

УДК 576.858

НАКОПИЧЕННЯ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ НА КУЛЬТУРАХ КЛІТИН РИБ

М. І. Майстренко¹, Ю. П. Рудь², Л. П. Бучацький^{1,2}
maistrenko.mia@gmail.com

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 60, Київ — 01033, Україна

²Інститут рибного господарства НААН, вул. Обухівська,
135, Київ — 03164, Україна

Досліджено репродукцію українського ізоляту вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) «Карпати» у перецелюваних культурах клітин риб RTG-2, FHM та EPC. Усі три клітинні лінії виявились чутливими до IPNV. Цитопатична дія (ЦПД) вірусу характеризувалася вакуолізацією цитоплазми та округленням клітин. Згодом клітини відшаровувались від поверхні. Для культур клітин RTG-2 та FHM повна деструкція моношару наступала на 7–8 день після інфікування (д.п.і.). Для культури EPC характерна ЦПД та повна деструкція клітинного моношару наставала на 10–12 д.п.і. Інфекційний титр IPNV «Карпати» в досліджуваних клітинних лініях становив для EPC $10^{5.5-5.8}$ ТЦД₅₀/мл, а для культур FHM та RTG-2 — $10^{6.2-6.5}$ і $10^{6.9-7.4}$ ТЦД₅₀/мл відповідно. Низький інфекційний титр вірусу в клітинах EPC може бути пов'язаний з його повільною репродукцією у цій культурі. Найвищий інфекційний титр вірусу спостерігався в культурі клітин RTG-2, що є цілком закономірно, оскільки ця клітинна лінія виділена з райдужної форелі, природного хазяїна IPNV. Тому для накопичення українського ізоляту IPNV «Карпати» слід використовувати культуру RTG-2. У цілому для діагностики українського ізоляту IPNV «Карпати» можуть бути використані усі три культури клітин RTG-2, FHM та EPC. Результати електронно-мікроскопічних досліджень очищеної вірусної суспензії показали характерну для бірнавірусів морфологію та ультраструктуру. Віріони українського ізоляту IPNV «Карпати» мали гексагональну форму, їхній діаметр складав 70 ± 5 нм. Для подальшого дослідження ізоляту «Карпати» слід використовувати методи молекулярної діагностики, які дозволять визначити генотип цього штаму IPNV та його можливе походження.

Ключові слова: ВІРУС ІНФЕКЦІЙНОГО ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ, ІЗОЛЯТ «КАРПАТИ», КУЛЬТУРА КЛІТИН, РЕПРОДУКЦІЯ, ІНФЕКЦІЙНИЙ ТИТР, ЦПД

PROPAGATION OF INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS IN FISH CELL CULTURES

М. Maistrenko¹, Yu. Rud², L. Buchatsky^{1,2}
maistrenko.mia@gmail.com

¹Taras Shevchenko Kyiv National University, 60, Volodymyrska str., 01033, Kyiv, Ukraine

²Institute of Fisheries of NAAS, 135, Obukhivska str., 03164, Kyiv, Ukraine

The reproduction of the Ukrainian isolate of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) «Carpathians» in fish continuous cell cultures of RTG-2, FHM and EPC was investigated. All three cell lines were sensitive to virus. IPNV caused morphological changes, such as vacuole enlargements and cells rounding. Subsequently cells scaled from a surface and characteristic cytopathic effect (CPE) of virus on cells was visible. For cell lines of RTG-2 and FHM the complete destruction of monolayer was noted on 7–8 day after infection (d.a.i.). For culture of EPC characteristic CPE and complete destruction of cell monolayer were marked on 10–12 d.a.i. Infectious titer of IPNV «Carpathians» in studied cell lines was following for EPC $10^{5.5-5.8}$ TCID₅₀/ml, and for the lines of FHM and RTG-2 — $10^{6.2-6.5}$ and $10^{6.9-7.4}$ TCID₅₀/ml respectively. The low infectious titer of virus in cells of EPC can be related to its slow reproduction in this culture. The greatest infectious titer was observed for the culture of RTG-2, that is fully appropriately, as

