

УДК 576.858:574

Н.М. МАТВІЄНКО

Інститут рибного господарства НААН
вул. Обухівська, 135, м. Київ, 03164

МОНІТОРИНГ ВІРУСНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ РИБ У РИБОГОСПОДАРСЬКИХ ВОДОЙМАХ УКРАЇНИ

На основі епізоотичних даних оцінено стан рибницьких господарств України щодо вірусних захворювань риб. Виявлено новий для нашої країни вірус панкреатичного некрозу, що уражує райдужну форель (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). Проведений філогенетичний аналіз виділених ізолятів цього вірусу риб свідчить про їх близьку спорідненість з ізолятами, що циркулюють на території Польщі та про можливі шляхи потрапляння цього вірусу на територію України.

Ключові слова: моніторинг, IPNV, SVCV, VHS, філогенетичний аналіз, ЗТ-ПЛР, ІФА

Водні біоресурси України є важливою частиною природних ресурсів держави і мають велике господарське значення. Процеси інтенсифікації рибництва неможливі без впровадження нових методів його ведення таких як застосування полікультури, ущільнення посадок, впровадження і акліматизація нових об'єктів аквакультури. Також не варто залишити поза увагою перевезення риб із одних господарств в інші, що знаходяться у різних географічних та кліматичних зонах із характерними для них екосистемами. Причинно-наслідковим зв'язком такої діяльності є виникнення нових захворювань риб, часто не характерних для даного регіону або окремо взятого господарства. Найбільших збитків рибництву завдають захворювання, що викликаються вірусами, зокрема такими рабдовірусами як весняна віремія коропа (SVC) та вірусна геморагічна септицемія форелі (VHS), а також представником родини *Birnavirinae* вірусом інфекційного некрозу підшлункової залози (IPN). Ці хвороби занесені до кодексу особливо небезпечних хвороб водних тварин [4, 12]. Необхідність проведення комплексних моніторингових досліджень щодо виявлення вірусних захворювань риб в Україні визначається в першу чергу тим, що нині значна частина території України – це райони, сприятливі для інтенсивного ведення рибництва. Господарства, що займаються рибогосподарською діяльністю, постійно завозять рибу, ікру та рибопосадковий матеріал в Україну з різних географічних зон (в тому числі і з закордону).

Метою роботи було провести моніторингові дослідження та філогенетичний аналіз виділених українських ізолятів вірусів риб, а також визначити клінічні характеристики виявлених захворювань.

Матеріал і методи досліджень

Матеріал для вірусологічних досліджень був відібраний в рибницьких господарствах та природних водоймах різних областей України. Найчастіше вірусні ізоляти виділяли від різновікових груп коропа (*Ciprinus carpio*, Linnaeus, 1758), з мальків та цьоголіток райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) з ознаками вірусного ураження. Відбір та обробку патологічного матеріалу проводили згідно міжнародних нормативних документів [10, 12]. Для серологічної діагностики було використано метод класичного імуноферментного аналізу в модифікації сендвіч за стандартною методикою. Використано діагностичні тест-системи „VHSV Ag-ELISA”, „IPNV Ag-ELISA» та SVCV Ag-ELISA (фірми «TestLine»), дослідження проводили згідно інструкції виробника.

Розміри вірусних часток ізолятів визначали за допомогою електронної мікроскопії методом негативного контрастування. Зразки тканин експериментально заражених цьоголіток коропа і зараженої культури клітин риб фіксували за Іто і Карновським [9], обезводнювали в спиртах висхідної концентрації і заливали в метакрилат. Ультратонкі зрізи контрастували цитратом свинцю за Рейнольдсом [14] і досліджували в електронному мікроскопі при інструментальному збільшенні 20000-40000х.

Виділення РНК із зразків та реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою наборів „Рибозоль-А” та „РЕВЕРТА-Л” згідно з рекомендаціями виробника („АмплиСенс”, Росія). Для детекції вірусу інфекційного панкреатичного некрозу форелі використовували 3 різних пари праймерів та проводили оптимізацію постановки реакції. Для детекції вірусу весняної віремії корпа використовували метод гніздової ПЛР з використанням олігонуклеотидних праймерів, рекомендованих Міжнародним епізоотичним бюро [13]. У якості другої пари праймерів були використані праймери, рекомендовані І.С. Щелкуновим [3].

