

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

МАЙСТРЕНКО МАРІЯ ІГОРІВНА

УДК [578.82/.83:597-12]:[639.371.13+639.371.52](477)

## ДИСЕРТАЦІЯ

ЕМЕРДЖЕНТНІ ВІРУСНІ ІНФЕКЦІЇ КОРОПА (*Cyprinus carpio*)  
ТА РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ (*Oncorhynchus mykiss*)

03.00.06.- вірусологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_Майстренко М.І.

Науковий керівник: Бучацький Леонід Петрович, доктор біологічних наук,  
професор

Київ – 2021

## АНОТАЦІЯ

**Майстренко М.І. Емерджентні вірусні інфекції коропа (*Cyprinus carpio*) та райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.06. – вірусологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка Міністерства освіти і науки України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена діагностиці та вивченню деяких біологічних особливостей емерджентних для України вірусних інфекцій коропа (*Cyprinus carpio*) та райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*).

Емерджентні хвороби риб викликають надзвичайно напружені епізоотичні ситуації і завдають великої шкоди рибництву. Для України такими є вірус інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) та вірус герпесу коропа 3-го типу (CyHV-3). Особливо небезпечним для рибництва є CyHV-3. Спалахи нового захворювання, який він спричиняє, призвели до масової загибелі коропових риб в Ізраїлі, США та багатьох країнах Європи, Азії та Північної Америки. Швидке розповсюдження цього вірусу по всьому світу обумовлене тим, що він вражає декоративного коропа кої, який має широкий попит серед акваріумістів і є предметом інтенсивної торгівлі. Міжнародне епізоотичне бюро (МЄБ) у 2007 р. 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.

IPNV також викликає масову загибель лососевих риб, особливо форелі. У зв'язку з тим, що в Україні в останній час розведення цієї риби в умовах аквакультури набуло широкого розповсюдження, вивчення інфекційного панкреатичного некрозу є актуальним завданням іхтіопатологів. Одним з основних молекулярних методів ідентифікації IPNV є ампліфікація РНК вірусу за допомогою зворотної транскрипції та ПЛР (ЗТ-ПЛР). Тому метою нашої

роботи було підібрати до українського ізоляту IPNV специфічні олігонуклеотидні праймери та оптимізувати параметри постановки реакції. До того ж, оскільки в Європі поширеними є одразу декілька штамів IPNV, з метою встановлення приналежності українського ізоляту ми проаналізували нуклеотидні послідовності ампліфікованих фрагментів геному вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, виділеного в Україні. Проаналізувавши дані, було встановлено, що найефективнішими ділянками РНК вірусу IPNV для підбору олігонуклеотидних праймерів і специфічної ампліфікації є ділянки, що кодують структурний білок VP2 та неструктурний білок NS. Але, оскільки у Європі поширеними є одразу декілька штамів цього вірусу (Ab, Sp, Te та He), які відрізняються антигенними детермінантами структурних білків і, відповідно, за нуклеотидними послідовностями РНК, які їх кодують, ми обрали за основу нуклеотидні послідовності неструктурного білка NS та консервативну ділянку структурного білка VP2, які є найменш варіабельними. В результаті проведених досліджень було показано, що обрані олігонуклеотидні праймери, специфічні до ділянок генів неструктурного білку NS та структурного білку VP2 IPNV, ампліфікували очікувані за розміром фрагменти кДНК. Розмір ампліконів для праймерів IPN становив 620 пар нуклеотидів (п.н.), для WB – близько 200 п.н., а фрагмент довжиною 175 п.н. був характерний для праймерів PrD.

За допомогою градієнтного ампліфікатора була проведена оптимізація постановки ПЛР. Для відпалу праймерів використовували діапазон температур від 53 до 64°C. Виявилось, що температура 60°C є оптимальною для всіх досліджуваних пар праймерів. Також шляхом 10-кратних розведень препаратів кДНК перевіряли ефективність досліджуваних пар праймерів. Як показали результати дослідження, найбільшу працездатність демонстрували праймери WB, які є універсальними для всіх генотипів IPNV та інших водних бірнавірусів. Аналогічна ефективність спостерігалась для праймерів PrD, але, як заповнюють автори цих олігонуклеотидів, вони не здатні діагностувати деякі штами IPNV. Найнижча ефективність була характерна для праймерів IPN, реакція проходила тільки в зразках з високою концентрацією вірусної РНК. На специфічність

праймерів IPN може впливати той факт, що реверс-праймер комплементарний варіабельній N-кінцевій частині білка VP2.

Нуклеотидні послідовності трьох ампліфікованих фрагментів сегмента А українського ізоляту IPNV «Карпати» (150 п.н. для гена NS та 175 і 480 п.н. для N- і С-кінцевих ділянок гена VP2 відповідно) були аналізовані в автоматичному ДНК-секвенаторі Genetic Analyser 3130. Як показали результати наших досліджень, український ізолят IPNV належить до штаму Sp, вперше виділеному в Данії. Порівняння послідовності нуклеотидів ізоляту «Карпати» з нуклеотидними послідовностями з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (NCBI) показало, що ампліфіковані фрагменти кДНК на 95-99% ідентичні послідовностям генів NS и VP2 штаму Sp. Серед ізолятів штаму Sp найбільш спорідненими до українського ізоляту IPNV виявились віруси, виділені у Великобританії, Норвегії, Франції, Туреччині та Ірані. Таким чином ізолят, який був виділений з басейну річки Сірет в Чернівецькій області Західної України, належить до штаму Sp.

Для ідентифікації вірусу методом ПЛР використовували олігонуклеотидні праймери, специфічні для ділянки гену тимідинкінази CyHV3.

**Ключові слова:** вірус інфекційного панкреатичного некрозу форелі, вірус герпеса коропа, діагностика, тест-система ПЛР, культура перевивних клітин риб, електронна мікроскопія.

## SUMMARY

**Maistrenko M.I.** Emerging viral infections in carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) species – The manuscript.

Thesis for the degree of candidate of biological science in specialty 03.00.06 - virology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine. – Kyiv, 2021.

This dissertation is dedicated to the diagnosis and study of some of the biological emerging highly contagious viral infections properties in carp (*C. carpio*), specifically

cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) and fish birnavirus – infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*O. mykiss*).

Emerging fish diseases cause extremely tense epizootic situations and cause great damage to fish farming. For Ukraine, these are infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and carp herpes virus type 3 (CyHV-3).

CyHV-3 is especially dangerous for fish farming. Outbreaks of the new disease, which it causes, have led to mass carp deaths in Israel, the United States and many countries in Europe, Asia and North America. The rapid spread of this virus around the world is due to the fact that it affects the ornamental carp koi, which is in great demand among aquarists and is the subject of intense trade. International Office of Epizootics (OIE) in 2007 recognized this emergent infection as threatening and subject to mandatory declaration and eradication. The lack of reports of the spread of this virus in Eastern Europe is one of the reasons for the ban on the import of carp into the European Union. IPNV also causes mass deaths of salmon, especially trout. Due to the fact that in Ukraine recently the breeding of this fish in aquaculture has become widespread, the study of infectious pancreatic necrosis is an urgent task of ichthyopathologists.

The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) causes great damage to the development of trout in aquaculture. Therefore, another aim of our work was to select specific oligonucleotide primers for the Ukrainian IPNV (strain "Carpathians" ) isolate and to optimize the reaction parameters. In addition, since several strains of IPNV are common in Europe, in order to establish the affiliation of the Ukrainian isolate, we analyzed the nucleotide sequences of amplified fragments of the genome of infectious pancreatic necrosis virus isolated in Ukraine.

As a part of this dissertation the following areas were researched and studied:

1. To isolate and identify emerging carp (*C. carpio*) and trout (*O. mykiss*)viruses with modern virological and molecular biological methods.
2. Develop test systems for PCR diagnostics of emerging carp and trout viruses.

3. Conduct electron microscopic examination of the kidneys of carp affected by CyHV-3.
4. To determine the primary sequence of certain gene fragments VP2 and NS strain "Carpathians" IPNV.
5. To study the effect of IPNV on the activity of some enzymes in transplanted cell cultures and in the body of infected fish.
6. Assess possible hosts of IPNV (strain "Carpathians") in natural reservoirs.

The virus CyHV3 has been accumulated on fish cell cultures for maintaining strains in the laboratory, further purification and diagnostic systems development. Oligonucleotide primers specific for the CyHV3 thymidine kinase gene region were used to identify the virus by PCR. With the help of the PCR developed by us, the virus was detected in koi carp and aquarium fish of the Kyiv Zoo. The virus CyHV3 was first detected in labeo carp (*Labeo bicolor*) and bagfish (*Heteropneustes fossilis*).

One of the main molecular methods of IPNV identification is amplification of virus RNA by reverse transcription and PCR (RT-PCR). After analyzing the data, it was found that the most effective sites of RNA of IPNV virus for the selection of oligonucleotide primers and specific amplification are areas encoding the structural protein VP2 and non-structural protein NS. However, since several strains of this virus (Ab, Sp, Te and He) are common in Europe, which differ in antigenic determinants of structural proteins and, accordingly, in the nucleotide sequences of RNA that encode them, we chose the nucleotide sequences of non-structural protein NS and the conserved region of the structural protein VP2, which are the least variable. Studies have shown that selected oligonucleotide primers specific for the non-structural protein genes of the NS protein and the structural protein VP2 IPNV amplified the expected cDNA fragments. The size of the amplicons for IPN primers was 620 nucleotide pairs (bp), for WB - about 200 bp, and a fragment length of 175 bp. was characteristic of PrD primers.

Using a gradient amplifier, the PCR was optimized. For annealing of primers used a temperature range from 53 to 64 ° C. It turned out that the temperature of 60 ° C is optimal for all studied primer pairs. The effectiveness of the studied primer pairs was

also tested by 10-fold dilutions of cDNA preparations. According to the results of the study, the greatest performance was demonstrated by WB primers, which are universal for all genotypes of IPNV and other aqueous birnaviruses. Similar efficacy has been observed for PrD primers, but the authors of these oligonucleotides claim that they are not able to diagnose some strains of IPNV. The lowest efficiency was characteristic of IPN primers, the reaction took place only in samples with a high concentration of viral RNA. The specificity of IPN primers may be affected by the fact that the reverse primer is complementary to the variable N-terminal part of the VP2 protein.

The nucleotide sequences of the three amplified fragments of segment A of the Ukrainian isolate IPNV "Carpathians" (150 bp for the NS gene and 175 and 480 bp for the N- and C-terminal regions of the VP2 gene, respectively) were analyzed in an automatic DNA sequencer Genetic Analyzer 3130. According to the results of our research, the Ukrainian isolate IPNV belongs to the strain Sp, first isolated in Denmark. Comparison of the nucleotide sequence of the isolate "Carpathians" with nucleotide sequences from the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) showed that the amplified cDNA fragments are 95-99% identical to the gene sequences of NS and VP2 strain Sp. Among the isolates of strain Sp, the most closely related to the Ukrainian IPNV isolate were viruses isolated in Great Britain, Norway, France, Turkey and Iran. Thus, the isolate, which was isolated from the basin of the river Siret in the Chernivtsi region of Western Ukraine, belongs to the strain Sp.

An evaluation of possible carriers of infectious pancreatic necrosis virus by experimental infection of brown trout (*Salmo trutta*), striped zebrafish (*Danio rerio*), freshwater mollusk (*Anodonta cygnea*) and broad fingered crayfish (*A. astacus*) was made. Using newly developed diagnostical methods based on PCR, it is now possible to reduce financial losses caused by diseases, significantly improve the epizootic situation and increase fish productivity in fisheries.

**Key words:** infectious pancreatic necrosis virus of trout, carp herpes virus, diagnostics, PCR test system, transplantable fish cell cultures, electron microscopy.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ  
ДИСЕРТАЦІЇ

*Статті в рецензованих журналах, що індексуються Scopus та Web of*

1. Characterization of an infectious pancreatic necrosis virus from rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) in West Ukraine // Yu. Rud, M. Maistrenko, L. Buchatsky // *Virologica Sinica*. 2015. N 30. P. 231–233. (Особистий внесок здобувача: Накопичення вірусу на культурах клітин, підбір та аналіз праймерів, постановка ПЛР, проведення електрофорезу).
2. Experimental infection of brown trout (*Salmo trutta*), zebrafish (*Danio rerio*), and swan mussel (*Anodonta cygnea*) with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) / Rud Y. P., Maistrenko M. I., Zaloilo O. V., Liubchenko G. A., Buchatskiy L. P., Hrytsyniak I. I. // *Agricultural Science and Practice*. 2020. Vol. 7, No. 3. P. 31—39. (Особистий внесок здобувача: інфікування раків та молюсків, підрахунок інфікованих тварин, проведення ПЛР).

**Статті у наукових фахових виданнях України:**

(які входять до переліку ВАК/МОН України)

1. Майстренко М.І. Емерджентна хвороба коропа / М.І. Майстренко // *Рибогосподарська наука України*. 2011. № 1. С. 104–106.
2. Майстренко М.І. Електронна мікроскопія клітин нирок коропа (*Cyprinus carpio*), уражених СуНВ-3 // М.І. Майстренко, Н.М. Матвієнко, Л.П. Бучацький // *Рибогосподарська наука України*. 2012. №1 (19). С. 97–100. (Особистий внесок здобувача: Проведення розтинів риб, розрізання нирок на частинки, фіксація препаратів для електронної мікроскопії, фотографування зображень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті для опублікування).
3. Майстренко М.І. Ідентифікація вірусу СуНВ3 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.(Особистий внесок здобувача: Проведення розтинів риб, розрізання нирок на частинки, фіксація препаратів для електронної мікроскопії, фотографування зображень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті для опублікування).
4. Майстренко, М. І. Біологічні властивості бірнаврусів / М. І. Майстренко // *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Сер. Біологія*. – Тернопіль : ТНПУ, 2013. Вип. 4 (57). С. 96–102.
5. Rud Yu., Maistrenko M., Buchatsky L. Isolation of IPNV from wild-life rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Western Ukraine // *The Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kiev. Biology*. 2013. № 3(65). P. 63—65. (Особистий внесок здобувача: Очистка вірусу, електронна мікроскопія, аналіз зображень).
6. Майстренко М. І., Драган Л. П., Рудь Ю. П. Вміст катепсину В у печінці райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) в динаміці вірусної інфекції //

- Біологія тварин. 2014. Т. 16, № 3. С. 85—90. (*Особистий внесок здобувача: інфікування риб, постановка біохімічної реакції, підготовка статті для опублікування*).
7. Майстренко М. І., Рудь Ю. П., Бучацький Л. П. Накопичення IPNV на культурах клітин риб // Біологія тварин. 2014. Т. 16, № 4. С. 93—99. (*Особистий внесок здобувача: проводила культивування IPNV на культурах клітин риб різного походження, підготовка та стерилізація посуду, виготовлення фотографій, аналіз отриманих даних*).
  8. Експериментальне інфікування довгопалого річкового рака (*Pontastacus leptodactylus*) вірусом інфекційного панкреатичного некрозу / Рудь Ю. П., Майстренко М. І., Безусий О. Л., Бучацький Л. П. // Вісник проблем біології і медицини. 2014. Т. 1, вип. 4. С. 70—74. (*Особистий внесок здобувача: інфікування раків, підрахунок інфікованих тварин, проведення ПЛР, підготовка статті для публікації*).
  9. Нові хазяї вірусу герпеса коропа третього типу (CyHV-3) / І.П. Гаврилова, М.І. Майстренко, В.І. Римар, Ю.П. Рудь, Л.П. Бучацький // Наукові записки Тернопільського Ун-ту. Серія Біологія. 2014. №1. С. 16–20. (*Особистий внесок здобувача: доставка риб до лабораторії, проведення ПЛР, аналіз отриманих результатів, підготовка статті для публікації, підготовка патенту на винахід*).
  10. Активність амінотрансфераз у печінці райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) під впливом вірусної інфекції / Драган Л. П., Майстренко М. І., Любченко Г. А., Рудь Ю. П., Бучацький Л. П. // Рибогосподарська наука України. 2015. № 3. С. 99—106. (*Особистий внесок здобувача: інфікування риб, постановка біохімічної реакції, підготовка статті для опублікування*).
  11. Polymerase chain reaction for identification of Cyprinid Herpesviruses in Ukraine / Yu. Rud, M. Maistrenko, L. Buchatsky // Biotechnologia acta. 2018. Vol. 11. №1. P. 58–63. (*Особистий внесок здобувача: Підбір та аналіз праймерів, постановка ПЛР, проведення електрофорезу*).

#### **Статті в іноземних виданнях:**

1. Майстренко М.І. Влияние IPNV на активность аспартаминотрансферазы в перевиваемой культуре клеток рыб / М.И. Майстренко, Л.П. Драган, Ю.П. Рудь // Труды НИИЖК. – 2014. Вып. 7. Т. 2. С. 389–392. (*Особистий внесок здобувача: інфікування риб, постановка біохімічної реакції, підготовка статті для опублікування*).
2. Matvienko N.M. Diseases of different aetiologies in salmonids in Ukraine. N.M. Matvienko, M.I.Maistrenko, L.P.Buchatskyi, A.Didenko // Biologija. 2019.v.65. N4. P.273282. (*Особистий внесок здобувача: збір матеріалу, обробка результатів та підготовка статті для опублікування*).

#### **Статті в інших виданнях:**

1. Бучацький Л.П. Застосування ПЛР для діагностики вірусу герпесу коропа кої / Л.П. Бучацький, Н.М. Матвієнко, М.І. Майстренко, І.П. Гаврилова, В. Панасенко // Ветеринарна медицина України. 2011. - № 1.- С. 38–39. (*Особистий внесок здобувача: доставка риб до лабораторії, проведення ПЛР, аналіз отриманих результатів, підготовка статті для публікації, підготовка патенту на винахід*).

2. Рудь Ю.П. Ампліфікація та аналіз нуклеотидної послідовності генів VP2 та NS вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, виділеного в Західній Україні / Ю.П. Рудь, М.І. Майстренко, Л.П. Бучацький // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. 2013. Вип. 4 (118). С. 34–40. (*Особистий внесок здобувача: інфікування риб, постановка ПЛР, підготовка статті для опублікування*).
3. Майстренко М.І. Біологія герпесвірусів риб / М.І. Майстренко, Л.П. Бучацький // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2014. – Вип. 3 (123). – С. 19–35. (*Особистий внесок здобувача: підбір та аналіз літератури, підготовка статті для опублікування*).

#### **Патенти:**

1. Бучацький Л.П., Матвієнко Н.М., Майстренко М.І. Штам герпесвірусу Коі (KHV) ІМВ V-4 для отримання вакцини проти вірусу герпеса Коі : патент України на корисну модель № 79945; заявл. 26.10.2012; опубл. 13.05.2013, Бюл. № 9.
2. Рудь Ю.П., Майстренко М.І. Штам вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізолят «Карпати» (IPNV “Karpaty”), для отримання вакцини проти інфекційного некрозу підшлункової залози лососевих : патент України на корисну модель №88693; заявл.06.11.2013; опубл. 25.03.2014, Бюл. № 6.

