

41. Lysytsya, A.V., Lyco, S.M. & Portuhaj, O.I. (2013). The polyhexamethyleneguanidine stimulation of seeds growing and cell proliferation. *Journal of Materials Science and Engineering B.*, 3, 10, 653–660.

42. Lysytsya, A.V. (2015). Vyznachennia farmazevtychnoi sumisnosti PHMG z biologichno aktyvnymy rehovynamy metodom mass-spektrometrii [Determination of pharmaceutical compatibility PHMG with biologically active substances by mass spectrometry]. *Veterynarna biotekhnologiya. Biuleten – Veterinary Biotechnology. Bulletin*, 7, 184–190 [in Ukrainian].

УДК 616.98:578.824.11:616-036.22

МАЗУР М.В.*, email: mazur_mykola1991@ukr.net,

ПОЛУПАН І.М., канд. вет. наук, email: vetmedic@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВУЛИЧНИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ СКАЗУ ВИДІЛЕНИХ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

В статті наведені результати молекулярно-генетичних досліджень польових ізолятів вірусу сказу виділених від 12 видів тварин та двох людей з 20 областей України в період з 2009 по 2013 рік. Встановлено, що усі зразки за своїми генетичними характеристиками належать до першого генотипу, першої філогрупи ліссавірусів тварин, окрім зразку від кажана, який за генетичними характеристиками близький до європейських ліссавірусів кажанів першого типу. За результатами філогенетичного аналізу, проведено розподіл ізолятів вірусу сказу на чотири кластери, враховуючи географічну приналежність.

Ключові слова: сказ, ліссавіруси, вуличні ізоляти, філогенетичний аналіз

Вступ. Збудник сказу – нейротропний вірус з ряду *Mononegavirales*, родини *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus* (*Lyssa* з грецької – сказ) [1].

Дослідження молекулярно-генетичних характеристик різних ізолятів вірусу сказу, і зокрема їх нуклеотидних послідовностей, дозволяє визначити філогенетичні зв'язки в межах філогрупи та генотипів, встановити їх еволюційну історію, а також важливим аспектом є прогнозування можливих змін і набуття нових властивостей циркулюючими в певному ареалі ізолятів [2].

У філогенетичних дослідженнях еволюційні відносини між формами життя представляють у вигляді філогенетичних, або еволюційних дерев. В основу філогенетичного аналізу покладено визначення дивергенції та спорідненості досліджуваних ізолятів. Чим менший час дві форми життя дивергували від загального предка, тим більш вони споріднені між собою [3].

Важливим є і той факт, що середня частота точкових мутацій для РНК-вмісних вірусів становить одну невірну вставку на 10^4 – 10^5 полімеризованих нуклеотидів, що в мільйон разів більше, ніж у випадку ДНК-вмісних вірусів [4].

Висока частота мутацій у РНК-вмісних вірусів спостерігається внаслідок великої кількості помилок при роботі РНК-залежних РНК-полімераз. Середній

* Аспірант

розмір геному РНК-вмісного вірусу приблизно 10 – 12 тисяч основ. Якщо рівень помилок при мутаціях досягає однієї помилки на кожний генетичний вірус, не можна говорити про РНК-вмісний вірус з єдиним геномом. Таким чином, вуличні ізоляти, представлені не індивідуальним геномом, а сукупністю тісно споріднених геномів, які не є ідентичними [5].

Тому, проведення молекулярно-генетичних досліджень повинно бути невід'ємною частиною сучасної лабораторної діагностики сказу з обов'язковим виділенням РНК вірусу та подальшим філогенетичним аналізом.

Мета роботи. Провести філогенетичний аналіз ізолятів вірусу сказу з території України за допомогою молекулярно-генетичних методів.

Матеріали і методи досліджень. В роботі використано 82 патологічних матеріали, які були отримані від 12 видів тварин (кіт, собака, лисиця, енотовидний собака, борсук, шур, вовк, лось, куниця, ВРХ, кажан, рись) і двох людей з 20 областей України (за виключенням Волинської, Сумської, Полтавської, Кіровоградської та Одеської області) в період з 2009 по 2013 рік.

Зразки визнані позитивними на сказ в регіональних державних лабораторіях ветеринарної медицини за допомогою методу флуоресціюючих антитіл в реакції прямої імунофлуоресценції (РПФ) та біопробу.