Для детекції вірусу геморагічної септицемії форелі використали вітчизняну тест-систему для виявлення РНК вірусу геморагічної септицемії форелі «ВГС-ТЕСТ»[1].

Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі з використанням стандартних маркерів Gene Ruller 100 bp DNA Ladder plus (ThermoScientific, США).

Сиквенування очищених ампліфікованих фрагментів проводили на Applied Biosystems 3730x1 DNA Analyzer з використанням Big Dye terminators, version 3.1 (Applied Biosystems, США). Ідентифікацію та порівняння отриманих послідовностей проводили за допомогою BLAST-аналізу. Філогенетичний аналіз проводили за допомогою програмних пакетів MEGA 5 [16]. Для перевірки достовірності побудованих дерев застосовували бутстреп тест (bootstrep) з 1000 бутстреп реплікаціями [7]. Філогенетичні дерева конструювали методом зв'язування найближчих сусідів (neighbour-joining, NJ) [15] та максимальної правдоподібності (ML) [8].

Результати досліджень та їх обговорення

Для дослідження епізоотичної ситуації були проведені обстеження господарств різних форм власності, що спеціалізуються на вирощуванні райдужної форелі та корпа. Дослідження проводились впродовж 2005-2013 років. Також проводили обстеження природних водойм, які забезпечують водопостачання цих господарств.

Відомо, що більшість форелевих господарств – це повносистемні господарства закритого типу [2]. Більшість цих господарств сконцентровано у західних областях України (Закарпатська, Львівська, Чернівецька, Волинська, Рівненська) та АР Крим. Саме в цих регіонах природно кліматичні умови є сприятливими для вирощування форелі.

У результаті комплексу досліджень виявлено у райдужної форелі із природних водойм вірус інфекційного панкреатичного некрозу (Чернівецька та Закарпатська обл.). Цей вірус також виділений нами у приватних фермерських господарствах Львівської та Волинської областей. Вірус був виділений під час обстеження личинок та молоді райдужної форелі. Візуальні прояви інфекції полягали у зміні забарвлення тіла риб до чорного, у порушенні рухових функцій, які проявлялися в нетипових колоподібних рухах форелі на одному місці, екзофтальмії. (рис. 1).



Рис.1. Клінічні ознаки у малька райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*), викликані вірусом IPN.

Вірус виділяли з печінки, нирок, гонад, травного тракту і мозку навіть у тих цьоголіток, де не було зафіксовано ніяких ознак захворювання.

Вірусосумісний матеріал, ізольований від форелі, був підданий електронно-мікроскопічному дослідженню з метою вивчення морфології виділених ізолятів. При негативному контрастуванні та інструментальному збільшенні 30 000 були виявлені віріони гексагональної і округлої форми діаметром 65-85 нм (рис. 2).

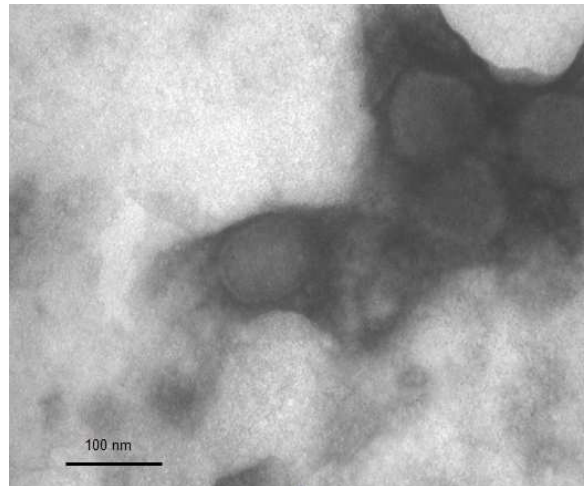


Рис. 2. Електронна мікрофотографія вірусу панкреатичного некрозу (IPN).

Негативне контрастування ураніацетатом, інструментальне збільшення 30 000.

Вірусу геморагічної сиптицемії форелі у риби з обстежених господарств та природних водойм нами виявлено не було.