#### **Матеріали конференцій та тези доповідей:**

1. Майстренко М.І. Електронна мікроскопія клітин нирок коропа, уражених герпесвірусом коі / М.І. Майстренко, Л.П. Бучацький // Збірник тез Міжнар. наук. конф. «Молодь і поступ біології». Львів, 2012. С. 233–239.
2. Рудь Ю.П. Аналіз нуклеотидних послідовностей фрагментів сегменту А українського ізоляту вірусу інфекційного панкреатичного некрозу. / Ю.П. Рудь, М.І. Майстренко, Н.М. Матвієнко, Л.П. Бучацький // Тези доповіді конф. «Біоресурси і віруси». – Київ, 2013. – С. 57.
3. Мальцев В.Н.Результаты вирусологического инспектирования карповых рыбобитомников южных областей Украины. Мальцев В.Н., Рудь Ю.П., Майстренко М.И. «Біоресурси і віруси». – Київ, 2013. – С. 51.
4. Рудь Ю.П. Филогенетический анализ вируса инфекционного панкреатического некроза, выделенного в естественных водоемах западной части Украины / Ю.П. Рудь, М.И. Майстренко, Н.М. Матвієнко, Л.П. Бучацький // Материалы 4-й научно-практической конференции «Современные проблемы и перспективы рыбохозяйственного комплекса». – Москва, 2013. С.106–108.
5. Рудь Ю.П. Диагностика вируса инфекционного панкреатического некроза методом полимеразной цепной реакции / Ю.П. Рудь, М.И. Майстренко, Л.П. Бучацький. // Труды научной конф. «Водные биоресурсы аквакультура и экология водоемов». – 2013. – Калининград. С. 278–281.

6. Драган Л.П. Вплив IPNV на вміст катепсину В у печінці райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*). Драган Л.П., Майстренко М.І., Рудь Ю.П. Матеріали III міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих учених Донецьк. 2014. С.110.
7. Matvienko N. Major diseases of salmonids in Ukraine / N. Matvienko, M. Maistrenko, L. Buchatsky, A. Didenko // FABА, International symposium on fisheries and aquatic science. 2016. P. 46.

## ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень.....	13
ВСТУП.....	14
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	19
1.1. Біологічні властивості герпесвірусів риб.....	19
1.2. Біологічні властивості бірнавірусів риб.....	31
РОЗДІЛ 2. ОБ’ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	41
2.1. Об’єкти досліджень.....	42
2.2. Методи досліджень.....	40
РОЗДІЛ 3. БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ВІРУСУ ГЕРПЕСА КОРОПА ТРЕТЬОГО ТИПУ (СУНВ-3).....	49
3.1 Клінічні ознаки інфікованих коропів.....	49
3.2. Електронна мікроскопія нирок інфікованих коропів.....	50
3.3 Конструювання тест-системи для діагностики вірусу герпеса коропа третього типу (СуНВ-3).....	53
3.3. Нові хазяї СуНВ-3. ....	54
РОЗДІЛ 4. БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ІРNV (ШТАМ «КАРПАТИ»).....	58
4.1. Ізоляція ІРNV та його накопичення .....	58
4.2. Ампліфікація та аналіз нуклеотидної послідовності генів VP2 та NS .....	65
4.3. Філогенетичний аналіз сегмента А ІРNV (штам Карпати») .....	67
4.4. Визначення впливу вірусу на активність АсАТ.....	70
4.5. Визначення впливу вірусу на активність катепсину В .....	72
4.6. Вивчення можливих носіїв вірусу у водоймах.....	79
РОЗДІЛ 5 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ ДАНИХ.....	88
ВИСНОВКИ.....	97
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	98

## Перелік умовних скорочень

- IPNV – вірус інфекційного панкреатичного некрозу
- CyHV-3 – вірус герпесу коропа 3-го типу
- МЕБ – Міжнародне епізоотичне бюро
- АГ – антигени
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
- АЛТ – аланінамінотрансфераза
- АСТ – аспартатамінотрансфераза
- АТ – антитіла
- ІФА – імуноферментний аналіз
- ІФН – інтерферон
- NS – неструктурний білок
- ВРЗ – відкрита рамка зчитування
- кДНК – комплементарна дизоксирибонуклеїнова кислота;
- кЗТ-ПЛР – кількісна зворотньотранскрипційна ПЛР
- мРНК – матрична РНК
- п.о. – пар основ
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
- РНК – рибонуклеїнова кислота
- PDB – Protein Data Bank
- ДНК – дизоксирибонуклеїнова кислота
- ЗТ-ПЛР – зворотньотранскрипційна ПЛР

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Емерджентними називають хвороби, які виникають або проявляються раптово, несподівано, які раніше були невідомі і часто викликають надзвичайно напружені епізоотичні ситуації. Для України такими є вірус інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) та вірус герпесу коропа 3-го типу (СуHV-3). Особливо небезпечним для рибництва є СуHV-3. Спалахи нового захворювання, який він спричиняє, призвели до масової загибелі коропових риб в Ізраїлі, в США та багатьох країнах Європи, Азії та Північної Америки. Швидке розповсюдження цього вірусу по всьому світу обумовлене тим, що він вражає декоративного коропа кої, який 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.

IPNV також викликає масову загибель лососевих риб, особливо форелі. У зв'язку з тим, що в Україні в останній час розведення цієї риби в умовах аквакультури набуло широкого розповсюдження, вивчення інфекційного панкреатичного некрозу є актуальним завданням іхтіопатологів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана в рамках наукової програми «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо- та віробіоти України з використанням біоінформаційних технологій» (номер держреєстрації: 11БФ 036-02). Робота також є складовою частиною досліджень, передбачених тематичним планом Інституту рибного господарства НААН та відповідає НТП НААН за 2011-2015 рр. з теми: «Дослідити біологічні і еколого-географічні особливості поширення збудників хвороб промислових видів риб і впровадити молекулярні методи дослідження виділених патогенів» (№ д. р. 0111U006973).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було дослідження біологічних властивостей IPNV (штам «Карпати») та СуHV-3 як у природних водоймах, так і в прісноводній аквакультури України та вивчення їх молекулярно-біологічних властивостей, а також проведення філогенетичного аналізу для розробки засобів діагностики і профілактики вірусних захворювань цінних видів риби. Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Провести виділення та ідентифікацію емерджентних вірусів коропа (*C. carpio*) та форелі (*O. mykiss*) за допомогою сучасних вірусологічних та молекулярно-біологічних методів.
2. Розробити тест-системи щодо ПЛР-діагностики емерджентних вірусів коропа та форелі.
3. Провести електронномікроскопічне дослідження нирок коропів, вражених СуHV-3.
4. Провести визначення первинної послідовності певних фрагментів генів VP2 та NS штаму «Карпати» IPNV.
5. Вивчити вплив IPNV на активність деяких ферментів в перевивних культурах клітин та в організмі інфікованих риби.
6. Оцінити можливих хазяїв IPNV (штам «Карпати») у природних водоймах.

**Об'єкт дослідження:** емерджентні віруси риби різних таксономічних груп (IPNV (штам «Карпати») та СуHV-3).

**Предмет дослідження:** біологічна характеристика IPNV (штам «Карпати») та герпесвірусу СуHV-3, які є емерджентними для України.

**Методи дослідження:** для виконання поставлених завдань у роботі використано комплекс вірусологічних, біохімічних, електронно-мікроскопічних і статистичних методів досліджень.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше в Україні від коропа кої та від акваріумних риби з Київського зоопарку був виділений високопатогенний вірус герпеса третього типу (СуHV-3). Розроблений на основі ПЛР діагностичний ефективний для виявлення цієї висококонтагіозної інфекції.

Вперше на території України вірус інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) був виявлений у райдужної форелі, виловленої з природних водойм (р. Серет). Проаналізовано первинну послідовність генів VP2 та NS, сконструйовано олігонуклеотидні праймери, та відпрацьовані умови постановки

ПЛР, які дозволяють ідентифікувати віруси в культурі клітин та клінічному матеріалі.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблені діагностичні тест-системи на основі ПЛР для виявлення та ідентифікації герпесвірусу коропа третього типу та вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати»).

Результати проведених досліджень розширюють уявлення про особливості перебігу інфекційного процесу у організмі риб, висвітлюють механізми і принципи реплікації вищезгаданих вірусів риб.

Застосування нових засобів діагностики на основі ПЛР дозволить зменшити втрати від хвороб в рибницьких господарствах та підвищити рибопродуктивність. Це дасть змогу суттєво покращити епізоотичну ситуацію в рибницьких господарствах.

Матеріали даної роботи використані при розробці патентів на винаходи в галузі рибного господарства.

**Особистий внесок автора.** За особистої участі здобувача визначені тема та мета дослідження, обґрунтовано актуальність і основні напрямки роботи; окреслено завдання наукових досліджень. Планування експериментів та вибір методичних підходів, формулювання основних положень і висновків дисертації здійснено під керівництвом д.б.н., професора Л.П. Бучацького.

Автором особисто здійснено інформаційно-патентний пошук, вивчено та проаналізовано сучасну літературу з досліджуваної проблеми. Дисертанткою здійснено електронно-мікроскопічні дослідження та вивчено морфолого-структурні особливості герпесвірусу коропа (СuHV-3), вивчено особливості процесу інфікування райдужної форелі та інших досліджуваних гідробіонтів вірусом інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV). Здобувачем проведено науковий аналіз та статистичну обробку.

Виділення IPNV з природнього середовища, культивування вірусу на культурі клітин, градієнтне ультрацентрифугування здійснено у співавторстві із завідувачем лабораторії біотехнологій в рибництві Інституту рибного господарства НААН Рудьом Ю.П. Під керівництвом Рудя Ю.П. дисертантка

здійснила молекулярно-біологічні дослідження, включаючи ідентифікацію вірусу за допомогою ПЛР, секвенування фрагментів вірусного геному та біоінформаційний аналіз. Біохімічні дослідження інфікованих риб здійснено за участю к.б.н. Драган Л.П. Електронно-мікроскопічні дослідження впливу СуHV-3 на нирки та інші внутрішні органи коропа проведені у співавторстві з доктором біологічних наук Матвієнко Н.М.

Автор взяла участь у підготовці двох патентів на винахід щодо ізольованих на території України штамів емерджентних вірусів риб. Автор висловлює щире подяку усім співавторам публікацій за темою дисертації.

**Обґрунтування та достовірність основних положень, висновків, рекомендацій.** Представлена робота виконана на сучасному науково-методичному рівні з використанням комплексу вірусологічних та біохімічних методів та статистичних методів, адекватних поставленим завданням. Застосовані в роботі методи є сучасними та дозволяють повною мірою оцінити отримані дані. Наукові положення, висновки, практичні рекомендації, порівняні з літературними джерелами, є достовірними і обґрунтовані на підставі вивчення сучасних досягнень лабораторної діагностики, переконливі та репрезентативні. В науковому дослідженні використовувались сучасні науково-методичні підходи, які відповідають поставленим завданням. Цифровий матеріал повністю базується на фактичних даних, підданий статистичній обробці.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на конференції «Молодь і поступ біології» (Львів, 2012); на VII Міжнародній конференції «Біоресурси і віруси» (Київ, 2013); на 4-ій науково-практичній конференції «Современные проблемы и перспективы рыбохозяйственного комплекса» (Москва, 2013), на міжнародному симпозіумі з водних наук (Туреччина, 2014).

**Публікації.** За результатами дослідження опубліковано 18 наукових праць загальним обсягом 4,5 д.а. (з них 0,94 д.а. належать особисто автору), (2 статті у виданнях Web of Science та Scopus, 11 статей у наукових фахових виданнях України, 2 статті в іноземних виданнях, 3 статті в інших виданнях та 7 тез

матеріалів наукових конференцій), які відповідають вимогам п.п. 11, 13 постанови Кабінету Міністрів України «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» від 24 липня 2013 року. Отримано 2 патенти на штам вірусу герпеса та на штам бірнавірусу «Карпати», права співавторів не порушено.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертаційна робота викладена на 116 стор. машинописного тексту (основний текст – 97 стор.) і складається зі вступу, огляду літератури, основної частини (включає матеріали і методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення), висновків, списку використаних джерел, що містить 163 джерела, з яких 111 – зарубіжних авторів. Робота ілюстрована 6 таблицями, 20 рисунками.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Біологічні властивості герпесвірусів риб

Назва герпесвірусів походить від грецького слова *herpes*, що в перекладі означає «повзучий». Вони широко розповсюджені в природі – наразі відомо понад 130 різних герпесвірусів тварин. Найбільше їх ізольовано з вищих хребетних та з людини, лише декілька герпесвірусів ізольовано з амфібій, та один із молюсків (*Ostreavirus*, родина *Malacoherpesviridae*). Серед вищих еукаріот рідко зустрічаються тварини, які б не були вражені цими вірусами. Серед герпесвірусів тварин зустрічаються також такі віруси як вірус хвороби Марека та вірус Люке, які здатні викликати канцерогенз. Біологічні властивості не всіх герпесвірусів є однаковими. Наприклад, існують герпесвіруси з широким спектром хазяїв, які швидко руйнують клітини хазяїна, інші мають вузький спектр хазяїв. Багато з герпесвірусів тварин та людини здатні утворювати латентні інфекції і довго співіснувати з організмом свого хазяїна. Всі герпесвіруси вищих еукаріот (родина *Herpesviridae*) за останньою класифікацією відносяться до трьох підродин: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* та *Gammaherpesvirinae*. Всі герпесвіруси риб відносяться до родини *Alloherpesviridae*. До цієї родини відносяться такі роди:

1. Рід *Batrachovirus*;
1. Рід *Cyprinivirus*;
2. Рід *Ictalurivirus*;
3. Рід *Salmonivirus*.

Герпесвіруси риб завдають значної шкоди рибництву. Відомо багато герпесвірусів, які здатні викликати значні патологічні зміни в організмі риб. Серед них найбільш відомими є герпесвірус кої, вірус віспи коропа, герпесвірус каналного сома, герпесвірус сіми (Табл. 1.1). Крім них, відомі і інші герпесвіруси риб, які були виявлені лише за допомогою електронної мікроскопії, але завдяки їхній високій видовій специфічності для цих вірусів ще не розроблені методи накопичення на перевивних культурах клітин, тому не вивчені їх біологічні властивості.

Аллогерпесвіруси риб за біологічними ознаками подібні до герпесвірусів вищих хребетних та людини. Вони володіють високою видовою специфічністю, характеризуються складними етапами взаємодії з захисними механізмами хазяїна і здатні великий проміжок часу з ним співіснувати (латентна форма інфекції). Висока видова специфічність аллогерпесвірусів чітко проявляється підчас їх культивування в перевивних клітинах риб. Наприклад, всі три аллогерпесвіруси коропових риб здатні розмножуватись лише в перевивних клітинах, отриманих з короїв, герпесвіруси лососевих риб – лише в культурах, отриманих із лососів, і т.д. Виключенням є лише герпесвірус вугрів, який здатний розмножуватись в перевивних клітинах, отриманих з коропових (ЕРС, FHM) та лососевих (RTG-2) риб.

Більшість аллогерпесвірусів вражають в першу чергу клітини епітелію. Там вони викликають некрози, гіпертрофію клітин, гіперплазії, папіломи та аденокарциноми, формують синтиції. У вражених аллогерпесвірусами клітинах спостерігається видовження ядер та маргіналія хроматину.

#### *Структура аллогерпесвірусів*

Структура всіх герпесвірусів характеризується значною консервативністю і аллогерпесвіруси не складають виключення. Діаметр віріонів аллогерпесвірусів становить 115-130 нм. Вірусний капсид побудований з 162 капсомерів. З них 150 є гексамерами, а 12 пентамерами. В центрі віріонів розташоване щільно упаковане ядро (кор.). Нуклеокапсид вірусу огорожений аморфним шаром, який має назву називається тегумент. Вся ця конструкція вкрита ліпідною двошаровою мембраною, яка походить від мембрани клітин хазяїна і містить різні глікопротеїди.

Таблиця 1.1

## Віруси герпеса риб (за Hanson et al., з модифікаціями)

Назва вірусу	Хазяїн	Клінічні ознаки	Посилання
1	2	3	4
AngHV1	Японський вугор ( <i>Anguilla japonica</i> ), європейський вугор ( <i>A. Anguilla</i> )	Геморагічні враження шкіри, зябер, плавців, печінки	[1, 2]
СуHV1	Короп ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Екзофтальмія, геморагії, папіломи, висока смертність мальків	[3, 4]
СуHV2	Карась сріблястий ( <i>Carassius auratus</i> )	Висока смертність на всіх стадіях, некрози гемопоетичної тканини, селезінки, підшлункової залози	[5-7]
СуHV3	Короп ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Висока смертність на всіх стадіях, запалення зябер, гіперплазія, некрози	[8, 9]
ІсHV1	Канальний сомик ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	Некрози печінки, нирок та внутрішніх органів, висока смертність малька при $t > 27^{\circ}\text{C}$	[10, 11]
ІсHV2	Чорний сомик ( <i>Ameiurus melas</i> )	Некроз нирок, геморагії, висока смертність на всіх стадіях	[12, 13]
АсіHV1	Білий осетр ( <i>Acipenser transmontanus</i> )	Дифузні дерматити, висока смертність мальків	[14]
АсіHV2	Білий осетр ( <i>Acipenser transmontanus</i> )	Епідермальна гіперплазія	[15]
SalHV1	Райдужна форель ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Клінічні ознаки відсутні	[16]
SalHV2	Сима ( <i>O. masou</i> ) Кижуч ( <i>O. kisutch</i> ) Нерка ( <i>O. nerka</i> ) Кета ( <i>O. Keta</i> ) Форель ( <i>O. mykiss</i> )	Віремія, витрішкуватість, некрози печінки, висока смертність мальків. У дорослих папіломи	[17, 18]
SalHV3	Озерний голец ( <i>Salvelinus namaycush</i> ) та його гібрид з американською палією ( <i>S. fontinalis</i> )	Епідермальна гіперплазія, геморагія на очах і щелепі, висока смертність мальків	[19, 20]
GaHV1	Атлантична тріска ( <i>Gadus morhua</i> )	Висока смертність дорослих, гіпертрофія клітин зябер	[21]

1	2	3	4
Без назви	Австралійська сардинка ( <i>Sardinops sagax</i> )	Епідермальна гіперплазія і гіпертрофія	[22-25]
TLEV	Блакитна тиліяпія ( <i>Oreochromis aureus</i> )	Енцефаліти і висока смертність личинок	[26]
PeHV1	Судак ( <i>Stizostedion vitreum</i> )	Епідермальна гіперплазія	[27]
EsHV 1	Щука північна ( <i>Esox lucius</i> ), мускелунг ( <i>E.masquinongy</i> )	Блакитні цятки на шкірі, видовження клітин епітелію	[28]
PIYV1	Калкан великий ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	Гігантські клітини в шкірі і епітелії зябер	[29,30]
FHV	Азійський параліхт ( <i>Paralichthys olivaceous</i> )	Епідермальна гіперплазія	[22]
Golden ide HV	Язь ( <i>Leuciscus ide</i> )	Епідермальна гіперплазія папіломатоз	[31]
Pacific cod HV	Тріска тихоокеанська ( <i>Gadus macrocephalus</i> )	Гіпертрофія клітин епідерми	[32,33]
SHV	Сом європейський ( <i>Silurus glanis</i> )	Епідермальна гіперплазія, папіломатоз	[34]
ESHV	Корюшка європейська ( <i>Osmerus eperlans</i> )	Папіломи, гіперплазія біля спинних плавців	[35, 36]
RSHV	Корюшка азійська ( <i>Osmerus mordax</i> )	Папіломи і карциноми	[37]
SDHV	Акула собача ( <i>Mustelus canis</i> )	Депігментація клітин епідерми	[38]
ASHV	Атлантичний лосось ( <i>Salmo salar</i> )	Папіломи	[39]
AHV	Скалярія висока ( <i>Pterophillum altum</i> )	Геморагічні враження шкіри, вздуття селезінки і печінки	[40]
RSRHV	Морський окунь ( <i>Sebastes proriger</i> )	Некрози печінки, гепатомегалія	[41]

### Структура геному

Дотепер секвеновані геноми 45 герпесвірусів вищих тварин та людини, три герпесвіруси риб [42-46] та один герпесвірус молюсків [47]. Найбільший геном серед аллогерпесвірусів виявлений у СуHV3 (295 000 тпн), найменший – у ІсHV1 (134 000 тпн). СуHV3 містить 156 відкритих рамок зчитування. Кожна з них транскрибується в окрему молекулу мРНК.

