

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ІНФІКУВАННЯ ДОВГОПАЛОГО РІЧКОВОГО РАКА
(*Pontastacus leptodactylus*) ВІРУСОМ ІНФЕКЦІЙНОГО
ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ**

Інститут рибного господарства НААН України (м. Київ)

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

(м. Київ)

Робота виконана в рамках НДР «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо- та віробіоти України з використанням біоінформаційних технологій», № держ. реєстрації 11БФ 036-02.

Вступ. Вірус інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) належить до роду *Aquabirnavirus* родини *Birnaviridae* і викликає гостре висококонтагіозне захворювання у риб [4]. Найбільш вразливими до вірусу є мальки атлантичного лосося (*Salmo salar*), райдужної форелі (*Onchorhynchus mykiss*) та голяця (*Salvelinus fontinalis*). Смертність цих об'єктів аквакультури сягає понад 70% [10]. Інфекційний панкреатичний некроз діагностується здебільшого у представників лососевих та деяких інших прісноводних видів риб. Але як свідчать останні літературні дані, збудник цього захворювання був ідентифікований й у морських видів риб, як в природі, так і в умовах аквакультури [12]. IPNV характеризується високою стійкістю у водному середовищі, а це забезпечує зберігання інфекційного титру вірусу та його транспортування у водоймах на значні відстані від епіцентру епізоотії [6,9]. До того ж, переживши, риба залишається носієм інфекції, яка зберігається в організмі в латентному стані. Механізм передачі вірусу – вертикальний та горизонтальний, переносники (вектори) – не встановлені.

Окрім риб, IPNV був виділений від водних безхребетних тварин, таких як двостулкові молюски хамагури *Meretrix lusoria* [7], мідія їстівна *Mytilus edulis* і морський гребінець *Pecten maximus* [8], та представників ракоподібних – широкопалого рака *A. astacus* [8] і японської тигрової креветки *Penaeus japonicus* [3]. Ідентифікації IPNV у безхребетних тварин передувала діагностика вірусу у водоймі, що в свою чергу супроводжувалось локалізацією меж поширення вірусу від джерела інфекцій – рибогосподарських підприємств. Слід зазначити, що у деяких випадках титр вірусу в організмі безхребетних був вищим ніж у воді, а це може свідчити про репродукцію вірусу.

Разом з тим, на відміну від переважної більшості країн Західної Європи в астакофауні України найбільш поширеними є представники роду *Pontastacus*, і, зокрема *P. leptodactylus* [1]. Слід зауважити, що представники даного роду відрізняються від *A. Astacus* значно більшою еврибіонтністю, екологічною

пластичністю та резистентністю щодо ряду специфічних хвороб раків. І оскільки саме довгопалий рак може бути потенційним переносником вірусу на більшості території України, передусім викликає інтерес дослідження можливості репродукції вірусу в його організмі.

Контроль інфекційного панкреатичного некрозу має велике значення для рибогосподарських підприємств. В останні роки через розширення та диверсифікацію аквакультури багато зусиль було покладено у вивчення біологічних властивостей IPNV та патогенезу захворювання [2]. Не виключенням є і дослідження способів передачі вірусу та його переносників. Деякі водні безхребетні тварини виявились чутливими господарями, в яких можливо відбувається вірусна репродукція.

Метою дослідження було дослідити репродукцію ізоляту IPNV "Карпати", виділеного від райдужної форелі *O. mykiss* з річки Сірет, Чернівецької області України [11] в організмі довгопалого рака *P. leptodactylus*, як потенційного переносника вірусу.

