла свиней А – на 10%, збільшення в 400 разів; Б – на 10%, збільшення в 4000 разів; В– виснаження фолікулів на 20 %, частковий некроз лімфоцитів, збільшення в 4000 разів; Г – виснаження фолікулів на 40 %, зони некрозу лімфоцитів, сполучнотканинне заміщення, збільшення в 4000 разів.

Значно вищі рівні ураження тканини лімфатичного вузла було зареєстровано у 8 випадках і встановлено, що структура органу була зруйнованою, а рівень виснаження фолікулів сягав близько 70 %, крім того

були наявні обширні зони некрозу тканини (рис. 5.5 А, Б). У 5 досліджених зразках пахових та мезентеріальних лімфатичних вузлів було встановлено 100 % виснаження фолікулів, некроз лімфоцитів та наявність повного заміщення структури органу сполучною тканиною (рис. 5.5, В, Г).

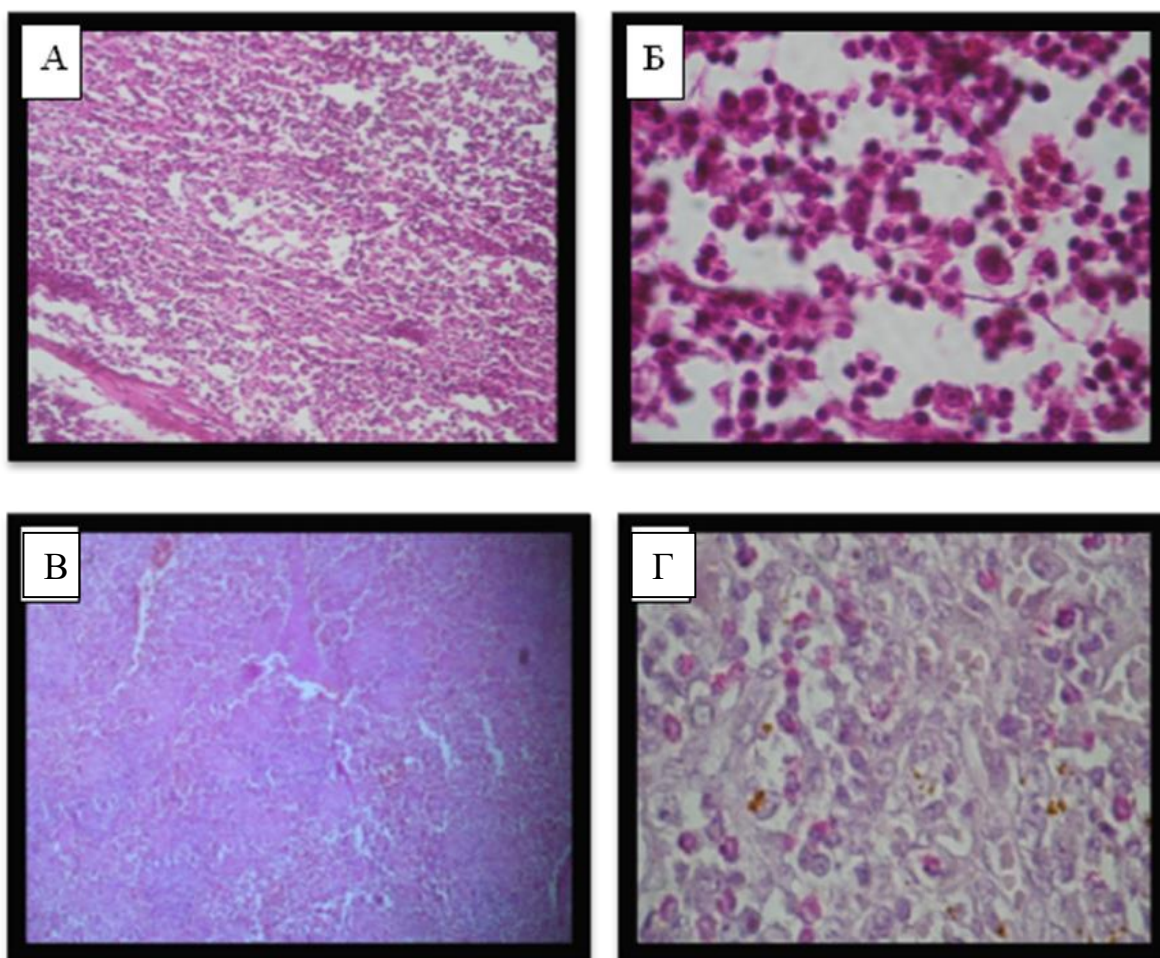


Рис. 5.5. Виснаження фолікулів лімфатичного вузла свиней, некроз лімфоцитів: А – на 70 %, збільшення в 400 разів; Б – на 70%, збільшення в 4000 разів; В - на 100 %, некроз лімфоцитів, сполучнотканинне заміщення органу, збільшення в 400 разів, Г – на 100 %, некроз лімфоцитів, сполучнотканинне заміщення органу, збільшення в 4000 разів.

Окрім зареєстрованих змін тканини лімфатичних вузлів, патолого-морфологічні ураження спостерігалися і у структурі іншого органу імунної системи свиней – селезінці. Так, виснаження білої пульпи селезінки на рівні 15 % зареєстрували у 22 зразках від тварин (рис. 5.6, А, Б).

У 9 досліджених зразках виснаження білої пульпи селезінки сягало 70 %, також було відмічено наявність великих ділянок некрозу лімфоцитів та сполучнотканинного заміщення структури даного органу (рис. 5.6, В). Крім того, у 7 зразках селезінки свиней було зареєстровано повне руйнування структури органу, 100 % виснаження білої пульпи з абсолютним некрозом лімфоцитів та сполучнотканинним заміщенням (рис 5.6, Г).

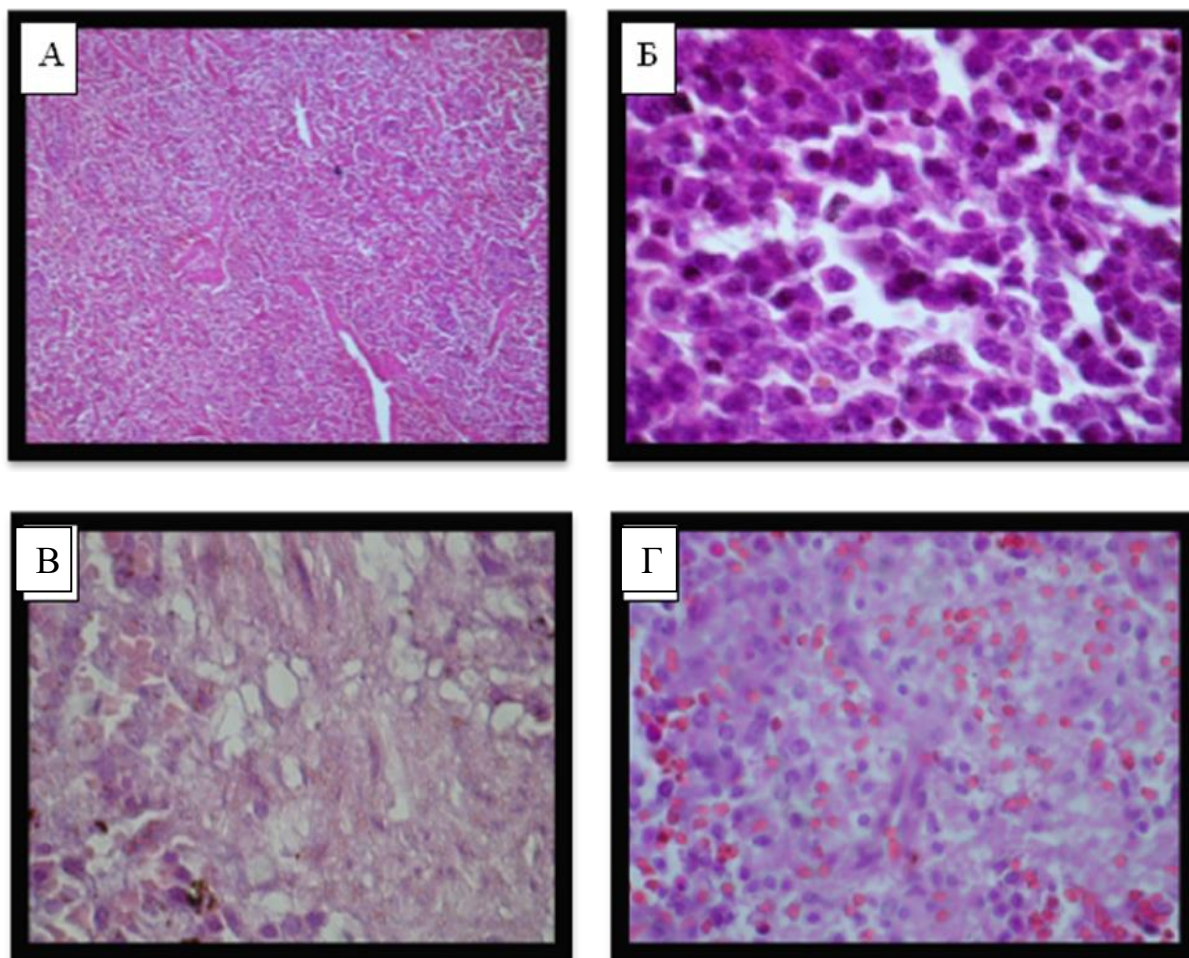


Рис. 5.6. Виснаження білої пульпи селезінки свиней: А – на 15 %, частковий некроз лімфоцитів, збільшення в 400 разів; Б – на 15 %, частковий некроз лімфоцитів, збільшення в 4000 разів; В – на 70%, некроз лімфоцитів, сполучнотканинне заміщення селезінки свиней, збільшення в 4000 разів; Г - на 100%, сполучнотканинне заміщення селезінки, збільшення в 4000 разів.

Також патолого-морфологічні зміни було виявлено у легенях досліджених зразків від 26 з 54 свиней. А саме, було зареєстровано значне потовщення інтерстицій легень за рахунок лімфоцитарної інфільтрації та некротичні зміни паренхіми органу (рис. 5.7). Крім того, спостерігали велику

кількість крововиливів у легеневій тканині, а особливо у перибронхіальних ділянках, а також перибронхіальну фіброплазію та капілярний виразковий бронхіт (рис 5.8).

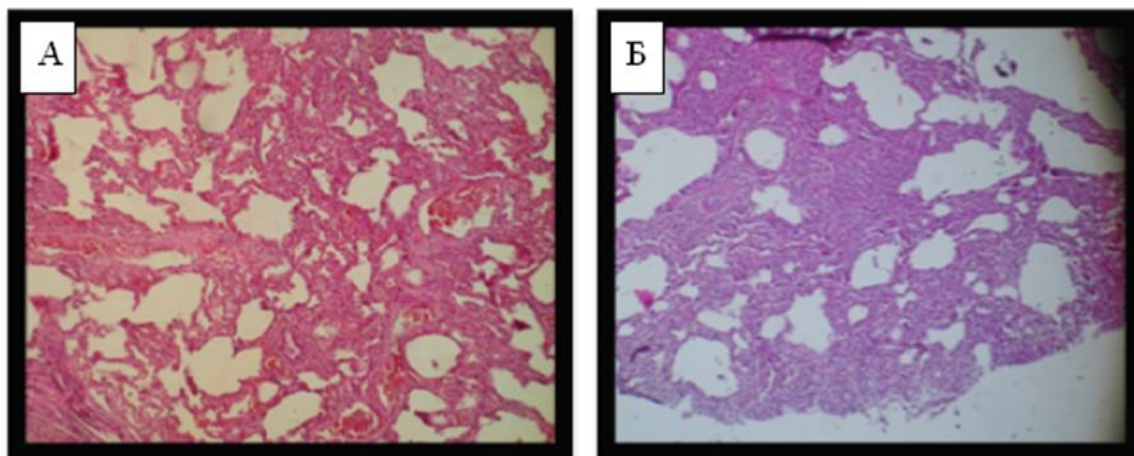


Рис. 5.7. Патолого-морфологічні зміни структури легень, збільшення в 400 разів: А – некротичні зміни паренхіми органу, Б – значне потовщення інтерстицій легень.

