

УДК 576.858

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ІНФІКУВАННЯ ПРІСНОВОДНИХ ВИДІВ РИБ ІРИДОВІРУСОМ КОМАРА

Рудь Ю.П., Буцацький Л.П.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ

Значення іридовірусів в інфекційній патології риб зростає з кожним роком. За останні 10-15 років в умовах аквакультури та в природних водоймах було ідентифіковано велику кількість іридовірусів риб. Ізоляція цих вірусів тісно пов'язана із збільшенням обсягів ведення світової аквакультури. В умовах аквакультури іридовіруси спричиняють масову загибель риб і наносять великі збитки промислового рибництва [2].

Іридовірус комара (MIV) – це ДНК-вмісний ікосаедричний цитоплазматичний вірус, що уражує комарів родів *Aedes*, *Culex*, *Culiseta* (порядок *Diptera*). Середній діаметр віріонів становить 200 нм. MIV характеризується політропністю по відношенню до тканин господаря. Окрім комарів, MIV також реплікується в личинках великої вощиної молі *Galleria mellonella*, що є представником порядку *Lepidoptera*. Інфекційний титр MIV в личинках *G. mellonella* може становити $\lg ID_{50} 10^8$ [3].

Очищені віріони іридовірусів, а інколи й інфіковані організми безхребетних тварин, мають характерне кольорове забарвлення з райдужним відтінком. Звідси і походить назва цієї родини вірусів [1].

Іридовірус комара був ізольований з личинки кровосисних комарів *Aedes flavescens*, які, як відомо, мешкають в багатьох водоймах і є джерелом поживи для прісноводних риб. Літературні дані свідчать про можливість іридовірусів безхребетних спричиняти смертність у риб, амфібій та рептилій [4, 5]. Більш того, деякі іридовіруси комах реплікуються в культурі тканин ссавців [6]. Тому метою нашої роботи було дослідити інфекційність MIV для прісноводних видів риб.

Матеріали та методи. MIV. У роботі використовували іридовірус комара (MIV) *Aedes flavescens* виділений нами в Київській області. MIV культивували на личинках великої вощиної молі *G. mellonella*. Личинки інфікували вірусомісним матеріалом та інкубували за температури 20-22 °С. Через 20 діб з личинок виділяли MIV [3].

Для приготування інокуляту з інфікованих личинок готували гомогенат. Низькошвидкісне центрифугування гомогенату проводили при 5000 об/хв протягом 5 хв. на центрифугі K-24. Надосадову рідину нашаровували на 30 % розчин сахарози і центрифугували при 20000 об/хв впродовж 40 хв. на ультрацентрифугі Beckman L5-50B в роторі SW-40. Характерний блакитний осад свідчив про наявність віріонів MIV. Осад ресуспендували у мінімальній кількості 0,05 M TRIS-HCl буфера (pH-7,2) і освітляли на центрифугі K-24 при 5000 об/хв впродовж 5 хв. Очищення іридовірусу комара проводили в градієнті щільності сахарози (10-50 %) на ультрацентрифугі Beckman L5-50B в роторі SW-40 при 20000 об/хв впродовж 40 хв. Інфекційний титр іридовірусу комара в культурі личинок *G. mellonella* визначали за загальноприйнятими методами [7]. Інфекційний титр MIV в личинках *G. mellonella* становив $2 \cdot 10^7 ID_{50} \text{ мл}^{-1}$. Концентрацію білку в вірусомісному препараті визначали за мікриметодом Лоурі на спектрофотометрі JENWAY 6305 [8]. Концентрація білку становила 1,7 мг/мл. Перед інфікуванням в інокулят додавали антибіотики пеніцилін (100 од/мл) та стрептоміцин (100 мг/мл) і витримували 2 год при температурі 27 °С.

Біопроба. Досліди з вивчення інфекційності MIV для риби проводили на однорічках коропа *Cyprinus carpio*, чабачка *Pseudorasbora parva*, в'юна *Misgurnus fossilis* та акваріумної риби даніо *Danio rerio*. Риб інфікували шляхом введення вірусомісного матеріалу в очеревину (табл. 1). Їх утримували в 20-літрових ваннах при температурі 18-20 °С й годували комбікормом. Перед інфікуванням риб досліджували на наявність патогенної мікрофлори, паразитів та гельмінтів [9]. Всі риби були здорові.