Герпесвіруси поділяють на три родини. До родини *Herpesviridae* відносять герпесвіруси ссавців, птахів та рептилій відносять до родини *Alloherpesviridae*, до родини *Malacoherpesviridae* належить герпесвірус моллюска. За послідовністю нуклеотидів ці родини значно відрізняються між собою. Єдиним виключенням є ген, що кодує молекулу АТФ-ази, яка входить до складу термінази. Терміназа відіграє основну роль при інкапсидзації вірусного геному у зрілий віріон в процесі його зборки [47-49]. Подібний ген існує у бактеріофага Т4, що вказує на походження аллогерпесвірусів від прокариот.

У герпесвірусів риби існує 12 генів, які є консервативними [46]. Сім з них кодують білки, які необхідні для реплікації вірусу, для морфогенезу віріонів, а інші 5 кодують білки з невідомими функціями [50, 51]. Використовуючи консервативні послідовності, за допомогою ПЛР було встановлено філогенетичну спорідненість 13 аллогерпесвірусів. Виявилось, що всі герпесвіруси риби чітко розділяються на дві клади. До однієї з них (клада 1) відносяться герпесвіруси корошових риби і вугра, а всі інші – до клади 2. До останньої були віднесені також герпесвірус атлантичної тріски, який не культивується в перевивних клітинах [21] і герпесвірус австралійської сардинки [22]. Аналіз послідовності нуклеотидів гену ДНК-полімерази герпесвірусу тиліпії свідчить про виняткову властивість цього вірусу риби – його подібність до родини *Herpesviridae*, а не до аллогерпесвірусів [26].

Із шести структурно охарактеризованих геномів п'ять мають прямі прикінцеві повтори розміром від 22 000 тпн до 636 000 тпн [52]. Виключенням є *SalHV1*, який містить зворотні повтори розміром 7 700 тпн.

#### *Аллогерпесвірус CyHV3*

Аллогерпесвірус *CyHV3* є високо контагіозним і викликає масові спалахи інфекції у коропа звичайного (*Cyprinus carpio carpio*) та його підвиду коропа кої (*C. carpio koi*). За міжнародною класифікацією вірусів він дістав назву вірус герпеса коропа третього типу (*CyHV-3*).

Вперше ця хвороба була виявлена в Ізраїлі навесні 1998 року у деяких рибних господарствах уздовж усього узбережжя Середземного моря – там

спостерігались численні масові (понад 80%) випадки загибелі коропа [53, 54]. З того часу загроза даного захворювання у цій країні ніколи не зникала. На даний момент захворювання розповсюдилось по багатьох фермах країни, що призводить до суттєвих фінансових витрат. Хоча збудник хвороби виявився надзвичайно вірулентним, захворюваність та летальні випадки спочатку були описані лише у кої та коропа звичайного [55]. Було виявлено, що деякі види риб, включаючи таких представників родини коропоподібних, як *Carassius auratus*, стійкі до даного захворювання, незважаючи навіть на довготривале співмешкання з хворою рибою в одному водяному резервуарі. Спалахи нового захворювання, що призвели до масової загибелі риби в Ізраїлі, спостерігались також в США та багатьох країнах Європи, Азії та Північної Америки. За всіма ознаками ця інфекція є емерджентною. Емерджентними називають хвороби, які виникають або проявляються раптово, несподівано, які раніше були невідомі і часто викликають надзвичайно напружені епізоотичні ситуації [56]. Швидке розповсюдження цього вірусу по всьому світу обумовлене тим, що декоративний короп кої користується попитом серед акваріумістів і є предметом інтенсивної торгівлі. Міжнародне епізоотичне бюро (МЕБ) у 2007р. визнало цю емерджентну інфекцію як загрозливу 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 [57].

Найчастіше захворювання виникає в перехідний період – навесні та восени, його вплив обмежений температурними умовами 17-27°C, вірус особливо контагіозний при температурі 22-24° С [55, 58].

З інфікованого коропа був ізольований та ідентифікований ДНК вмісний вірус, морфологічно схожий на вірус простого герпесу людей. СуHV3 містить найбільший серед вірусів герпеса геном, який побудований із 295 000 пар нуклеотидів [59] і здатний кодувати 156 різних білків, з яких 40 – є структурними [60].

Як і інші герпесвіруси, СуHV3 має гени, які кодують білки, що здатні впливати на імунну систему хазяїна. Серед них є інтерлейкін-10, ліпопротеїн, фактор некрозу пухлин (TNFR-2) [61].

Даний вірус вже через 2 дні після зараження призводить до нефриту, який може тривати до десяти діб. В інфікованої риби вражаються зябри, про що свідчить втрата ворсинок та запалення зябрових тичинок. Основними симптомами хвороби коропа є втомлюваність, втрата координації руху, внутрішні крововиливи, запалі очі, бліді плями на шкірі, збільшення секреції слизу, нефрит та некроз зябер, різке збільшення числа зовнішніх паразитів і бактерій. Основним методом діагностики вірусу є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), а також метод імуофлуоресценції. Інший імунологічний метод, який широко використовують для діагностики вірусів – ELISA, – для цього вірусу ще не розроблений.

За даними ізраїльських та японських дослідників, вірусна ДНК за допомогою ПЛР виявляється в нирках та в крові інфікованих риб уже через один день після інфікування [62]. Через три дні після інфікування кількість вірусної ДНК в нирках починає зростати [63]. З часом вірусна ДНК з'являється в зябрах, печінці, кишківнику та у шкірі. В тканинах головного мозку вона виявляється не завжди.

При електронно-мікроскопічних дослідженнях в цитоплазмі клітин нирок і печінки хворих коропів були виявлені віріони діаметром 120 нм. Мітохондрії уражених клітин мали видовжену форму, деякі мітохондріальні крісти були зруйновані. В цитоплазмі уражених клітин були розширені каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулума, мало місце розходження листків ядерної мембрани. В цитоплазмі уражених клітин нирок віріонів було набагато більше, ніж в клітинах печінки [64, 65].

Вірус СуHV3 успішно інфікує перевивну культуру клітин із плавників кої або коропа. Первинна культура із плавників коропа також придатна для накопичення вірусу. Цитопатичний ефект в інфікованій культурі клітин настає через 4-6 діб після інфікування. Латентність аллогерпесвірусів була описана для

CyHV1, CyHV3, SalHV2 та IcHV [62-65]. Зазвичай її виявляють за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Про шляхи розповсюдження вірусу CyHV3 в природі інформації мало.

Нещодавно наявність ДНК CyHV3 була підтверджена за допомогою ПЛР у інших риб, які вирощувались в полікультурі разом з інфікованими коропами – у карася (*Carassius carassius*), білого амура (*Stenopharyngodon idella*), строкатого товстолобика (*Aristichthys nobilis*), звичайного товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*), линя (*Tinca tinca*), рибця (*Vimba vimba*), російського (*Acipenser gueldenstaedtii*) та атлантичного (*Acipenser oxyrinchus*) осетрів [66]. Японськими дослідниками ДНК KHV виявлена у коловерток [67].

Ймовірним джерелом зараження є вода, що містить слиз або інші продукти життєдіяльності заражених риб, а також знаряддя рибальства. Істотну роль в перенесенні вірусу виконують водоплавні птахи, зокрема чайки. Збереження інфекційності CyHV3 у воді може сягати кілька днів [68]. Встановлено, що в організм риб вірус може проникати через шкіру біля спинних плавців. Потім вірус проникає в лейкоцити і розноситься в різні органи риб. Оскільки за допомогою ПЛР ДНК вірусу герпеса була виявлена у коропів без клінічних ознак хвороби, які вирощувались при температурі 13°C, такі риби можуть бути джерелом інфекції у рибницьких господарствах.

Один з запропонованих профілактичних заходів захворюваності риб від вірусу CyHV3 – дотримання правил ветеринарної санітарії щодо інфекційних хвороб риб. Перевозити мальків коропа в Європі дозволяється тільки з господарств, які мають посвідчення про відсутність у них CyHV-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 CyHV-3. Вчені Ізраїлю пропонують практичні рекомендації, що засновані на набутті резистентності до вірусу через утримання молоді риб в умовах короткочасного (5 діб) впливу підвищених температур, що сприяють термоінактивації вірусу та їх подальшого звільнення у ставки для одужання протягом літа [55].

Інший метод полягає в підвищенні резистентності до вірусної інфекції шляхом міжвидового схрещування чутливого свійського коропа та резистентного дикого виду. Гібриди показують високі темпи росту, вони менш чутливі до СуHV-3, ніж їхні чистокровні батьківські форми [69].

Ще один з перспективних методів захисту – вакцинація риб атенуйованою вакциною проти СуHV-3. Але ця вакцина ще не в достатній мірі протестована в умовах рибницьких господарств, тому все ще залишається відкритим питання її безпеки для не імунізованих риб [63, 70].

Зважаючи на високу потенційну загрозу СуHV-3 для рибництва, необхідно впроваджувати ефективні експрес-методи його діагностики та вжити ряд організаційних заходів по недопущенню розповсюдження цього вірусу в рибницьких господарствах України.

#### *Аллогерпесвірус каналного сомика (IcHV1)*

Аллогерпесвірус (IcHV1) був відкритий в США в 1971 р. під час спалаху інфекції у мальків каналного сомика (*Ictalurus punctatus*) [11]. Інфекція у мальків каналного сомика супроводжувалась високою смертністю, затримкою росту риб і високою чутливістю до бактеріальних інфекцій. За останніми повідомленнями, цей вірус може залишатися у 10-20% популяції риб у латентній формі [71]. IcHV1 є найбільш детально охарактеризованим представником класу 2 аллогерпесвірусів. Геном вірусу являє собою лінійну неперматовану ДНК розміром 130 000 тпн [72, 73], яка кодує 79 відкритих рамок зчитування [44], 11 з яких кодують вірусні структурні білки. Як і в інших герпесвірусів, IcHV1 кодує 8 зовсім ранніх білків (2 години після інфікування), 8 ранніх (2-4 години після інфікування) і 16 пізніх білків (після 4 годин). Очищена ДНК вірусу здатна інфікувати перевивні клітини риб [74].

Під час репродукції в чутливих клітинах риб IcHV1 швидко пригнічує білковий синтез хазяїна [72], вірус перебудовує цитоскелет [75]. При цьому відбувається руйнування актинових філаментів, перегрупування мікротрубочок і віментінових філаментів, зростає кількість синтиціїв. Повна руйнація

мікротрубочок за допомогою хімічних реагентів (нокодазол) призводить до інгібування вірусу.

Аллогерпесвірус ІсНV1 здатний до репродукції в макрофагах, в В і Т-лімфоцитах [76]. Клітини ССО, попередньо інфіковані реовірусом каналного сомика, не здатні підтримувати репродукцію ІсНV1 [77].

Спалахи інфекції, зумовлені ІсНV1, бувають спорадичними. Вони виникають влітку і вражають здебільшого мальків, хоча дорослі риби теж хворіють. За два тижні гине біля 90% популяції каналного сомика. Клінічні ознаки хвороби з'являються у риб через 2-3 дні після інфікування. Риби втрачають орієнтацію при плаванні, у них наявна екзофтальмія, вздуття кишківника, геморагія плавців.

На розтині у здутій селезінці і нирках наявні жовті асцити. Найбільш значимі патологічні враження відмічені в гематопоетичній тканині, а також в печінці та травному тракті. Некрози присутні у підшлунковій залозі, селезінці та м'язах [78, 79].

Для ІсНV1 характерна висока видова специфічність. До нього чутливі лише близькоспоріднені блакитний (*I. furcatus*) та білий (*I. catus*) сомики. Інші представники сомових риб, такі як європейський, американський, африканський та азійський стійкі до цього аллогерпесвірусу [80-83]. Така ж ситуація спостерігається і в перевивних культурах клітин [51].

Про шляхи передачі вірусу в організмі риб інформації мало. Використання вірусу, міченого радіоактивними ізотопами, показало, що спочатку він накопичується в зябрах і хвостових плавцях, а потім, через 3-4 дні, максимальне його накопичення відбувається в печінці, травному тракті та нирках інфікованих риб [84]. Після цього відбувається повторне максимальне його накопичення в зябрах сомиків. В цей же час відбувається масова смертність інфікованих риб [72].

Про випадки перебування ІсНV1 в організмі каналного сомика в латентній формі існує багато повідомлень [85-88], проте механізми, які стримують розмноження вірусу, не досліджені. Є припущення, що спусковим

гачком інфекції може бути температура або стрес [89]. Для профілактики захворювання розроблені такі вакцини, як ДНК-вакцина [90], вакцина на основі живого ослабленого вірусу [91] та рекомбінантні вакцини з відсутнім геном тимідинкінази [92], або гену 50 [93]. Найбільш ефективною виявилась жива ослаблена вакцина [94].

Таким чином, не дивлячись на те, що у риб досить детально вивчені лише два вищеописані герпесвіруси, можна прогнозувати, що з подальшим розвитком аквакультури будуть описані нові представники аллогерпесвірусів та детально вивчені біологічні властивості тих, що вже відкриті. Застосування нових молекулярних методів досліджень дозволить краще розуміти їх взаємодію з організмом риби та попереджувати їх розповсюдження в аквакультурі.

## 1.2 Біологічні властивості бірнавірусів риб

Родина бірнавірусів (*Birnaviridae*) об'єднує віруси з двома сегментами дволанцюгової РНК, найважливішими з яких, з економічної точки зору, є вірус інфекційного панкреотичного некрозу риб (IPNV) та вірус інфекційного бурситу курей (IBDV).

За сучасною класифікацією до родини *Birnaviridae* входять чотири роди: *Aquabirnavirus*, *Avibirnavirus*, *Entombirnavirus* та *Blosnavirus*. До роду *Aquabirnavirus* відносять вірус інфекційного панкреатичного некрозу лососевих та деяких прісноводних риб, а також близьких до IPNV вірусів, ізольованих із устриць, крабів та коловертки. Основними представниками роду *Aquabirnavirus* є IPNV, *Tellina virus 2* (TV-2) та *Yellowtailascites virus* (YTAV) [95].

Єдиним представником роду *Avibirnavirus* є вірус інфекційного бурситу курей [96, 97]. Представники роду *Entombirnavirus* вражають тільки мух. До складу роду *Blosnavirus* відносять бірнавірус, ізольований із перевивних клітин тропічної риби *Channa lucius*.

### *Фізико-хімічні властивості бірнавірусів*

Віріони бірнавірусів мають ікосаедричний тип симетрії, діаметр віріонів складає 65 нм, вони вкриті одношаровою гексогональною оболонкою, яка складається з протеїну VP2, з'єданого у тримери. Оболонка віріонів

бірнавірусів містить в собі 260 капсомерів розміром 4 нм, які виступають над поверхнею віріонів [98, 99, 100].

Бірнавіруси стабільні при рН 3-9, резистентні до нагрівання (60°C протягом однієї години), до ефіру та 1% SDS при температурі 20°C, рН 7,5 протягом 30 хв [95].

Бірновіруси мають РНК-вмісний геном, який складається з двох лінійних сегментів (А і В) [95, 96, 99, 101]. Більший сегмент (А) має довжину 3,1 – 3,6 тпн, сегмент В – менший, його довжина коливається від 2,8 до 3,3 тпн, в залежності від роду. Геномна РНК бірнавірусів містить в собі 53 -58% пар G+C, за винятком *Rotifer birnavirus* (RBV) та *Drosophila X virus* (DXV), вміст пар G+C у яких становить 44-47% [97]. На 5'-кінці вірусної РНК міститься ковалентно зв'язаний з нею вірусний протеїн VPg. На 3'-кінці РНК термінальний полі-А стоп-кодон відсутній [102]. Детальна характеристика геному бірнавірусів була вивчена на моделі вірусу інфекційного бурситу та на вірусі інфекційного панкреатичного некрозу. Встановлено, що перші 30 нуклеотидів 5'-некодуючої послідовності в двох сегментах містять консервативні послідовності в обох локусах у вірусів IPNV та IBDV [96, 103]. Сегмент А кодує велику рамку зчитування, яка передує маленькій закритій рамці зчитування [104]. Для *Telina* вірусу 1 (TV-1), *Blotched snaked virus* (BSNV) та DXV маленька рамка зчитування у сегменті А не перекриває ініціюючий кодон великої рамки [105]. Для RBV не має доказів існування маленької рамки зчитування в сегменті А [97].

Поліпротеїн, який кодується великою рамкою зчитування в сегменті А першим процесується впродовж трансляції з утворенням преVP2, VP4 та VP3. Подальший процесінг преVP2 відбувається в термінальному С-домени для формування зрілого капсидного протеїну (VP2) та трьох з чотирьох білків, які залишаються в віріонах.