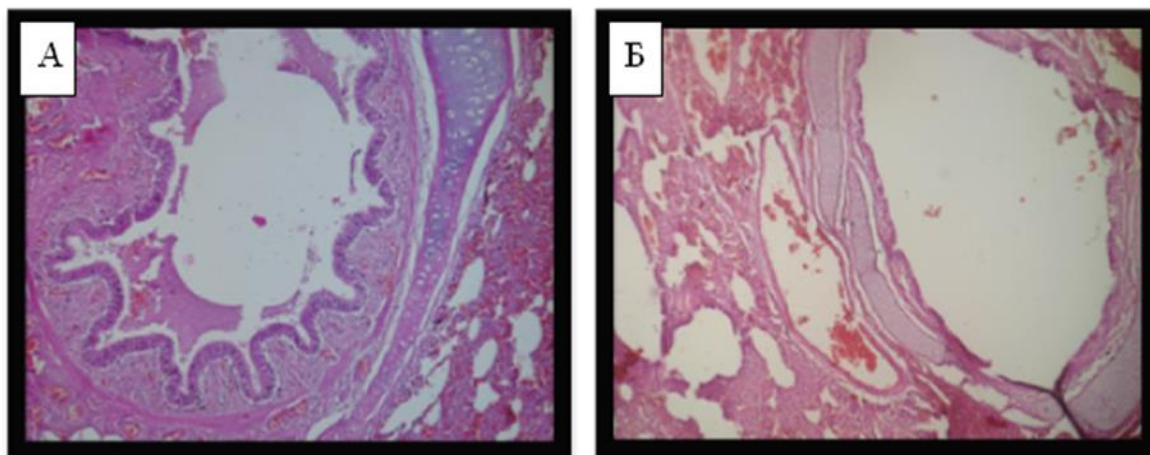


Рис. 5.8. Патолого-морфологічні зміни структури легень: А – структура бронху збережена (збільшення у 800 разів), Б – значна кількість крововиливів у перибронхіальних ділянках, капілярний виразковий бронхіт (збільшення у 400 разів).

При дослідженні структури кишечника у 13 з 54 досліджених зразків спостерігалися крововиливи у підслизовій оболонці органу, некротичні зміни епітелію слизової та підслизової оболонок і вкорочення ворсинок. Патолого-морфологічні зміни кишечника характеризувались також наявністю

лімфоцитарних інфільтрацій у підслизовій оболонці, що призводило до втрати структури органу. Втім у 41 з 54 досліджених зразків кишечника свиней значних морфолого-патологічних змін виявлено не було. У цих зразках реєстрували наявність лише незначних зон некрозу епітелію слизової оболонки (рис. 5.9).

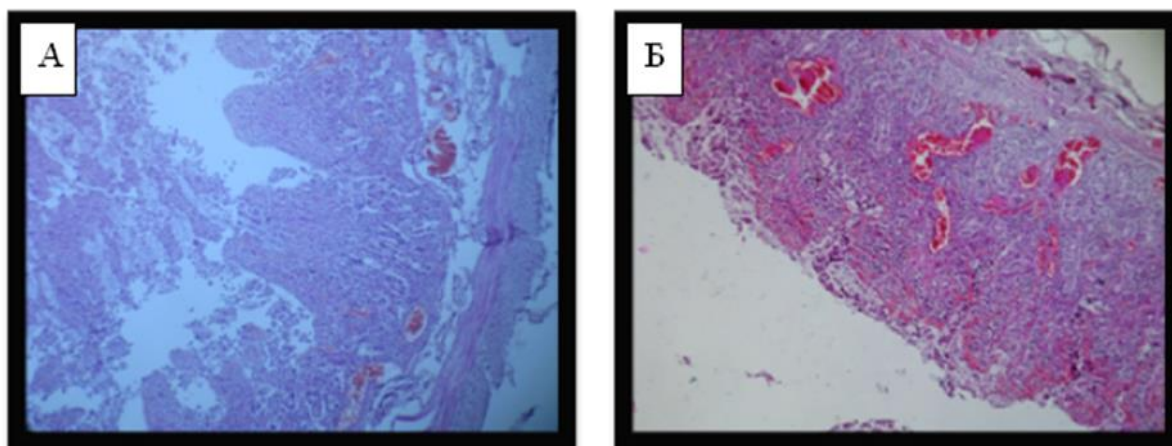


Рис. 5.9. Патолого-морфологічні зміни структури кишечника: А – структура кишечника збережена, незначні крововиливи (збільшення у 400 разів), Б – крововиливи у підслизовій оболонці, некроз, вкорочення ворсинок (збільшення у 800 разів).

Окрім порушень структури лімфатичних вузлів, селезінки, легень та кишечника в зразках тварин, патолого-морфологічних змін спостерігалися і в структурі печінки у 4 з 54 обстежених свиней. Втім у 50 з 54 досліджених разків жодних відхилень від норми виявлено не було (рис. 5.10, А, Б). Структура гепатоцитів була збережена, відсутні дистрофічні зміни та ознаки атрофії і розвитку гепатиту. Однак у решти тварин було виявлено значні локуси з геморагіями та лімофцитарно-макрофагальними інфільтратами, що свідчить про розвиток гепатиту (рис. 5.10, В, Г). Крім того була присутня дрібно краплинна жирова дистрофія гепатоцитів, що ймовірно було результатом порушення функціонування шлунково-кишкового тракту.

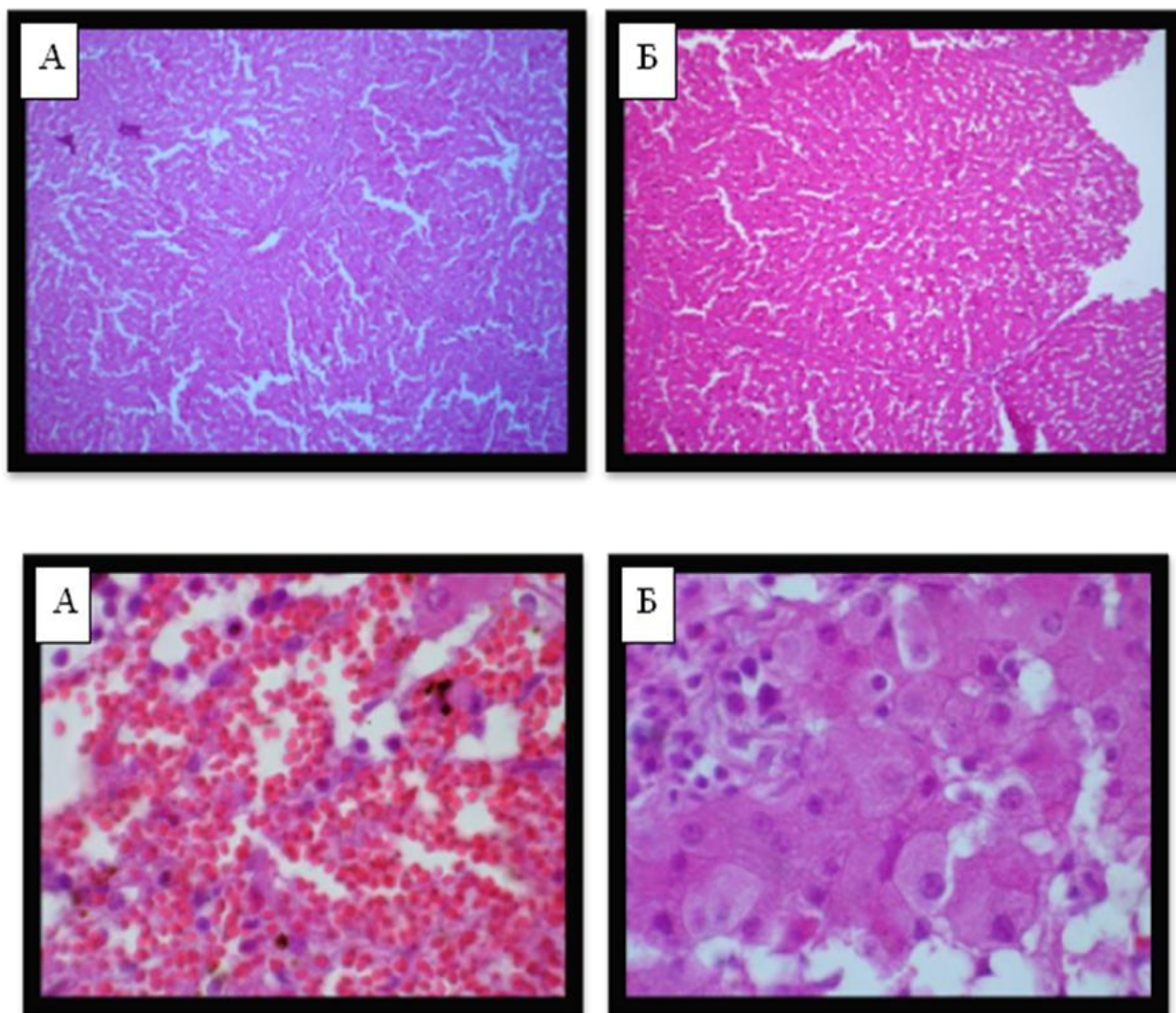


Рис. 5.10. Патолого-морфологічна характеристика структури печінки: А, Б - структура печінки у нормі, збільшення у 400 разів; В – крововиливи, лімфоцитарна інфільтрація, збільшення у 4000 разів.; Г – некроз гепатоцитів, інфільтрація паренхіми лімфоцитами, збільшення у 4000 разів:.

Отже, найбільше відхилень спостерігається в органах імунної системи, а саме лімфовузлах та селезінці, які, в свою чергу, характеризуються різним ступенем тяжкості (від незначних ділянок виснаження органів до повного некрозу тканини з сполучнотканинним заміщенням).

Певні порушення було виявлено також і в структурі легень, кишечника та печінці тварин. Натомість специфічних змін тканин мозку, трахей, серця, нирок і шлунку виявлено не було.

Дані результати описано та опубліковано [210].

5.3. Диференційне виявлення ЦВС2 в зразках абортів плодів від свиней методом ПЛР та імуногістохімії при одночасному інфікуванні вірусом РРСС.

Гістологічний аналіз не є показовим, та не може бути використаний для дослідження абортів плодів та підтвердження діагнозу ЦВС2-асоційованих репродуктивних порушень, особливо при одночасному інфікуванні вірусом РРСС, що викликає аналогічні морфолого-патологічні зміни. Тому нами було продемонстровано можливість використання імуногістохімічного підходу з метою безпосереднього виявлення антигену ЦВС2 в тканинах абортів плодів [124].

Для первинного встановлення діагнозу та визначення причин виникнення абортів у свиноматок зазвичай використовують певні клінічні та патолого-анатомічні ознаки, тому на першому етапі роботи проводили опис та аналіз патологічних змін абортів матеріалу.

