

УДК 578(035)

І.П. ГАВРИЛОВА¹, М.І. МАЙСТРЕНКО², В.І. РИМАР¹, І.Б. ВАСИЛЬКОВСЬКА³, Ю.П. РУДЬ², Л.П. БУЧАЦЬКИЙ²

¹ТОВ «Бальд», ²Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 60, м. Київ 01601

³Київський зоологічний парк загальнодержавного значення
проспект Перемоги, 32, м. Київ 03055

НОВІ ХОЗЯЇ ВІРУСУ ГЕРПЕСА КОРОПА ТРЕТЬОГО ТИПУ (CyHV-3)

За допомогою ПЛР під час спалаху вірусної інфекції у Київському зоопарку вірус герпеса третього типу вперше виявлено у мішкожаберного сома та двокольорового лабео.

Ключові слова: вірус герпесу, мішкожаберний сом, двокольоровий лабео

Донедавна єдиним хазяїном вірусу герпеса коропа третього типу (CyHV-3) вважався лише короп звичайний (*Cyprinus carpio carpio*) та його підвид, якого називають короп кої (*Cyprinus carpio koi*) [1]. Було встановлено, що деякі види риб, включаючи таких представників родини коропоподібних, як *Carassius auratus*, стійкі до цього захворювання, незважаючи навіть на довготривале перебування з хворою рибою в одному водяному резервуарі [2].

Проте, нещодавно наявність CyHV-3 була підтверджена за допомогою ПЛР у інших коропоподібних риб, які вирощувались в полікультурі разом з інфікованими коропами – у звичайного карася (*Carassius carassius*), білого амура (*Stenopharyngodon idella*), строкатого товстолобика (*Aristichthys nobilis*), звичайного товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*), линя (*Tinca tinca*), рибця (*Vimba vimba*) [3]. Більш того, виявилось, що CyHV-3 здатний інфікувати представників сомових (*Silurus glanis*) та осетрових риб, таких як російський (*Acipenser gueldenstaedtii*) та атлантичний (*Acipenser oxyrinchus*) осетри та стерлядь (*Acipenser ruthenus*) [3]. Японськими дослідниками ДНК CyHV-3 виявлена у коловерток [4].

Вірус герпеса третього типу викликає у коропових риб гостру інфекцію, яка за всіма ознаками є емерджентною. Емерджентними називають хвороби, які виникають або проявляються раптово, несподівано, які раніше були невідомі і часто викликають надзвичайно напружені епізоотичні ситуації [5].

Вперше ця хвороба була виявлена в Ізраїлі навесні 1998 року у деяких рибних господарствах уздовж усього узбережжя Середземного моря спостерігали численні масові (понад 80%) випадки загибелі коропа [6, 7]. З того часу загроза цього захворювання є постійною. Нині захворювання розповсюдилося по багатьох фермах країни, що призводить до суттєвих фінансових втрат. Спалахи нового захворювання, що призвели до масової загибелі риби в Ізраїлі, спостерігались також в США [8] та багатьох країнах Європи, Азії та Північної Америки. Швидке розповсюдження цього вірусу по всьому світу обумовлене тим, що декоративний короп кої має широкий попит серед акваріумістів і є предметом інтенсивної торгівлі. Міжнародне епізоотичне бюро (МЄБ) у 2007р. визнало цю емерджентну інфекцію як загрозову і таку, що підлягає обов'язковому декларуванню та викоріненню. Відсутність повідомлень про розповсюдження цього вірусу у Східній Європі є однією з причин заборони ввезення коропа до країн Європейського Союзу.

Про шляхи розповсюдження CyHV-3 в природі інформації недостатньо. Ймовірно, джерелом зараження, окрім декоративних рибок кої, може бути і вода, що містить слиз або інші продукти життєдіяльності заражених риб, а також знаряддя рибальства. Встановлено, що вірус з води санітарному може проникати в організм риб через шкіру. Істотну роль в перенесенні вірусу виконують водоплавні птахи, зокрема чайки. Збереження інфекційності CyHV-3 у воді може сягати кілька днів [9]. Оскільки за допомогою ПЛР ДНК CyHV-3 виявляється у коропів без клінічних ознак хвороби, які вирощувались при температурі 13°C [10], то такі риби також можуть бути джерелом інфекції у рибницьких господарствах.

В Україні CyHV-3 вперше був описаний нами недавно [11, 12, 13]. Існує реальна загроза розповсюдження цього вірусу у рибницьких господарствах України. Один із запропонованих профілактичних заходів захворюваності риб від CyHV-3 – це дотримання правил ветеринарної

санітарії щодо інфекційних хвороб риб. Перевозити мальків коропа в Європейському Союзі дозволяється тільки з господарств, які мають посвідчення про відсутність у них СуНВ-3. Методи біобезпеки включають також дотримання карантину для завезених риб протягом 2 місяців в умовах сумісного їх культивування з чутливими рибами при температурах, оптимальних для репродукції СуНВ-3.