Білок VP1 (амінокислоти 844 – 1045) являє собою РНК-залежну РНК-полімеразу (RdRp) і кодується сегментом В. Білок VP1 перебуває у віріоні як у вільному стані, так і ковалентно асоційований з геномом, як і білок VPg [99]. Білок VP4 (NS в IPNV) являє собою протеазу, яка розщеплює N- та С-кінці

поліпротеїну і надалі процесує пре-VP2. Каталітичний домен VP4 структурно подібний до протеазного домена бактеріальної АТФ-залежної Lon протеази [102].

Білок VP5 (17 кДа в IBDV та 15 кДа в IPNV) являє собою неструктурний позитивно заряджений поліпептид, який кодується маленькою рамкою зчитування сегменту А. Цей білок є несуттєвим для реплікації IBDV та IPNV [104]. Ліпіди і вуглеводи у складі бірнавірусів відсутні.

#### *Організація геному та реплікація*

Як зазначено вище, геном бірновірусів є дволанцюговим. Він має дві рамки зчитування: рамка зчитування 2 кодує великий протеїн розміром 105 – 120 кДа і перекриваючу (IPN, IBDV та DBV) або внутрішню (DXV, BSNV, TV-1) рамку зчитування 1, яка кодує протеїн розміром 15 – 27 кДа. Позиція поліпротеїнового сайту рестрикції для синтезу преVP2, VP4 та VP3 під час трансляції визначалась експериментально для IBDV, IPN, BSNV, DXV та TV-1 [104, 106, 107]. Для BSNV та TV-1 між преVP2 та VP4 доменами кодується додатковий поліпептид Х. Один цикл реплікації займає приблизно 18-22 години для IPNV і 4-8 для IBDV [100, 103].

Шляхи потрапляння вірусу в клітину досі недостатньо вивчені, а інформація фрагментарна. Для IBDV функціональними рецепторами зв'язування на поверхні різних клітин курей слугують протеїн теплового шоку 90 та a4b2 інтегрин. Один з невеликих структурних білків IBDV, рер46 та його гомологи в інших бірнавірусів, можуть індукувати пори в мембранах чутливих до вірусу клітин [100]. Після потрапляння віріонів в цитоплазму в ній активуються RdRp, в результаті чого продукуються дві геномні (24S) мРНК молекули з кожного 14s dsRNA геномного сегменту. Ці мРНК кеповані, у них відсутні полі-А послідовності. В інфікованих клітинах були знайдені також проміжні продукти реплікації [101].

Після 3-4 годин після інфікування у клітинах з'являються дві мРНК, які синтезуються за один реплікативний цикл в однакових пропорціях. Вірус-специфічні білки з'являються вже через 4-5 годин після інфікування та

перебувають в інфікованих клітинах у приблизно однаковій пропорції до кінця реплікативного циклу. Сегмент А мРНК транслюється до вихідного 105 кДл білку, який включає в себе преVP2, VP4 та VP3 білки, за виключенням BSNV та TV-1, який має X білок між преVP2 та VP4 доменами. Протеаза VP4 розрізає білок для того, щоб створити три (або чотири для BSNV та TV-1) поліпептиди. ПреVP2 утворюється під час зборки вірусу за допомогою рестриктази для формування зрілого VP2 білка та маленьких структурних пептидів. Вірусна збірка та дозрівання капсидних білків преVP2 та VP2 одночасна та незалежна [107].

Вірусні частки збираються та акумулюються у цитоплазмі. Механізм вивільнення вірусу невідомий. В перевивній культурі клітин майже половина вірусного потомства залишається зв'язаною з клітиною та залежить від множинності інфекції [100].

#### *Антигенні властивості*

Антигенну детермінанту бірнаврусів формує капсидний протеїн VP2, який являє собою видоспецефічний антиген. Антитіла до білку VP3 інфекційність вірусного агента не нейтралізують. Серологічної перехресної реакції між бірнаврусами птахів, комах та риб, а також поміж аквабірнаврусами IPNV, BSNV, TV-1 та RBV не існує [102]. IPNV антигенно споріднений з ізолятами, виділеними з інших морських та прісноводних риб, а також з двостулкових молюсків (*Tellina virus 2*) [106].

Розрізняють кілька штамів аквабірнаврусів, в першу чергу на основі видів природних хазяїв. Аквабірнавруси також мають значне антигенне різноманіття. Результати вивчення послідовностей амінокислот капсидного білку свідчать про тісну кореляцію між географічним розповсюдженням та серологічними властивостями бірнаврусів. На основі подібності нуклеотидних послідовностей та результатах реакції нейтралізації з поліклональною антисывороткою і імунологічного аналізу з моноклональними антитілами, рід був згрупований в дев'ять перехресно-реагуючих серотипів та шість геногруп (табл. 1.2).

Характеристика нових ізолятів аквабірнавірусів з Азії та Австралії свідчить про можливість виокремлення додаткової геногрупи (штам *Yellowtail ascites virus*) та збільшення геногрупи 5 (штам NZ10 та подібні віруси). На основі вивчення антигенних характеристик до роду *Aquabirnavirus* можуть бути віднесені також штами *Marine birnavirus* – AY-98 та *Marine birnavirus* – H-1.

Таблиця 1.2

## Серотипи та геногрупи аквабірнавірусів

Назва штаму	Серотипи	Геногрупи	
<i>West Buxton</i>	A1	1	A1+A9
<i>Sp</i>	A2	2	A7 + A8
<i>Ab</i>	A3	3	A3
<i>Hecht</i>	A4	4	A5 + A6
<i>Tellina virus-2</i>	A5	5	A2
<i>Canada 1</i>	A6	6	A4
<i>Canada 2</i>	A7	2	A7 + A8
<i>Canada 3</i>	A8	2	A7 + A8
<i>VR299</i>	A9	1	A1+A9

*Аквабірнавіруси*

Найбільш досконало вивченим серед аквабірнавірусів є IPNV. Інфекційний панкреотичний некроз риб був вперше діагностований у Канаді в 1940 році, на сьогодні це захворювання поширилось в багатьох регіонах світу і завдає значних економічних втрат лососевій аквакультури [107]. Природним хазяїном вірусу IPNV є лососеві риби. Механізм передачі вірусної інфекції вертикальний та горизонтальний, переносники вірусу (вектори) не встановлені. Вірус розповсюджений по всьому світу, він може спричиняти епізоотії, результатом яких є величезні втрати в інкубаторах мальків лососевих риб. Вірус спричиняє некротичні ураження підшлункової залози, а також накопичується в інших органах, таких як нирки, гонади, кишківник і мозок за відсутності некрозу.

Дорослі риби, інфіковані IPNV, стають позитивними носіями вірусу без явно виражених ознак захворювання [107].

IPNV здатний інфікувати різні види лососевих риб, включаючи такі роди як *Salmo*, *Salvalinus*, *Oncorhynchus*. Симптоми захворювання у різних риб бувають різними. Наприклад, у японського вугра вірус викликає нефрит, у атлантичного менхадена (*Brevoortia tyrannus*) – порушення координації при плаванні, мальки риб *Seriola quinqueradiata* страждають від асцити та від значних черепних крововиливів, спричинених вірусом. У палтуса (*Scophthalmus maximus*) бірнавірус викликає некроз гематопоетичної системи, нирковий некроз та високу смертність. Багато видів риб є безсимптомними носіями цього вірусу [107].

Основними носіями IPNV вважають атлантичного лосося (*Salmo salar*), райдужну форель (*Oncorhynchus mykiss*), американську палію (*Salvelinus fontinalis*), кумжу (*Salmo trutta*) та каліфорнійського жовтохвоста (*Seriola lalandi*). Список риб, які є чутливими до цього вірусу, представлений в табл. 1.3.

При експериментальному інфікуванні чутливими до IPNV без клінічних ознак захворювання були короп, золота рибка, морський карась, південна камбала, жовтопірий лящ та інші види риб.

Інший представник аквабірнавірусів, RBV, був ізольований у Франції з популяції коловерток *Brachionus plicatilis*, які вирощувалися для годівлі мальків морської риби в риборозплідниках [101]. При електронномікроскопічному дослідженні ультратонких зрізів хворих коловерток було встановлено, що вірус розмножується в цитоплазмі клітин. При цьому в ній спостерігались три типи включень:

1. Великі гранулярні електроннощільні включення;
2. Паличкоподібні включення;
3. Паракристалічні упаковки віріонів розміром 1,5-2,0 мкм.

Таблиця 1.3

Список видів риб, чутливих до IPNV

Вид риб	Назва риб	Вид риб	Назва риб
---------	-----------	---------	-----------

<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Чавича	<i>Hippoglossus stenolepsis</i>	Тихоокеанський палтус
<i>O.keta</i>	Кета	<i>Seriola guinqueradiata</i>	Жовтохвіст
<i>O.kisutch</i>	Кіжуч	<i>Salvelinus namaycush</i>	Озерний голець
<i>O.masu</i>	Сіма	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Амурський в'юн
<i>O.rhodurus</i>	Підвид риби сіми	<i>Thymallus thymallus</i>	Європейський харіус
<i>O.nerka</i>	Нерка	<i>Chondrostoma toxostoma</i>	Французький подуст
<i>Salvelinus alpinus</i>	Арктичний голець	<i>Channa striatus</i>	Полосатий змієголов
<i>Brevoortia tyrannus</i>	Атлантичний менхеден	<i>Pharalichthys dentatus</i>	Літня камбала
<i>Salmo clarki</i>	Лосось Кларка	<i>Psetta maxima</i>	Великий ромб
<i>Hucho hucho</i>	Дунайський лосось		

Вірус не розмножується в перевивних клітинах риб BF2 і RTG, які є високочутливими до інших аквабірnavірусів. Він швидко втрачає інфекційність при заморожуванні та відтаюванні при температурі  $-35^{\circ}\text{C}$  та  $-180^{\circ}\text{C}$  – інфекційність вірусу в таких умовах зникає протягом доби. Проте в організмі коловерток при цих же умовах його інфекційність зберігається протягом кількох місяців.

При вивченні фізико-хімічних властивостей вірусу було встановлено, що він володіє всіма характеристиками, притаманними для аквабірnavірусів. Діаметр сферичних віріонів складає 59 нм, він має 4 структурних білки розміром 60К, 52К, 33К, і 27К. Капсомери вірусу мають діаметр 7 нм, серед очищених віріонів зустрічаються, окрім звичайних сферичних часток, трубчаті структури діаметром 60 нм і довжиною 0,3-1,0 мкм, які побудовані із капсомерів діаметром 7 нм, розташованих під кутом  $60^{\circ}$  до осі трубки [108].

Бірнавірус жовтохвоста виявили у риби *S. quinquerediata* (жовтохвіст, або японська лакедра), яка використовується для виготовлення суші, сашімі та консервів. Основною патологією хворих риб є розвиток асцитів, тому вірус назвали «Асцитний вірус жовтохвоста» (YAV). Подібні віруси були ізольовані також із інших морських риб та молюсків.

Крім IPNV, YAV та RBV, до аквабірнавірусів відносять TV-1 та TV-2, які були ізольовані із морських двостулкових молюсків *Tellina tenuis* [106]. Було підмічено, що в популяціях морських молюсків зустрічаються екземпляри з тонкою оболонкою. Травні залози таких молюсків мали жовтий колір замість звичайного темно-коричневого. В травних залозах таких молюсків за допомогою електронної мікроскопії були знайдені сферичні вірусні частки діаметром 54-70 нм. Вивчення біологічних властивостей бірнавірусів молюсків показало, що вони мають багато спільних характеристик з IPNV. Обидва ці віруси вивчені недостатньо, в науковій літературі інформації про них мало.

#### *Авібірнавіруси*

Вперше авібірнавірус, вірус інфекційного бурситу кур, був виявлений у 1962 році під час спалаху захворювання у Гумбро, штат Делевер, США. У хворих птиць методом електронної мікроскопії було знайдено велику кількість віріонів, але впродовж декількох років вірус невірно діагностувався як адено-, пікорна-, або реовірус [97]. Надалі подібні спалахи хвороби отримали назву «Захворювання Гумбро». Назву «інфекційний бурсит кур» (IBDV) вірус отримав від місця його масового накопичення, оскільки найбільше він вражає фабрицієву сумку птахів (бурсу).

Природним хазяїном для IBDV є кури та індички. Також вірус можна ізолювати із качок та інших свійських птахів. Механізм передачі вірусу горизонтальний, вектори невідомі. IBDV розповсюджений по всьому світу. Вірус вражає бурсу молодих курчат, спричиняючи В-клітинну недостатність. Смертність курчат настає у віці 3-10 тижнів, супроводжуючись запаленням фабрицієвої сумки, формуванням імунних комплексів та порушенням згортання крові [97].

### *Ентомобірнавiруси*

Природним хазяїном DXV є муха *Drosophila melanogaster*. Механізм передачі вірусу горизонтальний, вектори невідомі. Він вперше був виявлений у Франції в 1979 році як контамінант в лінії плодової мушки *D. melanogaster*, котра підтримувалась протягом кількох років в лабораторії професора Ваго. Характерною ознакою цієї хвороби є чутливість інфікованих мух до CO<sub>2</sub> або N<sub>2</sub>: в атмосфері цих газів інфіковані мухи гинуть через 15 хв, неінфіковані мухи за цей час не гинуть. В залежності від дози вірусу, яку вводять мухам при визначенні інфекційного титру вірусу, вони гинуть через 5-15 днів після інфікування. Чутливість до вищезгаданих газів з'являється у них за 3-4 дні до загибелі.

При контактному інфікуванні мухи гинуть не всі (всього 30%) і їх загибель починається лише через 30-40 днів з моменту інфікування. Вірус вражає мозок, трахеї і клітини яєчників.

DXV широко розповсюджений серед перевивних культур клітин дрозофіл. У світі майже 70% перевивних ліній мух інфіковано цим вірусом. Вірус накопичується в перевивних клітинах у великих кількостях (10 млрд БУО/мл) і викликає в них через 24-48 год. характерну ЦПД: інфіковані клітини немовби фрагментовані. Існуючі факти свідчать про можливість персистенції вірусу в перевивних клітинах дрозофіл. Окрім мух, DXV був ізольований також із природних популяцій мокриць (*Culicoides spp.*) [108]. DBV був ідентифікований шляхом визначення послідовності нуклеотидів маленьких ділянок РНК, присутніх в культурі клітин *D. melanogaster* [103].

Блоснавірус BSNV був ізольований у Великобританії із культури клітин, виділеної з тропічних видів риб *Channa lucius*. За послідовністю нуклеотидів гену структурного білка, за молекулярними масами білків та за антигенними властивостями цей вірус відрізняється від інших представників аквабірнавiрусів, тому його виділили в окремий рід. Риби *C. lucius* зовнішніх ознак захворювання не мають.

В 2013 р., в Ірландії у рибки-лікаря *Garra rufa*, яка активно використовується в спа-салонах для пілінгу, був описаний новий бірнавірус, який схожий до блоснавірусів [109].

Близьким до DXV є вірус *Espirito Santo* (ESV). Цей вірус був відкритий у 2012 році як контамінант серед препаратів вірусу денге-2, ізольованому від хворих пацієнтів у бразильському штаті Espirito Santo [110]. У інших штамів вірусу денге його не виявляли. ESV розмножується тільки в перевивних клітинах комарів C6/36. Характерною особливістю цього вірусу є його повна залежність від коінфекції вірусом денге-2. В клітинах ссавців (Vero) ESV не розмножується. Послідовність нуклеотидів РНК-залежної РНК-полімерази ESV подібна до такої у DBV на 70% [111]. Ймовірно, цей вірус віднесуть до нового роду бірнавірусів.

### Висновки

1. За біологічними властивостями герпесвіруси риб значно відрізняються від добре вивчених представників родини *Herpesviridae*, але вони також мають багато подібних ознак. Це може свідчити про їхню паралельну еволюцію і про можливість походження від спільного пращура.
2. Аналіз літератури свідчить про те, що найбільше бірнавірусів серед тварин було виділено із водяних тварин, в основному із риб та молюсків. Аналіз біологічних властивостей бірнавірусів свідчить про унікальну природу цих вірусів і про перспективи розробок на їх основі ефективних вакцин для боротьби з бірнавірусними хворобами риб в аквакультурі.
3. Застосування нових молекулярних методів досліджень герпес- та бірнавірусів риб дозволяє краще розуміти їх взаємодію з організмом риби та попереджувати їх розповсюдження в аквакультурі.

Матеріали у поданому розділі були оприлюднені автором у таких публікаціях:

1. Майстренко М.І. Емерджентна хвороба коропа / М.І. Майстренко // Рибогосподарська наука України. 2011. № 1. С. 104–106.

2. Майстренко М. І. Біологічні властивості бірнавірусів / М. І. Майстренко // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Сер. Біологія. – Тернопіль : ТНПУ, 2013. Вип. 4 (57). С. 96–102.

3. Майстренко М.І. Біологія герпесвірусів риб / М.І. Майстренко, Л.П. Бучацький // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2014. – Вип. 3 (123). – С. 19–35.

## РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Об'єкти досліджень

Дослідження проводилися над такими об'єктами:

1. Віруси. Об'єктом дослідження були ізолят герпесвірусу, виділений із зябер та нирок інфікованих коропів кої та ізолят вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, виявленого та виділеного нами на території України у райдужної форелі *Oncorhynchus mykiss*, виловленої у річці Серет, Чернівецької області та названий IPNV «Карпати» [112].

2. Риби. Дослідження проводились на різновікових групах райдужної (*O. mykiss*), та струмкової (*Salmo trutta*) форелей, що були вирощені на експериментальній базі Інституту рибного господарства НААН в господарстві «Ішхан» та на рибах Київського зоологічного парку.

3. Раки. Для дослідів використовували широкопалого рака *Astacus astacus*.

Для проведення досліджень використовувались наступні матеріали:

1. Тест-системи. 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).

Виділення ДНК з гелю здійснювали за допомогою набору Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) відповідно до протоколу виробника. Ампліфіковані фрагменти досліджували на автоматичному ДНК-секвенаторі Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems) з використанням набору для секвенування BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

2. Програмне забезпечення. Для підбору олігонуклеотидних праймерів до українського ізоляту IPNV, визначення їхньої специфічності та фізичних властивостей використовували програмне забезпечення Vector NTI 10. Крім того, специфічність праймерів перевіряли за допомогою онлайн-сервісу BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

Аналіз послідовностей нуклеотидів проводили за допомогою алгоритмів ClustalW в програмному забезпеченні MEGA 5.2 та BLASTN.

3. Культури клітин. При роботі *in vitro* з вірусом інфекційного панкреатичного некрозу ізоляту «Карпати» використовували культури клітин RTG-2 (Rainbow Trout Gonad Tissue), культура отримана з тканини гонад райдужної форелі *O. mykiss* та має фібробластоподібну форму; FHM (Fat Headminnow), отримана з епітелію анального отвору пічкара *Gobio sp.*; та EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) – отримана з клітин папіломи коропа *Cyprinus carpio*, епітеліальна культура, що, має широкий спектр чутливості до вірусів риб.