Загалом, у результаті проведеної роботи, нами було обстежено 1156 тварин з 65 господарств різних областей України. Внаслідок патолого-анатомічного аналізу було з'ясовано, що у обстежених абортів плодів спостерігалися крововиливи у міокарді (у 9% від загальної кількості обстежених тварин) та легенях (у 14%), анемія (у 3%), іктеричність (у 2%), гіперемія легень (у 11%), тимусу (у 9%), селезінки (у 3%), набряк легень (у 9%) та атрофія тимусу (у 7%) (рис. 5.11, рис. 5.12). Наявність всіх вище перелічених ознак притаманна як цирковірусу свиней 2 типу, так і вірусу репродуктивно респіраторного синдрому свиней (ВРРСС).

Зразки відібраного матеріалу (легені, міокард та тимус) нумерували та систематизували відповідно до місця забору абортів матеріалу. Оскільки вірус РРСС швидко руйнується після смерті абортів плодів, виявлення його генетичного матеріалу за допомогою ПЛР в абортів матеріалі є достатньо ускладненим, деякі вчені надають перевагу імуногістохімічному методу дослідження, оскільки антиген вірусу зберігається у тканинах

достатньо тривалий час. Для виявлення ВРСС в абортіваних плодах з огляду на дані Rowland та співав. відбирали тимус та легені [163].



Рис. 5.11. Спектр патологоанатомічних змін, характерних для ВРСС та ЦВС2 інфікування, виявлених у абортіваних плодів.

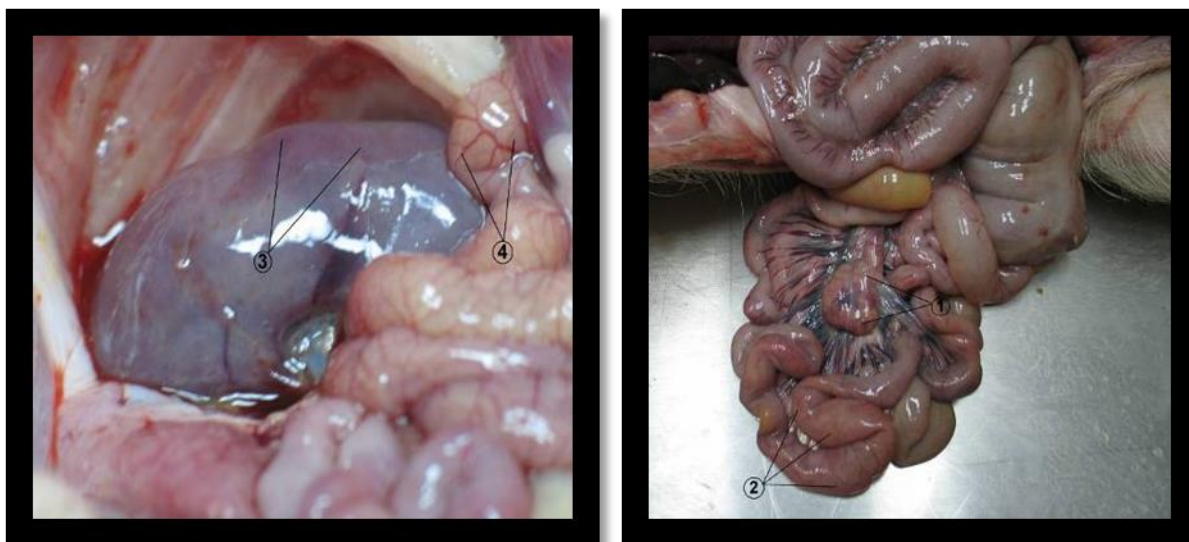


Рис. 5.12. Патологоанатомічні зміни органів у обстежених тварин: 1 – гіперемія мезентеріальних лімфатичних вузлів, 2 – катаральний ентерит тонкого відділу кишечника, 3 – точкові крововиливи у нирках, 4 – гіперемія тонкого відділу кишечника

Загалом було виявлено 192 позитивних на ЦВС2 зразки абортіваного матеріалу, що становить близько 17% від загальної кількості досліджених

зразків. ВРРСС був виявлений у 125 зразках (близько 11%) (рис.5.13). У 17 клінічних випадках нами було виявлено обидва патогени, що складає близько 2% від загальної кількості зразків. У цих випадках наявність ко-інфікування ВРРСС та ЦВС2 ускладнило прояв репродуктивних проблем у свиноматок.



Рис. 5.13. Частота виявлення ВРРСС, ЦВС2 в абортіваному матеріалі третього триместру супоросності.

Наступним етапом дослідження було виявлення антигену ВРРСС та ЦВС2 в тканинах органів 17 абортіваних плодів, в яких за результатами молекулярно-біологічних досліджень було детектовано генетичний матеріал обох патогенів (ВРРСС та ЦВС2). За результатами імуногістохімічного дослідження антиген до ВРРСС найчастіше та в більшій кількості виявляли в тимусі, тоді як ЦВС2 антиген частіше візуалізували в легенях, та значно менше в міокарді абортіваних плодів (рис. 5.14). Rowland та співав. показали, що найбільша кількість вірусу РРСС при дослідженні тканин плоду присутня в тимусі, тоді як в легенях - значно менше [163], що повністю узгоджується з отриманими нами результатами (рис. 5.15). Наявність антигену у серці абортіваних плодів може бути пов'язана з реплікацією вірусу в імунних клітинах, що мігрують у серцевий м'яз під час інфекції [206]. Доволі часто у результаті аналізу позитивних імуногістохімічних зразків серця гістологічно виявляли ознаки розвитку міокардиту.

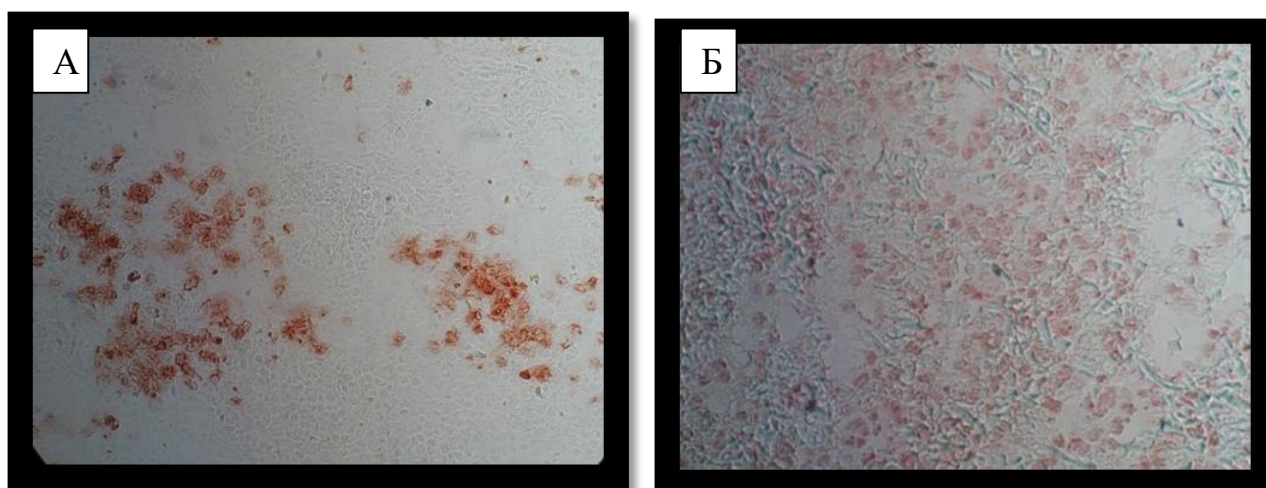


Рис. 5.14. Абортований плід інфікований ВРРСС та ЦВС2: А - тканина тимусу, Б - тканина легень;. внутрішньо цитоплазматичне зафарбування антигену ВРРСС в макрофагах тимусу (А) та легень (Б), імуногістохімічне пофарбування, збільшення x400.

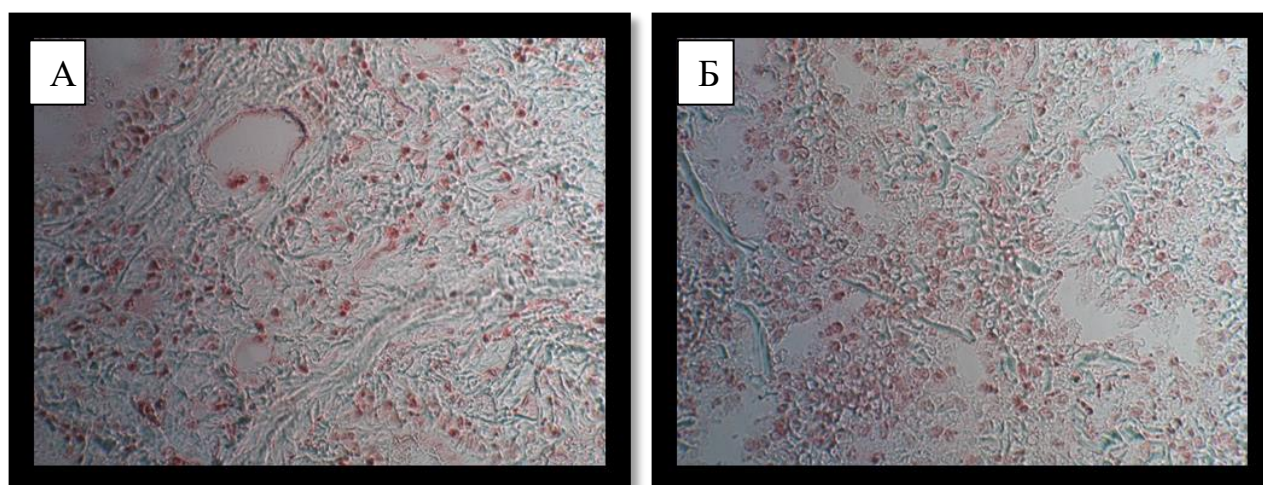


Рис. 5.15. Тканина міокарду (1), тканина легень (2); абортований плід інфікований ВРРСС та ЦВС2. Внутрішньоцитоплазматичне зафарбування антигену ЦВС2 в міокарді (1) та легенях (2). Імуногістохімічне пофарбування x400.

Антигени ВРРСС було виявлено в 14 зразках, тоді як антиген ЦВС2 було детектовано у всіх 17 зразках. Отримані результати вказують на недоліки у використанні імуногістохімічного методу дослідження для діагностики ВРРСС. Ефективність імуногістохімії для виявлення антигену ВРРСС залежить від генетичних характеристик самого патогену та якості абортowanego матеріалу (ступінь автолізу тканин).

Використання імуногістохімічного методу для діагностики ЦВС2 є результативним та показовим, оскільки ми не отримали хибно негативних результатів навіть у випадку незначного вірусного навантаження.

Таким чином, у результаті проведеної роботи нами було досліджено 1156 абортів плодів, з 65 господарств 24 областей України та АР Крим за 6 років. Встановлено, що з них 334 зразки уражені принаймні одним з двох вірусних патогенів (ВРРСС та ЦВС2). Серед усіх досліджених тварин лише у 2 % детектовано ко-інфікування аборт-плодів ВРРСС та ЦВС2. Проте, враховуючи значний інфекційний потенціал вищевказаних патогенів, також тенденції до поширення в Україні та світі [4, 57, 60] кількість ко-інфікувань в майбутньому вірогідно значно зросте. Це свідчить про значну роль ВРРСС та ЦВС2 у виникненні репродуктивних порушень у свиноматок, а також необхідність жорсткого контролю відповідних інфекцій для промислового свинарства в Україні. Виникає нагальна необхідність у впровадженні ефективних шляхів вирішення вже існуючих проблем та блокування шляхів поширення ВРРСС та ЦВС2 територією України [80].

