

УДК 574.632+597-12

ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЛІМФОСАРКОМАТОЗУ ЩУК КИЇВСЬКОГО ТА КАНІВСЬКОГО ВОДОСХОВИЩ

Л.П. Буцацький¹, М.І. Вудмаска², В.Г. Найдюнов²,
О.В. Ногарев³, О.В. Залоїло¹

¹ Інститут рибного господарства УААН,

² Інститут мікробіології НАН України,

³ Верхньодніпровське державне басейнове управління
охорони водних живих ресурсів, м. Київ

Вивчено рівні захворюваності щук на лімфосаркоматоз у Київському і Канівському водосховищах залежно від пори року. Досліджено можливість застосування полімеразної ланцюгової реакції для діагностики ретровірусу щук.

Вперше лімфосаркоматоз щук описано в Ірландії у щук *Esox lucius* у 1963 р. [1], а в континентальній Європі — у щук Київського водосховища у 2000 р. [2]. Проведені нами дослідження показали, що лімфосаркоматоз щук значно поширений також у Канівському [3], Кременчуцькому [4] і Каховському [5] водосховищах дніпровського каскаду.

Ірландські дослідники установили, що ретровірус, асоційований з лімфосаркоматозом щук, здатний в експериментах передаватися молодим особинам [6] і призводить у них до хвороби з типовими клінічними ознаками. Попри значний інтерес науковців і спеціалістів рибного господарства до цієї загрозливої інфекції, через різні обставини ретровірус щук і дотепер є маловивченим представником недавно утвореного роду *Epsilonretrovirus*.

Нами представлено результати роботи з підбору праймерів і постановки полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з метою вивчення біологічних властивостей ретровірусу щук, а також його діагностики у риб Київського та Канівського водосховищ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Епізоотологічні дослідження. Епізоотологічний моніторинг щук у водоймах Київського та Канівського водосховищ

проводили протягом року в періоди відсутності льоду шляхом візуального обстеження шкіри риб. Гістологічні та електронно-мікроскопічні дослідження — за загальноприйнятими методами.

Очищення геномної ДНК відбувалося з використанням набору “Genomic DNA Purification Kit” фірми “Qiagen” за методикою, запропонованою виробником.

Праймери для ПЛР. Підбір праймерів у першому варіанті дослідів здійснювали на основі аналізу нуклеотидних послідовностей, які кодують циклічні ретровіруси риб, а саме вірусу епідермальної гіперплазії судака 1 і 2-го типів. Вибрані праймери мали такі послідовності: WENV1f1 5'-ATGGARAARTAYCTNAAAYC-3'; WENV1f2 5'-ACTGCATATGGARAARTAYCTNAAAYCCN CARGC-3'; WENV1r 5'-CTACTCGAGRTCNCRCANARATCNARDATYTT-3'.

У другому варіанті дослідів послідовності праймерів для ПЛР були складені на підставі аналізу консервативних ділянок гена РНК-залежної ДНК-полімерази різних ретровірусів (включаючи, крім вищезгаданих, ВІЛ-1, ВІЛ-2, ретровірус змієголова, віруси лейкозу ВРХ, саркоми Рауса, дермальної саркоми судака). Перша пара праймерів фланкувала відносно консервативну ділянку роІ-гена завдовжки близько 120 нуклеотидів, друга пара відповідає ділянкам послідовності в ме-

жах вищезгаданого 120-нуклеотидного фрагмента і призначалася для другого раунду ПЛР з використанням як матриці продукту першого раунду.

ПЛР геномної ДНК щуки. З метою постановки ПЛР у першому раунді як матриця використовували 1 мкг сумарної ДНК, виділеної з уражених ділянок шкіри і м'язів хворої щуки, а також з аналогічних зразків тканин щуки, що не мала видимих ознак захворювання (імовірно здорової).