Біологічна проба. Виділення вірусу (біопроба) проводили на білих мишах масою 6-8 г за методом Korowski H. (1996 р.) [6]. Специфічність біопроби підтверджували РПФ.

ЗТ-ПЛР. Для постановки ЗТ-ПЛР використано олігонуклеотидні праймери комплементарні до N-гену вірусу сказу JW6DPL (CAATTCGCACATTTGTG) позиція 660-641 та JW12 (ATGTAACACC(C/T)CTACAATTG) позиція 55-73.

Екстракцію РНК проводили тест-системою QIAampViral RNA MiniKit згідно настанови виробника. Для постановки ЗТ-ПЛР використовували попередньо підготовлені зразки, з додаванням реакційної суміші, ензимів MixSuperscript III/PlatinumTaq, 2-ох олігонуклеотидних праймерів JW6DPL та JW12 і води для ПЦР. Реакція складалася з 35 циклів. Кожний цикл із 6-ти етапів, 1 і 2 денатурація, 3–4 відпал праймерів, 5–6 полімеризація (добудова комплементарних праймерів). Ампліфікація дослідних зразків виконувалася в ампліфікаторі PCR SystemProFlex згідно інструкції. Далі, отримані зразки поміщали в 1,5 % агарозний гель з лунками, який приготовлений на TAE-буфері із додаванням 0,004 % етидіум броміду, через який пропускали струм 110 V протягом 35 хвилин.

Продукти ампліфікації очищали з використанням комерційного набору (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN).

Очищені амплікони секвенували в обох напрямках з використанням пари олігонуклеотидних праймерів, яка використовувалася в ЗТ-ПЛР та автоматизованого секвенатора HELICON «Applied Biosystems ABIPRISM» та набору BigDye Sequencing Kit (Applied Biosystems) з GeneScan програмним забезпеченням для аналізу.

Філогенетичний аналіз

Нуклеотидні послідовності були вирівняні з використанням Clustal W множинного вирівнювання і візуалізували з використанням програмного забезпечення BioEdit v. 7.0.5.3.

З метою визначення філогенетичної спорідненості, дослідні зразки були порівняні із обраними з GenBank еталонними генетичними послідовностями вакцинних штамів вірусу сказу (JX276550, EF206709, EF206708), які використовуються при виробництві антирабійних вакцин.

Аналіз результатів секвенування проводили з використанням пакету електронних програм MEGA 6.06. Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей дослідних, вакцинних штамів та вуличних ізолятів вірусу сказу було побудоване за методом NJ (найближчих сусідів), модель Кімура з 1000 бутстреп реплікацій.

Результати дослідження та їх обговорення. Після підтвердження діагнозу рутинними методами, 82 патологічних матеріали були досліджені в ЗТ-ПЛР з використанням пари олігонуклеотидних праймерів JW6DPL та JW12, які використовуються для виділення всіх відомих генотипів ліссавірусів. Постановкою ЗТ-ПЛР підтверджено наявність генетичного матеріалу вірусу сказу в усіх пробах патологічного матеріалу.

Наступним етапом роботи було проведення аналізу результатів секвенування та порівняння зразків між собою та з вакцинними штамми, які є типовими представниками 1-ої філогрупи, 1-го генотипу ліссавірусів тварин, послідовності яких внесені до GenBank. Для філогенетичного аналізу дослідних зразків були побудовані дендрограми за допомогою програми MEGA 6.06. (рис. 1).

Провівши детальний аналіз еволюційної дивергенції досліджуваних зразків між собою та з вакцинними штамми, було встановлено, що польові ізоляти за своїми характеристиками генетично однорідні, належать до 1-шої філогрупи, 1-го генотипу ліссавірусів тварин. Ступінь генетичної спорідненості становить 99,8% за амінокислотним складом, що є типовим для представників ліссавірусів тварин, які циркулюють на території північно-східної Європи.

Однак, вуличний ізолят від кажана (порядковий номер ізоляту 26), який було виділено на території Харківської області, має відмінність за амінокислотним складом 96–98%.

Згідно розміщення на дендрограмі, усі досліджувані ізоляти були розподілені на 4 кластери за певними географічними зонами та областями:

1 кластер – Житомирська, Вінницька, Хмельницька, Київська, Черкаська, Івано-Франківська та Тернопільська області;

2 кластер – Закарпатська, Львівська, Рівненська, Івано-Франківська, Тернопільська, Чернівецька, Рівненська та Миколаївська області;

3 кластер – Миколаївська, Черкаська, Запорізька, Херсонська, Київська, Харківська, Дніпропетровська, Автономна Республіка Крим, Чернігівська, Донецька та Луганська області;

4 кластер – Автономна Республіка Крим та Чернівецька область.

