

УДК 636.09:578.2:578.5:578.831.2

O. GOLOVKO, postgraduating student
 V. KATSYMON, senior Researcher
 O. DERYABIN, head of the department of molecular biology and immunochemistry
 State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of microorganisms, Kyiv

STUDY OF GENETIC COGNATION OF VACCINE AND EPIZOOTIC VIRUS STRAIN OF CANINE DISTEMPER

The article presents studying results of genetic relationship between epizootic strains of canine distemper (CDV), which are circulating in the territory of Ukraine and vaccines: Onderstepoort (Duramune Max 5 SvK/4L) and Snyder Hill (Vanguard plus 5/L). According to the electrophoresis results of RNA amplification products of virus strains found a high degree of affinity between vaccine and epizootic strains. As a result of phylogenetic analysis of identified sequences fragments of gene NP revealed that isolates showed higher homology to strain Snyder Hill, which made the vaccine Vanguard plus 5/L.

Distemper is a very common disease of carnivores in Ukraine which causes significant economic losses and has negative moral and psychological consequences for the person who loses their pet. One of the main measures to prevent this disease is timely vaccination of animals.

A number of live vaccines against canine distemper are registered in Ukraine, including produced in the United States: Vanguard plus 5/L and 5 CvK Duramune Max/4L. CDV has a typical homogeneous immunological feature, that's why different isolates and versions of adapted strains cannot be differentiated by serological methods. In the late of 20th century in the United States, Europe and Africa were identified CDV isolates from different animal species that are significantly different from the vaccine strains of the virus [1, 3].

The aim of the work – to study the genetic relationship of CDV epidemiological isolates allocated in Ukraine and CDV vaccine strains, which are comprised most commonly used vaccines in Ukraine.

MATERIALS AND METHODS

In studies was used emphasis CDV isolates from different regions of Ukraine during 2013–2014: № 19 – Lviv, № 26 – Kharkiv, № 51 – Kyiv and 2 vaccines – DR (Duramune Max 5 CvK/4L, USA) con-

taining attenuated strain Onderstepoort and Vg (Vanguard plus 5/L, USA) containing attenuated strain Snyder Hill.

RNA isolation from a sample of isolates and vaccine and providing the reaction of reverse transcription was performed using a set of «Rybozol-A» and «REVERTA-L» (AmplifySens, Russia) according to the manufacturer's recommendations. For the polymerase chain reaction (PCR) was used set of «AmplifySens 200-1» (AmplifySens, Russia). Analysis of amplification products was performed by electrophoresis in 1,5% agarose gel (Sigma, USA) using markers «GeneRuller 100 bp DNA Ladder Plus» (ThermoScientific, USA) and recorded using gel documentation system «Gel Doc XR Plus» (BioRad Laboratories, USA).

For amplification and sequencing of the nucleoprotein gene (NP) fragment have been used oligonucleotide primers CDV-F3 5'-TTCTGAGGCAGATGAGTTCTTC-3' and CDV-R 5'-CTTGGATGCTATTTCTGACACT-3' [2], from the collection of State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of microorganisms. Cleaning amplified DNA samples performed by set «GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit» (MoBio, USA).

Sequencing of purified amplified fragments was performed on the Applied Biosystems 3730 x1 DNA Analyzer using Big Dye terminators, version 3.1 (Applied Biosystems, USA). Using the software

package «Vector NTI» v.11.0.1 (Invitrogen) chromatogram has been analyzed and obtained sequences by module Contig-Express, and alignment and comparative analysis by module AlighX Blocks.

As a reference gene sequence using nucleoprotein registered in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sequence of isolate Onderstepoort (AF305419) [5].

RESULTS AND DISCUSSION

Among carnivores livestock compass different variants of the canine distemper virus that are prone to genetic variability and may differ from the existing vaccines [6]. According to the theory of quasispecies [4], the population of RNA-containing viruses does not consist of a single genotype, and is an ensemble of related sequences generated by the rapid genomic evolution – the high rate of mutation of viral RNA replication. Although this rate of mutation leads to the formation of numerous non-viable virus variants at the same time it creates a «cloud» potentially favorable mutations at the population level that provides greater likelihood of virus quasispecies evolution and adaptation to new environmental conditions, including the acquisition of resistance to vaccines during infection.