Реізоляція MIV. Для реізоляції іридовірусу комара використовували зябра та внутрішні органи загиблих риб. Гомогенат внутрішніх органів та зябер фільтрували та центрифугували 5 хв при 5000 об/хв на центрифугі K-24. Супернатант використовували для ін'єкції інтактних личинок *G. mellonella*. Личинок інкубували при температурі 20-22 °С. Через 20 діб з личинок виділяли MIV.

Електронна мікроскопія. Електронно-мікроскопічні дослідження вірусної суспензії проводили на сітках з коллоїдними плівками-підкладками. Вірус контрастували 1 %-им розчином уранілацетату та вивчали на електронному мікроскопі EM-125.

Результати досліджень та їх обговорення. При інфікуванні іридовірусом комара коропа, чабачка та даніо перші ознаки захворювання виникали в різних особин у різний час, загалом, з 6-ї по 10-у добу після інфікування. Загибель інфікованої риби спостерігалась з 8-ї по 20-у добу після інфікування (рис 1).

Таблиця – Результати експериментального інфікування прісноводних видів риби іридовірусом комара

Вид риби	Кількість риб в досліді, екз.	Кількість риб в контролі, екз.	Кількість інокуляту, мкл	Доза вірусу, $\lg ID_{50}$	
Короп	<i>Cyprinus carpio</i>	5	5	200	2×10^4
Чабачок	<i>Pseudorasbora parva</i>	5	5	50	5×10^3
В'юн	<i>Misgurnus fossilis</i>	5	5	100	10^4
Даніо	<i>Danio rerio</i>	5	5	10	10^3

У інфікованого коропа змінювався колір зябер з темно-червоного на бурий. Край зяберних дуг мав рихлу структуру та був забарвлений в коричневий колір. По всій площині зябер утворювались некротичні осередки з крововиливами розміром 1-2 мм. Картина нагадувала характерну зяброву мозаїку, що спостерігається під час захворювання риб, пов'язаного зі збудниками вірусної етіології (рис. 2а). Нирки та печінка характеризувалися світло-рожевим забарвленням з осередками некротичного запалення, тоді як у контрольних риб спостерігали темно-вишневий колір цих органів без ознак некрозу. Загибель коропа спостерігалась з 7-ї по 14-ту добу після інфікування. При появі перших ознак захворювання інфікована риба не харчувалась, а за 1-2 доби до смерті не реагувала на механічні подразнення та була млявою. Смертність коропа становила 60 % (рис. 1).

Загибель чабачка спостерігалась з 8-ї по 18-ту добу після інфікування. У інфікованої риби змінювалась пігментація шкіри. Риба не харчувалась та була млявою, вона постійно знаходилась на поверхні води. Зябра інфікованого чабачка характеризувалися некрозом та зміною забарвлення. Деякі особини боковою частиною тіла займала придонне положення та залишалась нерухомою до настання смерті. Смертність чабачка при експериментальному інфікуванні іридовірусом комара становила 80 % (рис. 1).