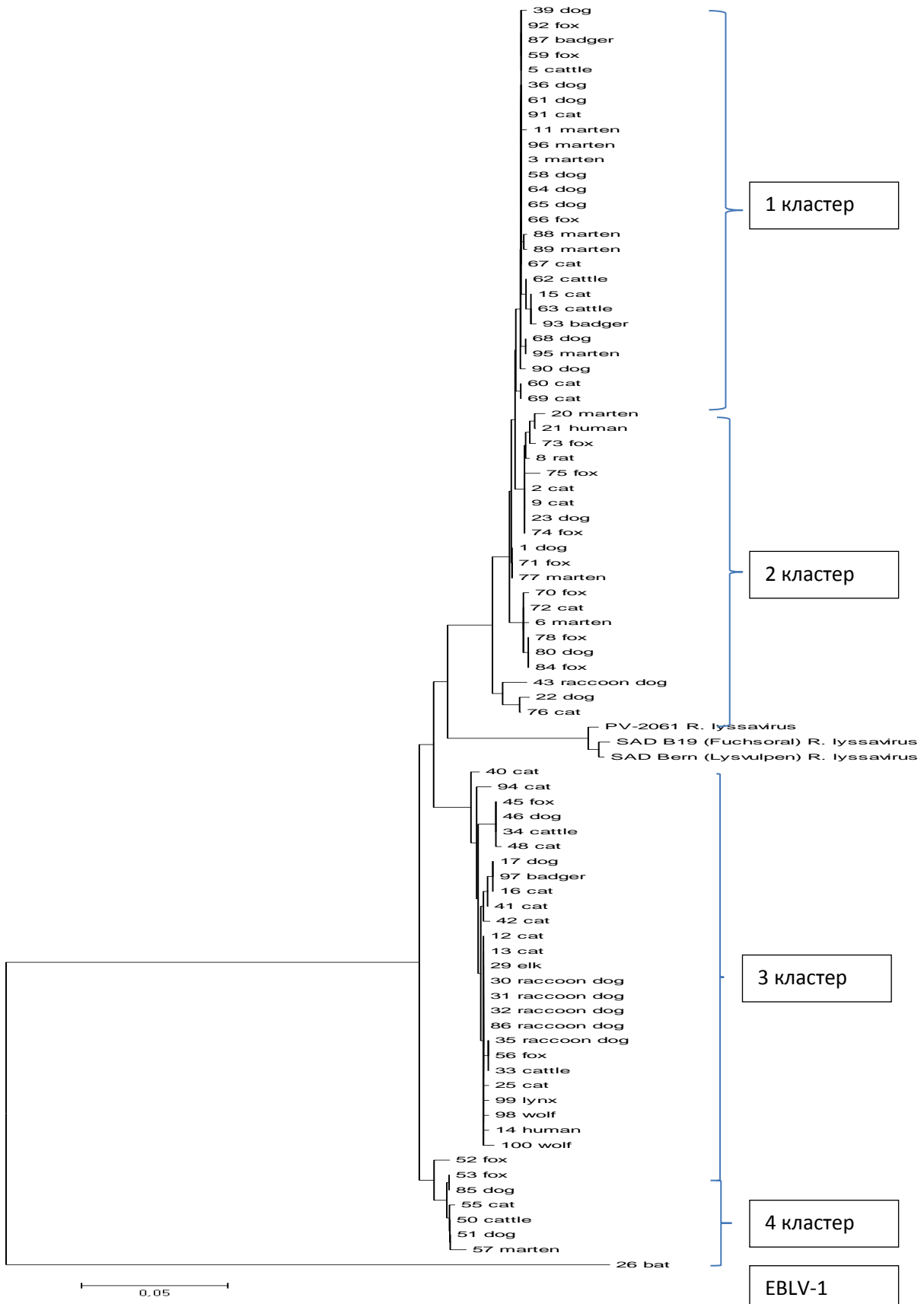


Рис. 1. Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей та вакцинних штамів вуличних ізолятів вірусу сказу з території України, побудоване за методом NJ (найближчих сусідів), модель Кімура з 1000 бутстреп реплікацій.