Об'єкт і методи дослідження. Для накопичення вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізоляту «Карпати» в умовах *in vitro* використовували культуру клітин RTG-2 (Rainbow Trout Gonad Tissue), культура отримана з тканини гонад райдужної форелі *O. mykiss*. Культуру клітин RTG-2 культивували на поживному середовищі MEM з додаванням 10% інактивованої ембріональної телячої сироватки (ETC) FBS Gold (PPA, Австрія) та антибіотику гентаміцину. Клітини культивували у вигляді моношарових культур у пластикових флаконах площею 25 см² за температури 20°C з інтервалом субкультивування 6-7 днів. Перед інфікуванням, з флаконів зливали поживне середовище, моношар клітин промивали розчином Хенкса та додавали вірусомісний матеріал. Адсорбцію вірусу проводили упродовж двох годин за температури 20°C. Після адсорбції зливали вірусомісний матеріал та додавали поживне середовище для підтримки, у складі якого було 2% ETC. Упродовж експерименту проводили щоденну перевірку стану дослідних та контрольних флаконів з метою виявлення цитопатичної дії (ЦПД) вірусу на клітини. Стан культури клітин за морфологічними ознаками та визначення інфекційного титру вірусу проводили на інвертованому мікроскопі.

Для експериментального інфікування довгопалого рака використовували культуральну рідину інфікованої клітинної лінії RTG-2. Перед інфікуванням інокулянт фільтрували через шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм (Sarstedt, Німеччина) для відокремлення клітинних уламків та бактерій. З інокулянту робили 10-ти кратні розведення для досягнення інфекційного титру вірусу $10^{3,0}$ ID₅₀/мл⁻¹. Для ін'єкції використовували 0,2 мл вірусомісного матеріалу. Контрольну групу тварин інокулювали стерильним поживним середовищем. Кількість особин довгопалого рака для інфікування становила двадцять екземплярів, п'ятнадцять дослідних та п'ять контрольних. Раки утримувались по п'ять особин на акваріум. В акваріумі містилось 40 л води та аератор для підтримання кисневого режиму. Тривалість досліду становила 35 днів. Кожен 7 днів з трьох дослідних раків прижиттєво відбирали зразки гемолімфи для ідентифікації вірусу та визначення його інфекційного титру.

Для ідентифікації вірусу упродовж дослідів використовували метод зворотньої транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). РНК вірусу виділяли як з гемолімфи раків, так і з культуральної рідини клітин RTG-2 для порівняння інфекційного титру. Для виділення РНК IPNV використовували набір GenJet™ RNA Purification Kit (Thermo Scientific). Для синтезу кДНК з отриманих препаратів РНК використовували набір RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). ЗТ-ПЛР здійснювали з використанням двох пар олігонуклеотидних праймерів, специфічних до гену VP2 IPNV. Послідовність праймерів була такою: WB1 5'-CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC-3', WB2 5'-CGTCTGGTTTCAGATCCACCTGTAGTG-3', PrA1 5'-GAGATCCATTATGCTTCCAGA-3', PrA2 5'-GACAGATCATCTTGGCATAAGT-3'. Пару олігонуклеотидів WB використовували для ідентифікації вірусу в організмі раків, оскільки ці праймери характеризуються високою чутливістю [11]. Праймери PrA фланкують повнорозмірний вірусний ген VP2, що кодує капсидний білок. Кількість копій повнорозмірного гену VP2 свідчить про цілісність сегменту А геному вірусу, а отже і про повноцінний віріон. Тому саме олігонуклеотиди PrA були використані для визначення концентрації вірусу в організмі раків та культуральній рідині інфікованих клітин RTG-2 з метою встановлення інфекційного титру.

Ампліфікацію проводили на термоциклері "96 Universal Gradient PEQ STAR" (PEQLAB, Німеччина). До складу реакційної суміші входили наступні компоненти: 12,5 мкл DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), олігонуклеотидні праймери (Metabion, Німеччина) по 1 мкл кожного (20 пмоль/мкл), 2 мкл кДНК та стерильна деіонізована вода до загального об'єму 25 мкл. Ампліфікація складалась з 1 циклу інкубації при 50°C 15 хвилин, циклу попередньої денатурації при 94°C (3 хвилини) та 35 циклів денатурації при 94°C (30 секунд), відпалу праймерів при температурі 60°C (30 секунд), синтезу при 72°C (1 хвилина) та додаткового останнього циклу