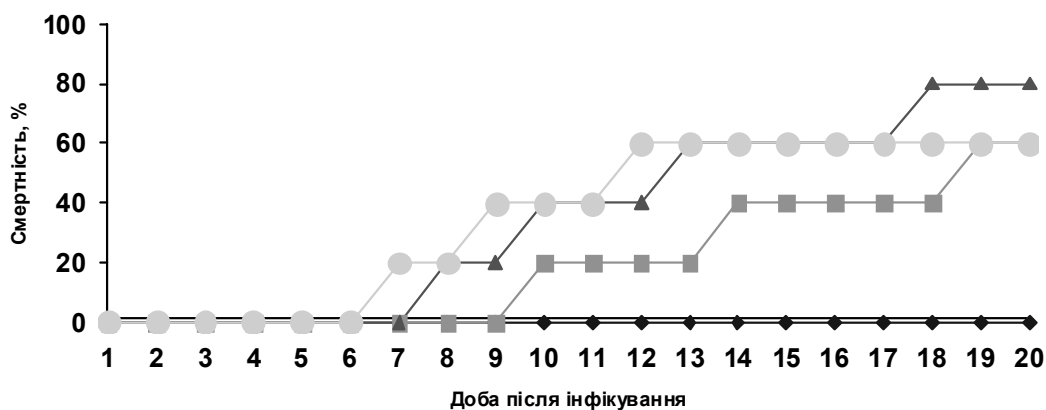


Рис. 1 Смертність риб, інфікованих іридовірусом комара. ● – короп; ▲ – чабачок; ■ – даніо; ◆ – в'юн

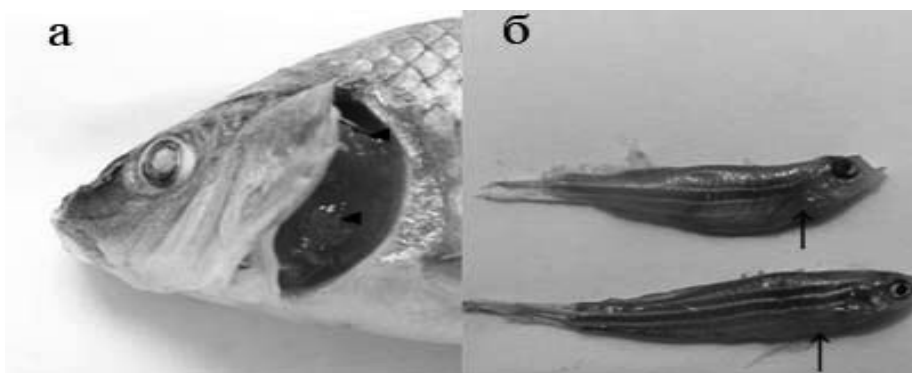


Рис. 2 Осередки некротичного запалення на зябрах інфікованого коропа (а); крововиливи біля грудних плавників інфікованих даніо (б).

У інфікованих акваріумних рибок даніо спостерігалось утворення осередків некротичного запалення та крововиливи біля грудних плавців (рис. 2б). Перед загибеллю інфікована риба не харчувалась та не реагувала на механічні подразнення. Загибель даніо спостерігалась з 10-ї по 20-ту добу після інфікування. Смертність даніо при експериментальному інфікуванні MIV становила 60 % (рис. 1).

Ху et al (2008) повідомляють про експериментальне інфікування даніо іридовірусом ISKNV, виділеним під час епізоотії від китайського окуня *Sinipercha chuatsi*. Смертність даніо при внутрішньочеревному введенні вірусу становила 60 %. Електронно-мікроскопічні дослідження та ампліфікація транскриптів ISKNV в ЗТ-ПЛР підтвердил наявність вірусу та його реплікацію в організмі даніо [10]. Цікаво відміти, що симптоми ураженої риби були подібні до симптомів у даніо, інфікованої іридовірусом комара.

В'юни були стійкими до іридовірусу комара. Впродовж експерименту поведінка риб не змінювалась, вони були жвавими та харчувались. Зовнішніх ознак захворювання на тілі та зябрах в'юнів не спостерігалось. При розтині патологічних змін внутрішніх органів не було виявлено. В контрольних варіантах короп, чабачок, в'юни та даніо залишились живими без ознак захворювання.

Іридовірус комара був реізолований від інфікованих риб на личинках великої вощиної молі *G. mellonella*. Як показали результати експериментів, вірус у розведеннях гомогенатів з риб 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} був здатний накопичуватись в личинках великої вощиної молі. Після диференційного ультрацентрифуговування спостерігали характерний блакитний осад, що свідчить про наявність вірусу. Електронно-мікроскопічні дослідження виявили вірус у зразках уражених органів інфікованої риби. Віріони мали гексагональну форму, їх діаметр складав 200 нм (рис. 3).