Реакційна суміш для ПЛР містила в об'ємі 50 мкл: 20 мМ тріс HCl, рН 8,5; 10 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2 мМ MgCl_2 ; 100 мкг/мл бичачого сироваткового альбуміну; 0,1%-й тритон X-100; 0,2 мМ кожного з чотирьох дезоксинуклеозидтрифосфатів; 1 мкг ДНК-матриці; 1 мМ кожного з праймерів F1 і R1; 2,5 одиниці активності Taq полімерази (Fermentas).

Умови ПЛР: денатурація (94°C) — 1 хв; відпал праймерів (50°C) — 1 хв; синтез (72°C) — 1 хв.

Після проведення 30 циклів ПЛР 15 мкл реакційної суміші аналізували електрофорезом в 2%-му агарозному гелі, а 1 мкл реакційної суміші використовували як матрицю у другому раунді ПЛР з праймерами F2 і R2.

Клонування ПЛР-продукту. Продукт другого раунду ПЛР (фрагмент розміром близько 100 пар нуклеотидів) був вирізаний з агарозного гелю і клонований в плазмиду pUC19 за сайтом рестрикції HincII.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Протягом 2002–2006 рр. нами проводився скринінг онкологічної захворюваності щук у виловах рибодобувних організацій та рибалок-аматорів на території Київського та Канівського водосховищ.

Як засвідчили результати досліджень, у хворих щук та судаків на тілі одночасно буває від однієї і більше пухлин. Іноді вони зливаються одна з одною, утворюючи великі ділянки враженої шкіри. Вони розташовані на латеральній частині тіла і є ідеальним епізоотологічним маркером (рис. 1).

Встановлено, що в основному хворіють особини віком від 2-х до 5-ти років. Це зумовлено тим, що саме в цьому віці риби беруть активну участь у процесі нересту, під час якого на обмеженій території водойми скупчується більша частина популяції і відбувається зараження від однієї особини до іншої.

За нашими дослідженнями, частота новоутворень становить від 7 до 30% в акваторії Київського та Канівського водосховищ. Найвищий рівень захворюваності зафіксовано в 2003–2004 рр. (рис. 2).

Спостереження показали, що пухлини у риб з'являються переважно в холодну пору року. Найбільша кількість уражених риб буває у періоди: березень–квітень та жовтень–грудень (рис. 3).

Влітку пухлин у щук не виявляли або спостерігались рубці на поверхні тіла, що свідчить про заживлення виразок та зворотність пухлинного процесу.

Проведені дослідження установили, що праймери, синтезовані на основі послідовностей нуклеотидів, що кодують цикліни ретровірусів риб, виявилися малоефективними для діагностики ретровірусів щуки з дніпровських водосховищ. Проведена ПЛР з використанням праймерів WENV1f1, WENV1f2, WENV1r не дала дискретних продуктів очікуваної довжини.

Для підбору ефективніших праймерів здійснили порівняльний аналіз послідовностей нуклеотидів у ділянці, що кодує РНК-залежну ДНК-полімеразу низки ретровірусів, (HIV-1, HIV-2, HTLV-1, ретровірус змієголова, віруси (лейкозу ВРХ, саркоми Рауса, дермальної саркоми судака, епідермальної гіперплазії судака 1 і 2-го типів). При цьому ефективність і специфічність ПЛР була збільшена за рахунок застосування двоетапної реакції: спочатку використовували праймери F1 і R1, а потім