Отриманні результати вказують на існування вираженого географічного розподілу генетичних варіантів вуличних ізолятів вірусу сказу. На правобережній Україні переважають ізоляти вірусу сказу, які відносяться до 1-го та 2-го кластеру, а на лівобережній – 3-го та 4-го кластерів.

Ізолят, отриманий від кажана, за своїми генетичними характеристиками близький до 3-го та 4-го кластерів, однак має певні відмінності, тому нами було побудоване додаткове філогенетичне дерево (рис. 2), на якому представленні всі класифіковані генотипи вірусу сказу виділені від кажанів на території різних країн, для визначення його генотипу.

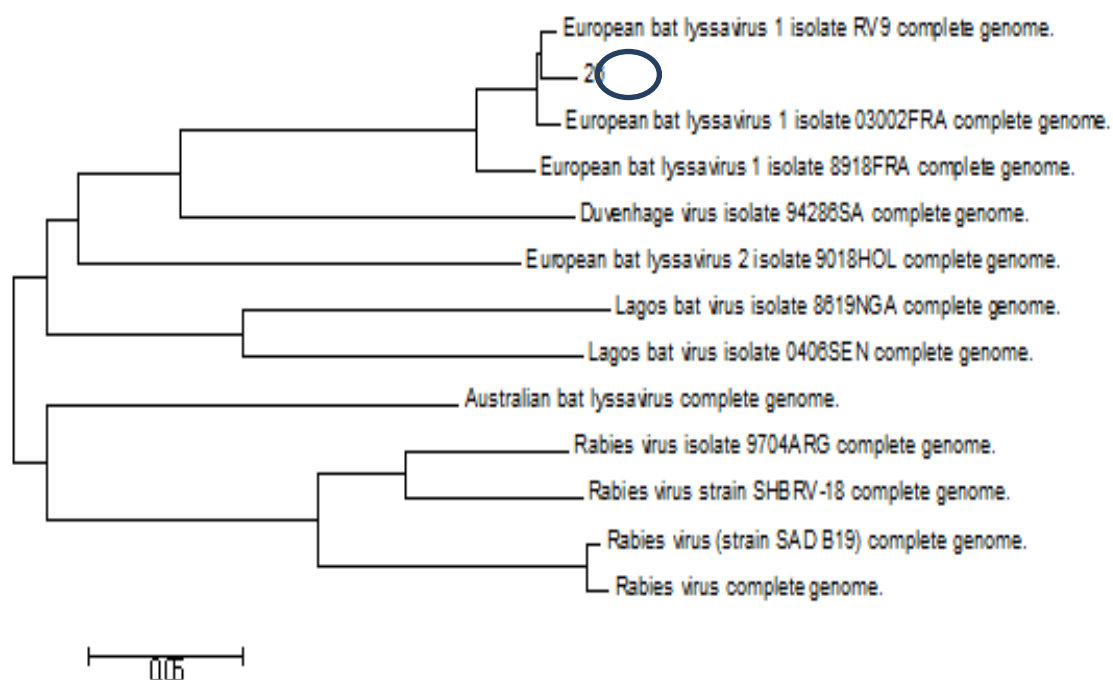


Рис. 2. Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей шести класифікованих генотипів вірусу сказу та зразку від кажана № 26 побудоване за методом NJ (найближчих сусідів), модель Кімура з 1000 бутстреп реплікацій.

Побудова філогенетичного дерева підтвердила приналежність зразку до першої філогрупи п'ятого генотипу ліссавірусів тварин (EBLV-1).

Так, з 48 із 82 досліджуваних вуличних ізолятів вірусу сказу було віднесено до першого та другого кластерів, які зосереджені на території правобережної України, головним чином на територіях Житомирської, Вінницької, Хмельницької, Київської, Тернопільської, Львівської, Івано-Франківської, Рівненської та Чернігівської областей. На території лівобережної України, спостерігається циркуляція третього та четвертого кластерів вірусу сказу. Однак, на територіях окремих областей відмічається наявність ізолятів, які належать до двох різних кластерів вірусу сказу, а саме:

- 1 та 2 кластер на території Тернопільської та Івано-Франківської області;
- 1 та 3 кластеру на території Київської та Черкаської області;
- 2 та 3 кластера на території Миколаївської області;

- 2 та 4 кластера на території Чернівецької області;
- 3 та 4 на території Автономної Республіки Крим.