Особливу увагу в останній час надають санітарному контролю за трансграничними перевезеннями акваріумних риб, які можуть слугувати в якості джерел інфікування промислових риб в аквакультури [14]. Тому в даній роботі нами були проведені дослідження хворих акваріумних риб лабео (*Labeo bicolor*) та мішкозяберного сомика (*Heteropneustes fossilis*) з метою встановлення етіологічного агента спалаху інфекції серед акваріумних риб Київського зоопарку.

Матеріал і методи досліджень

Загальну ДНК виділяли із зябер та нирок інфікованих риб. До 100 мкл приготовленого на фосфатному буфері (рН=7,4) гомогенату додавали 500 мкл лізуючого буферу (10мМ TRIS-HCl рН=8,0, 0,1М NaCl, 25 мМ ЕДТА, 0,5 % ДСН) та протеїназу К, ретельно перемішували та інкубували 2 години при температурі 37 °С. ДНК екстрагували фенолом та центрифугували 5 хвилин при 13 000 об/хв. Надосадову рідину відбирали та проводили повторну екстракцію ДНК сумішшю хлороформ – ізоаміловий спирт (24:1). Потім надосадову рідину відбирали та додавали 0,1 об'єм розчину 3М ацетату натрію (рН 5,2) та 2,5 об'єми охолодженого до -20°C абсолютного етанолу. Преципітацію ДНК проводили при кімнатній температурі упродовж 1 години. Після цього осаджували ДНК на мікроцентрифузі при 13 000 об/хв упродовж 10 хвилин. Осад ДНК промивали 70% етанолом. ДНК розчиняли в ТЕ-буфері (10мМ TRIS-HCl, 1мМ ЕДТА, рН=7,5) або у деіонізованій воді.

Для ідентифікації вірусу методом ПЛР використовували олігонуклеотидні праймери, специфічні до ділянки гену тимідинкінази СуНВ3 [12,15,16]. Послідовність олігонуклеотидів була такою:

For 5'- TACGAGGTGATGCAGCGTCTGGAGGAATAC -3'

Rev 5'- CTGAGAGATTCTGACGGTGAAGGGTGCG -3'

Для визначення специфічності праймерів та їхніх фізичних властивостей використовували програмне забезпечення VectorNT10, PrimerPremier5 та онлайн-сервіс BLAST.

Ампліфікація ділянки гену тимідинкінази СуНВ3 включала один цикл попередньої денатурації ДНК при 94°C упродовж 3 хвилин, 40 циклів денатурації при 95°C (10 секунд), віджигу праймерів при 60°C (10 секунд), синтезу при 72°C (10 секунд) та додаткового циклу синтезу у кінці реакції при 72°C (1 хвилина). ПЛР проводилась на ампліфікаторі ТП4-ПЦР-01-«Терцик» («НПО ДНК-Технология»). Після ампліфікації продукти реакції аналізували в 1% агарозному гелі. По закінченні електрофорезу гель фарбували бромистим етидієм та спостерігали результати під ультрафіолетовим транслюмінатором.

Також були поставлені ПЛР з праймерами для інших вірусів риб (вірус весняної віремії коропа та вірус геморагічної септицемії форелі).

Результати досліджень та їх обговорення

В 2013р. серед акваріумних риб Київського зоопарку спостерігався спалах інфекції, що супроводжувався 100% смертністю. Серед цих риб були як коропоподібні, такі як тетра червоноплавцева (*Hyphessobrycon anisitsi*) і двокольоровий лабео (*Labeo bicolor*), так і окунеподібні, такі як червоногорла цихлазома (*Cichlasoma meeki*), а також мішкожаберний сом (*Heteropneustes fossilis*). З метою встановлення етіологічного агента інфекції проводили візуальний огляд зябер та покривів шкіри хворих риб та їх розтин.

Як показали результати досліджень, зябра хворих риб були гіперимовані і мали рожевий колір. У мішкожаберного сома на розтині спостерігали порушення кольору та структури печінки, набряк нирок та переповнення жовчного міхура (рис. 1). Такі ж патологічні зміни спостерігались і в двокольорового лабео.