this cell line was derived from a rainbow trout — natural IPNV reservoir. That is why the RTG-2 is the most appropriate cell lines for accumulation of the Ukrainian isolate IPNV «Carpathians». But for diagnostics of the Ukrainian isolate IPNV «Carpathians» all three cell cultures of RTG-2, FHM and EPC can be used. Results of our electronic-microscopy researches of purified viral particles revealed basic for birnaviruses morphology and ultrastructure characteristics. Virions of the Ukrainian isolate of IPNV «Carpathians» had a hexagonal form, their diameter was 70 ± 5 nm. For subsequent research of isolate «Carpathians» the methods of molecular diagnostics are needed, which will allow to determine the genotype of this IPNV strain and his possible origin.

Keywords: INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS, ISOLATE “KARPATY”, CELL CULTURE, REPRODUCTION, INFECTIVE TITER, CPE

НАКОПЛЕНИЕ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК РЫБ

М. И. Майстренко¹, Ю. П. Рудь², Л. П. Бучацький^{1,2}
maistrenko.mia@gmail.com

¹Киевський національний університет імені Тараса Шевченка,
ул. Владимирская, 60, Киев — 01033, Украина

²Інститут рибного господарства НААН, ул. Обухивская,
135, Киев — 03164, Украина

Исследовано репродукцию украинского изолята вируса инфекционного панкреатического некроза (IPNV) «Карпаты» в перевиваемых культурах клеток рыб RTG-2, FHM и EPC. Все три клеточные линии оказались чувствительными к IPNV. Цитопатическое действие (ЦПД) вируса характеризовалось вакуолизацией цитоплазмы и округлением клеток. Впоследствии клетки отслаивались от поверхности. Для культур клеток RTG-2 и FHM полная деструкция монослоя наступала на 7–8 день после инфицирования (д.п.и.). Для культуры EPC характерно ЦПД и полная деструкция клеточного монослоя наступала на 10–12 д.п.и. Инфекционный титр IPNV «Карпаты» в исследуемых клеточных линиях составлял для EPC $10^{5.5-5.8}$ ТЦД₅₀/мл, а для культур FHM и RTG-2 — $10^{6.2-6.5}$ и $10^{6.9-7.4}$ ТЦД₅₀/мл соответственно. Низкий инфекционный титр вируса в клетках EPC может быть связан с его медленной репродукцией в этой культуре. Наивысший инфекционный титр вируса наблюдался в культуре клеток RTG-2, что вполне закономерно, поскольку данная клеточная линия выделена из радужной форели, естественного хозяина IPNV. Поэтому для накопления украинского изолята IPNV «Карпаты» следует использовать культуру RTG-2. В целом для диагностики украинского изолята IPNV «Карпаты» могут быть использованы все три культуры клеток RTG-2, FHM и EPC. Результаты электронно-микроскопических исследований очищенной вирусной суспензии показали характерную для бирнавирусов морфологию и ультраструктуру. Вирионы украинского изолята IPNV «Карпаты» имели гексагональную форму, их диаметр составлял 70 ± 5 нм. Для последующего исследования изолята «Карпаты» следует использовать методы молекулярной диагностики, которые позволят определить генотип этого штамма IPNV и его возможное происхождение.

Ключевые слова: ВИРУС ИНФЕКЦИОННОГО ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА, ИЗОЛЯТ «КАРПАТЫ», КУЛЬТУРА КЛЕТОК, РЕПРОДУКЦИЯ, ИНФЕКЦИОННЫЙ ТИТР, ЦПД

Вірус інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) належить до роду *Aquabirnavirus* родини *Birnaviridae* і викликає гостре висококонтагіозне захворювання у лососевих видів риб.

Найбільш вразливими до вірусу є мальки атлантичного лосося (*Salmo salar*), райдужної форелі (*Onchorhynchus mykiss*) та гольця (*Salvelinus fontinalis*). Смертність цих об'єктів аквакультури сягає понад

70 %. Перехворівши, риба залишається носієм інфекції, яка зберігається в організмі в латентному стані. Механізм передачі — вертикальний і горизонтальний, переносники (вектори) не встановлені [1].