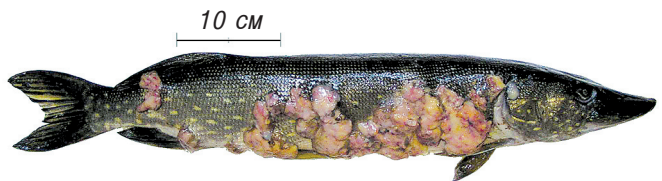


Рис. 1. Щука *Esox lucius*, уражена лімфосаркоматозом

Кількість хворих риб, %

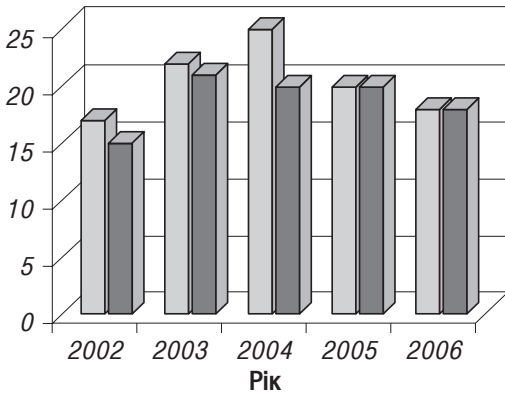


Рис. 2. Рівень захворюваності щук лімфосаркоматозом у Київському (□) та Канівському (■) водосховищах

Рівень захворюваності



Рис. 3. Сезонність прояву лімфосаркоматозу щук

продукт реакції як матрицю на другому етапі ПЛР з праймерами F2 і R2.

Результати експериментів з використанням праймерів, складених на підставі аналізу гомологічних ділянок генів РНК-залежної ДНК-полімерази різних ретровірусів риб показали, що вони можуть бути використані для діагностики вірусу лімфосаркоматозу щук.

На рис. 4 видно, що внаслідок двораундової ПЛР спостерігається ампліфікація фрагмента ДНК з очікуваним розміром

близько 100 нуклеотидних пар, причому цей фрагмент утворюється тільки на ДНК-матриці, одержаній з тканин хворої щуки (доріжка 3), тоді як на ДНК здорової щуки (доріжка 2) відповідний фрагмент відсутній.

З метою проведення аналізу нуклеотидної послідовності вищезгаданого фрагмента останній був клонований в плазмиду рUC-19. Аналіз рекомбінантних клонів проводили методом ПЛР на рівні колоній з використанням універсальних

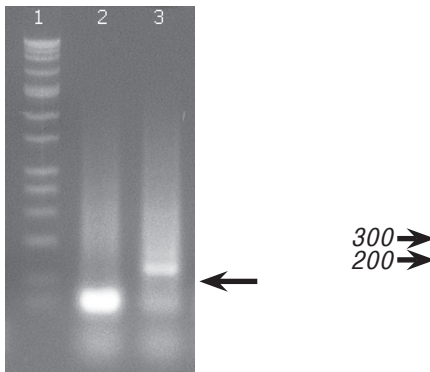


Рис. 4. Електрофореграма розділення в 2%-му агарозному гелі продуктів другого раунду ПЛР: 1 — ДНК-маркери. Розташування маркера розміром 100 нуклеотидних пар показано стрілкою; 2 — продукти ПЛР, одержані на ДНК-матриці здорової щуки; 3 — продукти ПЛР, одержані на ДНК-матриці хворої щуки

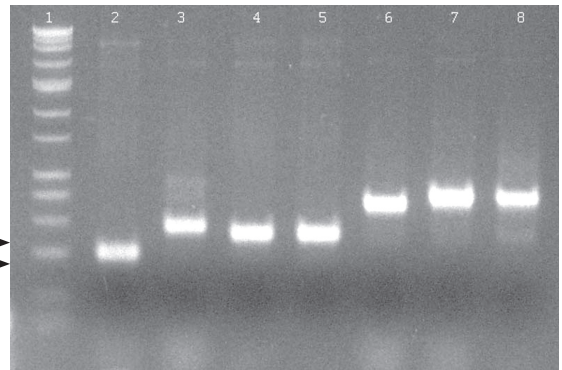


Рис. 5. ПЛР — аналіз рекомбінантних плазмід: 1 — ДНК-маркери. Стрілками показано розташування у гелі фрагментів розміром 200 і 300 пар нуклеотидів; 2 — продукт ПЛР при використуванні його як матриці контрольної плазмиди; 3–8 — продукти ПЛР при використуванні його як матриці рекомбінантних плазмід (відповідно клони 1, 2, 3, 4, 5 і 6)