Як показали результати наших досліджень специфічні олігонуклеотидні праймери до гену тимідинкінази СуНВ-3 успішно ампліфікували фрагменти ДНК обох вищевказаних риб. Довжина ампліфікованих ПЛР продуктів, як і передбачалось, становила 264 пари нуклеотидів (рис. 2). ПЛР з праймерами до вірусу весняної віремії коропа та вірусу геморагічної септицемії форелі були негативними.



Рис. 1. Мішкозяберний сом (*Heteropneustes fossilis*), інфікований СуНВ-3

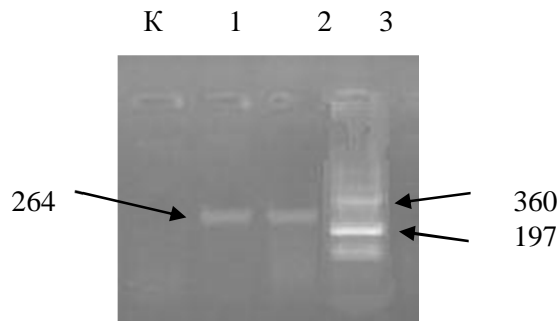


Рис. 2. Електрофорез результатів ПЛР з праймерами для визначення СуНВ-3.

К- – контроль (усі компоненти реакції, окрім ДНК); 1 - зразки ДНК, виділеної від лабео двоколькового (*Labeo bicolor*); 2 - зразки ДНК, виділеної від мішкозяберного сомика (*Heteropneustes fossilis*). 3. ДНК-маркер.

Згідно з існуючими ДНК СуНВ-3 за допомогою ПЛР можна виявляти в нирках та в крові інфікованих коропів уже через один день після інфікування [8]. Через три дні після інфікування кількість вірусної ДНК в нирках починає зростати [9]. З часом вірусна ДНК з'являється в зябрах, печінці, кишківнику та у шкірі. В тканинах головного мозку вона виявляється не завжди. Вірус впродовж значного часу здатний зберігатись в донних осадах і накопичуватись в планктоні, зокрема в коловертках [4].

Як свідчать дані літератури, цей вірус вже через 2 дні після зараження коропів призводить до нефриту, який може тривати до десяти діб. В інфікованій рибі вражаються зябри, про що свідчить втрата ворсинок та запалення зябрових тичинок. Основними симптомами хвороби коропа є втомлювальність, втрата координації руху, внутрішні крововиливи, запалі очі, плями на шкірі, збільшення секреції слизу, нефрит та некроз зябер. Різке збільшення числа зовнішніх паразитів і бактерій. Загибель акваріумних риб у зоопарку також супроводжувалась наявністю у них іхтіофтиріозу.

Не викликає сумніву той факт, що в багатьох випадках інфекції акваріумних риб можуть протікати безсимптомно. Показано, що СуНВ-3 здатний продукувати у коропових риб латентну форму інфекції, яка під впливом екологічних чинників може переходити в активну форму (Uchii et al., 2014). Тому не контрольоване завезення в країну акваріумних риб становить велику небезпеку для рибницьких господарств.

Висновки

За допомогою ПЛР під час спалаху вірусної інфекції у Київському зоопарку вірус герпеса третього типу вперше виявлено у мішкозяберного сома та двоколькового лабео. Довжина

ампліфікованих ПЛР продуктів, специфічних до ділянки гену тимідинкінази, як і передбачалось, становила 264 пари нуклеотидів