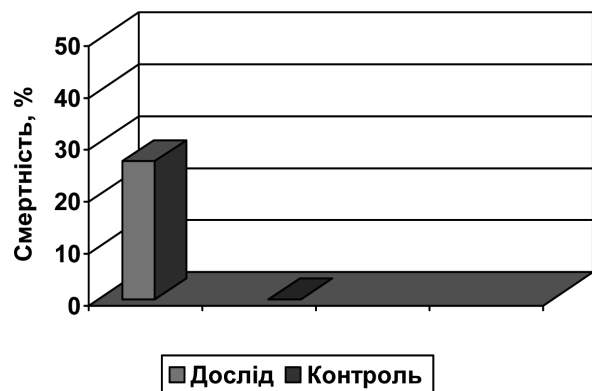


Рис. 1. Смертність довгопалого рака *P. leptodactylus*, інфікованого українським ізолятом IPNV "Карпати".

синтезу при 72°C (7 хвилин). Після ПЛР продукти аналізували у 2%-му агарозному гелі в TAE-буфері (40 мМ TRIS-HCl, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ EDTA). Результати електрофорезу спостерігали під ультрафіолетовим транслюмінатором. Аналіз електрофореграм та щільність продуктів ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення TotalLab TL120 v2008.

Результати досліджень та їх обговорення.

При інфікуванні вірусом інфекційного панкреатичного некрозу довгопалого рака характерні ознаки захворювання не спостерігались упродовж всього експерименту. Раки були досить активними, реагували на дотик. На 17-19 день після інфікування (д. п. і.) кілька особин довгопалого рака перестали реагувати на зовнішнє подразнення, у них спостерігалась летаргія, а рух кінцівок провокувався тільки підняттям тіла з води. Загибель інфікованих особин довгопалого рака відбувалась в період з 21-го по 23 д. п. і. Загинули чотири з п'ятнадцяти раків у трьох дослідних групах. У контрольній групі всі особини залишились живими. У контрольному варіанті раки були активним упродовж всього дослідів. Таким чином смертність довгопалого рака при експериментальному інфікуванні українським ізолятом IPNV "Карпати" з урахуванням загальної кількості особин становила $26,6 \pm 6,6\%$ (рис. 1).

Як показали результати наших досліджень, український ізолят вірусу інфекційного панкреатичного некрозу "Карпати" був ідентифікований в організмі довгопалого рака методом ЗТ-ПЛР. Усі експериментально інфіковані особини були позитивні на IPNV "Карпати", а от в контрольній групі вірус не діагностувався (рис. 2). Присутність вірусу в організмі рака відмічалась як на 7 д. п. і., так і на кінець дослідів (35 д. п. і.). Це свідчить про можливість вірусу значний період часу акумулюватись в організмі рака та знаходитись в стані персистенції. Такий перебіг подій вірусної інфекції ніяк не вплинув на стан більшості піддослідних тварин. По закінченню експерименту дослідні раки, так як і контрольні, продовжували активно рухатись,

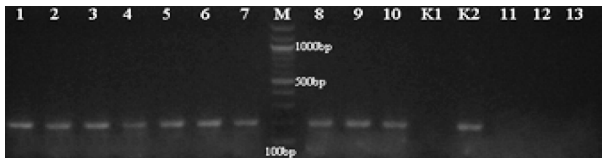


Рис. 2. Ідентифікація вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізолят “Карпати” в організмі довгопалого рака *P. leptodactylus* методом ЗТ-ПЛР: 1-10 – зразки з експериментально інфікованих раків; 11-13 – контрольна група неінфікованих раків; K1 – контроль реакції (всі компоненти реакції окрім кДНК); K2 – позитивний контроль, культуральна рідина клітинної лінії RTG-2, інфікованої IPNV “Карпати”.

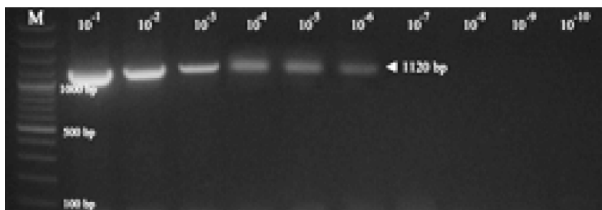


Рис. 3. Визначення чутливості ПЛР для ідентифікації повнорозмірного гену VP2 IPNV “Карпати” в культуральній рідині клітин RTG-2.