Контроль цього захворювання має велике значення для рибогосподарських підприємств. В останні роки через розширення та диверсифікацію аквакультури багато зусиль було вкладено у вивчення біологічних властивостей IPNV та патогенезу інфекційного панкреатичного некрозу [2]. У 2011 році вірус був виявлений на території України. Ізолят отриманий від райдужної форелі *O. mykiss* з річки Сірет, Чернівецької області та названий IPNV «Карпати» [3]. Українські рибогосподарські підприємства ведуть активну торгівлю з форелевими господарствами Східної Європи. IPNV був ідентифікований у Польщі та Чехії, а, отже, існує велика вірогідність того, що вірус був завезений із заплідненою ікрою саме з господарств Східної Європи [4, 5].

Культура клітин — це найбільш досконала з лабораторних модельних систем для культивування вірусів. У вірусологічній практиці культуру клітин найчастіше використовують для виділення вірусу з патологічного матеріалу, підтримання вірусних штамів у лабораторії та накопичення вірусу для його подальшої очистки і розробки діагностичних систем. За даними Міжнародного Епізоотичного Бюро (ОІЕ) IPNV здатний культивуватись у культурах клітин CHSE-214 та RTG-2, отриманих із представників лососевих чавичі (*O. tshawytscha*) та райдужної форелі відповідно [6]. Але оскільки вірус характеризується високою контагіозністю, то не виключено, що він здатний репродукуватись і в інших культурах клітин риб. Тому метою нашої роботи було дослідити репродукцію та накопичення вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізоляту «Карпати», виділеного в Україні, в культурах клітин риб.

Матеріали і методи

При роботі *in vitro* з вірусом інфекційного панкреатичного некрозу ізолятом «Карпати» використовували

наступні культури клітин: 1) RTG-2 (Rainbow Trout Gonad Tissue) — отримана з тканини гонад райдужної форелі *O. mykiss* і представлена фібробластоподібними клітинами; 2) FHM (*Fat Headminnow*) — отримана з епітелію анального отвору пічкура *Gobio* sp.; 3) EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*) — отримана з клітин папіломи коропа *Cyprinus carpio*, епітеліальна культура, що має широкий спектр чутливості до вірусів риб.

Культури клітин RTG-2 та FHM культивували на поживному середовищі MEM, а EPC — на середовищі DMEM (PPA, Австрія) з додаванням 10 % інактивованої ембріональної телячої сироватки FBS Gold (PPA, Австрія) та антибіотику гентаміцин. Клітини культивували у вигляді моношарових культур у пластикових флаконах площею 25 см² при температурі 20 °С з інтервалом субкультивування 6–7 днів. Перед інфікуванням із флаконів зливали поживне середовище, моношар клітин промивали розчином Хенкса та додавали вірусомісний матеріал. Адсорбцію вірусу проводили упродовж двох годин при температурі 20 °С. Після адсорбції зливали вірусомісний матеріал, а клітини двічі промивали розчином Хенкса та додавали поживне середовище для підтримки, що містило 2 % ембріональної телячої сироватки (ETC). Упродовж експерименту проводили щоденну перевірку стану дослідних і контрольних флаконів з метою виявлення наявності або відсутності цитопатичної дії (ЦПД) вірусу на клітини. Стан культури клітин за морфологічними ознаками вивчали під інвертованим мікроскопом. Для кожної з досліджуваних клітинних ліній визначали інфекційний титр вірусу [7].

Для очистки IPNV культуральну рідину з флаконів із характерними ознаками ЦПД центрифугували при 800 g упродовж 5 хвилин на низькошвидкісній центрифугі ELM1. Надосадову рідину нашаровували на 30 % розчин сахарози (5 мл сахарози ХЧ, на 0,05 М TRIS-HCl буфері рН 7,2) і центрифугували при 110000 g упродовж 1 години на ультрацентрифугі Beckman L5-50B в роторі SW-40. Осад

ресуспендували в 150 мкл 0,05 М TRIS-HCl буфера (рН-7,2) і освітляли на центрифугі ELM1 при при 800 g упродовж 5 хвилин.