## 2.2. Методи досліджень

2.2.1 Електронна мікроскопія. Електронно-мікроскопічні дослідження вірусної суспензії проводили на сітках з коллодієвими плівками-підкладками. Вірус контрастували 1%-ним розчином уранілацетату та вивчали на електронному мікроскопі EM-125. Для виготовлення ультратонких зрізів нирки та печінку хворих риб фіксували у 1%-ному розчині  $OsO_4$ , доведеному до рН 7,0 за допомогою 0,1 М фосфатного буфера. Після фарбування 0,5%-ним водним розчином уранілацетату матеріал зневоднювали, проводили крізь етанол та ацетон і вміщували в епоксидну смолу. Ультратонкі зрізи фарбували цитратом свинцю. Одержані таким чином препарати вивчали на електронному мікроскопі JEM-100B при інструментальному збільшенні 20 000 разів.

2.2.2 Біопроба. Біопробу ставили у лабораторних умовах шляхом введення 0,2 мл вірусомісного розчину у черевину форелі чи звичайного коропа. Риб утримували у ваннах при кімнатній температурі протягом 10 днів.

2.2.3 Ідентифікація герпесвірусу. 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°C. 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 мікроцентрифусі 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 CyHV3 [113, 114]. Послідовності олігонуклеотидів були такими:

For 5'- TACGAGGTGATGCAGCGTCTGGAGGAATAC -3'

Rev 5'- CTGAGAGATTCTGACGGTGAAGGGTGCG -3'

Для визначення специфічності праймерів та їхніх фізичних властивостей використовували програмне забезпечення VectorNTI10, PrimerPremier5 та онлайн-сервіс BLAST.

Ампліфікація ділянки гену тимідинкінази CyHV3 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-«Герцик» («НПО ДНК-Технологія»). 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).

2.2.4 Культивування IPNV. Відбір, приготування та зберігання патологічного матеріалу, а також накопичення вірусу в культурі клітин проводили відповідно до міжнародних нормативних документів. Накопичення ізоляту IPNV «Карпати» проводили на культурі клітин RTG-2 (гонади райдужної форелі). Клітини культивували при температурі 20°C в поживному середовищі MEM (РАА, Австрія), а ЕРС на середовищі DMEM (РРА, Австрія) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки FBS Gold (РАА, Австрія) та антибіотиків (гентаміцин). У роботі використовували гомогенати внутрішніх органів

цьоголіток райдужної форелі *O. mykiss*, відібраних для дослідження з річки Серет в Чернівецькій області [112]. Для цього готували гомогенати внутрішніх органів на поживному середовищі MEM в співвідношенні 1:10. Матеріал для інокуляції фільтрували через шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм (Sarstedt). Для інфікування клітин використовували 1 мл приготовленого інокулята. Після настання цитопатичної дії (ЦПД) та деструкції моношара клітин, культуральну рідину використовували для виділення РНК вірусу. Клітини культивували у вигляді моношарових культур у пластикових флаконах площею 25 см<sup>2</sup> при температурі 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 при температурі 20°C. Після адсорбції зливали вірусомісний матеріал, а клітини двічі промивали розчином Хенкса та додавали поживне середовище для підтримки, що містило 2% ембріональної телячої сироватки (ЕТС). Упродовж експерименту проводили щоденну перевірку стану дослідних та 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.

2.2.5. Ідентифікація IPNV. Ампліфікацію здійснювали з використанням трьох пар олігонуклеотидних праймерів, специфічних до генів VP2 та NS [115]. 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 градієнті температур 53-64°C (30 секунд), синтезу при 72°C (1 хвилина) та додаткового останнього циклу синтезу при 72°C

(7 хвилин). Після ПЛР продукти аналізували у 2%-му агарозному гелі в ТАЕ-буфері (40 мМ TRIS-HCl, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ EDTA). Результати електрофорезу спостерігали під ультрафіолетовим транслюмінатором.

2.2.6 Очистка вірусу. Для очистки IPNV культуральну рідину з флаконів з 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 800 g упродовж 5 хвилин.

2.2.7. Визначення нуклеотидних послідовностей. Нуклеотидні послідовності трьох ампліфікованих фрагментів сегмента А українського ізолята IPNV «Карпати» (150 п.н. для гена NS та 175 і 480 п.н. для N- и С-кінцевих ділянок гена VP2 відповідно) були аналізовані в автоматичному ДНК-секвенаторі Genetic Analyser 3130.

2.2.8 Вивчення кола неспецифічних хозіїв IPNV. Для експериментального інфікування струмкової форелі (*Salmo trutta*), полосатого даніо (*Danio rerio*), прісноводного молюска беззубки (*Anodonta cygnea*) та широкопалого рака (*Astacus astacus*) використовували культуральну рідину інфікованої клітинної лінії RTG-2. Перед інфікуванням інокулят фільтрували через шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм (Sarstedt, Німеччина) для відокремлення клітинних уламків та бактерій. З інокуляту робили 10-ти-кратні розведення для досягнення інфекційного титру вірусу  $10^{3,0}$  ІД<sub>50</sub>/мл<sup>-1</sup> [116]. Для ін'єкції використовували 0,2 мл вірусомісного матеріалу. Контрольну групу тварин інокулювали стерильним поживним середовищем. Кількість особин для інфікування становила двадцять екземплярів: п'ятнадцять дослідних та п'ять контрольних. Раки та інші водні тварини утримувались по п'ять особин на акваріум. В акваріумі містилось 40 л води та аератор для підтримки кисневого режиму. Тривалість дослідження становила 35 днів. Кожні 7 днів з трьох дослідних раків прижиттєво відбирали зразки гемолімфи для ідентифікації вірусу та визначення його інфекційного титру.

Для ідентифікації вірусу упродовж досліду використовували метод зворотної 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. Послідовності праймерів були такими:

WB1 5'-CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC-3',

WB2 5'-CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG-3',

PrA1 5'-GAGATCCATTATGCTTCCAGA-3',

PrA2 5'-GACAGGATCATCTTGGCATAGT-3'.

Пару олігонуклеотидів WB використовували для ідентифікації вірусу в організмі тварин, оскільки ці праймери характеризуються високою чутливістю [117].

#### 2.2.9. Визначення активності аспаратамінотрансферази (AsAT).

При роботі *in vitro* з вірусом інфекційного панкреатичного некрозу використовували культури клітин RTG2 (trout rainbow gonad tissue) – культура отримана з тканини гонад райдужної форелі, культивується при температурі 4-24°C. Ця культура перевивних клітин риб є високочутливою до інфікування IPNV. Клітини культивували на поживному середовищі MEM з 10% інактивованою ембріональною телячою сироваткою (ЕТС) з додаванням антибіотика гентаміцину (80 мкг/см<sup>3</sup>). Клітини вирощували у вигляді моношарових культур в пластикових флаконах при температурі 22°C з інтервалом субкультивування 6-7 днів. Перед введенням вірусу поживне середовище зливали, а моношар клітин промивали розчином Хенкса для видалення залишків сироватки. Інкубацію з вірусом проводили протягом двох годин при кімнатній температурі. Потім вірус зливали, а клітини двічі промивали розчином Хенкса та додавали поживне середовище, що містило 2% ЕТС.

Проводили щоденну перевірку стану дослідних і контрольних флаконів з метою виявлення наявності чи відсутності цитопатичної дії (ЦПД) IPNV на клітини. Стан культури клітин вивчали під мікроскопом за морфологічними ознаками. Активність АсАТ визначали загальноприйнятим колориметричним методом Райтмана і Френкеля [118].

2.2.10 Визначення активності катепсину В. Для досліджень використовували цьоголіток райдужної форелі. Досліди зі штучного інфікування риб проводились в лабораторних умовах у ємностях об'ємом 40 дм<sup>3</sup> при температурі води 9°C. Зараження IPNV проводили методом внутрішньочеревної ін'єкції. За джерело вірусу використовували вірусомісну культуральну рідину, інфіковані культури клітин RTG-2, з ознаками яскраво вираженого ЦПД (90% ураження моношару). Вірусомісну культуральну рідину попередньо очищали від зруйнованих клітин і вводили риbam в дозі 0,5 мл. Щоденно проводили реєстрацію поведінки риб, а при розвитку захворювання аналізували клінічні, патологоанатомічні зміни і добову смертність. Для біохімічних аналізів використовували 10%-ний гомогенат печінки. Відбір матеріалу проводили в три етапи: на 3-тій, 12-тій і 22-ий день після інфікування вірусом. Активність катепсину В визначали згідно з методом Шатернікова [119] і виражали в нмолях п-нітроаніліну (п-НА), відщепленого від БАПНА за хвилину інкубації при 37°C.

Отримані результати статистично обробляли за допомогою комп'ютерних програм «Statistica» для Windows.

## РОЗДІЛ 3. БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ВІРУСУ ГЕРПЕСА КОРОПА ТРЕТЬОГО ТИПУ (СУНВ-3)

### 3.1. Клінічні ознаки інфікованих коропів.

Інфіковані СуНВ-3 коропи кої при візуальному обстеженні мали виснажений вигляд, на шкірі у них були наявні яскраво виражені білі плями. Очі у заражених риб були запалі, риби інтенсивно виділяли у воду слиз. У хворих коропів був виявлений інтенсивний некроз зябер (рис. 3.1). На розтині у них виявився нефрит та інші патологічні ознаки, обумовлені вторинними бактеріальними інфекціями.



Рис. 3.1. Зябра коропа кої (*Cyprinus carpio koï*), уражені СуНВ-3

З метою виявлення СуНВ-3 в рибницьких господарствах України спільно з Південною лабораторією ветеринарної медицини України в 2011-2012 рр. за допомогою розробленого нами методу ПЛР були проведені моніторингові дослідження коропових риб у рибних господарства півдня України [120]. Як відомо, короп (*C. carpio carpio*) є основним об'єктом товарного рибництва в Україні. Тому контроль за поширенням вірусу герпесу кої, який спричиняє гостру хворобу коропа і викликає 90%-ну смертність риб, має важливе практичне значення. Нами було проведено обстеження 11-ти риборозплідників (племінних заводів, репродукторів), а саме ВАТ «Кримрибокомбінат», ДУ «Кримський риборозплідник», ВАТ

«Донрибокомбінат», ВАТ «Запорізький рибокомбінат», ВАТ «Миколаївське сільськогосподарське рибоводне підприємство», Аграрно-рибогосподарський кооператив «Придунайська Нива», рибоаграрний багатопрофільний кооператив «Новонекрасовський», ТОВ «Одесарибогосп», Виробничий кооператив «Херсонські рибалки», ВАТ «Херсонрибогосп», ТОВ «Гемма ЛТД». В кожному господарстві клінічно обстежено 100-200 екземплярів риб; патологоанатомічно обстежено 25-30 екземплярів однорічок, рідше дворічок коропа. Супернатанти з 27 збірних проб (в кожній пробі ділянки печінки, нирки, селезінка, зябри від 5-ти риб в фосфатно-сольовому буфері) протестовані методами ПЛР. СуHV-3 ідентифікували з використанням олігонуклеотидних праймерів, специфічних для гену тимідинкінази. Результати досліджень показали, що клінічні ознаки гострого перебігу віспи коропа не виявлені ні в одному з досліджуваних риборозплідників. Патологоанатомічні ознаки, що нагадують хронічний перебіг весняної віремії коропа (SVC) (здуття черевця, блідість зябер, кров'янистий ексудат в порожнині тіла та ін.) були виявлені в Миколаївській, Одеській та деяких інших областях. Всі 27 проб дали негативні результати щодо СуHV-3. Таким чином, вперше з використанням молекулярно-генетичних методів виконано вірусологічне інспектування коропових риборозплідників південних областей України. Його результати вказали на сприятливий епізоотичний статус цих господарств стосовно СуHV-3.

### **3.2. Електронна мікроскопія нирок хворих коропів**

При електронно-мікроскопічних дослідженнях в ядрах клітин нирок хворих коропів спостерігалось ущільнення хроматинового матеріалу. На ранніх етапах герпесвірусної інфекції в цитоплазмі інфікованих клітин спостерігались як зрілі, так і не зрілі віріони СуHV-3 (рис.3.2).

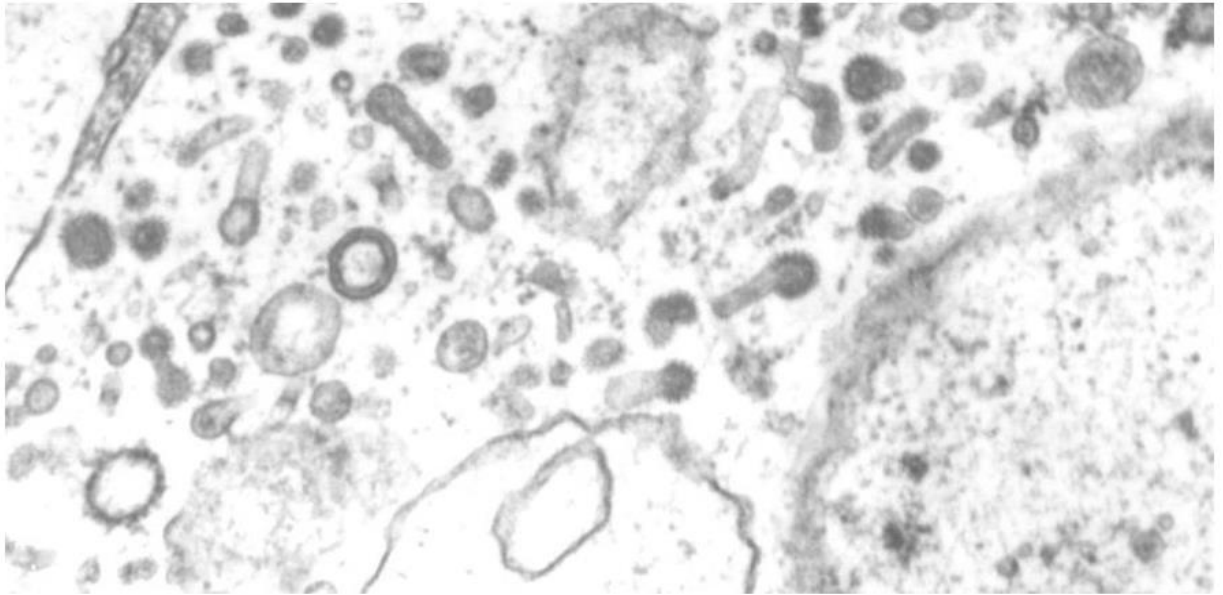


Рис.3.2. Етипи формування віріонів СуНV-3 в клітинах нирок інфікованого коропа кої (*Cyprinus carpio koi*).

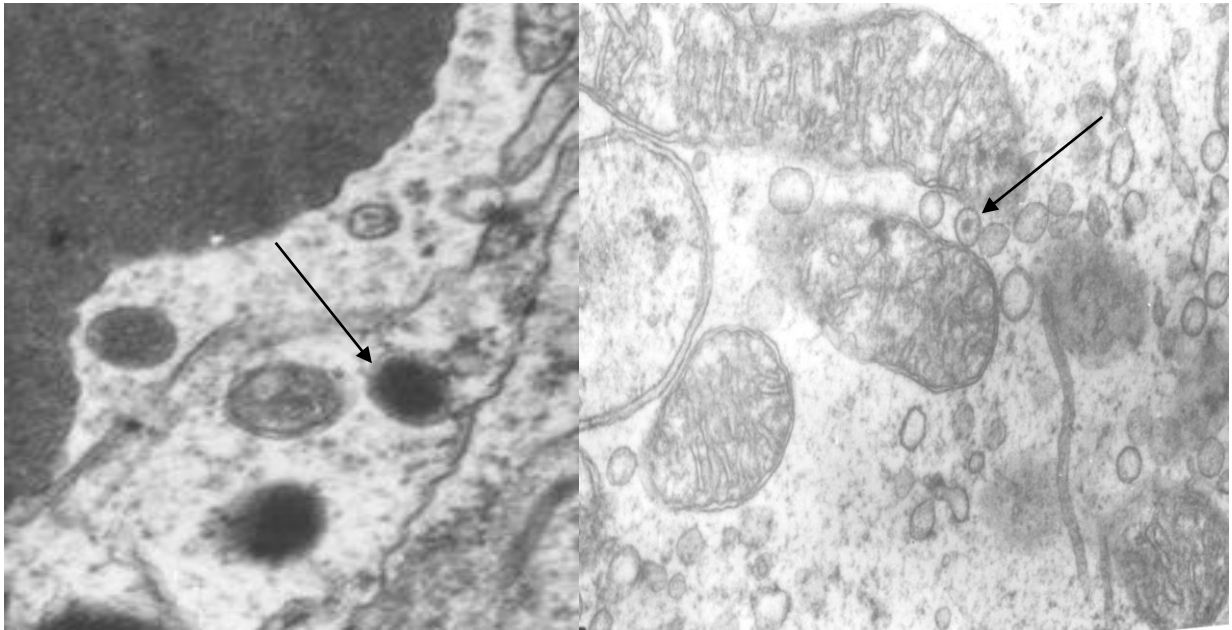
В перинуклеарній зоні виявлені віріони діаметром 120 нм. Здебільшого вірусні частки були розташовані між внутрішнім та зовнішнім листками ядерної мембрани (рис. 3.3А).

В цитоплазмі уражених клітин нирок коропа, в яку із ядра проникають нуклеокапсиди, були розширені каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулума і спостерігались вірусні частинки, загорнуті в мембрани.

Мітохондрії уражених клітин мали видовжену форму (рис. 3.3Б), багато мітохондріальних крист були зруйновані.

Для вірусів герпесу встановлено, що реплікація вірусної ДНК відбувається в ядрі, після чого вона вмонтовується у вірусний у капсид і залишає ядро шляхом вип'ячування через внутрішню ядерну мембрану. При цьому віріони розташовуються у перинуклеарній зоні. Після цього первинна оболонка вірусу зливається з зовнішнім листком ядерної мембрани і віріони опиняються в цитоплазмі [121]. На наступному етапі вони одягають на себе ще одну оболонку, яка походить із везикул Гольджі.

Отримані нами результати [122] свідчать про те, що репродукція СуНV-3 відбувається за сценарієм, схожим для всіх вірусів герпесу. За даними багатьох дослідників ДНК СуНV-3 за допомогою ПЛР можна виявляти в нирках та в крові інфікованих коропів уже через один день після інфікування.



А

Б

Рис. 3.3. Ультратонкий зріз нирок коропа кої (*C. carpio koi*), враженого СуНВ-3, де А – ущільнення хроматинового матеріалу в ядрі. В перинуклеарній зоні клітини розташовані вірусні частки (стрілки). Б – вірусні частки в цитоплазмі інфікованих клітин. Діаметр віріонів 120 нм.