Таблиця

Динаміка інфекційного титру IPNV “Карпати” в організмі довгопалого рака *P. leptodactylus*

День після інфікування	0	7	14	21	28	35
Інфекційний титр, $ID_{50}/мл^{-1}$	10^3	10^3	10^3	10^3	10^2	10^2

реагувати на механічні подразнення та не проявляти будь-яких ознак захворювання.

З метою встановлення інфекційного титру IPNV “Карпати” в організмі довгопалого рака упродовж дослідів кожні 7 днів відбиралась гемолімфа. Для підрахунку інфекційного титру IPNV “Карпати” визначали титр вірусу як в культурі клітин RTG-2, так і в гемолімфі піддослідних раків за допомогою десятикратних розведень препаратів кДНК. На початку експерименту доза інфікування становила $10^3 ID_{50}/мл^{-1}$. Титр вірусу в культуральній рідині інфікованих клітин RTG-2 становив $10^{7.0} ID_{50}/мл^{-1}$. Такий вірусний титр в культуральній рідині визначався в розведенні 10^{-6} препарату кДНК IPNV “Карпати” (рис. 3). Тобто, десятикратні розведення гемолімфи довгопалого рака прямопропорційно відображали вірусний титр в організмах інфікованих раків.

Література

1. Бродський С. Я. Річкові раки // Фауна України. – 1981. – Т. 26, вип. 3. – Київ : Наукова думка. – 210 с.
2. Bandin I. Host range, host specificity and hypothesized host shift events among viruses of lower vertebrates / I. Bandin, C. P. Dopazo // Veterinary Research. – 2011. – Vol. 42. – P. 67-83.
3. Bovo. G. Isolation of an IPN-like virus from adult kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) / G. Bovo, G. Cescha, G. Giogetti, M. Vanelli // Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. – 1984. – Vol. 4 (2). – P. 21-25.
4. Dixon P. F. Proposal for a fourth aquabirnavirus serogroup / P. F. Dixon, G. -H. Nghoh, D. M. Stone [et al.] // Archives of Virology. – 2008. – Vol. 153. – P. 1937-1941.

Результати наших досліджень показали, що упродовж експерименту інфекційний титр вірусу в організмі довгопалого рака був сталим і коливався в межах $10^2-10^3 ID_{50}/мл^{-1}$ (табл.). Такі результати свідчать про довготривалу персистенцію вірусу в організмі довгопалих раків. Також, з огляду на стабільність інфекційного титру упродовж експерименту можна стверджувати і про можливу репродукцію вірусу. Потрапивши в організм, вірус зустрічається з захисними механізмами і його інфекційний титр має зменшуватись. Натомість, результати свідчать про стабільність інфекційного титру на рівні $10^3 ID_{50}/мл^{-1}$. Щоправда такий низький рівень вірусного титру може свідчити і про лімітованість чутливих клітин, в яких можуть формуватись зрілі віріони.

Вірус інфекційного панкреатичного некрозу призводить до суттєвих економічних втрат при культивуванні лососевих видів риб у всьому світі. Спалахи захворювань, спричинених IPNV, відбуваються навіть в країнах з добре розвинутим лососівництвом і цей факт, скоріше за все пов'язаний з імпортом риби та її ікри. В умовах сучасної аквакультури необхідно проводити постійний моніторинг популяцій чутливих до вірусу видів риб та водойми, в яких вони культивуються. Контролю має підлягати й імпортована риба та ікра. Більш того, як показали результати наших досліджень IPNV здатний зберігати свою інфекційність в організмах інших видів тварин, зокрема безхребетних, таких як довгопалый рак. Вживаючи в їжу інфіковану рибу, довгопалый рак може акумулювати вірус в своєму організмі та переносити його в межах ареалу свого існування.

Висновки. При експериментальному інфікуванні смертність довгопалого рака становила $26,6 \pm 6,6\%$, при чому більшість піддослідних тварин по закінченню досліді продовжували активно рухатись, реагувати на механічні подразнення і не проявляти будь-яких ознак захворювання.