Thus, given that the successful colonization of any ecosystem is due to the interaction of different variants of the virus that are occupying some regions of population distribution of the sequence (genome), to analyze the epizootic options of CDV, we have selected isolates from different regions of Ukraine. These isolates were identified in the 2013–2014 years due to research of developing a diagnostic test system «CDV-test» (registration certificate № BB-00688-06-14

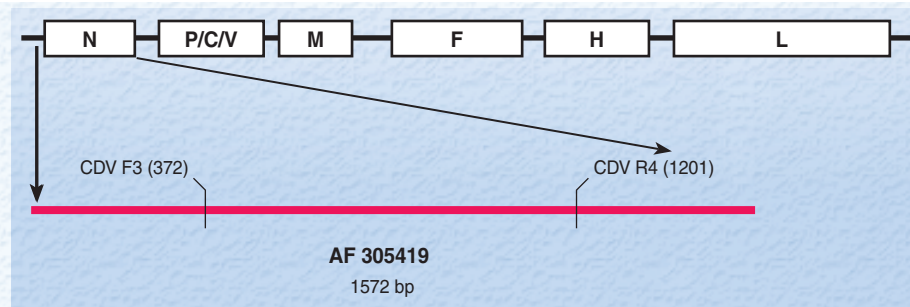


Fig. 1. Schematic representation of the CDV genome and primers positions for sequencing (CDV-F3 / CDV-R) on nucleoprotein gene sequence of strain Onderstepoort

from 07.11.2014). To improve the accuracy of the results for determining the affinity of Ukrainian epidemiological vaccines isolates, also were sequenced with primers CDVF3/CDVR4 (Fig. 1) 2 vaccines are similar of fragments – DR (Onderstepoort strain) and Vg (strain Snyder Hill), registered and used in Ukraine.

For nucleoprotein gene sequencing of the canine distemper virus of local isolates, were selected isolates identified in Kyiv, Kharkiv and Lviv. The concentration determined spectrophotometrically gained in RT-PCR and purification of DNA in samples was 31–34 ng/ml (Fig. 2).

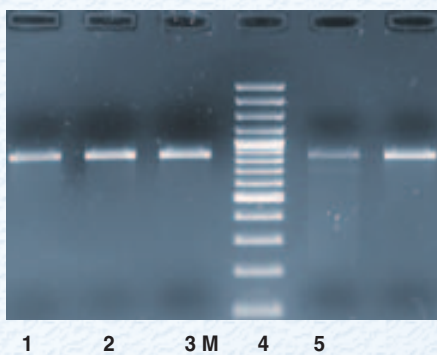


Fig. 2. Electrophoretic analysis in 1.5% agarose gel purification amplified DNA preparations: 1 – isolate № 19 (Lviv), 2 – isolate № 26 (Kharkiv), 3 – isolate № 51 (Kyiv), 4 – Vaccine Vg (Vanguard plus 5/L), 5 – Vaccine DR (Duramune Max 5 SvK/4L), M – marker of DNA fragments size

One can see by results of electrophoretic analysis of amplification products, NP gene fragment size in selected isolates and vaccine strains coincide and were 829 bp.

Phylogenetic analysis of identified sequences of NP gene fragments from ukrainian isolates and vaccine strains showed the presence of 99% homology with the vaccine DR (Duramune Max 5 SvK/4L) with the sequence isolates Onderstepoort registered in GenBank. The difference was the replacement of one nucleotide (C/T) at position 840 in the sequence AF305419.1. Homology for isolates was 96% for Kiev isolates and 95% for Lviv and Kharkiv.

As seen in Fig. 3 isolates showed higher homology to the virus strain of vaccine Snyder Hill Vg (Vanguard plus 5/L).