Через три дні після інфікування кількість вірусної ДНК в нирках починає зростати [121]. З часом вірусна ДНК з'являється в зябрах, печінці, кишківнику та у шкірі. В тканинах головного мозку вона виявляється не завжди.

Як свідчать дані літератури, даний вірус вже через 2 дні після зараження коропів призводить до нефриту, який може тривати до десяти діб. В інфікованій рибі вражаються зябра, 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.

При електронномікроскопічному дослідженні очищених віріонів СуНВ-3 були виявлені вірусні частки такого ж діаметру, що й на ультратонких зрізах уражених клітин. Ці препарати були використані нами в якості контролю при адаптації методу ПЛР для діагностики СуНВ-3.

### 3.3. Конструювання тест-системи для діагностики вірусу герпеса коропа третього типу (CyHV-3)

Відомо, що своєчасне виявлення симптомів у хворої риби та проведення експрес-діагностики запобігають епізоотіям та масовій смертності об'єктів аквакультури. На сьогоднішній день ПЛР є самим точним та чутливим методом діагностики вірусних інфекцій. Швидке розповсюдження в останні роки CyHV-3 по всьому світу обумовлене тим, що декоративний короп має широкий попит серед акваріумістів і є предметом інтенсивної торгівлі. Незважаючи на те, що фірмою KoVax Ltd (Ізраїль) розроблена вакцина для профілактики CyHV-3 [123], він продовжує поширюватись по всьому світі. В останні роки цей вірус виявлений у сусідніх державах – Польщі, Румунії та Чехії [124,125], тому він являє собою реальну загрозу для рибницьких господарств нашої країни.

Як показали результати досліджень [126], обрані нами пари олігонуклеотидних праймерів, специфічних до гену тимідинкінази CyHV-3, ампліфікували фрагмент ДНК вірусу розміром близько 400 пар нуклеотидів. За допомогою ПЛР було ідентифіковано вірус в зразках зябер та нирок інфікованого коропа (рис. 3.4). Для ідентифікації вірусу методом ПЛР використовували олігонуклеотидні праймери, специфічні до ділянки гену тимідинкінази CyHV3. Послідовності олігонуклеотидів були такими:

TKf 5'–GGGTTACCTGTACGAG–3'

та TKr 5'–CACCCAGTAGATTATGC–3'.

Для визначення специфічності праймерів та їхніх фізичних властивостей використовували програмне забезпечення VectorNTI10, PrimerPremier5 та онлайн-сервіс BLAST. Ампліфікація ділянки гену тимідинкінази CyHV-3 включала один цикл попередньої денатурації ДНК при 94°C упродовж 5 хвилин, 40 циклів денатурації при 95°C (1 хвилина), віджигу праймерів при 55°C (1 хвилина), синтезу при 72°C (1 хвилина) та додаткового циклу синтезу у кінці реакції при 72°C (10 хвилин). Після ампліфікації продукти реакції аналізували в 2% агарозному гелі. По закінченні електрофорезу гель фарбували бромистим етидієм та спостерігали результати під ультрафіолетовим транслюмінатором.

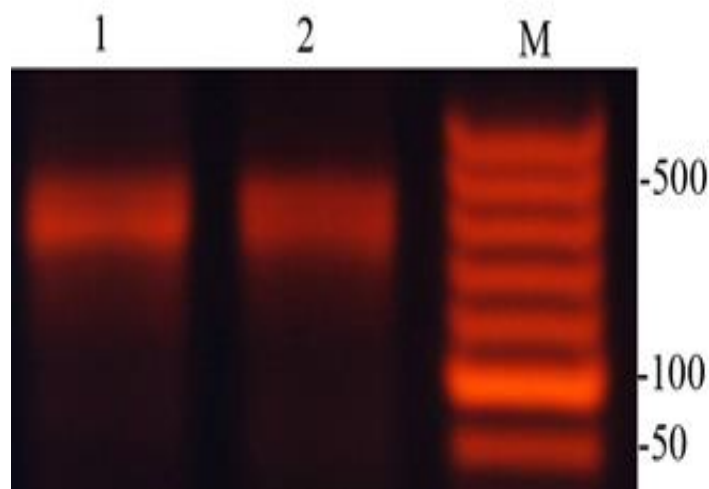


Рис. 3.4. Електрофореграма фрагментів ДНК CyHV-3, ампліфікованих за допомогою праймерів, специфічних до гену тимідинкінази: ДНК виділена із зябер (1) та нирок (2) інфікованих коропів; М –ДНК-маркер

Тому обрані нами олігонуклеотидні праймери можуть бути використанні для експрес-діагностики CyHV-3 в рибних господарствах та річках України. Профілактична вакцинація здорової риби дозволить уникнути значних економічних втрат у рибних господарствах.

### 3.4 Нові хазяї CyHV-3.

В 2013 р. серед акваріумних риб Київського зоопарку спостерігався спалах інфекції, що супроводжувався масовою смертністю, яка сягала 100%. 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 [114], зябра хворих риб були гіперемовані і мали рожевий колір. У мішкожаберного сома на розтині спостерігали порушення кольору та структури печінки, набряк нирок та переповнення жовчного міхура (рис. 3.5). Такі ж патологічні зміни спостерігались і в коропа двокольорового лабео (3.6).



Рис. 3.5. Мішкозяберний сом (*Heteropneustes fossilis*), інфікований СуНВ-3



Рис.3.6. Двокольоровий короп лабео (*Labeo bicolor*), інфікований СуНВ-3

Під час спалаху вірусної інфекції у Київському зоологічному парку загальнодержавного значення за допомогою розробленої нами ПЛР СуНВ-3 був виявлений як у мішкожаберного сома так і у двокольорового лабео.

Як показали результати наших досліджень [114], 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. 3.7). ПЛР з праймерами до вірусу весняної віремії коропа та вірусу геморагічної септицемії форелі були негативними.

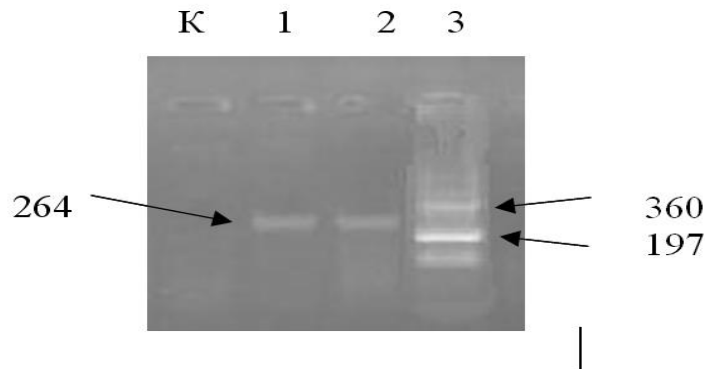


Рис. 3.7. Електрофорез результатів ПЛР з праймерами для визначення СуНВ-3, де К – контроль (усі компоненти реакції, окрім ДНК); 1 – зразки ДНК, виділеної від двокольорового коропа лабео (*Labeo bicolor*); 2 – зразки ДНК, виділеної від мішкозяберного сомика (*Heteropneustes fossilis*); 3 – ДНК-маркер.

За даними багатьох дослідників ДНК СуНВ-3 за допомогою ПЛР можна виявляти в нирках та в крові інфікованих коропів уже через один день після інфікування. Через три дні після інфікування кількість вірусної ДНК в нирках починає зростати. З часом вірусна ДНК з'являється в зябрах, печінці, кишківнику та у шкірі. В тканинах головного мозку вона виявляється не завжди. До недавніх пір єдиним хазяїном вірусу герпеса коропа третього типу (СуНВ-3) вважався лише короп звичайний (*C. carpio carpio*) та його підвид, якого називають короп кої (*C. carpio koi*) [53]. 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 [54].

Проте, нещодавно наявність СуНВ-3 була підтверджена за допомогою ПЛР у інших коропоподібних риб, які вирощувались в полікультурі разом з інфікованими коропами – у звичайного карася (*C. carassius*), білого амура

(*Stenopharyngodon idella*), строкатого товстолобика (*Aristichthys nobilis*), звичайного товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*), линя (*Tinca tinca*), риба (*Vimba vimba*) [66]. Більш того, виявилось, що СуHV-3 здатний інфікувати представників сомових (*Silurus glanis*) та осетрових риб, таких як російський (*Acipenser gueldenstaedtii*) та атлантичний (*Acipenser oxyrinchus*) осетри та стерлядь (*Acipenser ruthenus*) [67]. Японськими дослідниками ДНК СуHV-3 виявлена у коловерток [101].

Про шляхи розповсюдження СуHV-3 в природі інформації мало. 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 може проникати в організм риб через шкіру. Істотну роль в перенесенні вірусу виконують водоплавні птахи, зокрема чайки. Збереження інфекційності СуHV-3 у воді може сягати кілька днів [124]. Вірус впродовж значного часу здатний зберігатись в донних осадах і накопичуватись в планктоні, зокрема в коловертках [101].

Оскільки за допомогою ПЛР ДНК СуHV-3 виявляється у коропів без клінічних ознак хвороби, які вирощувались при температурі 13°C, то такі риби також можуть бути джерелом інфекції у рибницьких господарствах. Існує реальна загроза розповсюдження цього вірусу у рибницьких господарствах країни. Один із запропонованих профілактичних заходів проти захворюваності риб від СуHV-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 СуHV-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 СуHV-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 [58]. 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.

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

### ***Висновки***

За допомогою розробленого нами методу ПЛР під час спалаху вірусної інфекції у Київському зоопарку вірус герпеса третього типу вперше виявлено у мішкожаберного сома та у коропа двокольорового лабео. Довжина ампліфікованих ПЛР продуктів, специфічних до ділянки гену тимідинкінази, як і передбачалось, становила 264 пари нуклеотидів. Обстеження рибницьких господарств півдня України показало відсутність даної інфекції в аквакультури.

Матеріали у поданому розділі були оприлюднені автором у таких публікаціях:

1. Бучацький Л.П. Застосування ПЛР для діагностики вірусу герпесу коропа кої / Л.П. Бучацький, Н.М. Матвієнко, М.І. Майстренко, І.П. Гаврилова, В. Панасенко // Ветеринарна медицина України. 2011. № 1. С. 38–39.
2. Гаврилова І.П., Майстренко М.І., Римар В.І., Рудь Ю.П., Бучацький Л.П. /Нові хазяї вірусу герпесу коропа третього типу (СуHV-3). // Наукові записки Тернопільського Ун-ту. Серія Біологія. 2014. №1. С. 16–20.
3. Мальцев В.Н., Рудь Ю.П., Майстренко М.І. / Результати вірусологічного інспектування карпових рибопитомників южних областей України. // «Біоресурси і віруси». – Київ, 2013. – С. 51.
4. Майстренко М.І., Н.М. Матвієнко, Л.П. Бучацький / Електронна мікроскопія клітин нирок коропа (*Cyprinus carpio*), уражених СуHV-3 // Рибогосподарська наука України. 2012. №1 (19). С. 97–100.

5. Polymerase chain reaction for identification of Cyprinid Herpesviruses in Ukraine / Yu. Rud, M. Maistrenko, L. Buchatsky // *Biotechnologia acta*. 2018. Vol. 11. №1. P. 58–63.

6. Бучацький Л.П., Матвієнко Н.М., Майстренко М.І. Штам герпесвірусу Кої (KHV) ІМВ V-4 для отримання вакцини проти вірусу герпеса Кої : патент України на корисну модель № 79945; заявл. 26.10.2012; опубл. 13.05.2013, Бюл. № 9.

## РОЗДІЛ 4. БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ IPNV (штам «Карпати»)

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 та горизонтальний, переносники (вектори) – не встановлені [100, 127].

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 захворювання під назвою інфекційний панкреатичний некроз [101]. Українські рибогосподарські підприємства ведуть активну торгівлю з форелевими господарствами східної Європи. IPNV був ідентифікований у республіках Польщі та Чехії, а отже існує велика вірогідність того, що вірус був завезений із заплідненою ікрою саме з господарств Східної Європи [124,125].

*4.1. Ізоляція вірусу та його накопичення.* У 2011 році вірус був виявлений нами на території України у райдужної форелі *O. mykiss*, виловленої у річці Серет, Чернівецької області та названий IPNV «Карпати» [115].

Накопичення вірусу проводили на культурах перевивних клітин риб. Культура клітин – це найбільш досконала з лабораторних модельних систем для культивування вірусів. В вірусологічній практиці культуру клітин найчастіше використовують для виділення вірусу з патологічного матеріалу, підтримання вірусних штамів в лабораторії та накопичення вірусу для його подальшої очистки та розробки діагностичних систем. За даними Міжнародного Епізоотичного Бюро (OIE) IPNV здатний культивуватись в культурах клітин CHSE-214 та RTG-2, виділених з представників лососевих: чавичі (*O. tshawytscha*) та райдужної форелі відповідно [103]. Але оскільки вірус характеризується високою контагіозністю, то не виключно, 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, на культурах клітин риб.

При роботі *in vitro* з вірусом інфекційного панкреатичного некрозу ізоляту «Карпати» використовували культури клітин RTG-2 (Rainbow Trout Gonad Tissue), культура отримана з тканини гонад райдужної форелі *O. mykiss* та має фібробластоподібну форму; FHM (Fat Headminnow), отримана з епітелію анального отвору пічкура *Gobio sp.*; та EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) – отримана з клітин папіломи коропа *Cyprinus carpio*, епітеліальна культура, що, має широкий спектр чутливості до вірусів риб.

Культури клітин оцінювали кожні 24 години [128]. 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 EPC 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 плавала в середовищі, в результаті замість суцільного клітинного моношару залишались поодинокі клітинні острівки (рис. 4.1). 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. 4.2).

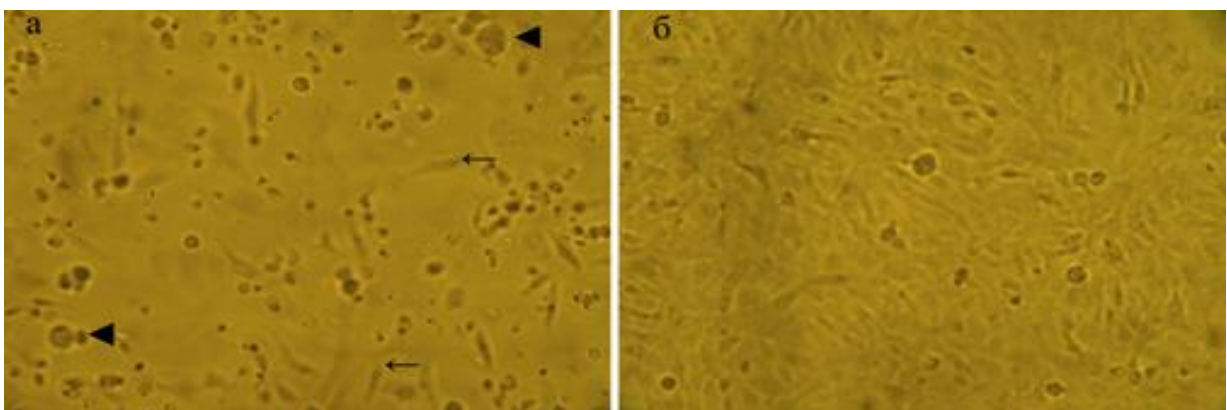


Рис. 4.1. Репродукція вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати») в культурі клітин RTG-2 (світлова мікроскопія ( $\times 200$ )), де а – абсолютна руйнація моношару клітин на 7 д.п.і.; б – контрольний варіант; ◀ – великі округлі клітини; ← – поодинокі прикріплені клітини.

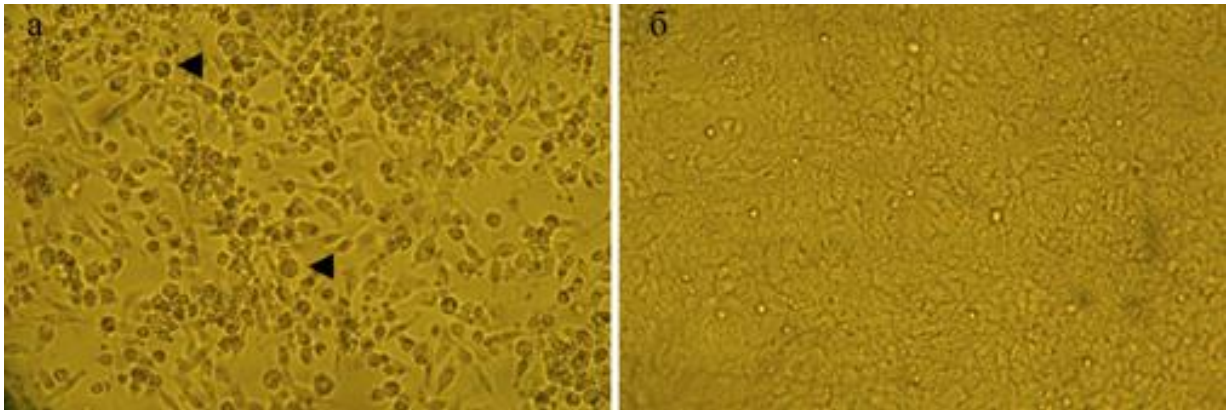


Рис. 4.2. Репродукція вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати») в культурі клітин FHM (світлова мікроскопія ( $\times 200$ )), де а – цитопатична дія вірусу на 5 д.п.і. і часткова руйнацію клітинного моношару; б – контрольний варіант; ◀ – великі округлі клітини.

ЦПД на культурі клітин EPC відмічалась з 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 утворювали невеликі ущільнені клітинні скупчення (рис. 4.3). На 9-10 д.п.і. в флаконах з EPC спостерігали характерну картину ЦПД вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, а повна руйнація моношару була відмічена на 12 д.п.і.

Інфекційний титр IPNV «Карпати» в досліджуваних культурах клітин був неоднаковий. Так, найнижчий інфекційний титр спостерігався в культурі клітин EPC і становив  $10^{5.5-5.8}$  ІД<sub>50</sub>/мл. Можливо такий інфекційний титр є наслідком повільної репродукції IPNV «Карпати» в клітинах EPC. В культурі клітин FHM інфекційний титр вірусу становив  $10^{6.2-6.5}$  ІД<sub>50</sub>/мл і це фактично на порядок вище ніж в культурі EPC. Найвищий інфекційний титр IPNV «Карпати» спостерігався в культурі RTG-2 і становив  $10^{6.9-7.4}$  ІД<sub>50</sub>/мл. Культура RTG-2 є однією з спеціалізованих клітинних ліній під вірус інфекційного панкреатичного некрозу

[103]. А з огляду на високу контагіозність досліджуваного вірусу такий високий інфекційний титр цілком закономірний. Результати інфікування культур клітин RTG-2, FHM та EPC представлено у таблиці 4.1.