Електронно-мікроскопічні дослідження вірусної суспензії проводили на сітках із коллодійовими плівками-підкладками. Вірус контрастували 1 % розчином ураніацетату та вивчали на електронному мікроскопі EM-125.

Результати й обговорення

Культури клітин оцінювали кожні 24 години. Вже на третій день після інфікування (д.п.і.) вірусом інфекційного панкреатичного некрозу ізолят IPNV

«Карпати» спостерігалися зміни у моношарі досліджуваних культур клітин. Такі морфологічні зміни, як вакуолізація цитоплазми та округлення клітин спостерігались для культур RTG-2 та FHM на 3 д.п.і., а для ЕРС подібні ознаки з'являлись на 4 день експерименту. На 5 д.п.і в дослідних флаконах RTG-2 та FHM спостерігалась класична цитопатична дія вірусу на культуру клітин. Більша частина клітин відшарувалась від поверхні флакону та вільно плавали в середовищі, в результаті замість суцільного клітинного моношару залишались поодинокі клітинні острівки (рис. 1).

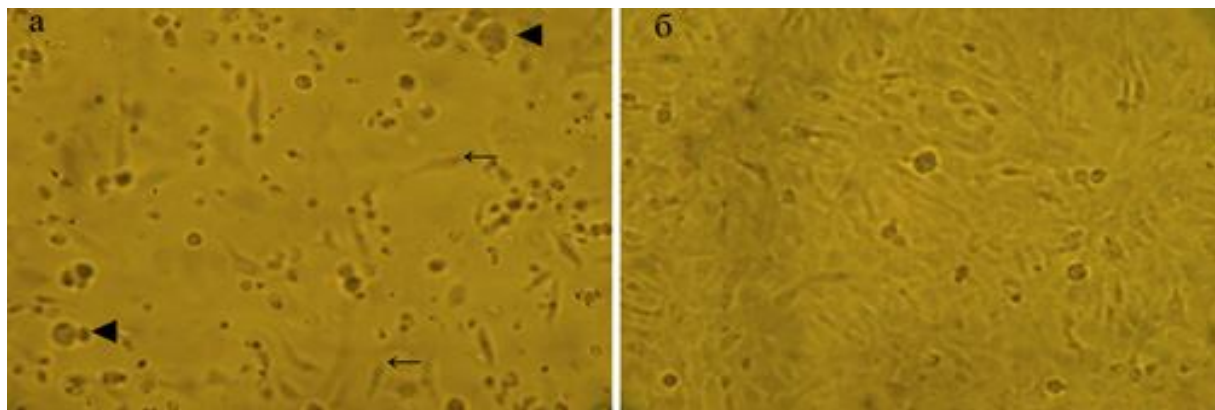


Рис. 1. Репродукція вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізоляту «Карпати» у культурі клітин RTG-2. Показано абсолютну руйнацію моношару клітин на 7 д.п.і. (а) та контрольний варіант (б). ◄ — великі округлі клітини; ← поодинокі прикріплені клітини. Світлова мікроскопія (×200)

На 7 д.п.і в культурі клітин RTG-2 не спостерігали прикріплених до пластику клітин. Клітини знаходились у товщі поживного середовища. Така ж картина

була характерна і для культури клітин FHM, щоправда вона наступала на 8 д.п.і (рис. 2).