Одним із ефективних шляхів боротьби з даними патогенами є їх швидка та точна детекція. Оскільки робота з абортіваним матеріалом ускладнюється швидким розкладенням тканин органів та елімінацією ВРРСС імуногістохімічний метод діагностики ВРРСС виявився менш ефективним порівняно з використанням ПЛР. ЦВС2 є більш стійким до зовнішнього середовища, з огляду на це його виявлення методом ІГХ є достовірним та точним. Отримані результати описано та опубліковано в статті [79].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

З початку 2000-х років в Україні відбувся значний розвиток промислового вирощування тварин. Даний процес мав надзвичайно швидкий та практично не контрольований характер. Паралельно з появою нових господарств, відбувалось значне нарощування потужностей вже існуючих. І, переслідуючи ідею максимально технологічного та прибуткового свинарства, та за відсутності власних генетичних ліній з високим репродуктивним потенціалом, до нашої держави було завезено надзвичайно велику кількість тварин з усього світу. В той же час, заходи державного регулювання та карантинізації привезених тварин, дослідження їх імунного статусу щодо різних захворювань не виконувались. З огляду на це, паралельно із завезенням генетичного потенціалу відбулось завезення великої кількості інфекційних агентів, які раніше поширені не були. Серед інших, одним з таких патогенів, які швидко поширились серед господарств України, та тих, що завдали найбільших економічних збитків, був цирковірус свиней 2 типу. До 2007 року даний вірус не виявляли, не включали до списків обов'язкового моніторингу, а захворювання, яке він викликає – не діагностували. І тільки з 2007 року, після спалаху захворювання, яке характеризувалось високим рівнем летальності свиней та низкою специфічних симптомів, притаманних цирковірус-асоційованим синдрому, нами було проведено дослідження з метою ідентифікації його збудника. Упродовж 6-ти років було проведено відбір зразків з господарств усіх областей України, де за зовнішніми ознаками та характером перебігу клінічних проявів можливо було запідозрити цирковірус-асоційовані захворювання. На початку нашої роботи ми не знали, який краще матеріал відбирати, та як це впливатиме на частоту виявлення, тому відбирали всі ключові органи та біологічні рідини, що використовувались у дослідженнях зарубіжних авторів, та де було раніше продемонстровано потенційну можливість виявлення ЦВС2. Таким чином накопичений матеріал

став основою для наступних епізоотологічних, молекулярно-біологічних досліджень, а також для розробки комплексного підходу до діагностики ЦВС2-асоційованих синдромів, який був надзвичайно необхідним.

Характер поширення ЦВС2 серед областей України набув критичного рівня і в період з 2007 до 2012 року, вірус було виявлено в 20 з 24 областей України та АР Крим. При чому найбільшу кількість випадків захворювання зафіксовано у Дніпропетровській, Донецькій, Київській, Полтавській, Черкаській та Чернігівській областях, в яких частота виявлення коливалась від 26,9 до 51,7%. В Житомирській, Івано-Франківській, Хмельницькій та Рівненській областях – ЦВС2 ідентифіковано не було. Проведена нами оцінка розповсюдження вірусу, дозволяє стверджувати, що рівень поширення ЦВС2 в Україні сягає близько 50 %. Вказаний рівень є характерним для областей, з яких було досліджено від 16 до 25 зразків. Такий показник розповсюдження згаданого збудника співпадає зі значеннями, отриманими дослідниками інших європейських країн [130, 171, 176], які описують схожу динаміку ЦВС2 і визначений рівень поширення вірусу варіює від 30 до 100%.

Цікаво, що після впровадження карантинних заходів та масової вакцинації поголів'я свиней в промислових господарствах, рівень поширення ЦВС2 практично не змінився, однак зменшилась кількість клінічних випадків захворювань та ступінь тяжкості їх перебігу.

Зазвичай, для моніторингових досліджень та визначення превалювання вірусних захворювань використовують метод ІФА (ELISA) та визначають рівні АТ до певних збудників, та кількість серопозитивних в групах [110, 123]. Однак, для досліджень ЦВС2 даний метод абсолютно не підходить, оскільки при перших же спробах його використання, нами було визначено, що практично всі зразки є серопозитивними, та навіть ті, де щодних проявів ЦВС2-асоційованих захворювань зафіксовано не було. Як виявилось, між ЦВС1 та ЦВС2 існує сильна перехресна реакція і практично не можливо диференційно ідентифікувати АТ до ЦВС2, оскільки дані віруси є дуже подібними. Тому, єдиним методом який би задовольнив диференційне

виявлення ЦВС2 та міг бути використаний для великого масиву зразків – є полімеразна ланцюгова реакція зі специфічними олігонуклеотидами.

Тому для проведення описаної вище ідентифікації ЦВС2 та встановлення його поширення нами було розроблено ефективний і специфічний молекулярно-біологічний підхід до виявлення ЦВС2. Виділений таким чином генетичний матеріал від українських ізолятів використано для сиквенування та більш ґрунтовного з'ясування їх походження та філогенетичних зав'язків.

Розроблений нами підхід, що відноситься до вірусології тварин, призначений для виявлення специфічних фрагментів нуклеїнових кислот (ДНК) цирковірусу свиней 2 типу може бути використаний для проведення діагностики цирковірус-асоційованих синдромів свиней, в науково-дослідних роботах, в біотехнологічному виробництві вакцин, в навчальних процесах.

Відомий спосіб, близький за технічним рішенням є первинне виділення та ідентифікація цирковірусу свиней 2 типу (ЦВС2) на культурах клітин РК-15. Принцип методу полягає у виділенні вірусу на моношарових перещеплюваних культурах клітинах і у подальшій імунологічній ідентифікації (вірусна нейтралізація, імуоферментний аналіз, метод імуофлуоресценції, тощо). Недоліками методу є довготривалість досліджень, висока вартість, постійна необхідність наявності чутливої культури клітин [127]. А прототипом запропонованого методу є ПЛР з використанням двох олігонуклеотидних праймерів, рекомендованих в 2000 році Міжнародним епізоотичним бюро [1]. Недоліком рекомендованих олігонуклеотидних праймерів є застарілий протокол реакції, не оптимізований під сучасне обладнання та реагенти, неспроможність забезпечити високу специфічність та чутливість реакції, а також ампліфікація неповної нуклеотидної послідовності відкритої рамки зчитування 2 (BP3-2, ORF-2) (502 н.о.), що значно обмежує наступний рестрикційний та філогенетичний аналіз з урахуванням сиквенування. Тоді як розроблений нами підхід дозволяє отримання послідовності, довжиною 1293 н.о., що дозволяє використання такого

ампліфікованого матеріалу для сиквенування, наступного клонування, створення ДНК-вакцин в будь-яких векторних системах та інших біотехнологічних маніпуляцій.

Таким чином, та за використання розробленого нами молекулярно-біологічного підходу було описано поширення ЦВС2 територією України впродовж 6 років, а також охарактеризовано особливості поширення в різних областях, що є першою роботою такого масштабу та тривалості, виконаної стосовно дослідження ЦВС2 в Україні. Результати, що були отримані відповідали очікуванню, та таким, що були отримані в інших країнах світу з розвиненим напрямком промислового вирощування свиней.

Переслідуючи ідею ґрунтового дослідження філогенетичних зав'язків та встановлення походження ізолятів ЦВС2, виявлених в Україні, ми провели сиквенування нуклеотидних послідовностей ідентифікованих ізолятів. При чому, для сиквенування використали генетичний матеріал ізолятів, ідентифікованих в матеріалі від диких кабанів. І з тих же регіонів, підібрали ізоляти від свійських свиней. А саме, використали матеріал з Чернігівської (Північ), Черкаської (Центр), Запорізької (Південь) та Харківської (Схід) областей. В результаті проведеного аналізу було встановлено, що генетичні особливості українських ізолятів ЦВС2 показали високий рівень різноманітності. Як було описано, виявлені ізоляти належать до обох підгруп (1A\B і 2) штамів ЦВС2. Окрім забезпечення цікавої моделі, яка може бути застосована до інших захворювань людини та тварин, це викликає інтерес до постійного моніторингу вірусної епідеміології, особливо для вірусів, що швидко розвиваються шляхом мутацій, таких як ЦВС2, та необхідності поділитися відповідною інформацією, щоб запобігти або негайно діяти у відповідь на потенційну можливість виникнення фактичних мутантів, що уникають поствакцинального імунітету [193, 198, 208].

Таким чином, філогенетичний аналіз, реконструйований з 4 послідовностей Черкаської, Харківської, Чернігівської, Запорізької областей України та послідовностей, опублікованих в базі GenBank, показав, що два

українські ізоляти ЦВС2 належали до генотипу 1 (ЦВС2-1b), і два належали до генотипу 2 (ЦВС2-2a) відповідно до класифікації, запропонованої Grau-Roma та співавт. [66]. Проведений філогенетичний аналіз не показав жодних доказів рекомбінації, як це повідомлялося для ЦВС2, виділених у Гонконгу, Кореї та США, де було ізольовано цілий ряд мутантних штамів [191, 193, 194]. Цікаво, що дані мутанти утворювались як шляхом геномних рекомбінацій між ЦВС2 та ЦВС1, так і шляхом обширних делецій, що абсолютно не характерно для таким малих ДНК-вмісних вірусів як ЦВС2 [69]. Наразі циркулюють і постійно ідентифікуються ЦВС2-подібні агенти, такі як P1, що був ідентифікований у Китаї та має геном майже вдвічі менший ніж ЦВС2 [196]. В той же час, нами таких варіантів детектовано не було, а виділені ізоляти належали до типових та поширених генотипових груп.

Враховуючи той факт, що поширення цирковірусу свиней 2 типу найбільше описано для популяції свійських тварин, і практично відсутні дані щодо його розповсюдження серед популяції диких кабанів, наступним етапом нашої роботи було встановлення генетичних особливостей ізолятів ЦВС2, виділених від диких тварин і порівняння їх ізолятами, що циркулюють в інших країнах. Також було досліджено рівень генетичного різноманіття ізолятів ЦВС2, поширених на рівні обох популяцій свиней в Україні.

Ця інформація може бути використана для з'ясування еволюційних зв'язків ізолятів вірусу між вказаними групами [50]. У роботі проведено виділення ДНК та сиквенування нуклеотидних послідовностей геномів ЦВС2, ізольованих від диких кабанів, з чотирьох регіонів України. А також порівняння їх з сиквенсами ізолятів, виділених від свійських свиней, тих же регіонів.

Всі 4 послідовності українських ізолятів ЦВС2 від диких кабанів мали довжину геному 1768 нт, тоді як, наприклад, описані ізоляти від диких кабанів виділені в Угорщині та Словенії, мали довжину геномів 1767 нуклеотидів [39]. В той же час, рівень гомології послідовностей вказаних ізолятів від

становив 91,5 – 99 %, що свідчить про істотні відмінності між генотипами ЦВС2, ізольованих від диких кабанів з різних країн світу.

Після встановлення філогенетичних особливостей ізолятів ЦВС2, виділених від свійських свиней та від диких кабанів, нами було проведено порівняння цих груп між собою. Як виявилось, більшість з них є досить різними і належать до різних підгруп. Така ж ситуація була описана і в інших європейських країнах. Втім штами, виділені від свиней Запорізької та Чернігівської областей, мають спільне походження зі штамом, виділеним від кабанів у регіоні Запоріжжя. Крім того, штами, виділені у тварин з Черкаської та Харківської областей, мають спільне походження зі штамми, виділеними від кабанів з Харківської області.