Що стосується господарств, які спеціалізуються на вирощування корокових риб, то ситуація тут залишається складною. Було проведено обстеження господарств, які знаходяться у різних регіонах України, зокрема у Львівській, Рівненській, Хмельницькій, Тернопільській, Вінницькій, Київській, Миколаївській, Херсонській та Донецькій областях. Постановку діагнозу проводили комплексно, з урахуванням клінічних, патолого-анатомічних та молекулярно-біологічних методів. При дослідженні риби у весняно літній період, у момент стресу при пересадженні її з зимувальних ставів у нагульні, поряд із бактеріальними збудниками були виділені ізоляти вірусу весняної віремії коропа. Захворювання носило системний характер. У цьоголіток спостерігали здуття черевця, скуйовдження луски, екзофтальмію (рис. 3).



Рис.3. Ознаки ураження коропа вірусом весняної віремії (SVC).

При електронно-мікроскопічному дослідженні матеріалу від коропа були виявлені віріони характерної будови для рабдовірусів (рис. 4).

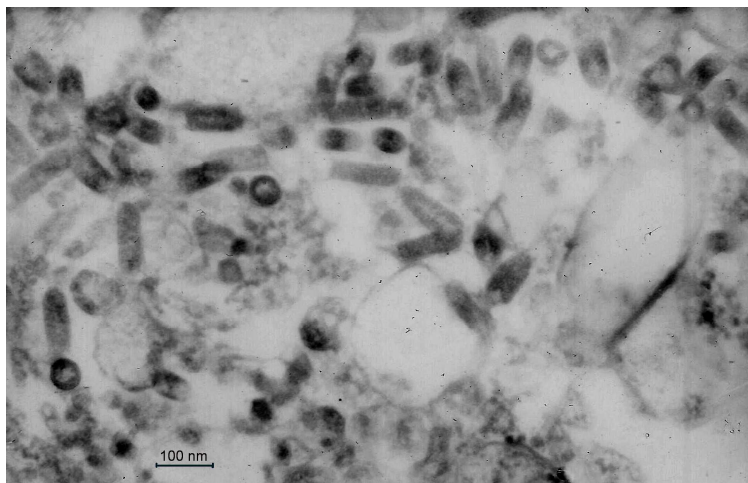


Рис. 4. Електронна мікрофотографія вірусу весняної віремії коропа (SVC). Інструментальне збільшення 30 000

Нижче наведена мапа України де зазначені регіони виявлення вірусних інфекцій риб (рис. 5).

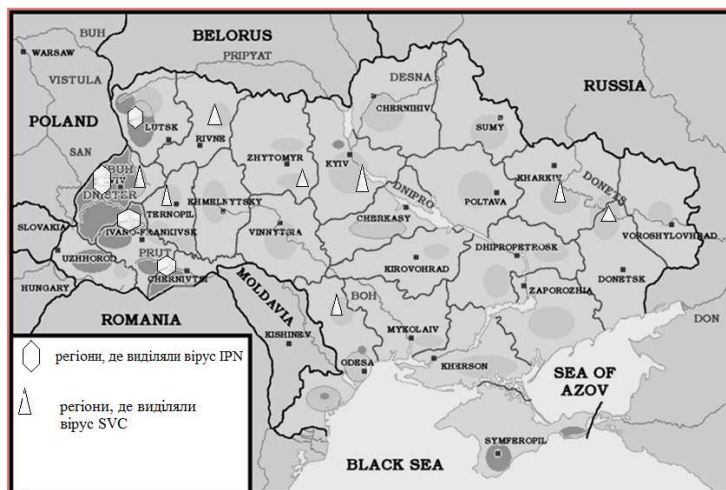


Рис. 5. Мапа України, із зазначенням регіонів, щодо виявлення вірусів риб

Оскільки одним із завдань нашої роботи було проведення філогенічного аналізу для вивчення походження українських ізолятів вірусів, на першому етапі роботи нуклеотидні послідовності капсидного білка двох ізолятів . IPNV. були сиквеновані та порівняні між собою. Як відомо, IPNV. є одним з типових представників роду *Aquabirnavirus*. Більше того, за існуючими даними [5] цей вид вірусу має значну кількість штамів та філогенетично споріднений з іншими представниками роду *Aquabirnavirus*.