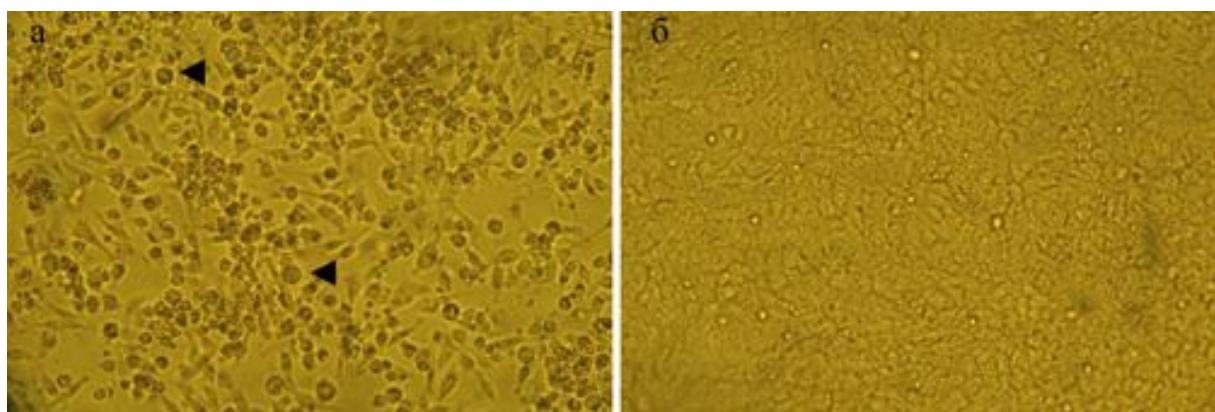


Рис. 2. Репродукція вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізоляту «Карпати» у культурі клітин FHM. Показано цитопатичну дію вірусу на 5 д.п.і. і часткову руйнацію клітинного моношару (а) та контрольний варіант (б). ◄ — великі округлі клітини. Світлова мікроскопія (×200)

ЦПД у культурі клітин ЕРС відмічалась із затримкою у декілька днів. Так, після настання перших морфологічних змін на 4 д.п.і., клітини починали відшаровуватись від моношару на 6–7 д.п.і. Під дією вірусу утворювалися невеликі

ущільнені клітинні скупчення (рис. 3). На 9–10 д.п.і. у флаконах з ЕРС спостерігали характерну ЦПД вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, а повна руйнація моношару була відмічена на 12 д.п.і.

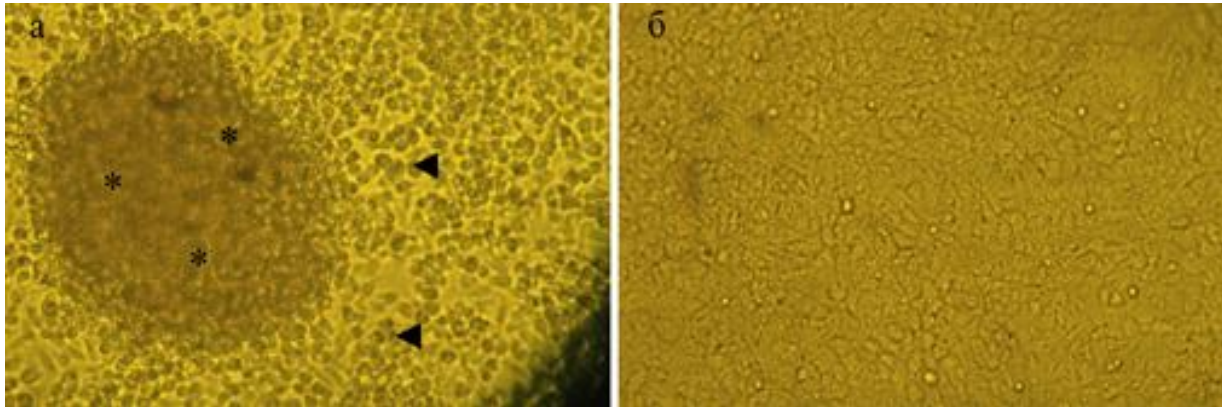


Рис. 3. Репродукція вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізолят «Карпати» у культурі клітин ЕРС. Показана цитопатична дія вірусу на 9 д.п.і. (а) та контрольний варіант (б). ◀ — великі округлі клітини; * — ущільнені клітинні скупчення. Світлова мікроскопія (×200)

Інфекційний титр IPNV «Карпати» у досліджуваних культурах клітин був неоднаковий. Так, найнижчий інфекційний титр спостерігався в культурі клітин ЕРС і становив $10^{5,5-5,8}$ ТЦД₅₀/мл. Можливо, такий інфекційний титр є наслідком повільної репродукції IPNV «Карпати» в клітинах ЕРС. У культурі клітин FHM інфекційний титр вірусу становив $10^{6,2-6,5}$ ТЦД₅₀/мл і це фактично на порядок вище ніж у культурі ЕРС. Найвищий інфекційний

титр IPNV «Карпати» спостерігався в культурі RTG-2 і становив $10^{6,9-7,4}$ ТЦД₅₀/мл. Культура RTG-2 є однією з спеціалізованих клітинних ліній під вірус інфекційного панкреатичного некрозу [6]. А з огляду на високу контагіозність досліджуваного вірусу такий високий інфекційний титр цілком закономірний. Результати інфікування культур клітин RTG-2, FHM та ЕРС представлено у таблиці.