Клон № 2	TTGCATGCCTGCAGGTC-CAATGGACACGCCTCCCTCAGGGTCTACACAATA
TM-4	AGACGGGTACAGCAAGTATCAATGGACACGCCTACCGCAGGGTCTACACAATA
WEHV-1	TGAAGGA--AGACAGTATATCTGGACTGTATTGCCTCAAGGGTTTATACATA
WEHV-2	CGAAGGA--AGGCAGTATATTTGGACAGTGTACCCCGGGGTTTATTCATA
WDSV	CGAAGGA--AGGCAGTATACTTGGACAGTGTACCCCGGGGTTGATTTCATA
Клон № 2	GCCCTCCATATACCATCAGG-CGTTG--C---GGAA-GCATCTACAAGACTTGC-C-TC-C
TM-4	GCCCTCCATATACCATCAGGCGTTG--C---GGAA-GCATCTACAAGACTTGC-A-TC-C
WEHV-1	GCCCTACTATATACCATCAGG-CTTTGTTT---AGCA-GCCTTTGCAAAA-TAAAGACTC--
WEHV-2	GCCCCACAGTTTTTTCTCAGG-CTCTGTTT---AGTA-GTCTGTGAAAAA-TAAGGACAG--
WDSV	GCCCCACACTGTTTTCCAGGCTTTGTACC---AGA--GTCTCCACAAAA-TTAATTTAA--
Клон № 2	AATGTC----CTC--A-GTTGTCATACACAGACTC
TM-4	AATGTC----CTCC-A-GTTGTCATACCAA-----
Wehv-1	TCTGAC----TTCGGAATTTGTATATACATGGAT
Wehv-2	CCTAAC----TTCGGAAGTTTGTATATATATGGAC
WDSV	AATTTT----CTCGGAATCTGCATTTACATGGAT

Рис. 6. Порівняння послідовності нуклеотидів 2-го клону з нуклеотидними послідовностями ретровірусів щуки (ТН4), епідермальної гіперплазії судака 1-го (WEHV-1) і 2-го (WEHV-2) типів та ретровірусу саркоми судака (WDSV). Виділено гомологічні ділянки послідовностей

для плазмід серії pUC праймерів m13 forward і m13 reverse. Як контроль використовували нерекомбінантну плазмиду.

Результати експериментів показали, що контрольна плазміда дає в ПЛР фрагмент розміром 200 пар нуклеотидів, що відповідає відстані між ділянками відпалу універсальних праймерів у “порожній” плазміді, тоді як рекомбінантні плазмиди містили додаткову вставку розміром близько 100 або 200 пар нуклеотидів (рис. 5). Імовірно, в останньому випадку мало місце “тандемне” вбудовування ПЛР-продукту в плазмиду.

Для визначення спорідненості ретровірусу лімфосаркоматозу щук з іншими ретровірусами проведено гель-секвенування зазначених рекомбінантних плазмід у ділянці вставок і порівняння одержаних нуклеотидних послідовностей з послідовностями генів РНК-залежної ДНК-полімерази відомих ретровірусів риб.

Виявлено, що послідовність вставки плазмиди 2-го клону має слабо виражену гомологію з rol-генами вірусу дермальної саркоми судака, вірусів епідермальної гіперплазії судака 1 і 2-го типів, послідовності яких представлені в базі даних “GenBank”, водночас практично ідентична послідовності поки що неохарактеризованого ірландського ізоляту ретровірусу щуки ТН4 (рис. 6).

ВИСНОВКИ

Таким чином, виявлені нами дані свідчать про те, що ретровірус щук *Esox lucius* дніпровських водосховищ є філогенетично близьким вірусу ТН4, раніше знайденого у щук у водоймах Ірландії.