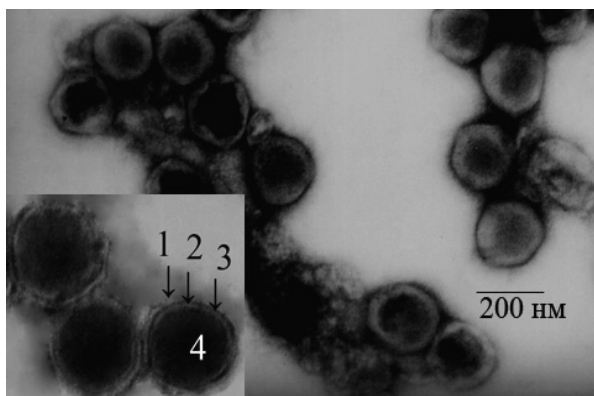


Рис 3. Іридовірус комара *Aedes flavescens*: 1 – зовнішня ліпідна оболонка, 2 – білковий капсид, 3 – внутрішня ліпідна мембрана, 4 – нуклеопротейд ($\times 20000$)

Іридовірус комара належить до роду *Chloriridovirus*. Незважаючи на те, що характерним господарем для MIV є комари родів *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, результати досліджень свідчать про високу інфекційність цього вірусу для представників віддаленої таксономічної категорії. Було встановлено, що при внутрішньочеревній ін'єкції MIV спричиняє смертність коропа, чабачка та данію яка сягає 60-80 % впродовж 7-20 діб. У інфікованій риби спостерігали зниження харчової активності, риба не реагувала на механічні подразнення, була малорухливою, млявою. Цікаво відмітити, що симптоматика внутрішніх органів та зябер ураженої риби, а саме некротичні осередки, нагадувала характерні ознаки захворювання, спричинене іридовірусами риб, які належать до родів *Ranavirus* та *Megalocytivirus* родини *Iridoviridae* [11].

Коло господарів іридовірусів безхребетних не обмежується комахами. Так, Just et. al. (2001) повідомляють про іридовірус, що був ізольований від рептилій. Електронно-мікроскопічні та молекулярно-біологічні дослідження виявили приналежність цього вірусу до групи CIV-подібних іридовірусів [10]. Було показано також, що іридовірус комах *Chilo iridescent virus* (CIV) при експериментальному інфікуванні спричиняє смертність у амфібій та мишей [5]. Вивчення патогенності іридовірусів комах по відношенню до хребетних вимагає подальших досліджень, однак відомо, що наприклад віруси з родини *Flaviviridae* здатні реплікуватися в організмах як безхребетних так і хребетних тварин.

Більш детальне вивчення інфекційності іридовірусу комара по відношенню до прісноводних видів риб вимагає застосування методу ЗТ-ПЛР для специфічної ампліфікації транскриптів MIV в організмі інфікованих риб.

Список літератури

1. Бучацкий, Л.П. Иридовирусы. – Киев: Вища школа. Изд-во при Киев. ун-те, 1981. – 120 с.
2. Essbauer, S., Ahne, W. Viruses of Lower Vertebrates. – J. Vet. Med. B. – 2001, vol. 48, – P. 403-475.
3. Бучацкий, Л.П., Канюка, В. Ю., Лебединець, Н.М. Чутливість великої вошиної молі до вірусу райдужності комара. – Мікробіологічний журнал, 1976, т. 38, №5. – С. 605-607.
4. Just, F., Essbauer, S., Ahne, W., Blahak, S. Occurrence of an invertebrate iridescent-like virus (*Iridoviridae*) in reptiles. – J. Vet. Med. B. – 2001, vol. 48, – P. 685-694.
5. Ohba, M., Aizawa, K. Lethal toxicity of an insect iridovirus to an amphibian, *Rana limnocharis*. – Arch. Virol. – 1981, vol. 68, – P. 153-156.
6. Ohba, M., Aizawa, K. Mammalian toxicity of an insect iridovirus. *Acta Virol.* – 1982. – 26. – P. 165-168.
7. Reed, L., Muench, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. – Am. J. Hy. – 1938, vol. 27, – P. 493-497.
8. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent. – J. Biol. Chem. – 1951, vol. 193, №1, – P. 265-275.
9. Мусселиус, В.А., Ванятинский, В.Ф., Вихман, А.А. и др. // Лабораторный практикум по болезням рыб. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. – 296 с.
10. Xu, X., Zhang, Z., Weng, S. A zebrafish (*Danio rerio*) model of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) infection. – *Virology.* – 2008, vol. 376, – P. 1-12.
11. Chinchar, V. G., Essbauer, S., He, J. G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Seligy, V. & Williams, T. (2005). Family Iridoviridae. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, – P. 150-162. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. San Diego: Elsevier/Academic Press.