Цей факт демонструє загальне походження описаних ізолятів і може бути спричинений прямою передачею ЦВС2 між кабанами та сільськогосподарськими тваринами, що не допускається політикою біозахисту. Ізоляти, виділені від диких кабанів із Запорізької, Чернігівської та Черкаської областей знаходяться в кластері ізолятів 1A/B підгрупи разом з ізолятами ЦВС2 від кабанів з Бразилії та Німеччини. Водночас, ізоляти із Харківської області були розділені на 2 субкластери, однак належать до одного кластеру ізолятів підгрупи 2. Отже, в результаті дослідження було показано, що ізоляти з Чернігівської, Запорізької, Черкаської та Харківської областей належать до різних субгруп ЦВС2 та мають різне походження. Крім того, встановлено досить високий рівень подібності з ізолятами з Хорватії та Бразилії. Водночас, показано подібність ізолятів, виділених від диких кабанів з Запорізької та Чернігівської областей з такими, що були виділені від тварин з промислових господарств. А отже, в Україні доведено факт, безпосередньої передачі цирковірусу свиней 2 типу між дикими кабанами та свійськими тваринами, що значно ускладнює можливість передбачення епізоотологічної ситуації та потенційних спалахів ЦВС2 в обох популяціях [155].

Проте, за таких результатів, не можливо чітко стверджувати який вектор передачі був присутнім. З одного боку, найбільш вірогідним є припущення,

що вказані ізоляти ЦВС2 були завезені з інших країн світу та передались від свійських свиней до диких кабанів. Шляхи такої передачі можуть бути різними, в тому числі при безпосередньому контакті та аліментарно. Однак, не можливо виключити той факт, що популяція диких кабанів є природнім резервуаром для ЦВС2 і передача могла бути й зворотною, від диких кабанів до свійських свиней. Особливо це стосується ізоляту, виділено від диких кабанів з Харківської області, який не має близькоспоріднених ізолятів, виділених від свійських свиней, а лише ізоляти виділені від свійських свиней тієї ж області. Описати шляхи такої передачі важко, особливо враховуючи той факт, що наразі не відомо жодного можливого спільного вектору для ЦВС2. Тим не менше, отримані результати є важливими для аналізу еволюції вказаного вірусу і розкривають епізоотологічні особливості Українських ізолятів.

Особливою характеристикою захворювань, асоційованих з цирковірусом свиней 2 типу є те, що здебільшого розвиток синдромів відбувається за змішаної інфекції, викликаної ЦВС2 та іншими патогенами свиней як вірусної етіології, так і бактеріальної: А це, своєю чергою, значно ускладнює діагностику цирковірус-асоційованих синдромів. Також у польових та лабораторних дослідженнях із використанням гнотобіонтних тварин неодноразово було продемонстровано, що наявність лише генетичного матеріалу вірусу в тканинах тварини не є визначальним діагностичним показником. Високий рівень контагіозності та смертності свиней за згаданого захворювання зумовлює необхідність розроблення та застосування експрес-методів діагностики з метою як найшвидшої ідентифікації збудника у зразках та запровадження карантинних і профілактичних заходів. Таким методичним підходом є створення тест-систем на основі полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, що є найшвидшим методом виявлення ЦВС2 як за хронічного та персистентного перебігу захворювання, так і для диференційного виявлення згаданого вірусу від інших збудників захворювань свиней. Також лише за допомогою вказаного методичного підходу можливим є виявлення

вірусоносійства, що необхідно для контролю за розповсюдженням інфікування. Однак це не забезпечує діагностичний аналіз наявності саме тих патолого-морфологічних змін, що викликані ЦВС2, а не іншими патогенами, а також диференціювання усіх можливих ЦВС2-асоційованих синдромів між собою. Саме тому, для найбільш точної діагностики ЦВС2-асоційованих захворювань, нами було розроблено та запропоновано комплексний підхід із застосуванням ПЛР разом із проведенням гістологічного та імуногістохімічного аналізу, що дає можливість оцінювати характер патолого-морфологічних змін тканин органів та встановлювати зв'язок між наявністю вірусу та синдромом, що розвивається. А результати обговорено в якості усної доповіді за опублікованими тезами [48].

Для виявлення генетичного матеріалу цирковірусу свиней 2 типу у відібраних зразках методом ПЛР в реальному часі було розроблено праймери та зонди, які б характеризувались повною унікальністю та низкою переваг, порівняно з уже існуючими та описаними. Обидва розроблені олігонуклеотидні зонди володіють умовно однаковими показниками специфічності. Проте, враховуючи особливості положення вказаних зондів на нуклеотидній послідовності, для діагностичної системи було обрано зонд PCVLD_probe1, не зважаючи на те, що зворотній праймер гібридується на наступному нуклеотиді після зонду. Таким чином, можемо стверджувати, про абсолютну унікальність та 100 % аналітичну специфічність розроблених праймерів та зондів, які, окрім того, характеризуються високими термодинамічними та реакційними показниками. В основі розробленого підходу – завдання розробити спосіб, який мав би такі якісні показники, як скорочення витрат реагентів, посуду, часу обліку результатів та постановки самої реакції, був би специфічним і чутливим при виявленні та ідентифікації цирковірусу свиней 2 типу, що відноситься до різних генотипів.

Розроблений нами молекулярно-біологічний підхід із використанням праймерів PCVLD_F і PCVLD_R та ДНК-зондів PCVLD_probe1 й PCVLD_probe2 дозволяє виявляти цирковірус свиней 2 типу у матеріалі різних

тканин від тварин різного віку. Вказані результати продемонстровано із використанням польових ізолятів, виділених в Україні, а також із застосуванням офіційно зареєстрованих ізолятів, наданих міжнародним центром ветеринарної лабораторної діагностики «GD», Девентер, Нідерланди.

Однак, як було зазначено раніше, лише виявлення ДНК вірусу не є гарантованим діагностичним показником наявності ЦВС2-асоційованого синдрому. Саме тому, було досліджено і запропоновано гістологічний підхід, який мав би поєднати факт виявлення геному ЦВС2 з тими патолого-морфологічними змінами, які він викликає. Гістологічний аналіз патолого-морфологічних змін проводили в тканинах органів, відібраних у тварин, у зразках від яких було виявлено цирковірус свиней 2 типу методом ПЛР. У результаті аналізу було встановлено, що у переважної більшості обстежених тварин (37 з 54) спостерігаються патологічні зміни у лімфатичних вузлах, а саме виснаження фолікул лімфатичного вузла, що варіює від 10 до 100 %. Окрім зареєстрованих змін тканини лімфатичних вузлів, патолого-морфологічні ураження спостерігалися і у структурі іншого органу імунної системи свиней – селезінці, а також у легенях досліджених зразків від 26 з 54 свиней. Зокрема, було зареєстровано значне потовщення інтерстицій легень за рахунок лімфоцитарної інфільтрації та некротичні зміни паренхіми органу. Крім того, спостерігали велику кількість крововиливів у легеневій тканині, а особливо у перибронхіальних ділянках, а також пери бронхіальну фіброплазію та капілярний виразковий бронхіт. При дослідженні структури кишковика у 13 з 54 досліджених зразків спостерігалися крововиливи у підслизовій оболонці органу, некротичні зміни епітелію слизової та підслизової оболонок і вкорочення ворсинок. Патолого-морфологічні зміни кишковика характеризувались також наявністю лімфоцитарних інфільтрацій у підслизовій оболонці, що призводило до втрати структури органу. Серед встановлених патолого-морфологічних змін печінки було виявлено значні зони некрозу гепатоцитів, потужні крововиливи та ознаки запального процесу в паренхімі органу.

На підставі результатів аналізу патоморфологічних змін, можна зробити висновки, що найбільше відхилень спостерігається в органах імунної системи, а саме лімфовузлах та селезінці. Діагностично важливі порушення було виявлено також і в структурі легень, кишковика та печінки тварин, тоді як специфічних змін тканин мозку, трахей, серця, нирок і шлунку виявлено не було. Як бачимо, поєднання методу ПЛР в реальному часі та гістологічного аналізу дозволяє встановити чіткий зв'язок між виявленням вірусу та розвитком захворювання, яке він викликає. Однак, гістологічний аналіз не є показовим, та не може бути використаний для дослідження абортіваних плодів та підтвердження діагнозу ЦВС2-асоційованих репродуктивних порушень, особливо за одночасного інфікування вірусом ВРСС, що викликає аналогічні морфолого-патологічні зміни. Тому нами було продемонстровано можливість імуногістохімічного підходу з метою безпосереднього виявлення антигену ЦВС2 в тканинах абортіваних плодів. Використання імуногістохімічного методу для діагностики ЦВС2 є актуальним та показовим, оскільки ми не отримали хибнонегативних результатів навіть у випадку незначного вірусного навантаження під час аналізу 1156 абортіваних плодів, з 65 господарств 24 областей України та АР Крим в період з 2007 по 2013 роки.

Також нами було показано можливість застосування полімеразної ланцюгової реакції для виявлення цирковірусу свиней 2 типу та вірусу репродуктивного та респіраторного синдромів свиней в тканинах абортіваних плодів. Встановлено частоту виявлення ЦВС2, ВРСС та ко-інфекції цих вірусів в зразках абортіваних плодів за 2007-2012 роки методом ПЛР. Досліджено можливість застосування імуногістохімічного підходу для виявлення антигенів ЦВС2 та ВРСС в міокарді, легенях та лімфатичних вузлах абортіваних плодів. За вказані 6 років було виявлено лише 17 клінічних випадків (2% від загальної кількості) ко-інфікування плоду ВРСС та ЦВС2. Проте, враховуючи значне поширення вищевказаних патогенів в Україні та світі кількість ко-інфікувань в потенціалі може зрости в десятки разів. Оскільки при ко-інфекції ВРСС та ЦВС2 спостерігаються ускладнення

проявів обох захворювань, виникає нагальна необхідність у впровадженні ефективних шляхів вирішення вже існуючих проблем та блокування шляхів поширення ВРРСС та ЦВС2 територією України. Одним із ефективних шляхів боротьби з даними патогенами є їх швидка та точна детекція. Оскільки робота з абатованим матеріалом ускладнюється швидким розкладенням тканин органів та елімінацією ВРРСС імуногістохімічний метод діагностики ВРРСС виявився менш показовим у порівнянні з ефективністю використання ПЛР. ЦВС2 проявляє більшу стійкість до зовнішнього середовища, з огляду на це проблем з детекцією цього патогену методом ІГХ та ПЛР не виявлено.

У господарствах України, де нами було виявлено ЦВС2, впроваджено карантинні заходи, що включають посилення дезінфекції приміщень і устаткування та здійснення більш детального моніторингу захворюваності тварин, що направлено на контроль поширення згаданого збудника. Однак авторами багатьох країн світу, зазначено, що оптимальним методом контролю поширення ЦВС2 є вакцинація [17]. Наразі, на світовому фармацевтичному ринку існують декілька комерційних препаратів для вакцинації свиней проти ЦВС2. І хоча вони з'явилися досить нещодавно, значний масив даних, щодо їх позитивної дії описано в науковій літературі [31, 81]. Проте, значною практичною проблемою є те, що починаючи з 2010 року в різних країнах світу дослідники описують випадки спалахів захворюваності, викликані ЦВС2 у вакцинованих стадах [152, 167, 174, 203]. Отже, надзвичайно важливим є розробка та створення нових, більш дієвих вакцин проти цирковірусу свиней 2 типу, що найвірогідніше стане перспективним продовженням нашої роботи.

Враховуючи всі переваги та особливості розроблених молекулярно-біологічних та гістологічних діагностичних підходів, їх було успішно впроваджено для виявлення цирковірусу свиней 2 типу та встановлення захворювання, яке він викликає в ЦСД НВП «Біо-Тест-Лабораторія».