При порівнянні ділянок нуклеотидних послідовностей кДНК капсидного білка VP2 виділених ізолятів (1, 2) IPNV. між собою встановлено, що гомологія становить 98-99%. Згідно з літературними даними [11], якщо частка гомології нуклеотидних послідовностей вірусів становить 95% і більше, то вони є ізолятами одного штаму, якщо ж менше 90% -то це різні штами одного вірусу.

Отже, всі українські ізоляти IPNV належать до одного і того ж штамму, подібного до штамму Sp, серотипу A2 [6]. Наступним кроком нашої роботи було порівняння нуклеотидних послідовностей українських ізолятів з представленими в світових базах даних відомими нуклеотидними послідовностями штамів та ізолятів IPNV. (рис. 6).

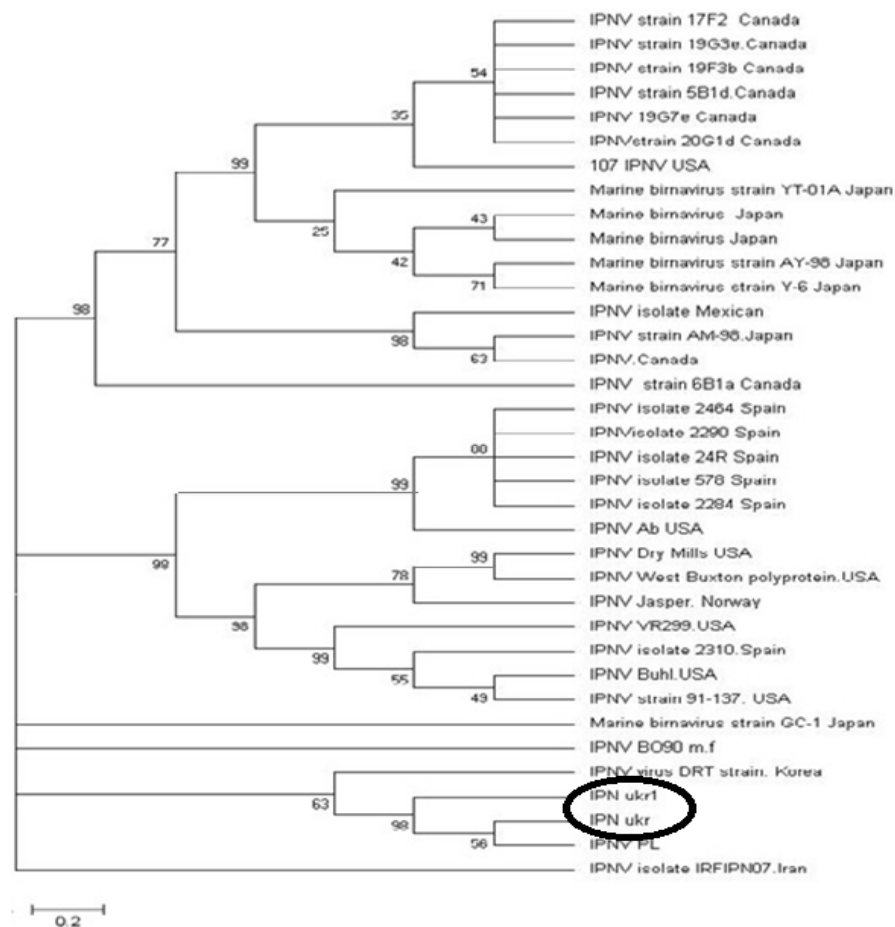


Рис. 6 Порівняльний філогенетичний аналіз українських ізолятів вірусу IPN та відомих ізолятів вірусу IPN з Генбанку (NJ з 1000 бутстреп)

Виявилося, що найвища частка подібності (біля 98% за нуклеотидними послідовностями) українські ізоляти мають з польським ізолятом, що може свідчити про їх спільне походження.

Висновки

За результатами проведеного моніторингу щодо вірусних інфекцій риб у господарств України з використанням клінічних, молекулярно-біологічних та серологічних методів встановлено ураження коропових риб вірусом весняної віремії (SVC) та виявлено новий (для України) вірус інфекційного панкреатичного некрозу (IPN) райдужної форелі.