Вірус інфекційного панкреатичного некрозу ізолят “Карпати” зберігає інфекційний титр в організмі довгопалого рака *A. astacus* понад 35 днів, що свідчить про потенційну можливість цих тварин бути переносниками IPNV.

Перспективи подальших досліджень. Для встановлення внутрішньоклітинної локалізації вірусу, а отже і для доведення його репродукції в організмі довгопалого рака *P. leptodactylus*, необхідно виконати електронно-мікроскопічне дослідження ультратонких зрізів чутливих тканин. Цей метод дозволить диференціювати такі процеси, як акумуляція, персистенція та репродукція вірусу. Це буде предметом наших подальших досліджень.

5. Halder M. Freshwater crayfish – a vector for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) // M. Halder, W. Ahne // Diseases of aquatic organisms. – 1988. Vol 4. – P. 205-209.
6. Isshiki T. Infectivity of aquabirnavirus strains to various marine fish species / T. Isshiki, T. Nagano, S. Suzuki // Diseases of aquatic organisms. – 2001. – Vol. 46. – P. 109-114.
7. Lo C -F. The characteristics of the virus isolated from the gill *Meterix lusoria* / C -F. Lo, Y. -W. Hong, S. -Y. Huang, C. -H. Wang // Fish Pathology. – 1988. – Vol. 23 (3). – P. 147-154.
8. Mortensen S. H. Persistence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in scallops *Pecten maximus* / S. H. Mortensen, E. Bachere, G. L. Gall, E. Mialhe // Diseases of aquatic organisms. – 1992. – Vol. 12. – P. 221-227.
9. Robert M. B. Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling / M. B. Robert, E. L. Scott, K. D. Arun // Journal of Virological Methods. – 2008. – Vol. 147. – P. 226-234.
10. Rodriguez S. J. Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. S. J. Rodriguez, J. J. Borrego, S. I. Perez-Prieto // Advanced in Virus Research. – 2003. – Vol. 62. – P. 113-165.
11. Rud Yu. P. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from wild-life rainbow trout *onchorhynchus mykiss* in western ukraine / Yu. P. Rud, M. I. Maistrenko, L. P. Buchatsky // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Biology. – 2013. – Vol. 64. – P. 63-65.
12. Zhe Z. Isolation, characterization and genome sequence of a birnavirus strain from flounder *Paralichthys olivaceus* in China / Z. Zhe, K. Fei, L. Zhengqiu [et al.] // Archives of Virology. – 2008. – Vol. 153. – P. 1143-1148.

УДК 576. 858

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ІНФІКУВАННЯ ДОВГОПАЛОГО РІЧКОВОГО РАКА (*Pontastacus leptodactylus*) ВІРУСОМ ІНФЕКЦІЙНОГО ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ

Рудь Ю. П., Майстренко М. І., Безусий О. Л., Бучацький Л. П.

Резюме. В роботі представлено результати експериментального інфікування довгопалого річкового рака *Pontastacus leptodactylus* вірусом інфекційного панкреатичного некрозу (український ізолят “Карпати”), виділеного від райдужної форелі *Onchorhynchus mykiss*. Встановлено, що смертність довгопалого рака становила $26,6 \pm 6,6\%$, при чому більшість піддослідних тварин по закінченню досліду не проявляли будь-яких ознак захворювання. Вірус зберігає свою інфекційність в організмі раків *P. leptodactylus* понад 35 днів, що свідчить про потенційну можливість цих тварин бути переносниками IPNV.

Ключові слова: IPNV ізолят “Карпати”, експериментальне інфікування, довгопалый рак.

УДК 576. 858

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИНФИЦИРОВАНИЕ ДЛИННОПАЛОГО РЕЧНОГО РАКА (*Pontastacus leptodactylus*) ВИРУСОМ ИНФЕКЦИОННОГО ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА

Рудь Ю. П., Майстренко М. И., Безусый А. Л., Бучацкий Л. П.