Дану ситуацію можна пояснити сусіднім розташуванням областей у випадку Тернопільської та Івано-Франківської, Київської та Черкаської областей та міграцією тварин з однієї області в іншу. Що ж стосується Автономної Республіки Крим, Миколаївської та Чернівецької області циркуляція різних кластерів можлива за умови перевезення тварин або міграції з інших країн.

На рахунок вуличного ізоляту від кажана з території Харківської області будь-які висновки за результатами секвенування одного зразку робити завчасно, але той факт, що зразок за своїми характеристиками, незначно, але відрізняється від решти зразків з території України та належить до європейських ліссавірусів кажанів 1-го типу повинен викликати занепокоєння в науковців та практичних лікарів ветеринарної медицини.

Приймаючи до уваги широку антигену й генетичну різноманітність ліссавірусів і виділення нових ізолятів, постає питання про ефективність існуючих антирабічних вакцин, адже штами вірусу в комерційних вакцинах відносяться лише до першого генотипу. Крім того, для захисту проти європейських ліссавірусів (генотип 5 і 6) необхідні вакцини з високою імуногенністю (більше 5 МО).

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. За результатами філогенетичних досліджень, 81 із 82 вуличних ізолятів вірусу сказу з території України, віднесені до першої філогрупи, першого генотипу ліссавірусів тварин.

2. Зразок від кажана з території Харківської області за своїми генетичними характеристиками, належить до першої філогрупи, п'ятого генотипу ліссавірусів тварин.

3. За результатами філогенетичного аналізу, проведено розподіл ізолятів вірусу сказу на чотири кластери, враховуючи географічну приналежність.

Висловлення подяки. Керівнику і співробітникам департаменту вірусології Національного ветеринарного інституту м. Пулави (Польща): Prof. Jan F. Żmudziński; Dr. Hab. Marcin Smreczak; Dr. Anna Orłowska.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. [Electronic resource] – Access to resources: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
2. Tordo N. Structure of rabies virus / N. Tordo, O. Poch. // Kluwer Academic Publishers. Rabies Boston. – 1988. – P. 25–45
3. Molecular epidemiological tools and phylogenetic analysis of bacteria and viruses with special emphasis on lyssaviruses / H. Bourhy, B. Kissi, N. Tordo [et al.]. // Preventative Veterinary Medicine. – 1995. – №25. – P. 161–181.
4. Johnson N. Phylogenetic comparison of the genus Lyssavirus using distal coding sequences of the glycoprotein and nucleoprotein genes / N. Johnson, L.M. McElhinney, J. Smith [et al.] // Arch. Virol. – 2002. – Vol.147. – P. 2111–2123.
5. Kuzmin I.V. The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution / I.V. Kuzmin, I.S. Novella, R.G. Dietzgen [et al.] // Infect. Genet. Evol. – 2009. – Vol. 9. – P. 541–553.

6. Kaplan M. Laboratory techniques in rabies / M. Kaplan, H. Koprowski. – Geneva: WHO, 1996. – 476 p. – [4th ed.].

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УЛИЧНЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ / Мазур Н.В., Полупан И.Н.

В статье наведены результаты молекулярно-генетических исследований полевых изолятов вируса бешенства выделенных от 12 видов животных и двух людей из 20 областей Украины в период с 2009 по 2013 год. Установлено, что все образцы по своим генетическим характеристикам относятся к первому генотипу, первой филогруппы лиссавирусив животных, кроме образца от летучей мыши, который по генетическим характеристикам близок к европейским лиссавирусив летучих мышей первого типа. По результатам филогенетического анализа, проведено распределение изолятов вируса бешенства на четыре кластера, учитывая географическую принадлежность.

Ключевые слова: бешенство, лиссавирусы, уличные изоляты, филогенетический анализ

MOLECULAR GENETIC CHARACTERIZATION OF STREET RABIES VIRUS ISOLATES SELECTED IN UKRAINE / Mazur M.V., Polupan I.M.

Introduction. *Studies of molecular genetic characteristics of different isolates of rabies virus, and in particular their nucleotide sequences allows to determine phylogenetic relationships within phylogroup and genotypes, establish their evolutionary history. Also, an important aspect of molecular genetic studies is the prediction of possible changes and the acquisition of new properties of isolates, circulating in a specific area.*

So, molecular genetic studies should be an integral part of modern laboratory diagnosis of rabies with RNA extraction and subsequent phylogenetic analysis.