На основі філогенетичного аналізу ділянки геному виділених ізолятів вірусу інфекційного панкреатичного некрозу райдужної форелі з послідовностями, опублікованими в ген банках встановлено ступінь подібності нуклеотидних послідовностей українських ізолятів з відомими у світі. Українські ізоляти IPNV показали високу подібність з польськими ізолятами – 98%, що може свідчити про їх спільне походження.

Проведення щорічного систематичного моніторингу, а також створення заходів щодо попередження заносу збудників інфекційних захворювань є запорукою благополуччя спеціалізованих рибницьких господарств України.

1. Гайдей О.С. Розробка діагностичної тест-системи для виявлення та ідентифікації вірусу геморагічної септицемії форелі на основі зворотно-транскриптазної ПЛР / О.С. Гайдей, А.М. Головка, О.М. Дерябін // Вісник аграрної науки. — 2011. — № 8. — С. 39—40.

2. Гибридизационная тест-система для экспресс-диагностики весенней виремии карпа / [И.С. Щелкунов, Т.И. Щелкунова, О.А. Купинская и др.] // Избранные труды ВНИИПРХ. — М., 2002. — Кн. 1. — Т 2. — С 471—473.
3. Привезенцев Ю.А. Интенсивное прудовое рыбоводство / Ю.А. Привезенцев. — М.: Агропромиздат, 1991. — 368 с.
4. Antychowicz J. Choroby ryb srodladowych / Antychowicz J. — Warszawa: Panstwowe Wydawnictwo Rolnicze i Lesne, 2007. — P. — 447.
5. Cutrin J.M. Restriction fragment length polymorphisms and sequence analysis: an approach for genotyping Infectious pancreatic necrosis virus reference strains and other aquabirnaviruses isolated from northwestern Spain / Cutrin, J.M., J.L. Barja, B.L. Nicholson, I. Bandin, S. Blake & C.P. Dopazo. //Appl. Environm. Microbiol., 2004. — № 70 (2). — C. 1059—1067.
6. Dadar. M. Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Iranian reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in 2012 / Dadar. M., Peyghan R., Memari Hamid Rajabi, et al. // Virus Genes- September 2013.- Springer, Part of Springer Science+Business Media <http://link.springer.com/article/10.1007/s11262-013-0981-4>.
7. Felsenstein J Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. // Evolution . — 1985. — V. 39. — P. 783—791.
8. Huelsenbeck John P. PHYLOGENY ESTIMATION AND HYPOTHESIS TESTING USING MAXIMUM LIKELIHOOD. / John P., Keith A. Crandall P. // Annual Review of Ecology and Systematics.— 1997. — Vol. 28. — P. 437—466.
9. Ito S. Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds / ITo S., KARNOVSKY. M.J // J. Cell Biol. — 1968. — V 39. — P. 168.
10. Mahy B.W. Virology Methods: manual / B.W. J Mahy, H. O Kangro. — London: Academic Press, 1996.
11. Mahy B.W. J. A Dictionary of Virology, 3rd edn. Academic Press, San Diego, CA. — 2001.
12. OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals Fourth Edition, 2003. <http://www.oie.int/doc/ged/D6505.PDF>.
13. OIE. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases 3 th Edition, Paris, Word Organization for Animal Health (Chapter 2.3.8.). — 2012.
14. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.08_SVC.pdf.
15. Reynolds E S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. — 1963. — 17: 208. — P.12.
16. Saitou N. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. / Saitou N., Nei M. // Molecular Biology and Evolution. — 1987. —V 4.— P. 406—425.
17. Tamura K. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. / Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. // Molecular Biology and Evolution. — 2011. — V. 28. — P. 2731—2739.

Н.Н. Матвиенко

Институт рыбного хозяйства НААН

МОНІТОРІНГ ВІРУСНИХ ЗАБОЛЕВАНЬ РИБ В РИБОХОЗЯЙСТВЕННИХ ВОДОЕМАХ УКРАЇНИ

На основе эпизоотологических данных дана оценка состояния рыбоводных хозяйств Украины по вирусных заболеваний рыб. Обнаружен новый для нашей страны вирус панкреатического некроза, который поражает радужную форель (*Oncorhynchus mykiss*). Проведенный филогенетический анализ выделенных изолятов этого вируса рыб указывает на их близкое родство с изолятами, циркулирующих на территории Польши и указывает на возможные пути попадания данного вируса на территорию Украины.