Резюме. В работе представлены результаты экспериментального инфицирования длиннопалого речного рака *Pontastacus leptodactylus* вирусом инфекционного панкреатического некроза (украинский изолят “Карпаты”), выделенного от радужной форели *Onchorhynchus mykiss*. Установлено, что смертность длиннопалого рака составляла $26,6 \pm 6,6\%$, при чем большинство подопытных животных по окончанию опыта не проявляли никаких признаков заболевания. Вирус хранит свою инфекционность в организме раков *P. leptodactylus* свыше 35 дней, что свидетельствует о потенциальной возможности этих животных быть переносчиками IPNV.

Ключевые слова: IPNV изолят “Карпаты”, экспериментальное инфицирование, длиннопалый рак.

UDC 576. 858

Experimental Infection of Freshwater Crayfish (*Pontastacus leptodactylus*) with Infectious Pancreatic Necrosis Virus

Rud Yu. P., Maistrenko M. I., Bezusiy O. L., Buchatskiy L. P.

Abstract. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) belongs to the family *Birnaviridae* and is an agent of an acute, contagious fish disease causing high mortality not only in juvenile salmonids but also in non-salmonid fishes. IPNV causes high mortalities followed by a life-long, chronic infection in the survivors. Persistently infected fish are asymptomatic that have virus in many visceral organs and can shed live virions.

The mechanism of transmission and the spread of fish viruses are not fully understood, it is known that fish acutely or chronically infected with IPNV excrete the virus via faeces and sexual products. Horizontal transmission of IPNV occurs via contaminated water or cannibalism, whereas vertical transmission takes place via eggs. Atypical host fishes and bloodsucking ectoparasites, as well as other aquatic organisms and fishery equipment, must also be regarded as sources of virus infections. Nothing is known about interactions between the freshwater crayfish and viruses pathogenic for fish. Therefore, we wondered whether freshwater crayfish could play a role in the epizootiology of IPNV.

The reproduction of the Ukrainian isolate IPNV “Karpaty” was carried out in fish continuous cell cultures RTG-2. Infectious titer of IPNV in RTG-2 cell line was $10^{6,9-7,4}$ TCID₅₀/ml. Freshwater crayfish *P. leptodactylus* were

experimentally infected with IPNV isolate "Karpaty" by injection of 0,2 ml with infective dose of $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml. Total amount of experimentally infected crayfish was fifteen. Genomic viral RNA was extracted from cell culture supernatant and crayfish organs and haemolymph using GeneJET™ RNA Purification Kit. The cDNA synthesis was conducted using RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit following the manufacturer's instructions. Then cDNA was subjected for PCR amplification.

IPNV was found in crayfish organs and haemolymph up to 35 days after infection (d. a. i.). The death of crayfish was noted in period of 21-23 d. a. i. The cumulative mortality of experimentally infected freshwater crayfish was $26,6 \pm 6,6\%$. The crayfish excreted IPNV into the water continuously that proved by PCR assay. By the method of RT-PCR the virus infectious titer was determined comparatively in RTG-2 cell culture supernatant with the highest virus titer and the haemolymph of crayfish during whole experiment using 10-fold dilutions assay. Our results showed that virus titer was continuously permanent in organisms of freshwater crayfish. The infective doses of IPNV in crayfish haemolymph before and after experiment did not differ impressively. Thus the results of our research indicate that freshwater crayfish could play a role in the epizootiology of IPN by means of accumulation the virus during feed the died IPNV-infected fish, and consequently favor the virus transmission. Also for demonstration of intracellular localization of IPNV and its reproduction in crayfish internal organs and haemolymph the electron microscope observation is needed and such study aspect will be preemptive in our future research.

Since salmonids breeding is mainly located in the west region of Ukraine the IPNV is an economically important fish pathogen for national trout farms. The ways of transmission and potential virus sources are very burning items in disease prophylaxis, so rapid diagnostic of IPNV should be provided overall including all susceptible and non-susceptible fish species, other aquatic organisms and fishery equipment. Only complete monitoring of IPNV in Ukraine has to result in total data of virus distribution in Ukraine and also to identify another strains which are widespread in Europe.

Keywords: IPNV isolate "Karpaty", experimental infection, freshwater crayfish *P. leptodactylus*.

Рецензент – проф. Дубінін С. І.

Стаття надійшла 1. 08. 2014 р.