ВИСНОВКИ

В дисертації була вирішена науково-практична проблема – досліджені молекулярно-біологічні та філогенетичні особливості та поширення ізолятів ЦВС2 в Україні. Розроблено комплексний підхід до діагностики цирковірус-асоційованих синдромів у патологічному матеріалі шляхом молекулярно-біологічного, гістологічного та імуногістохімічного аналізів, що дозволить швидко діагностувати збудник, оцінювати епізоотичну ситуацію для впровадження адекватної схеми вакцинопрофілактики, оцінювати ефективність застосованих профілактичних засобів та заходів біобезпеки для попередження розповсюдження ЦВС2 територією України.

1. Вперше ідентифіковано ЦВС2 у 20 із 24 областей України та АР Крим. Проведена оцінка розповсюдження вірусу, дозволяє стверджувати, що рівень поширення ЦВС2 в Україні сягає 41 %.
2. ЦВС2 є поширеним вірусом в Україні, найбільшу кількість випадків захворювання зафіксовано у Дніпропетровській, Донецькій, Київській, Полтавській, Черкаській та Чернігівській областях, в яких частота виявлення коливалась від 26,9 до 51,7%. В Житомирській, Івано-Франківській, Хмельницькій та Рівненській областях – ЦВС2 ідентифіковано не було.
3. Філогенетичний аналіз українських ізолятів ЦВС2 від свійських тварин засвідчив належність вірусів до групи 1 (ЦВС2-1a\b), і до групи 2 (ЦВС2-2b).
4. Встановлені еволюційні зв'язки між ізолятами, виділеними від свійських свиней та диких кабанів з однакових регіонів України вказують на те, що більшість з них має різне походження і належать до різних підгруп. Однак ізоляти з Харківської області є високогомологічними, що може бути спричинено безпосередньою передачею ЦВС2 між кабанями та сільськогосподарськими тваринами.
5. Розроблений нами універсальний молекулярно-біологічний підхід із використанням праймерів CVSTL_1F та CVSTL_3R дозволяє ефективно виявляти цирковірус свиней 2 типу методом ПЛР у матеріалі різних тканин.

Він є високоспецифічним, оскільки забезпечує диференційне виявлення саме цього вірусу, навіть від таких близькоспоріднених вірусів як ЦВС1 та BFDV.

6. Для діагностики ЦВС2 найбільш доцільно відбирати зразки лімфатичних вузлів та кишковика, або ж проводити діагностування об'єднаних зразків вказаних органів.

7. Експрес-метод виявлення генетичного матеріалу ЦВС2 на основі кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі з використанням праймерів PCVLD_F і PCVLD_R та ДНК-зондів PCVLD_probe1 й PCVLD_probe2 дозволяє виявляти цирковірус свиней 2 типу у матеріалі різних тканин від тварин різного віку без хибно-позитивних та хибно-негативних результатів і забезпечує високий рівень ефективності.

8. Для комплексної діагностики всіх ЦВС2-асоційованих синдромів рекомендуємо підхід, що поєднує результати, отримані на основі ПЛР в реальному часі з даними гістологічного та імуногістохімічного аналізу.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Allan G, Ellis J. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest.* 2000; 12:3–14.
2. Allan G, Kennedy S, McNeilly F, et al. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J of Comp Pathol.* 1999;121:1–11.
3. Allan G, Krakowka S, Ellis J, Charreyre C. Discovery and evolving history of two genetically related but phenotypically different viruses, porcine circoviruses 1 and 2. *Virus Res.* 2012; 164:4–9.
4. Allan G, Krakowka S, Ellis J. PCV2: ticking time bomb. *Pig Progress.* 2002; Vol.18:14–15.
5. Allan G, Mackie D, McNair J, et al. Production, preliminary characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994;43:357–71
6. Allan G, McNeilly E, Kennedy S, et al. PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990: porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Record.* 2000; 146:711–712.
7. Allan G, McNeilly F, Cassidy J, et al. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol.* 1995;44:49–64.
8. Allan G, McNeilly F, Ellis J, et al. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol.* 2000;145:2421–2429.
9. Allan G, McNeilly F, Kennedy S, et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe *J Vet Diagn Invest.* 1998;10:3–10.

10. Allan G, McNeilly F, McNair I, et al. Neonatal vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae* and post-weaning multisystemic wasting syndrome: a field trial. *Pig J.* 2001; 48:34–41.
11. Allan G, McNeilly F, Meehan B, et al. A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Med.* 2000; B (47):81–94.
12. Allan G, McNeilly F, Meehan B, et al. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol.* 1999;66:115–123.
13. Allan G, McNeilly F, Meehan B, et al. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs experimentally inoculated with a Swedish porcine circovirus isolate. *J Vet Diagn Invest.* 2003;15:553–560.
14. Allan G, Phenix K, Todd D, et al. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentral Veterinarmed B.* 1994;41:17–26.
15. Babiuk L, Liu Q, Tikoo S. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology.* 2001;285:91–99.
16. Balasch M, Segale's J, Rosell C, et al. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol.* 1999;121:139–148.
17. Beach NM & Meng XJ. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 2012;164:33–42.
18. Blanchard B, Loizel Ch, Baudouard M et al. Real time PCR quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) genome and correlation with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journées Recherche Porcine.* 2004;36:327-332.
19. Boisseson C, Beven V, Bigarre, et al. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J Gen Virol.* 2004;85:293–304.

20. Bolin S, Stoffregen W, Nayar G, et al. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest.* 2001;13:185–194.
21. Breitbart M, Delwart E, Rosario K, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Circoviridae. *J Gen Virol.* 2017;98:1997–1998.
22. Brunborg I, Moldal T, Jonassen C. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based realtime PCR. *J Virol Methods.* 2004;122:171–178.
23. Byeon I, Rocha S, Gronenborn B, et al. Solution structure, divalent metal and DNA binding of the endonuclease domain from the replication initiation protein from porcine circovirus 2. *J Mol Biol.* 2007;367:473–487.
24. Cadar D, Csagola A, Lorincz M, et al. Detection of natural inter- and intra-genotype recombination events revealed by cap gene analysis and decreasing prevalence of PCV2 in wild boars. *Infect Genet Evol.* 2012;12:420–427.
25. Cai L, Ni J, Xia Y, Zi Z, et al. Identification of an emerging recombinant cluster in porcine circovirus type 2. *Virus Res.* 2012;165(1):95–102.
26. Cano-Manuel FJ, López-Olvera J, Fandos P, et al. Longterm monitoring of 10 selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Sierra Nevada National Park, Southern Spain. *Vet Microbiol.* 2014;174(1–2):148–154.
27. Chao-Ting X, Patrick G, Halbur L, et al. 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. *J of Gen Virol.* 2015;96:1830–1841.
28. Cheung A, Lager K, Kohutyuk O, et al. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol.* 2007;152:1035–1044.

29. Cheung A. Porcine circovirus: transcription and DNA replication. *Virus Res.* 2012; 164:46–53.
30. Cheung A. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Viol.* 2003;313:452–459.
31. Cheung A. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Viol.* 2003;305:168–180.
32. Chianini F, Majo N, Segales J, et al. Immunohistological study of the immune system cells in paraffinembedded tissues of conventional pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001; 82:245–255.
33. Choi C, Chae C. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephrology syndrome by doublelabeling technique. *Vet Pathol.* 2001;38:436–441.
34. Choi J, Stevenson G, Kiupel M, et al. Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res.* 2002;66:217–224.
35. Chung W, Chan W, Chaung H, et al. Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in naturally-infected and challenged pigs. *J Virol Methods.* 2005;124:11–19.
36. Clark E. Postweaning multisystemicwasting syndrome (PMWS). Preliminary epidemiology and clinical findings. *Proc. West. Can. Assoc. Swine Pract.* 1996; 22–25.
37. Cortey M, Olvera A, Grau-Roma L & Segalés J. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. *Vet Microbiol.* 2011;149(3-4):522–523.

38. Crowther R, Berriman J, Curran W, et al. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J Virol.* 2003;77:13036–13041.
39. Csagola A, Kecskemeti S, Kardos G, et al. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch Virol.* 2005;151: 495–507.
40. DeLay J, McEwen B, Carman S, et al. Porcine circovirus type 2-associated disease is increasing. *AHL Newsletter.* 2005;9:22–23.
41. Du Y, Lin W, Chien M, et al. The N-terminus of porcine circovirus type 2 replication protein is required for nuclear localization and ori binding activities. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;379:1066–1071.
42. Dudar L, Budzanivska I, Polishchuk V. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from wild boars detected in different regions of Ukraine. *Biopolym Cell.* 2018;34:41–48.
43. Dudar L, Ivashchenko O. Prevalance of PRRSV and PCV2 associated abortions in Ukraine in 2007-2012 period. Proceedings of the Vth European symposium of porcine health management; 2013; Edinburg, UK: abstr. 2013, p.132.
44. Dudar L, Polishchuk V, Budzanivska I, Balka G, Csagola A. Complete genome sequence of porcine circovirus type 2 Ukrainian isolates. *Вісн. КНУ імені Тараса Шевченка. Серія Біологія.* 2016;72:5–8.
45. Dudar L, Polishchuk V. Distribution of porcine circovirus type 2 among pigs with respiratory pathology in different geographical regions of Ukraine during 2014-2015. Proceedings of The 24th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS); 2016; Dublin, Ireland; 2016; p. 549.
46. Dudar L, Polishchuk V, Sobko I, Budzanivska I. The nature of the spread of porcine circovirus type 2 as an emerging in Ukraine during the period from 2007 to 2012. *ScienceRise. Biol Science.* 2018;10:39–44.

47. Dudar L, Polishchuk V, Sobko I. The features of porcine circovirus type 2 as an emerging in Ukraine. Proceedings of The 23d International Pig Veterinary Society Congress (IPVS); 2014; Cancun, Mexico; 2014; p. 549.
48. Dudar L. Qualitative diagnosis and effective prevention of viral infection - Key factors for animal health. Proceedings of The VIII International Conf 'Bioresources & Viruses'; 2016; Kyiv, Ukraine; 2016.
49. Ellis J, Hassard L, Clark E, et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res.* 1998;39:44–51.
50. Ellis J, Krakowka S, Lairmore M, et al. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest.* 1999;11:3–14.
51. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol.* 1985;39:783-791.
52. Fenaux M, Halbur P, Gill M, et al. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clinical Microbiol.* 2000;38:2494–2503.
53. Fenaux M, Halbur P, Haqshenas G, et al. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *J Virol.* 2002;76:541–551.
54. Fenaux M, Opriessnig T, Halbur P, et al. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J Virol.* 2003;77:11232–11243.
55. Fenaux M, Opriessnig T, Halbur P, et al. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2

- (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J Virol.* 2004;78:6297–6303.
- 56.** Fenaux M, Opriessnig T, Halbur P, et al. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. *J Virol.* 2004;78:13440–13446.
- 57.** Finsterbusch T, Mankertz A. Porcine circoviruses—small but powerful. *Virus Res.* 2009;143:177–83
- 58.** Firth C, Charleston M, Duffy S, et al. Insights into the Evolutionary History of an Emerging Livestock Pathogen: Porcine Circovirus 2. *J Virol.* 2009;83(24):12813–12821.
- 59.** Franzo G, Cortey M, de Castro A, et al. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: an opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. *Vet Microbiol.* 2015;178(1–2):158–162.
- 60.** Franzo G, Tucciarone CM, Cecchinato M, Drigo M. Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. *Sci Rep.* 2016; 6:39458.
- 61.** Gagnon C, Music N, Fontaine G, et al. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): a type 1 and type 2 PCV recombinant. *Vet Microbiol.* 2010;144:18–23.
- 62.** Gagnon C, Tremblay D, Tijssen P, et al. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can. Vet. J.* 2007;48:811–819.
- 63.** Gibbs M, Weiller G. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:8022–8027.