Ключевые слова : мониторинг, IPNV, SVCV, VHS, филогенетический анализ, ОТ-ПЦР, ИФА

N.N. Matvienko

Institute of Fisheries NAAS

MONITORING OF VIRAL DISEASES OF FISH IN THE FISHERIES WATERS UKRAINE

Based on this data epizootic assessment fish farms Ukraine on viral diseases of fish. Discovered new for our country pancreatic necrosis virus that affects rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Conducted phylogenetic analysis of selected isolates of the virus of fish indicates their close

relationship with isolates circulating in Poland and points to possible ways of getting the virus into the territory of Ukraine .

Keywords : monitoring , IPNV, SVCV, VHS, phylogenetic analysis, RT-PCR , ELISA

Рекомендує до друку

Надійшла 19.06.2013

В.В. Грубінко

УДК 574.24: 577.123

О.Б. МЕХЕД

Чернігівський національний педагогічний університет ім. Т.Г.Шевченка
вул. Гетьмана Полуботка, 53, м. Чернігів 14037, Україна

ВМІСТ НУКЛЕЙНОВИХ КИСЛОТ В ОРГАНАХ ТА ТКАНИНАХ КОРОПІВ В РІЗНИХ УМОВАХ УТРИМАННЯ

Подано результати визначення вмісту нуклеїнових кислот у клітинах різних органах та тканин цьогорічок та дворічок коропів, які утримувалися за дії гербіцидів та йонів міді

Ключові слова: короп лускатий, зенкор, 2,4-Д, йони міді, нуклеїнові кислоти, нуклеази

Нуклеїновим кислотам і білкам, як відомо, належить надзвичайно важлива роль у регуляції біохімічних і фізіологічних процесів в організмі. Їх уміст у тканинах риб визначався видовими особливостями, стадією онтогенезу, а також впливом сезонних чинників [2]. Особливої уваги заслуговує вивчення вмісту нуклеїнових кислот в тканинах риб, які перебували за дії токсикантів [3-6]. Актуальність цих досліджень зумовлена тим, що мідь є одночасно необхідним для життєдіяльності мікроелементом і токсичним металом, оскільки виявляє значну дію завдяки пошкодженню плазматичних мембран. Механізм дії міді заснований переважно на порушенні структури ДНК. Крім того, існують передбачення про можливий зв'язок між використанням пестицидів і розвитком онкологічних захворювань як наслідку змін у структурі ДНК.

Мета дослідження — визначити уміст нуклеїнових кислот у клітинах різних органів та тканин цьогорічок та дворічок коропа лускатого за дії гербіцидів та йонів міді.

Матеріал і методи досліджень

Об'єктом дослідження слугував короп лускатий (*Cyprinus carpio* L.) масою 100-120 та 350-400 г. Досліди проводилися у модельних умовах в акваріумах об'ємом 200 дм³, в яких рибу розміщували з розрахунку 1 екземпляр на 40 дм³ води. Період акліматизації складав 3 доби. Риби витримувались в умовах досліду протягом 14 діб, що є достатнім для формування можливої адекватної відповіді організму [9]. Температура води коливалася в межах +15 - +16 °С, уміст розчиненого кисню знаходився в межах фізіологічної норми (5-7 мг/дм³). Воду змінювали кожні 3 доби. У експерименті риби знаходилися у чотирьох варіантах: контроль, та за дії 2,4-Д бутилового ефіру, зенкору та Cu²⁺. Їх уміст у воді відповідно становив Cu²⁺ 200 мг на 200 дм³, зенкору – 57,2 мг на 200 дм³, 2,4-Д бутиловий ефір 16 мг на 200 дм³. Для аналізу використовували зразки печінки, м'язової тканини та мозку. Кількісний уміст нуклеїнових кислот розраховували за методом [10]. Активність кислих нуклеаз визначали спектрофотометричним методом згідно з методикою [1]. Уміст загальних білків розраховували за методом Лоурі [11]. Статистична обробка результатів проводилися загальноприйнятими методами, а вірогідне розходження між середніми арифметичними величинами визначали за допомогою t-критерію Стюдента [7, 8]. Відмінності між порівнюваними групами вважали вірогідними при * - P < 0,05.