Таблиця

Репродукція вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізоляту «Карпати» в культурах клітин риб

Назва культури клітин	Ознаки ЦПД, д.п.і.				Інфекційний титр, lg ТЦД ₅₀ /мл
	Вакуалізація цитоплазми	Округлення клітин	Відшарування клітин	Руйнація моношару	
RTG-2	3	3	5	7	6,9–7,4
FHM	3	3	5	8	6,2–6,5
ЕРС	4	5	6-7	10	5,5–5,8

Загалом ЦПД вірусу спостерігалась однакова для всіх досліджуваних культур. Але слід відмітити, що для ЕРС дегенеративні зміни моношару клітин відбувались з двохденною затримкою. У контрольних флаконах із неінфікованими IPNV культурами клітин не спостерігали

цитопатичних змін. Таким чином, усі три досліджувані культури клітин виявились чутливими до вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізоляту «Карпати». Культури клітин RTG-2, FHM та ЕРС можуть бути використані в діагностиці цього ізоляту IPNV. Для накопичення

вірусу слід використовувати культуру RTG-2, в якій інфекційний титр вірусу був найвищим.

Як показали результати наших електронно-мікроскопічних досліджень очищеної вірусної суспензії, віріони IPNV характеризувались типовою для бірнавірусів морфологією та ультраструктурою (рис. 4). Віріони українського ізоляту вірусу інфекційного панкреатичного некрозу «Карпати» мали гексагональну форму, їх діаметр складав 70 ± 5 нм.

Використання перещеплюваних культур клітин для отримання вірусних препаратів має ряд переваг порівняно з культивуванням вірусу на макроорганізмах. Так, у культурі клітин легше контролювати репродукцію вірусу: лінії клітин можна відбирати за бажаними властивостями, забезпечувати їхню чистоту від сторонньої мікрофлори та зберігати в замороженому стані як постійний стабільний резерв. Культивування великої кількості клітин потребує меншої площі, ніж розведення еквівалентної кількості інтактних тварин.

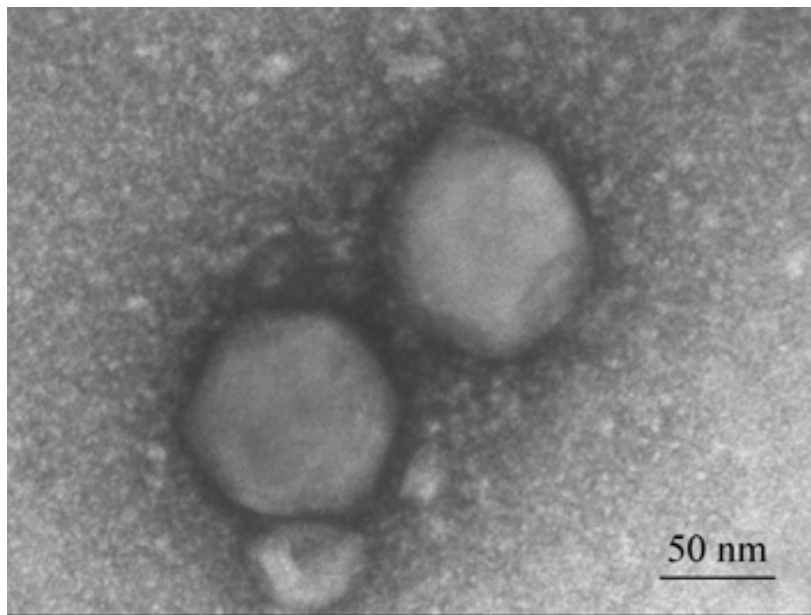


Рис. 4. Вірус інфекційного панкреатичного некрозу ізоляту «Карпати» ($\times 80000$)