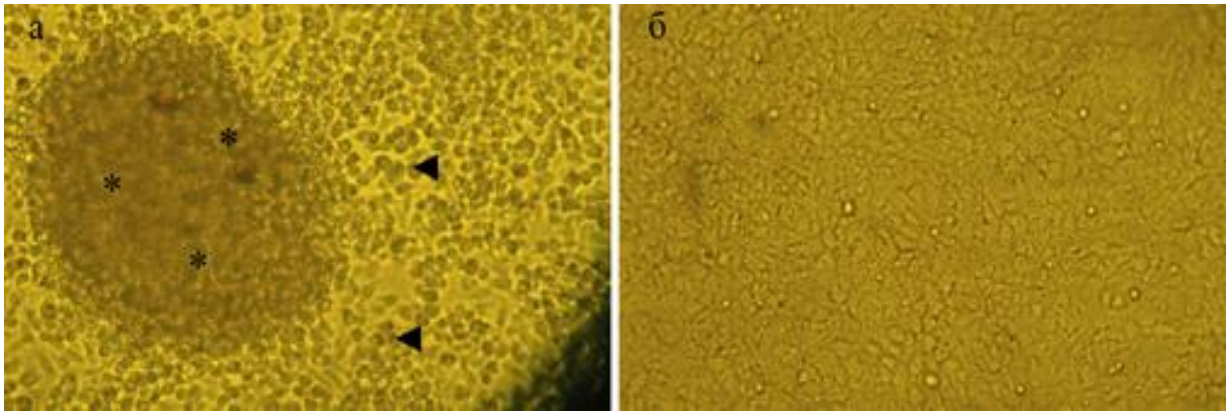


Рис. 4.3. Репродукція вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати») в культурі клітин EPC (світлова мікроскопія ( $\times 200$ )), де а – цитопатична дія вірусу на 9 д.п.і.; б – контрольний варіант; ◄ – великі округлі клітини; \* - ущільнені клітинні скупчення.

Загалом спостерігалась однакові морфологічні зміни та ЦПД вірусу на клітини для всіх досліджуваних культур [129]. Але слід відмітити, що для EPC дегенеративні зміни моношару клітин та настання ЦПД відбувалось з дводенною затримкою. В контрольних флаконах з неінфікованими IPNV культурами клітин не спостерігали морфологічних змін та ЦПД.

Таблиця 4.1

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

Назва культури клітин	Ознаки ЦПД, дні після інфікування				Інфекційний титр, $lg ID_{50}/мл$
	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
EPC	4	5	6-7	10	5,5-5,8

Таким чином, усі три досліджувані культури клітин виявились чутливими до вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізолят «Карпати». Культури клітин RTG-2, FHM та EPC можуть бути використанні 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. 4.4). Віріони українського ізоляту вірусу інфекційного панкреатичного некрозу «Карпати» мали гексагональну форму, їхній діаметр складав  $70 \pm 5$  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.

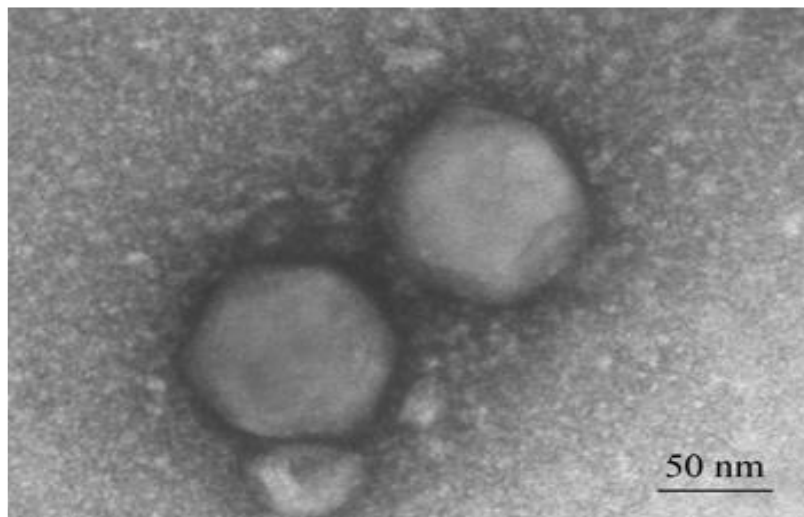


Рис. 4.4. Вірус інфекційного панкреатичного некрозу ізолят «Карпати». Діаметр віріонів становить  $70 \pm 5$  нм.

Віріони IPNV, отримані в культурі клітин, легше піддаються очистці, ніж у випадку виділення їх з інфікованих риб. IPNV культивується в багатьох культурах клітин риб [130]. Більш того, було показано, що вірус інфекційного панкреатичного некрозу проникає, але не реплікується в культурах клітин ссавців [131]. Висока вірулентність IPNV та його можливість реплікуватись в багатьох культурах клітин риб пов'язана з простою будовою віріонів та РНК геномом, що робить даний вірус невибагливим до внутрішньоклітинних систем біосинтезу макромолекул [132]. В 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 в країнах з добре розвинутим лососівництвом і цей факт, скоріше за все, пов'язаний з імпортом риби та її ікри. В таких умовах сучасної аквакультури необхідно провести моніторинг популяцій райдужної форелі, яка культивується в рибогосподарських підприємствах басейна річки Серет, де був виділений ізолят «Карпати», з метою підтвердження наявності або відсутності там IPNV. Для цього необхідно використовувати методи як культури клітин, так і методи молекулярної діагностики, наприклад полімеразну ланцюгову реакцію. Крім діагностики даного патогена, метод ПЛР додатково дозволить визначати генотип ізольованого штаму IPNV та його можливе походження.

Висновки:

1. Культури клітин RTG-2, FHM та EPC виявились чутливими до вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати»).
2. Культури клітин RTG-2, FHM та EPC можуть бути використанні для діагностики українського ізоляту (штам IPNV «Карпати»).
3. Для накопичення вірусу слід використовувати культуру RTG-2, в якій інфекційний титр вірусу був найвищим і становив  $10^{6,9-7,4}$  ІД<sub>50</sub>/мл.

#### 4.2. Ампліфікація та аналіз нуклеотидної послідовності генів VP2 та NS IPNV

Одним з основних молекулярних методів ідентифікації IPNV є ампліфікація РНК вірусу за допомогою зворотної транскрипції та ПЛР (ЗТ-ПЛР). Тому метою нашої роботи було підібрати олігонуклеотидні праймери, специфічні до українського ізоляту IPNV та оптимізувати параметри постановки реакції. До того ж, оскільки в Європі поширеними є одразу декілька штамів IPNV, з метою встановлення приналежності українського ізоляту ми проаналізували нуклеотидні послідовності ампліфікованих фрагментів геному вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, виділеного в Україні.

Проаналізувавши наукові дані, було встановлено, що найефективнішими ділянками РНК вірусу IPNV для підбору олігонуклеотидних праймерів і специфічної ампліфікації є ділянки, що кодують структурний білок VP2 та неструктурний білок NS [115]. Але, оскільки у Європі поширеними є одразу декілька штамів цього вірусу (Ab, Sp, Te та He), які розрізняються за антигенними детермінантами структурних білків, і, відповідно, за нуклеотидними послідовностями РНК, які їх кодують, ми обрали за основу нуклеотидні послідовності неструктурного білка NS та консервативну ділянку структурного білка VP2, які є найменш варіабельними. Для ампліфікації цих фрагментів сегменту А РНК українського ізоляту IPNV ми використали модифіковані нами праймери IPN, PrD та WB, рекомендовані Blake et al. [133], та Williams et al. [134].

Як показали результати наших досліджень, обрані олігонуклеотидні праймери, специфічні до ділянок генів неструктурного білку NS та структурного білку VP2 IPNV, ампліфікували очікувані за розміром фрагменти кДНК. Розмір ампліконів становив для праймерів IPN 620 пар нуклеотидів (п.н.), для WB близько 200 п.н., а фрагмент довжиною 175 п.н. був характерний для праймерів PrD (рис. 4.5).

За допомогою градієнтного ампліфікатора була проведена оптимізація постановки ПЛР. Для відпалу праймерів використовували діапазон температур

від 53 до 64°C. Було показано, що температура 60°C є оптимальною для всіх досліджуваних пар праймерів. Також шляхом 10-кратних розведень препаратів кДНК перевіряли ефективність досліджуваних пар праймерів. Як показали результати дослідження, найбільшу працездатність демонстрували праймери WB, які є універсальними для всіх генотипів IPNV та інших водних бірнавірусів. Аналогічна ефективність спостерігалась для праймерів PrD, але, як зазначають автори цих олігонуклеотидів, вони не здатні діагностувати деякі штами IPNV [133]. Найнижча ефективність була характерна для праймерів IPN, реакція проходила тільки в зразках з високою концентрацією вірусної РНК. На специфічність праймерів IPN може впливати той факт, що реверс-праймер комплементарний варіабельній N-кінцевій частині білка VP2.

#### *4.3. Філогенетичний аналіз*

Нуклеотидні послідовності трьох ампліфікованих фрагментів сегмента А українського ізоляту IPNV «Карпати» (150 п.н. для гена NS та 175 і 480 п.н. для N- і С-кінцевих ділянок гена VP2 відповідно) були аналізовані в автоматичному ДНК-секвенаторі Genetic Analyser 3130. Як показали результати наших досліджень, український ізолят IPNV належить до штаму Sp, вперше виділеному в Данії [135].

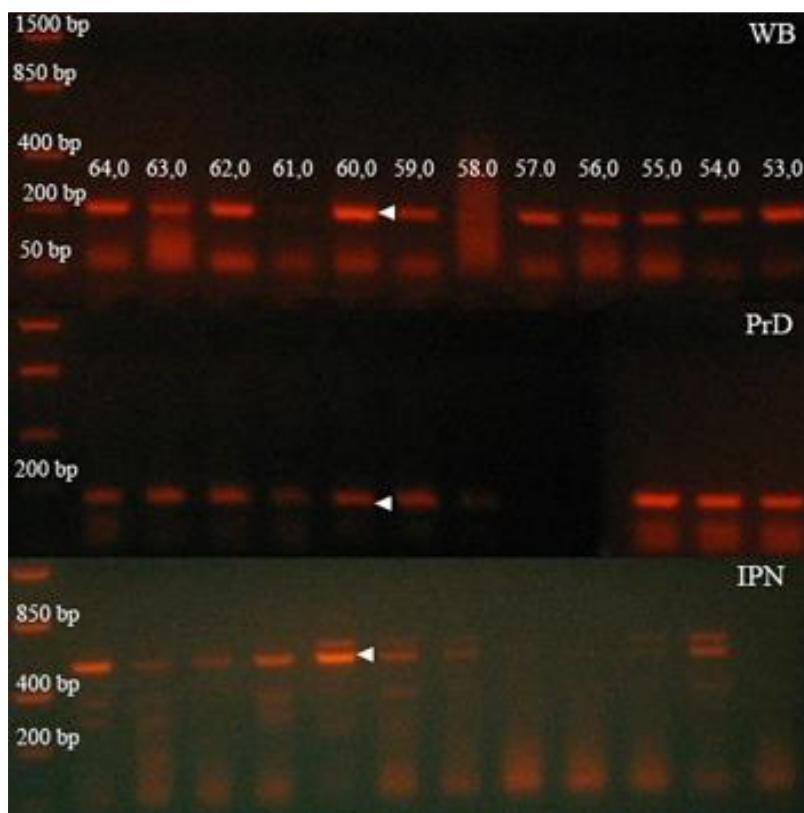
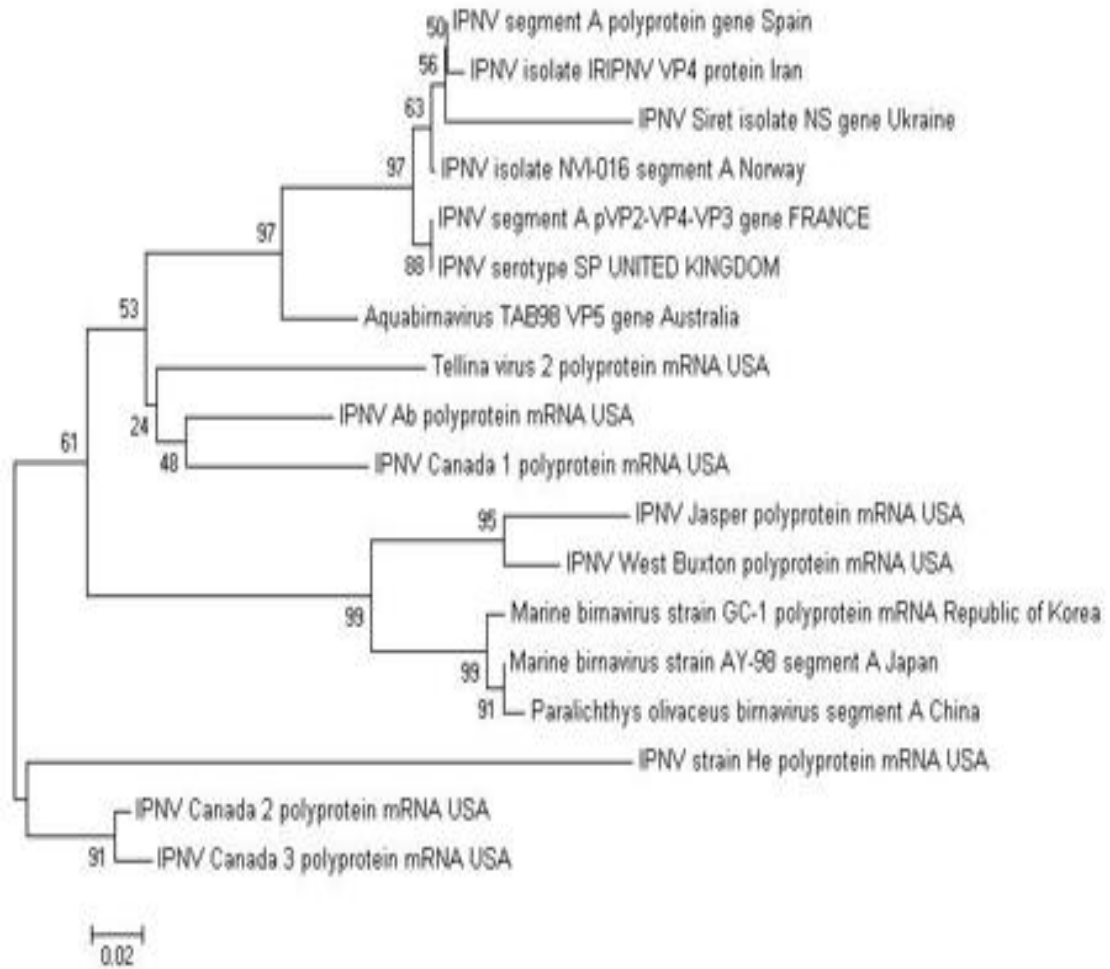
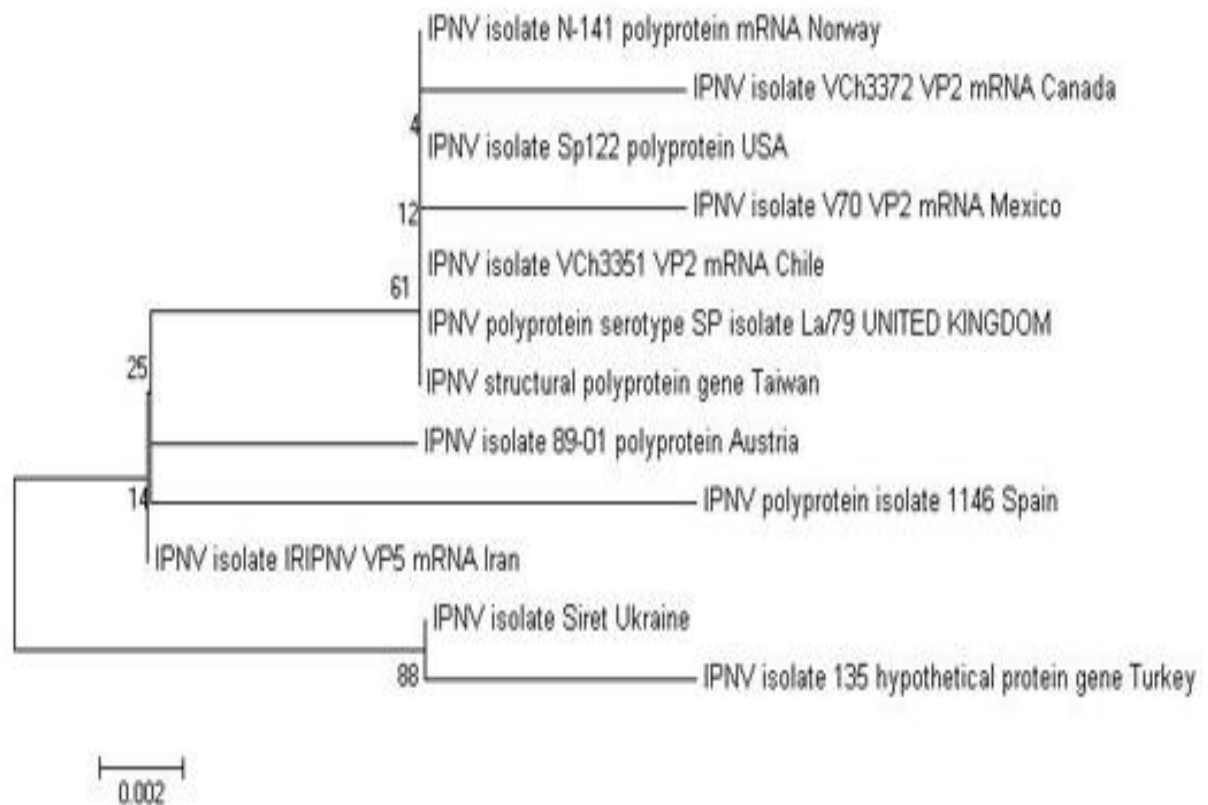


Рис. 4.5. Ампліфікація фрагментів генів VP2 (праймери IPN та WB) та NS (праймери PrD) українського ізоляту (штам «Карпати») вірусу інфекційного панкреатичного некрозу. Найкращий результат показано ◀; зліва нанесено ДНК маркер FastRuler™ (Thermo Scientific); діапазон температур відпалу праймерів складав 53-64°C.