EXPERIMENTAL INFECTION OF THE FRESH WATER FISH SPECIES BY MOSQUITO IRIDOVIRUS

Rud' Yu.P., Buchatsky L.P.

Kyiv National University named after Taras Shevchenko

*Experimental infection indicate that mosquito iridovirus (MIV) is pathogenic for carp *Cyprinus carpio*, stone moroco (*Pseudorasbora parva*), loach (*Misgurnus fossilis*) and zebrafish (*Danio rerio*). The cumulative mortality reached up to 60-80% within 20 days. Symptoms of inoculated fish included cessation of feeding and decreased ventilation. Just prior to death, the fish were lethargic. The infection was characterized by focal necrosis of the gill, kidney and liver. Electron microscopy observations revealed hexagonal virions in infected organs. In inoculated carp, zebrafish MIV was reisolated on larva *Galeria mellonella*. This is the first time that a virus isolated from a mosquito has been shown to cause mortalities in a fish species.*

УДК 619:616. 98:578.835.2.616.036.22

ПРОБЛЕМЫ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ И ОТСЛЕЖИВАНИЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ АРМЕНИЯ

Саргсян Х.В., Григорян Г.В.

Научный Центр Животноводства и Ветеринарии Республики Армения

Сохранение устойчивого эпизоотического благополучия по трансграничным болезням животных (ТБЖ) является важнейшей задачей ветеринарной общественности Республики Армения (РА) и имеет первостепенное значение в обеспечении населения страны полноценными продуктами питания. Общность границ со стационарно неблагополучными по ТБЖ государствами (Грузией, Турцией, Арцахом, Ираном и Азербайджаном) наряду с низким уровнем организации ветеринарного здравоохранения на протяжении последних двух десятилетий определяли РА в зону повышенного эпизоотического риска. В настоящее время вспышки ТБЖ продолжают время от времени наносить ощутимый экономический ущерб агропромышленному комплексу РА, обуславливая низкую рентабельность животноводческой отрасли в отдельных провинциях (марзах) страны. Вспышка африканской чумы свиней (АЧС) в 2007 году в полной мере выявила недостатки национальной системы эпизоотического надзора и явилась индикатором степени подготовленности ветеринарных служб РА к предупреждению заноса экзотических инфекций. Вследствие отсутствия действенного механизма раннего выявления ТБЖ в течение четырех месяцев вспышки АЧС были зарегистрированы в восьми из одиннадцати провинций (марзов) страны. Целью данной работы был обзор проблем, связанных с ранним выявлением и отслеживанием АЧС в 2007 году.

Материалы и методы. 4-го августа 2007 года была получена информация о падеже свиней в 120 километрах от армяно-грузинской границы. Учитывая эпизоотическую ситуацию по АЧС в соседней Грузии, после получения первого оповещения о падеже домашних свиней от заболевания с сомнительной этиологией, сотрудниками Научного Центра Животноводства и Ветеринарии (НЦЖВ МСХ РА) было решено провести предварительные лабораторные исследования в целях исключения заноса в первую очередь данной экзотической инфекции. В первичном очаге заболевания было отобрано репрезентативное количество проб патологического материала. Транспортировка проб осуществлялась в термических контейнерах при температуре 4°C. Предварительное лабораторное исследование на наличие вируса АЧС было произведено при помощи реакции гемадсорбции (РГАд) в первичных культурах клеток крови (лимфоцитов и лейкоцитов) и костного мозга свиней-доноров [1]. Для подтверждения результатов образцы проб были направлены в лабораторию Всероссийского Научно-Иссле-