Точніша систематизація знайденого ретровірусу щук на основі визначення повної нуклеотидної послідовності його генів має бути предметом подальших досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Mulcahy M.F. Lymphosarcoma in the pike *Esox lucius* L. (Pisces:Esocidae) in Ireland // Proceedings of the Royal Irish Academy, Section B: Biological, Geological and Chemical Science. — 1963. — Vol. 63. — P. 103–129.
2. Бучацький Л.П. Лімфосаркома щук Київського водосховища // Ветеринарна медицина України. — 2000. — № 11. — С. 14–15.
3. Бучацький Л.П., Вовк Н.І., Яременко Д.М. Епізоотична неоплазія щук Київського і Канівського водосховищ // Тез. доп. VIII з'їзду гідробіол. т-ва РАН. — Калінінград, 2001. — Т. 2. — С. 3–4.

4. Бучацький Л.П., Вовк Н.І. Галахін К.О. Гістологічна структура пухлин при лімфосаркоматозі щуки та карциномі ляща // Рибне господарство. — 2003. — Вип. 62. — С. 121–124.
5. Бучацький Л.П., Бузевич І.Ю., Галахін К.А., Ногарев О.В. Епізоотологічний моніторинг лімфосаркоматозу судака (*Stizostedion lucioperca*) у Каховському та Канівському водосховищах // Вет. медицина України. — 2006. — № 2. — С. 7–8.
6. Mulcahy M.F., O-Leary A. Cell-free transmission of lymphosarcoma in the northern pike *Esox lucius* L. (Pisces:Esocidae) // Experientia (Basel). — 1979. — Vol. 26. — P. 891.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛИМФОСАРКОМАТОЗА ЩУК КИЕВСКОГО И КАНЕВСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩ

Л.П. Бучацький, М.И. Вудмаска, В.Г. Найденов, А.В. Ногарев, О.В. Залоило

Изучены уровни заболеваемости щук лимфосаркоматозом в Киевском и Каневском водохранилищах в зависимости от времени года. Показана возможность применения полимеразной цепной реакции для диагностики ретровируса щук.

USE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) FOR DIAGNOSTICS LIMPHOSARCOMATOSIS PIKES IN THE KIEV AND KANEV STORAGE POOLS

L. Buchatsky, M. Vudmaska, V. Naydenov, A. Nogarev, O. Zaloilo

The levels of pikes limphosarcomatosis disease in the Kiev and Kanev storage pools depending on time of year are studied. Possibility of application of polymerase chain reaction for diagnostics of pikes retrovirus is shown.

УДК 597. 619:616.995

ГЕПАТИКОЛЬОЗ РИБ ТА НЕБЕЗПЕКА ЙОГО ПОШИРЕННЯ У РИБОГОСПОДАРСЬКИХ ВОДОЙМАХ УКРАЇНИ

Н.І. Вовк¹, О.В. Жемердей², В.І. Малай²

¹ Інститут рибного господарства УААН, м. Київ

² Миколаївська обласна державна лабораторія ветеринарної медицини

Наведено дані щодо гепатикольозу молоді коропа і білого амура, спричиненого паразитичною нематодою *Schulmanella petruschewskii* (*Hepaticola petruschewskii*), яку вперше виявили у водоймах України. Представлено результати власних досліджень та оригінальні фотографії збудника і його яєць, які локалізуються в паренхімі печінки хворих риб. Порушується проблема безпеки поширення гепатикольозу в рибогосподарських водоймах України.

Попередження втрат рибної продукції та економічних збитків, що завдають хвороби риб, — важлива проблема сучасного рибництва, яка вимагає підвищеної уваги науки та практики, оскільки від її розв'язання залежить успіх розведення об'єктів аквакультури. Заходи з профілактики хвороб риб — одна із ланок технологічного процесу вирощування риби, і їхня розробка повинна базуватися на основі вивчення епізоотичного стану водойм.

З 90-х років ХХ ст. під впливом економічної нестабільності та пов'язаних з цим об'єктивних і суб'єктивних причин, досить часто рибоводно-меліоративні та санітарно-ветеринарні заходи, спрямовані на поліпшення і стабілізацію епізоотичної ситуації в рибних господарствах не проводили. На сучасному етапі, за різних форм власності, важливе значення має науково-технічне та нормативно-правове забезпечення іхтіопатологічного контролю у рибогосподарських водо-