The goal of the work. *To conduct phylogenetic analysis of Ukrainian rabies isolates using molecular genetic techniques*

Materials and methods. *We used 82 pathological materials were obtained from 12 animal species (cat, dog, fox, raccoon dog, badger, rat, wolf, moose, marten, cattle, bats, lynx) and two samples from people from 20 oblasts of Ukraine (except Volyn, Sumy, Poltava, Kirovohrad and Odesa oblast) from 2009 to 2013.*

Results of research and discussion. *Obtained results indicated the existence of pronounced geographical distribution of genetic variants of street rabies virus. On the right-bank of Ukraine dominated rabies virus, which belong to the cluster number 1 and 2. On the left bank – cluster number 3 and 4.*

Street isolate from bat from the Kharkiv oblast by its characteristics belonged to the European bat Lyssavirus type 1.

Conclusions and prospects for further research:

1. *The results of phylogenetic studies have shown that 81 from 82 street rabies isolates from Ukraine belonged to the phylogroup 1, genotype 1 of animals Lyssavirus.*

2. *Sample from bat from Kharkiv oblast by its characteristics belonged to the first phylogroup, fifth genotypes Lyssavirus of animals.*

3. *According to the results of phylogenetic analysis, conducted distribution of rabies isolates into four clusters, according to the geographical affiliation.*

Acknowledgments. *Managers and employees of the Department of Virology of the National Veterinary Institute. Pulawy (Poland): Prof. Jan F. Żmudziński; Dr. Hab. Marcin Smreczak; Dr. Anna Orłowska.*

Keywords: rabies, Lissaviruses, street isolates, phylogenetic analysis

REFERENCES

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. *www.ictvonline.org*. Retrieved from <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
2. Tordo, N., & Poch, O. (1998). Structure of rabies virus. *Kluwer Academic Publishers. Boston*, 25-45.
3. Bourhy, H., Kissi, B., & Tordo, N. (1995). Molecular epidemiological tools and phylogenetic analysis of bacteria and viruses with special emphasis on lyssaviruses. *Preventative Veterinary Medicine*, 25, 161-181.
4. Johnson, N., McElhinney, L.M., & Smith, J. (2002). Phylogenetic comparison of the genus Lyssavirus using distal coding sequences of the glycoprotein and nucleoprotein genes. *Arch. Virol.* 147, 2111-2123.
5. Kuzmin, I.V., Novella I.S., & Dietzgen, R.G. (2009). The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution. *Infect. Genet. Evol.*, 9, 541-553.
6. Kaplan, M., & Koprowski, H. (1996). *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization.

УДК 616.379-008.64:619:[612.34+612.35+612.17+612.46]

МАЗУРКЕВИЧ А. Й., д-р вет. наук, проф., e-mail: a.mazurkevich@nubip.edu.ua,
КОВПАК В. В.¹, канд. вет. наук, e-mail: vitkovpak@mail.ru,
КОВПАК О. С.², e-mail: alex88-87@yandex.ru

Національний університет біоресурсів і природокористування України

ГУДЗЬ Н. В., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: gudznataly@gmail.com

Інститут ветеринарної медицини НААН

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В РІЗНИХ ОРГАНАХ ЩУРІВ ЗА АЛОКСАНОВОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Проведені дослідження морфологічних змін у підшлунковій залозі, печінці, нирках та серці за алоксанового цукрового діабету. Встановлено, що дана модель цукрового діабету супроводжується структурними змінами в ендокринній частині підшлункової залози, які залежать від важкості захворювання. У той же час, видимих гістологічних змін екзокринної частини не виявлено. У печінці виявлено ознаки хронічного гепатиту з портальними некрозами та фіброзом, а також застійними явищами у кровоносних судинах. У дослідних зразках нирок відмічали ознаки глікогенового нефрозу та багаточисельні комpositи солей кальцію. У серці виявлено ознаки дистрофії міокарда та потовщення ендокарду.

Ключові слова: алоксановий цукровий діабет, патологічні зміни, печінка, підшлункова залоза, серце, нирки

Вступ. Цукровий діабет (ЦД) 1 типу (або інсулінозалежний ЦД) – хронічне ендокринно-обмінне захворювання, зумовлене абсолютною недостатністю інсуліну внаслідок поєднаного впливу різних ендогенних

¹ Докторант, науковий консультант – д-р вет. наук, професор **Мазуркевич А.Й.**

² Аспірант, науковий керівник – д-р вет. наук, професор **Мазуркевич А.Й.**