CONCLUSIONS

1. The highest level of relationship (99%) with reference sequence of CDV nucleoprotein gene, registered in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), found in the vaccine strain, which composed in Duramune Max 5 CvK/4L vaccine.

2. Epidemiological strains of CDB which has been identified in various regions of Ukraine (Kyiv, Lviv, Kharkiv) had homology to the reference sequence of CDV nucleoprotein gene at the level of 95–96%.

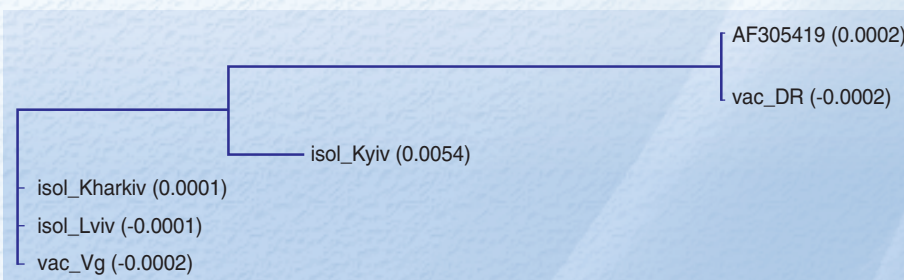


Fig. 3. Comparative phylogenetic analysis of Ukrainian CDV isolates and vaccines

3. The highest degree of nucleoprotein gene sequences affinity from epidemiological isolates of CDV, which are allocated in Ukraine marked to the vaccine strain Snyder Hill, which composed in Vanguard plus 5/L vaccine.

REFERENCE

1. **Сюрин В.Н.** Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв и др. – М.: ВНИТИБП. – 1998. – 928 с.
2. **Domingo E.** Mechanisms of viral emergence / E. Domingo // Journal of Veterinarian Research. – 2010. – Vol. 41. – P. 38–51.
3. **Harder T.C.** Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships / T.C. Harder, M. Kenter, H. Vos et al. // J. Gen. Virol. – 1996. – Vol. 77. – P. 397–405.
4. **Holmes E.C.** The Evolution and Emergence of RNA Viruses / E.C. Holmes // Oxford Series in Ecology and Evolution / Ed. by P.H. Harvey and P.M. May. – 2009. – P. 87–103.
5. **Multiplex** Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction (ARMS-PCR) for diagnosis of natural infection with canine distemper virus / S. Chulakasian, M.-S. Lee, C.-Y. Wang [at al.] // Virology Journal. – 2010. – Vol. 7. – P. 122–130.
6. **Wang F.** Differentiation of Canine Distemper Virus isolates in fur animals from various vaccine strains by reverse transcription-polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism according to phylogenetic relations in China / F. Wang, X. Yan, X. Chai [at al.] // Virology Journal. – 2011. – Vol. 8. – P. 85–92.

Одержано 16.01.2015

Supervisor – V.O. Ushkalov,
Doctor of Veterinary Sciences, corresponding member of the Academies.

Вивчення генетичного споріднення вакцинних і епізоотичних штамів вірусу чуми м'ясоїдних. О.А. Головка, В.В. Кацімон, О.Н. Дерябін

Наведено результати вивчення генетичного споріднення епізоотичних штамів вірусу чуми м'ясоїдних (ВЧМ), які циркулюють на території України, з вакцинними: Onderstepoort (Duramune Max 5 CvK/4L) і Snyder Hill (Vanguard plus 5/L). За результатами електрофорезу продуктів амплі-

УВАГА! ТРИВАЄ ПЕРЕДПЛАТА НА ЖУРНАЛ НА 2015 РІКІ

фікації РНК штамів вірусу встановлений високий ступінь споріднення вакцинних та епізоотичних штамів вірусу. В результаті філогенетичного аналізу певних послідовностей фрагментів гена NP встановлено, що ізоляти виявили велику гомологію до штаму Snyder Hill, з якого виготовляють вакцину Vanguard plus 5/L. ◉