64. Gilpin D, McCullough K, Meehan B, et al. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 94:149–161.
65. Grasland B, Loizel C, Blanchard P, et al. Reproduction of PMWS in immunostimulated SPF piglets transfected with infectious cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus. *Vet Res.* 2003; 36:685–697.
66. Grau-Roma L, Crisci E, Sibila M, et al. J. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet Microbiol.* 2008; 128(1-2):23-35.
67. Grierson S, King D, Sandvik T, et al. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. *Arch Virol.* 2004;149:1171–1183.
68. Grierson S, King D, Wellenberg G, et al. Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. *Res Vet Sci.* 2004;77:265–268.
69. Guo L, Lu Y, Wei Y, Huang L, Liu C. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Viol. J.* 2010;7:273.
70. Guo L, Lu Y, Wei Y, Huang L, Wu H, Liu C. Porcine circovirus genotype 2a (PCV2a) and genotype 2b (PCV2b) recombinant mutants showed significantly enhanced viral replication and altered antigenicity in vitro. *Virology.* 2011;419:57–63.
71. Hamel A, Lin L, Nayar G. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol.* 1998;72:5262–5267.
72. Hamel A, Lin L, Sachvie C, et al. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res.* 2000; 64:44–52.
73. Harms P, Sorden S, Halbur P, et al. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus

- and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol.* 2001;38:528–539.
- 74.** Haruna J, Hanna P, Hurnik D, et al. The role of immunostimulation in the development of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs under field conditions. *Can J Vet Res.* 2006;70:269–276.
- 75.** Hasslung F, Wallgren P, Ladekjær-Hansen A, et al. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol.* 2005;106:49–60.
- 76.** He J, Cao J, Zhou N, Jin Y, et al. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. *J Virol* 2013; 87:1420–1429.
- 77.** Hoogland M, Opriessnig T, Halbur P. Effects of adjuvants on porcine circovirus type 2-associated lesions. *J Swine Health and Product.* 2006;14:133–139.
- 78.** Huang C, Hung J, Wu C, et al. Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses *Vet Microbiol.* 2004;101:209–214.
- 79.** Ivashchenko O, Dudar L, Polischuk V. Detection of porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus using PCR and immunohistochemistry in the tissues of abortion foetuses. *Наук вісн НУБіП.* 2016;58:14.
- 80.** Ivashchenko O. The spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Ukraine. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка.* 2012; 62:9–11.
- 81.** Jacobsen B, Krueger L, Seeliger F, et al. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol.* 2009;138, 27–33.

82. Jensen T, Vigre H, Svensmark B, et al. Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J Comp Path.* 2006;135:176–182.
83. Johnson C, Joo H, Direksin K, et al. Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest.* 2002;14: 507–512.
84. Jones D, Taylor W, Thornton J. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci.* 1992; 8:275-282.
85. Kawashima K, Tsunemitsu H, Horino R, et al. Effects of dexamethasone on the pathogenesis of porcine circovirus type 2 infection in piglets. *J Comp Path.* 2003;129:294–302.
86. Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, et al. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J Comp Path.* 2000;122:9–24.
87. Khayat R, Brunn N, Speir J, et al. The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 2. *J Virol.* 2011;85:7856–7862.
88. Kim H, Luo Y, Moon H, et al. Phylogenetic and recombination analysis of genomic sequences of PCV2 isolated in Korea. *Virus Genes.* 2009;39:352–358.
89. Kim J, Chae C. A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs. *J Vet Diagn Invest.* 2004;16: 45–50.
90. Kim J, Chae C. Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res.* 2003;67:133–137.
91. Kim J, Chae C. Necrotising lymphadenitis associated with porcine circovirus type 2 in pigs. *Vet Res.* 2005;156:177–178.

92. Kim J, Chae C. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffinembedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. *J Virol Meth.* 2001;92:105–111.
93. Kim J, Choi C, Han D. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. *Vet Res.* 2001;149:304–305.
94. Kim J, Chung H, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet. J.* 2003; 66:251–256.
95. Kim J, Ha Y, Jung K, et al. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Can J Vet Res.* 2004; 68:218–221.
96. Kim J, Han D, Choi C, et al. Differentiation of porcine circovirus PCV-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J Virol Meth.* 2001;98:25–31.
97. Kim J, Han D, Choi C, et al. Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci.* 2003;65:741–744.
98. Kim J, Lyoo Y. Genetic characterization of porcine circovirus-2 field isolates from PMWS pigs. *J Vet Sci.* 2002;3:31–39.
99. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980;16:111-120.
100. Krakowka S, Ellis J, McNeilly F, et al. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol.* 2001;38:1–42.
101. Krakowka S, Ellis J, McNeilly F, et al. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Vir Immunol.* 2002;15: 567–582.
102. Krakowka S, Ellis J, Meehan B, et al. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome

- in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol.* 2000;37:254–263.
- 103.** Kyriakis S, Saoulidis K, Lekkas S, et al. The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Path.* 2002;126:38–46.
- 104.** Ladekjer-Mikkelsen A, Nielsen J, Stadejek T, et al. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary Microbiology.* 2002;89:97–114.
- 105.** Ladekjer-Mikkelsen A, Nielsen J, Storgaard T Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. *Vet Rec.* 2001;148:759–760.
- 106.** Lainson F, Aitchison K, Donachie W, et al. Typing of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with and without porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:588–593.
- 107.** Larochelle R, Bielanski A, Muller P, et al. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4629–4632.
- 108.** Larochelle R, Magar R, D’Allaire S. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res.* 2002;90:101–112.
- 109.** Li W, Wang X, Ma T, et al. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China. *Virus Genes.* 2010; 40:244–251.
- 110.** Liu C, Ihara T, Nunoya T, et al. Development of an ELISA based on the baculovirus-expressed capsid protein of porcine circovirus type 2 as antigen. *J Vet. Med Sci.* 2004;66:237–242.

111. Liu J, Chen I, Du Q, Chua H, Kwang J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J Virol.* 2006;80:5065–5073
112. Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol.* 2005; 79: 8262–8274.
113. Liu Q, Wang L, Willson P, et al. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3474–3477.
114. Lopez-Soria S, Segales J, Nofrarias M, et al. Genetic influence on the expression of PCV disease. *Vet Rec.* 2004;155:504–505.
115. Lopez-Soria S, Segales J, Rose N, et al. An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Prev Vet Med.* 2005;69:97–107.
116. Luo W, Zhao D, Yu XL, et al. Small-sized circular genomes similar to genome of porcine circovirus 2. *Genome Announc* 2013;1(2):913-915.
117. Madec F, Eveno E, Morvan P, et al. Porcine wasting disease (PWD) in France: description of the disease and impact in affected herds. *J de la Recherche Porcine en France.* 1999;31:347–354.
118. Magar R, Larochelle R, Thibault S. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. *J Comp Pathol.* 2000;123:258–269.
119. Magar R, Muller P, Larochelle R. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can J Vet Res.* 2000;64:184–186.
120. Mankertz A, Mankertz J, Wolf K, et al. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. 1998; *J Gen Virol.* 79:381–384.
121. Mankertz A. Molecular interactions of porcine circoviruses type 1 and type 2 with its host. *Virus Res.* 2012;164:54–60.

122. McIntosh K, Harding J, Parker S, et al. Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars. *J Vet Diagn Invest.* 2006;18:380–384.
123. McNair I, Marshall M, McNeilly F, et al. Interlaboratory testing of porcine sera for antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest.* 2004;16:164–166.
124. McNeilly F, Kennedy S, Moffett D, et al. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Virol Meth.* 1999;80:123–128.
125. McNeilly F, McNair I, Mackie D, et al. Production, characterization and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2. *Arch Virol.* 2001;146:909–922.
126. Meehan B, McNeilly F, Todd D, et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol.* 1998;79:2171–2179.
127. Meerts P, Misinzo G, McNeilly F, et al. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages. *Arch Virol.* 2005;150:427–441.
128. Meerts P, Van G, Cox E, et al. Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol.* 2005;18:333–341.
129. Meng X. Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune System. *Annu Rev Anim Biosci.* 2013, 1:43–64.
130. Meng X. Spread like a wildfire—the omnipresence of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its ever-expanding association with diseases in pigs. *Virus Res.* 2012; 164:1–3.

131. Mikami O, Nakajima H, Kawashima K, et al. Nonsuppurative myocarditis caused by porcine circovirus type 2 in a weak-born piglet. *J Vet Med Sci.* 2005;67:735–738.
132. Misinzo G, Delputte P, Lefebvre D, Nauwynck H. Porcine circovirus 2 infection of epithelial cells is clathrin-, caveolae- and dynamin-independent, actin and Rho-GTPase-mediated, and enhanced by cholesterol depletion. *Virus Res.* 2009;139:1-9.
133. Misinzo G, Delputte P, Meerts P, et al. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J Virol.* 2006;80:3487–3494.
134. Morozov I, Sirinarumitr T, Sorden S, et al. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 1998;36: 2535–2541.
135. Murtaugh M, Stadejek T, Abrahante J, et al. The ever-expanding diversity porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vir Res.* 2010;154:18–30.
136. Nawagitgul P, Morozov I, Bolin S, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol.* 2000;81:2281–2287.
137. Nawagitgul P, Morozov I, Sirinarumitr T, et al. Development of probes to differentiate porcine circovirus types 1 and 2 in vitro by in situ hybridization. *Vet Microbiol.* 2000;75:83–89.
138. Niagro F, Forsthoefel A, Lawther R, et al. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch Virol.* 1998;143:1723–1744.
139. O'Connor B, Gauvreau H, West K, et al. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J.* 2001;42: 551–553.
140. Olvera A, Busquets N, Cortey M, et al. Applying phylogenetic analysis to viral livestock diseases: moving beyond molecular typing. *Vet J.* 2010;184:130–137.

141. Olvera A, Cortey M, Segalés J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology*. 2007; 357(2):175-185.
142. Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M. et al. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Meth*. 2004;117:75–80.
143. Opriessnig T, Fenaux M, Thomas P, et al. Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. *Vet Pathol*. 2006; 43:281–293.
144. Opriessnig T, Fenaux M, Yu S, et al. Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. *Vet Microbiol*. 2004;98:209–220.
145. Opriessnig T, Halbur P, Yu S, et al. Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. *Vet Rec*. 2006;158:149–154.
146. Opriessnig T, Halbur P. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Res*. 2012; 164:20–32.
147. Opriessnig T, Janke B, Halbur P. Cardiovascular lesions in pigs naturally or experimentally infected with porcine circovirus type 2. *J Comp Pathol*. 2006;134:105–110.
148. Opriessnig T, McKeown N, Harmon K, et al. Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13:923–929.
149. Opriessnig T, McKeown N, Zhou E, et al. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2- associated lesions provides evidence for differences in virulence. *J Gen Virol*. 2006;87:2923–2932.