Віріони IPNV, отримані в культурі клітин, легше піддаються очистці, ніж у випадку виділення їх з інфікованих риб. IPNV культивується в багатьох культурах клітин риб [8]. Більш того, було показано, що вірус інфекційного панкреатичного некрозу проникає, але не реплікується у культурах клітин ссавців [9]. Висока вірулентність IPNV та його можливість реплікуватись в багатьох культурах клітин риб пов'язана з простою будовою віріонів та РНК-геномом, що робить цей вірус невибагливим до внутрішньоклітинних систем біосинтезу макромолекул [10]. У наших дослідженнях ми показали, що український ізолят вірусу інфекційного

панкреатичного некрозу «Карпати» реплікується в культурах клітин риб RTG-2, FHM та EPC та характеризується високим інфекційним титром.

Вірус інфекційного панкреатичного некрозу призводить до суттєвих економічних втрат при культивуванні лососевих видів риб у всьому світі. Спалахи захворювань, спричинених IPNV, відбуваються навіть у країнах із добре розвинутим лососівництвом, і цей факт, скоріше за все, пов'язаний з імпортом риби та її ікри.

Висновки

1. Культури клітин клітин RTG-2, FHM та EPC виявились чутливими до вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізоляту «Карпати».

2. Культури клітин RTG-2, FHM та EPC можуть бути використані для діагностики українського ізоляту IPNV «Карпати».

3. Для накопичення вірусу слід використовувати культуру RTG-2, в якій інфекційний титр вірусу був найвищим і становив $10^{6,9-7,4}$ ТЦД₅₀/мл.

Перспективи подальших досліджень. У таких умовах сучасної аквакультури необхідно провести моніторинг популяцій райдужної форелі, яка культивується в рибогосподарських підприємствах басейна річки Сірет, де був виділений ізолят «Карпати», для того, щоб підтвердити наявність або відсутність там IPNV. Для цього необхідно використовувати методи культури клітин молекулярної діагностики, наприклад, полімеразну ланцюгову реакцію. Крім діагностики цього патогена, метод ПЛР додатково дозволить визначати генотип ізолюваного штаму IPNV та його можливе походження.

1. Dixon P. F., Ngho G.-H., Stone D. M. et al. Proposal for a fourth aquabirnavirus serogroup. *Archives of Virology*, 2008, 153, pp. 1937–1941.

2. Rodriguez S. J., Borrego J. J., Perez-Prieto S. I. Infectious pancreatic necrosis virus: biology,

pathogenesis, and diagnostic methods. *Adv. Virus Res.*, 2003, pp. 113–165.

3. Rud Yu., Buchatski L. P. Detection of IPNV in the western Ukraine. *Abstract book of AQUA 2012*. Prague, Czech Republic, September 1–5, 2012, p. 166.

4. Antychowicz J., Wejman M., Grawinski E. The isolation of viral haemorrhagic septicaemia and infectious pancreatic necrosis viruses in trout in Poland. *Med. Weter.*, 2000, 56, (4), pp. 255–258.

5. Reschova S., Pokorova D., Hulova J., Kulich P., Vesely T. Surveillance of viral fish diseases in the Czech Republic over the period January 1999 – December 2006. *Veterinarni Medicina*, 2008, 53, (2), pp. 86–92.

6. *OIE Aquatic animal health code 12th Edition*. Paris, World Organisation for Animal Health (www.oie.int), 2009. 288 p.

7. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American journal of clinical hypnosis*, 1938, 27, pp. 493–497.

8. Espinoza J. C., Cort'es-Gutierrez M., Kuznara J. Necrosis of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infected cells rarely is preceded by apoptosis. *Virus Research*, 2005, 109, pp. 133–138.

9. Orpetveit I., Kuntziger T., Sindre H., et al. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from salmonid fish enters, but do not replicate in, mammalian cells. *Virology Journal*, 2012, 9:228. doi:10.1186/1743-422X-9-228.

10. Das B. K., Collet B., Snow M., Ellis A.E. Expression kinetics of ISG15 and viral major capsid protein (VP2) in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) fry following infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23, pp. 825–830.