1. *Бучацький Л.П.* Електронномікроскопічне дослідження репродукції герпесвірусу кои. / Л.П. Бучацький, Н.М. Матвієнко // Тваринництво України. — 2009. — № 9. — С. 22—23.
2. *Бучацький Л.П.* Застосування ПЛР для діагностики вірусу герпеса кои. / Л.П. Бучацький, Н.М. Матвієнко, М.І. Майстренко, І.П. Гаврилова, В.Панасенко // Ветеринарна медицина України. — 2011. — № 9. — С. 13.
3. *Майстренко М.І.* Ідентифікація вірусу CyHV-3 методами електронної мікроскопії та полімеразної ланцюгової реакції. М.І.Майстренко, Ю.П. Рудь, Н.М.Матвієнко, Л.С.Холодна Л.П.Бучацький // Доповіді НАН України. — 2013. — № 4. — С. 139—143.
4. *Макаров В.В.* Эпизоотологический лексикон. / А.А. Гусев, Е.В. Гусева, О.И. Сухарев // Москва: Колос, 2001. — 176 с.
5. *Рудь Ю.П.* Ампліфікація гену тимідинкінази як зручний метод діагностики ДНК-вірусів риб. / Рудь Ю.П., Бучацький Л.П. // Рибне господарство. — 2009. — Вип. 67. — С. 175—178.
6. *Aoki T.* Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. / T. Aoki, I. Hirono, K. Kurokawa, H. Fukuda, R. Nahary, A. Eldar, A.J.Davidson, T.B.Waltzek, H.Bercovier, R.P.Hedrick // Journal of Virology. — 2007. — Vol. 81. — P. 5058—5065.
7. *Ariav R.* First report of newly emerging viral disease of Cyprinus carpio species in Israel. / R. Ariav, S. Timan, N. Paperna, N. Bejerano // EAAP 9-th International Conference. — Rhodes Greece, 1998. — P. 36.
8. *Bercovier H.* Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis // H. Bercovier, Y. Fishman, R. Nahary, S. Sinai, A. Zlotkin, M. Eynigor, O. Gilad, A. Eldar, R. Hedrick // BMC Microbiology. — 2005. — N. 5. — P. 13.
9. *Bernoth E.M.* Viral diseases of aquarium fish. / E.M. Bernoth, M.J. Crane // J. Exot. Pet. Med., 1995. — Vol. 4. — N. 2. — P. 103—110.
10. *Hedrick R.* A herpes virus associated with mass mortality of juvenile and adult Koi, a strain of common carp. / R. Hedrick, O. Gilad, S. Yun J. // Agua. Anim. Health. — 2000. — Vol. 12. — P. 44—57.
11. *Hoffmann R.W.* Detection and isolation of RHV in Continental Europe. / R.W. Hoffmann, M. El-Matbouli, H. Soliman // Report of International Workshop on koi herpesvirus. — London, 2004. — P. 11.
12. *Kempton J.* Koi herpes virus: do acipenserid restitution programs pose a threat to carp farms in the disease-free zones?. / J. Kempton, J. Sadowski, H. Schutze, U. Fischer, M. Dauber, D. Fichtner, R. Panicz, S.Bergmann // Acta ichthyologica piscatoria. — 2009. — Vol. 2. — P. 119—126.
13. *Minamoto T.* Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plancton. / T. Minamoto, M. Honjo, H. Yamanaka, N. Tanaka, T. Itajama, Z. Kawabata // Recherche in Veterinary Science. — 2010. — Vol. 7. — P. 6—11.
14. *Pikarsky E.* Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. / E. Pikarsky, A. Ronen, J. Abramowitz, B. Levavi-Sivan, M. Hutoran, Y. Shapira, M. Steinitz, A. Perelberg, D. Soffer, M. Kotler // Journal of Virology. — 2004. — Vol. 78. — P. 9544—9551.
15. *Shapira Y.* Differential resistance to koi herpes virus (KHV)/carp interstitial nephritis and Gill necrosis virus (CNGV) among common carp (Cyprinus carpio L.) strains and crossbreds. / Y. Shapira, Y. Magen, T. Zak, M. Kotler, G. Hulata, B. Levavi-Sivan // Aquaculture. — 2005. — Vol. 245. — P. 1—11.
16. *Siwicki A.K.* Herpeswirusy a szczególnie koi herpes Virus (KHV) nowe zagrożenie w hodowli karpia. / A.K. Siwicki, E. Terech-Majewska // Choroby ryb. — 2002. — P. 368—411.
17. *Uchii K.* Seasonal reactivation enables Cyprinid Herpesvirus 3 to persist in wild host population. / K. Uchii, T. Minamoto, M. Honyo, Z. Kawabata // FEMS Microbiology Ecology. — 2014. — Vol. 87. — N. 2. — P. 536—542.

И.П Гаврилова, М.И. Майстренко, В.И.Римар, И.Б Васильковская, Ю.П. Рудь, Л.П. Бучацкий
ООО «Бальд», Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киевский зоопарк
НОВЫЕ ХОЗЯЕВА ВИРУСА ГЕРПЕСА ТРЕТЬЕГО ТИПА (СУHV-3)

С помощью ПЦР во время вспышки вирусной инфекции в Киевском зоопарке вирус герпеса третьего типа впервые был обнаружен у мешкожаберного сома и двуцветного лабео.

Ключевые слова: вирус герпеса, мешкожаберный сом, двуцветный лабео

I.P. Gavrilova, M.I. Maistrenko, V.I. Rymar, I.B. Vasilkovska, Y.P. Rud, L.P. Buchatskyi
LTD "Bald", Kyiv by Taras Shevchenko National University, Kyiv Zoo

NEW HOSTS OF HERPESVIRUS OF THIRD TYPE (CyHV3)

By means of PCR in Kyiv Zoo in bicolor labeo and sack-gill catfish an herpesvirus of third type was found.

Keywords: herpesvirus, bicolor labeo, sack-gill catfish

Рекомендує до друку

В.В. Грубінко

Надійшла 27.11.2013