150. Opriessnig T, Meng X, Halbur P. Porcine circovirus type 2–associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2007;19:591–615.
151. Opriessnig T, Thacker E, Yu S, et al. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol.* 2004;41:624–640.
152. Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF. & Halbur PG. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Vet Microbiol.* 2013;163:177–183.
153. Opriessnig T, Yu S, Gallup J, et al. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol.* 2003;40:521–529.
154. Pallare's F, Halbur P, Opriessnig T, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Vet Diagn Invest.* 2002; 14:515–519.
155. Patterson AR, Opriessnig T. Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Anim Health Res Rev.* 2010;11:217–234.
156. Pogranichniy R, Yoon K, Harms P, et al. Case control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 2002;14:449 – 456.
157. Ramamoorthy S, Meng X. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Anim Health Res Rev.* 2009;10:1–20.
158. Rodríguez-Arrijoja G, Segale's J, Rosell C, et al. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med. Series B.* 2003;50:99–101.

159. Rosario K, Breitbart M, Harrach B, et al. Revisiting the taxonomy of the family *Circoviridae*: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*. *Arch Virol*. 2017;162:1447–1463.
160. Rosario K, Duffy S, Breitbart M. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. *Arch Virol*. 2012; 157:1851–1871.
161. Rose N, Abherve-Gueguen A, Le Diguerher G, et al. Effect of the Pietrain breed on clinical post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): a cohort study on four farrow-to-finish herds. *J Rech Porcine Fr*. 2004;36:339–344.
162. Rovira A, Balasch M, Segale's J, et al. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol*. 2002;76:3232–3239.
163. Rowland A. The interaction between PRRSV and the late gestation pig fetus. *Virus Res*. 2010;154:114–122.
164. Rudova N, Smolyaninova Y, Lymanska O, Zlenko O. Phylogenetic and molecular genetic studies of porcine circovirus type 2. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. Volume 1, Issue 4, 2015.
165. Sachse, K. Specificity and performance of diagnostic PCR assays. *Methods of Molecular Biology*. 2003;216:3–29.
166. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987; 4:406-425.
167. Salgado R, Vidigal P, de Souza LF, et al. Identification of an emergent porcine circovirus-2 in vaccinated pigs from Brazilian farm during a postweaning multisystemic wasting syndrome outbreak. *Genome Announc*. 2014;2:163-165.
168. Sanchez R, Nauwynck H, McNeilly F, et al. Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. *Vet Microbiol*. 2001;83:169–176.

169. Segales J, Allan G, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev.* 2005;6:119–142.
170. Segales J, Calsamiglia M, Olvera A, et al. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol.* 2005;111:223–229.
171. Segales J, Kekarainen T, Cortey M. The natural history of porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease. *Vet Microbio .* 2013;165:13–20.
172. Segales J, Olvera A, Grau-Roma, L., et al. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec.* 2008;162:867–868.
173. Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 2012; 164:10–19.
174. Seo H, Park C, Kang I, et al. Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. *Arch Virol.* 2014;159(11):3107–3111.
175. Shen H, Beach N, Huang Y, et al. Comparison of commercial and experimental porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines using a triple challenge with PCV2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), and porcine parvovirus (PPV). *Vaccine* 2010;28:5960–5966.
176. Shen H, Halbur P, Opriessnig T. Prevalence and phylogenetic analysis of the current PCV2 genotypes after implementation of widespread vaccination programs in the United States. *J. Gen. Virol.* 2012;1345–1355.
177. Shi M, Lam T, Hon C, et al. Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. *Vir Res.* 2010;154:7–17.
178. Shibata I, Okuda Y, Yazawa S, et al. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J Vet Med Sci.* 2003;65:405–408.

179. Sliz I, Vlasakova M, Jackova A, Vilcek S. Characterization of porcine parvovirus type 3 and porcine circovirus type 2 in wild boars (*sus scrofa*) in Slovakia. *Journal of Wildlife Diseases*, 2015;51(3):703–711.
180. Sorden S. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Swine Health Prod* . 2000;8:133–136.
181. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30:2725-2729.
182. Thibault S, Drolet R, Germain M, et al. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol*. 1998;35:108–116.
183. Thomson J, Higgins R, Smith W Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: clinical and pathological features of cases in the United Kingdom (1993–1998). *J Vet Med. Series A*. 2002;49:430–437.
184. Timmusk S, Wallgren P, Brunborg IM, et al. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Genes*. 2008; 36:509–520.
185. Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*. 1982; 295:64–66.
186. Tischer I, Miels W, Wolff D, et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol*. 1986;91:271–276.
187. Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriolog Orig A*. 1974;226:153–167.
188. Tribble B, Rowland R. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Research*. 2012;164(1-2):68–77.
189. Turcitu M, Wellenberg G, Barboi G, et al. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the Romanian wild boar population. *Res Vet Sci*. 2011;91:103–106.

190. Vincent I, Carrasco C, Herrmann B et al. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J Virol*. 2003;77:13288–13300.
191. Wei C, Zhang M, Chen Y, et al. Genetic evolution and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 infections in southern China from 2011 to 2012. *Infect Genet Evol* .2013;17: 87–92.
192. Wellenberg G, Stockhofe-Zurwieden N, De Jong M, et al. Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. *Vet Microbiol*. 2004;99:203–214.
193. Wen L, He K, Li B, et al. In vitro and in vivo isolation of a novel rearranged porcine circovirus type 2. *J Virol*. 2012;86(23):13120.
194. Wen L, He K, Ni Y, et al. Complete genome sequence of the rearranged porcine circovirus type 2. *J Virol*. 2012;86(10):5963.
195. Wen L, He K, Ni Y, et al. In vitro intragenomic rearrangement of porcine circovirus type 2. *J Virol*. 2012;86(16):8911.
196. Wen L, He K, Xiao Q, et al. A novel porcine circovirus-like agent P1 is associated with wasting syndromes in pigs. *PLoS One*. 2012;7(8):41565.
197. Wen L, He K, Yang H, et al. Complete nucleotide sequence of a novel porcine circovirus-like agent and its infectivity in vitro. *Sci China C Life Sci*. 2008;51(5): 453–458.
198. Wen L, He K, Yang H, et al. Prevalence of porcine circovirus-like agent P1 in Jiangsu, China. *Virol J*. 2011;8: 543–547.
199. Wen L, He K, Yu Z, Mao A, et al. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus-like agent. *J Virol*. 2012;86(1):639.
200. Wen L, Wang F, He K, et al. Recombination in truncated genome sequences of porcine circovirus type 2. *Arch Viro*. 2015;160(1):371–374.
201. West K, Bystrom J, Wojnarowicz C, et al. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest*. 1999;11:530–532.

202. Wiederkehr D, Sydler T, Buergi E, et al. A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. *Veterinary Microbiology*. 2009;136: 27–35.
203. Xiao C, Halbur P, Opriessnig T. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. *J Virol*. 2012;86(22):12469–12473.
204. Xiao C, Halbur P, Opriessnig T. 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. *J Gen Virol*. 2015;96:1830-1841.
205. Yang J, Song D, Kim SY, et al. Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*. 2003;15:369–373.
206. Yu S, Carpenter S, Opriessnig T, et al. Development of a reverse transcription-PCR assay to detect porcine circovirus type 2 transcription as a measure of replication. *J Virol Meth*. 2005;123:109–112.
207. Zhang D, He K, Wen L, et al. Genetic and phylogenetic analysis of a new porcine circovirus type 2 (PCV2) strain in China. *Archives of Virology*. 2015; 160(12): 3149–3151.
208. Zhang F, Huang L, Liu D, Li S, Wu H, Liu C. A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in capsid protein showed more virulence in vivo, compared with classical PCV2a/b strain. *PLoS One*. 2012;7:41463.
209. Горальський Л, Хомич В, Кононський О. Основи гістологічної техніки у нормі та при патології. Житомир: Полісся; 2005. 288 с.
210. Дудар Л, Поліщук В. Гістологічні аспекти цирковірус-асоційованого синдрому свиней, уражених цирковірусом 2-го типу. *Вісн. КНУ імені Тараса Шевченка. Серія Біологія*. 2016;73: 77-79.
211. Дудар Л, Поліщук В. Молекулярно-біологічні та епізоотологічні особливості цирковірусу 2 типу як збудника емерджентного

захворювання свиней в промислових господарствах України. *Наукові записки НАУКМА* 2016;73: 38-41.

- 212.** Дудар Л, Поліщук В. Характер поширення цирковірусу свиней 2 типу в Україні в період з 2007 по 2012 роки. VII Міжнар. конф. Біоресурси та віруси; Верес10-13; Київ; 2013, с. 53.
- 213.** Зубкова Т, Тарнопольская О, Мармарова Т. Способ изготовления гистологических срезов. Патент України (ав. Св.) №95103182/14. 1998; 4 с.
- 214.** Ситюк М. П. Імунопероксидазний тест для вірусологічної та серологічної діагностики репродуктивно-респіраторного синдрому та цирковірусної інфекції свиней. *Вісник аграрної науки*. 2014;5:27–31.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

Список

наукових праць, опублікованих за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях України:

7. Дудар Л.В., Поліщук В.П. Гістологічні аспекти цирковірус-асоційованого синдрому свиней, уражених цирковірусом 2-го типу // Вісн. КНУ імені Тараса Шевченка. Серія Біологія. – 2016. – №73. – С. 77-79. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*
8. Дудар Л.В., Поліщук В.П. Молекулярно-біологічні та епізоотологічні особливості цирковірусу 2 типу як збудника емерджентного захворювання свиней в промислових господарствах України // Наукові записки НАУКМА– 2014. – №67. – С. 38-41. *(Здобувачем проаналізовані літературні джерела).*
9. Dudar L.V., Polischuk V.P., Budzanivska I.G., Balka G., Csagola A. Complete genome sequence of porcine circovirus type 2 Ukrainian isolates // Вісн. КНУ імені Тараса Шевченка. Серія Біологія. – 2016. – №72. – С. 5-8. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*

Статті у наукових фахових виданнях України,

які входять до міжнародних наукометричних баз даних

10. Dudar L.V., Budzanivska I.G., Polishchuk V.P. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from wild boars detected in different regions of Ukraine // Biopolym. Cell. – 2018. – №34. – С. 41-48. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*

11. Dudar L.V., Polishchuk V.P., Sobko I.A., Budzanivska I.G. The nature of the spread of porcine circovirus type 2 as an emerging in Ukraine during the period from 2007 to 2012 // ScienceRise. Biological Science.– 2018. – №10. – С. 39-44.*(Здобувачем проведені експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*
12. Ivashchenko O.A., Dudar L.V., Polishchuk V.P. Detection of porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus using PCR and immunohistochemistry in the tissues of abortion fetuses // Науковий вісник НУБіП.– 2016. – №58. – С. 14. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*

Тези наукових доповідей:

6. Dudar L.V., Ivashchenko O.A. Prevalance of PRRSV and PCV2 associated abortions in Ukraine in 2007-2012 period // Vth European symposium of porcine health management; Edinburg, UK:abstr. – 2013. – p.132.
7. Дудар Л.В., Поліщук В.П. Характер поширення цирковірусу свиней 2 типу в Україні в період з 2007 по 2012 роки // VII Міжнародна конференція «Біоресурси та віруси»: зб. тез. – Київ, 2013. – С. 53.
8. Dudar L.V., Polishchuk V.P., Sobko I.A. The features of porcine circovirus type 2 as an emerging in Ukraine // The 23d International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Cancun, Mexico:abstr. – 2014, p. 549.
9. Dudar L.V., Polishchuk V.P. Distribution of porcine circovirus type 2 among pigs with respiratory pathology in different geographical regions of Ukraine during 2014-2015 // The 24th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Dublin, Ireland:abstr. – 2016, p.1125.
10. Dudar L.V. Qualitative diagnosis and effective prevention of viral infection - Key factors for animal health // VIII Міжнародна конференція «Біоресурси та віруси». – Kyiv, 2016.