Изучение генетического родства вакцинных и эпизоотических штаммов вируса

чумы плотоядных. О.А. Головки, В.В. Кацимон, О.Н. Дерябин

В статье приведены результаты изучения генетического родства эпизоотических штаммов вируса чумы плотоядных (ВЧП), циркулирующих на территории Украины, с вакцинными: Onderstepoort (Duramune Max 5 CvK/4L) и Snyder Hill (Vanguard plus 5/L). По результатам электрофореза продуктов амплификации РНК штаммов вируса установлена высокая степень родства

вакцинных и эпизоотических штаммов вируса. В результате филогенетического анализа определенных последовательностей фрагментов гена NP установлено, что изоляты обнаружили большую гомологию к штамму Snyder Hill, из которого изготавливают вакцину Vanguard plus 5/L. ◉

З версією статті українською мовою можна ознайомитися на веб-сторінці журналу – <http://vmu.org.ua>

УДК 636.087.7:636.4:619:612.015.3

М.О. ЗАХАРЕНКО, докт. біол. наук, професор
Л.В. ШЕВЧЕНКО, докт. вет. наук, професор
В.М. ПОЛЯКОВСЬКИЙ, канд. вет. наук, доцент
В.М. МИХАЛЬСЬКА, канд. вет. наук, доцент

Л.В. МАЛЮГА, канд. сільгосп. наук, доцент
Ю.В. ГРИБ, канд. вет. наук
Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ

ФРАКЦІЙНИЙ СКЛАД БІЛКІВ ПЛАЗМИ КРОВІ СВИНОМАТОК ПРИ ЗГОДОВУВАННІ ГЛІЦІНАТІВ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ

Доведено, що заміна неорганічних джерел міді, цинку, заліза, марганцю та кобальту в комбікормі для поросних свиноматок у дозах, що становлять потребу та її половину в перерахунку на мікроелементи, не чинить негативного впливу на білковий спектр плазми крові. Згодовування хелатних сполук мікроелементів поросним свиноматкам збільшувало рівень білків фракції IgM та ліпопротеїдів, плазміногену й деяких фракцій трансферинів і не впливало на вміст фібриногену, IgA і IgG, церулоплазміну, гаптоглобіну, альбумінів і преальбумінів у їхній плазмі крові.

Серед основних причин нестачі мікроелементів у тварин – аліментарні фактори, які призводять до зниження резистентності організму, їх захворювання та загибелі [3].

Джерелом мінеральних речовин для тварин і птиці є їх солі з неорганічними кислотами. Проте ці сполуки не завжди дають очікуваний профілактичний ефект через низький рівень засвоєння у шлунково-кишковому тракті [7].

На цей час особливий науковий і практичний інтерес становлять комплексні (хелатні) сполуки мікроелементів з амінокислотними чи іншими органічними лігандами [5].

Вони позитивно впливають на здоров'я і продуктивність тварин, стимулюють процеси обміну речовин [2], не кумулюються в тканинах і органах, є менш токсичними, ніж їх солі з мінеральними кислотами [1].

Важливе значення у вивченні впливу органічних форм мікроелементів на організм тварин мають дослідження фракційного складу білків плазми крові. Відомо, що церулоплазмін (CER), трансферини (TRF), альбуміни й преальбуміни беруть участь у транспортуванні мікроелементів, гормонів і вітамінів до тканин. Гаптоглобін (Hp) активує реакцію гемаглютинації вірусів, є ендогенним інгібітором простагландинсинтезуючого ферментативного комплексу, пригнічує ріст і розмноження патогенних бактерій, стимулює синтез колагену – основного білка сполучної тканини. Імуноглобуліни крові свиноматок, переходячи в молозиво, створюють колостральний імунітет у новонароджених поросят.

Мета роботи – дослідити вплив комплексу гліцинатів міді, цинку, кобальту, марганцю та заліза на фракційний склад білків плазми крові свиноматок.