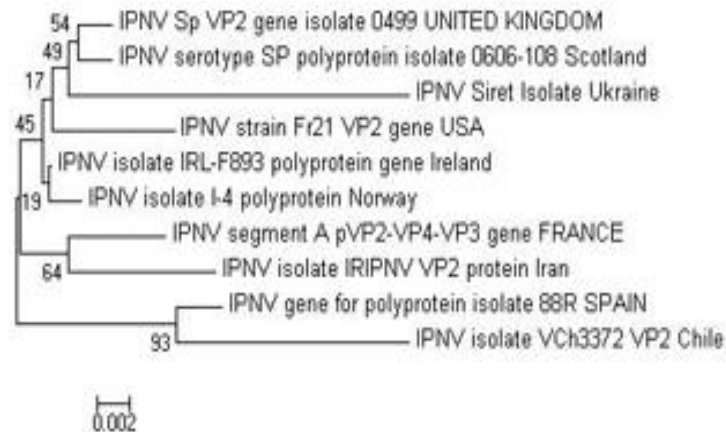
Порівняння послідовності нуклеотидів ізоляту «Карпати» з нуклеотидними послідовностями з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (NCBI) показало, що ампліфіковані фрагменти кДНК на 95-99% ідентичні послідовностям генів NS и VP2 штаму Sp. Серед ізолятів штаму Sp найбільш спорідненими до українського ізоляту IPNV виявились віруси, виділені у Великобританії, Норвегії, Франції, Туреччині та Ірані (рис. 4.6).



A



## Б



## В

Рис. 4.6. Філогенетичний аналіз гену NS (А) та N- (Б) і С-кінцевих (В) ділянок гену VP2 українського ізоляту IPNV «Карпати». Древа будувались за допомогою алгоритму Neighbor-joining у програмі MEGA версії 5.2

На рисунку 4.6А показано співвідношення всіх серотипів IPNV та приналежність українського ізоляту до штаму Sp. Рисунки 4.6Б та 4.6В демонструють взаємозв'язок ізолятів штаму Sp.

Таким чином, ізолят, який був виділений з басейну річки Серет в Чернівецькій області Західної України належить до штаму Sp. На жаль в банку геномів NCBI ми не знайшли нуклеотидні послідовності ізолятів IPNV, виділених в країнах Східної Європи. Відповідно ми не змогли порівняти їх з нуклеотидними послідовностями українського ізоляту вірусу інфекційного панкреатичного некрозу «Карпати».

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 провести моніторинг популяцій райдужної форелі, яка культивується в рибогосподарських підприємствах басейна річки Серет для того, щоб підтвердити наявність або відсутність там IPNV. Для цього необхідно використовувати методи

молекулярної діагностики, такі як ПЛР. Крім діагностики даного патогена, метод ПЛР додатково дозволить визначати генотип ізольованого штаму IPNV та його можливе походження.

Таким чином, підібрані олігонуклеотидні праймери можуть бути використані для ідентифікації вірусу інфекційного панкреатичного некрозу в природних водоймах і форелевих господарствах України. Для експрес-діагностики українського ізоляту IPNV краще за все використовувати праймери WB. Проведення всеукраїнського моніторингу IPNV дозволить скласти цілісну картину розповсюдження цього вірусу в країні, а також ідентифікувати інші штами, які циркулюють у Європі.

#### *4.4. Вплив IPNV на активність аспартатамінотрансферази.*

Біологічні властивості IPNV, особливо його вплив на ферментативні процеси в інфікованих клітинах риб, вивчені недостатньо. Тому метою роботи було вивчення впливу цього вірусу на активність аспартатамінотрансферази (АСТ) в перещеплюваних клітинах риб. Відомо, що активність цього ферменту служить одним з показників ураження печінки як у людей, так і у тварин.

При роботі *in vitro* з вірусом інфекційного панкреатичного некрозу використовували культури клітин RTG2 (trout rainbow gonad tissue) – культура отримана з тканини гонад райдужної форелі, культивується при температурі 4-24°C. Ця культура перещеплюваних клітин риб є високочутливою до інфікування IPNV. Клітини культивували на живильному середовищі MEM з 10% інактивованої ембріональної телячої сироватки (ЕТС) з додаванням антибіотика гентаміцину (80 мкг/см<sup>3</sup>).

Клітини вирощували у вигляді моношарових культур в пластикових флаконах при температурі 22°C з інтервалом субкультивування 6-7 днів. Перед внесенням вірусу зливали живильне середовище, а моношар клітин промивали розчином Хенкса для видалення залишків сироватки. Інкубацію з вірусом проводили протягом двох годин при кімнатній температурі. Потім вірус зливали, а клітини двічі промивали розчином Хенкса і додавали поживне середовище, що містить 2% ЕТС. Проводили щоденну перевірку стану дослідних і контрольних

флаконів з метою виявлення наявності або відсутності цитопатичної дії (ЦПД) IPNV на клітини. Стан культури клітин вивчали під мікроскопом за морфологічними ознаками.

Активність АсАТ визначали загальноприйнятим колориметричним методом Райтмана і Френкеля [118]. Культури клітин RTG2 оцінювали кожні 24 години.

Вже на третій день після інфікування вірусом спостерігалися характерні зміни в моношарі. На п'ятий день після інфікування в дослідних флаконах спостерігалася класична цитопатична дія вірусу на культуру клітин: морфологічна зміна клітин (вакуолізація цитоплазми, деструкція мітохондрій, округлення клітин). Велика частина клітин відшаровувалася від поверхні флакона і вільно плавала в середовищі, в результаті цього процесу замість суцільного клітинного моношару залишалися лише поодинокі клітинні острівці. Флакони з культурою клітин, заражених IPNV, щодоби порівнювали з контрольними незараженими флаконами з однаковим пасажем культур. На сьомий день після інфікування активність АсАТ досягала 106,31 Од/л, тобто більш ніж в 11 разів в порівнянні з контролем (рис.4.7).

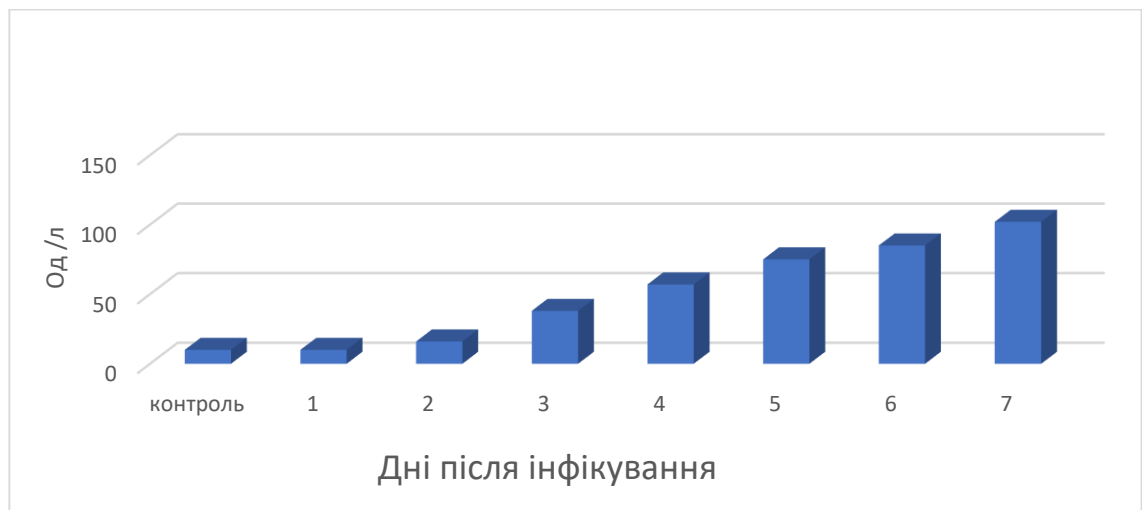


Рис. 4.7. Активність аспаратамінотрансферази в перещеплюваних клітинах форелі, інфікованих вірусом панкреотичного некрозу.

Активність цього ферменту в неінфікованих клітинах практично не змінювалася. Активність другого індикаторного для оцінки функціонального стану печінки ферменту, аланінамінотрансферази (АлАТ) в перещеплюваних клітинах риб була дуже низькою, що не дозволяло зробити висновки про її ролі в процесі репродукції IPNV.

Відомо, що АсАТ є представником класу трансаміназ і каталізує перенесення аміної групи з молекули глютамінової кислоти. Цей фермент зазнає значних змін при різних ураженнях печінки, в тому числі і при вірусних. Наприклад, при вірусних гепатитах активність АсАТ збільшується до 30 разів. У медицині визначення її активності кваліфікується як «печінковий тест». Печінка риб, як центральний орган метаболізму, характеризується високою інтенсивністю процесів обміну. Вона раніше інших органів реагує на дію зовнішніх і внутрішніх несприятливих факторів, що відбивається на її функціональному стані. Поряд з активними реакціями біосинтезу і катаболізму, необхідно також відзначити і постійно протікаючі в печінці активні процеси знешкодження і біоаккумуляції широкого ряду ксенобіотиків, в тому числі і вірусів [136].

Для оцінки фізіолого-біохімічного статусу риб і середовища їх проживання в якості індикаторів може бути використаний тест на активність амінотрансфераз. В цьому відношенні, за результатами проведених нами дослідів, найбільш інформативною є аспартатамінотрансфераза (АСТ). З огляду на простоту виконання аналізу визначення її активності може стати ефективним експрес-методом виявлення IPNV в форелевих господарствах.

#### *4.5. Вплив IPNV на активність катепсину*

Метою роботи було вивчити активність катепсину В в печінці цьоголіток райдужної форелі (*O. mykiss*), ураженої вірусом інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV, штам «Карпати»).

Проведені експериментальні дослідження показали [119], що IPNV сприяє активації катепсину В в гомогенатах печінки райдужної форелі, що призводить до розпаду білків в інфікованих клітинах. Деградація білків обумовлена

посиленням автолітичних процесів, до яких залучені лізосомальні протеїнази, однією з яких є катепсина В. Активація цього ферменту виникає в результаті пошкодження цілісності лізосомальної мембрани і зміни функцій тіолзалежних протеїназ.

Біохімічні аспекти патогенезу вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV), збудником якого є вірус роду *Aquabirnavirus* родини *Birnaviridae*, в інфікованих тканинах райдужної форелі практично не вивчені. Цей вірус вражає мальків і цьоголіток лососевих риб, і клінічні ознаки хвороби характеризуються значними змінами в печінці, селезінці та в інших паренхіматозних органах, а також швидким її розвитком і високою смертністю інфікованих риб. Наявні в науковій літературі дані свідчать про те, що у риб, як і у теплокровних тварин, розвиток багатьох захворювань супроводжується активацією протеолітичних процесів. Вони виникають внаслідок пошкодження внутрішньоклітинних мембран у тканинах інфікованих тварин та підвищення активності лізосомальних ферментів [137].

Актуальним є питання участі цистеїнових протеїназ в реалізації різних програм клітинної загибелі – апоптозу, некрозу, апонекрозу [138]. Припускають існування зв'язку між способом клітинної смерті і інтенсивністю лізосомальних пошкоджень, яке може призвести до обмеженого вивільнення лізосомальних ферментів у цитоплазму [139,140]. Вважають, що подібна лізосомальна пермеабілізація і частковий вихід протеолітичних ферментів у цитозоль є більш ранньою і превалюючою подією, а не частиною більш пізніх ефекторних стадій клітинної загибелі [137].

Таким чином, внаслідок дії вірусів можуть створюватися умови для часткового виходу катепсинів із лізосом з активацією подальшого розпаду білкових структур, що призводить до порушення численних метаболічних процесів у клітині [141, 142]. Враховуючи, що рН цитозольного середовища клітин наближене до нейтрального, а за дії IPNV відбувається його закиснення [143], то доцільно було визначити особливості активаційного каскаду катепсинів в цих умовах, а саме катепсину В (КФ 3.4.22.1), оскільки йому належить провідна

роль у різних моделях програмованої клітинної загибелі і він є найбільш стабільним ферментом при фізіологічних рН за дії різних чинників [144].

Враховуючи той факт, що в печінці постійно відбуваються активні процеси знешкодження та біоаккумуляції різноманітних ксенобіотиків, у тому числі і вірусної інфекції [136], а також процесів регенерації пошкоджених гепатоцитів, що також пов'язано з активацією біохімічних реакцій в лізосомах [143], метою роботи було вивчити активність катепсину В у печінці цьоголіток райдужної форелі, уражених вірусом інфекційного панкреатичного некрозу.

Для досліджень використовували цьоголіток райдужної форелі. Досліди зі штучного інфікування риб проводились в лабораторних умовах у ємностях об'ємом 40 дм<sup>3</sup> при температурі води 9°C. Зараження IPNV проводили методом внутрішньочеревної ін'єкції. За джерело вірусу використовували вірусомісну культуральну рідину, інфіковані культури клітин RTG-2, з ознаками яскраво вираженого ЦПД (90% ураження моношару). Вірусомісну культуральну рідину попередньо очищали від зруйнованих клітин і вводили риbam в дозі 0,5 мл. Щоденно проводили реєстрацію поведінки риб, а при розвитку захворювання аналізували клінічні, патологоанатомічні зміни і добову смертність. Для біохімічних аналізів використовували 10%-ний гомогенат печінки. Відбір матеріалу проводили в три етапи: на 3-тій, 12-тій і 22-ий день після інфікування вірусом. Активність катепсину В виражали в нмолях п-нітроаніліну (п-НА), відщепленого від БАПНА за хвилину інкубації при 37°C. Отримані результати статистично обробляли за допомогою комп'ютерної програми «Statistica» для Windows.

Проведені експериментальні дослідження показали, що вірус інфекційного панкреатичного некрозу сприяє активації катепсину В у печінці райдужної форелі за весь період дослідження (рис.4.8). Згідно з представленими результатами, активність ферменту змінюється залежно від періоду після інфікування. Так, рівень активності катепсину В у гепатоцитах риб на 3-тій день після інфекційного ураження IPNV зростав у 1,7 раз порівняно з контролем.

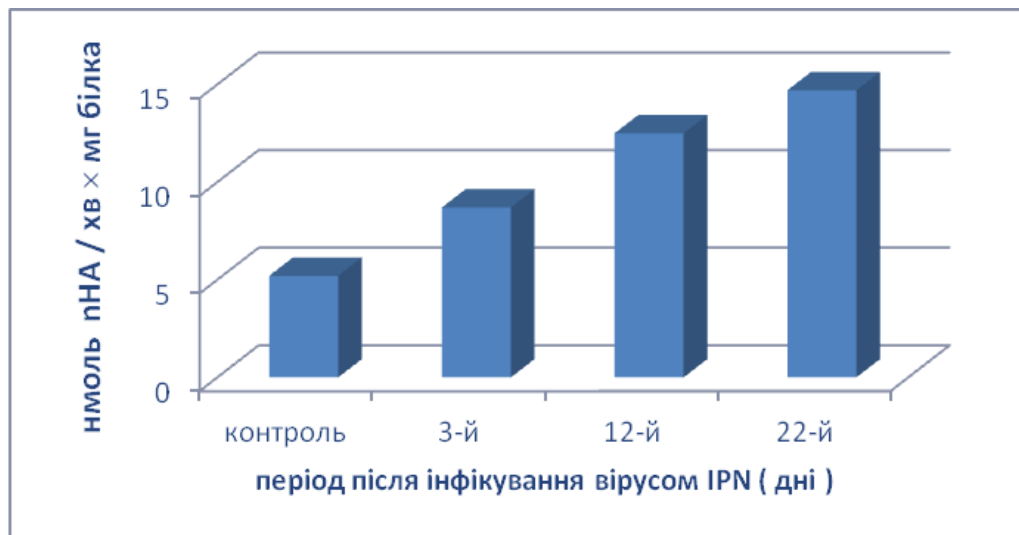


Рис. 4.8 Активність катепсину В у печінці радужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) ураженої вірусом інфекційного панкреатичного некрозу (достовірно по відношенню до контролю;  $P \leq 0,05$ )

На 12-тий день після ураження рівень активності ферменту підвищився у 2,4 рази відносно контрольного показника. А на кінець досліджуваного періоду захворювання радужної форелі (22-й день після інфікування) активність катепсину В зростала відносно контрольного значення у 2,8 рази.

Підвищення активності катепсину В у печінці за ураження IPNV можна пояснити порушенням мембранної проникності лізосом і вивільненням катепсинів, а також послабленням дії інгібіторів білкової та небілкової природи що узгоджується з наведеними вище літературними даними [145].

Відповідно до сучасних уявлень лізосомальні цистеїнові протеїнази розглядаються як позитивні медіатори, що задіяні в реалізації як початкових, так і кінцевих етапів клітинної загибелі, однак роль конкретних механізмів та зв'язок з іншими клітинними шляхами програмованої загибелі залишається до кінця не з'ясованим. Серією експериментальних досліджень було встановлено, що лізосомальні протеїнази можуть бути стабільними та зберігати активність при фізіологічних значеннях рН впродовж кількох годин після надходження до цитоплазми, що і обумовлює їх деструктивний потенціал під час розвитку клітинної загибелі [146]. Ряд авторів постулює участь катепсинів у активації безпосередніх виконавців загибелі клітин – ефektorних каспаз [142, 145].

Експерименти, проведені *in vitro* показали, що дія катепсину В направлена переважно на каспази -8, -9 і -3 [140]. Окрім того, катепсин В приймає участь у розвитку загибелі, індукованої TNF $\alpha$ , в гепатоцитах миші, кардіоміоцитах, фібробластах або клітинах фібросаркоми, де каспази були заблоковані [147]. Це дозволяє припустити, що механізм дії катепсину В може відбуватися незалежно від каспаз.

Проте, у сучасній науковій літературі більш поширеною є модель згідно з якою вивільнення лізосомальних протеїназ викликає мітохондріальну дисфункцію та надходження до цитоплазми проапоптотичних білків в результаті прямої та опосередкованої дії катепсинів [139, 148]. Дослідження Zhao M. et al. [142] показали, що додавання очищених катепсинів В і D до мітохондрій *in vitro* призводить до значного зростання ступеня генерування мітохондріями активних кисневих метаболітів. Встановлено [149], що катепсин В індукує мінімальний вихід цитохрому с, в той час як інкубація ізольованих мітохондрій з катепсином В за присутності цитоплазматичних екстрактів супроводжується значним вивільненням цитохрому с та розвитком характерних морфологічних ознак програмованої клітинної загибелі. Ретельні і перспективні дослідження Stoka et al. [146] дали можливість запропонувати механізм опосередкованого катепсинами розвитку програмованої клітинної загибелі. В основі даного механізму є безпосереднє розщеплення катепсинами молекули проапоптотичного білка Bid, який ініціює загибель клітин за мітохондріальним шляхом. Як відомо, деградація Bid може здійснюватися також за участі каспази-8 та гранзиму В, але локуси розрізання при цьому відмінні від сайту, що розпізнається катепсинами.

Отже, на початкових етапах загибелі клітин катепсини можуть діяти як самостійні медіатори, викликаючи активацію залежного від мітохондрій шляху індукції клітинної загибелі.

До цього часу залишаються невідомими механізми виходу протеолітичних ферментів із лізосом у відповідь на дію різноманітних індукторів клітинної загибелі, одним із яких є IPNV. Показано, що пермеабілізація мембран лізосом

відбувається майже відразу після дії індукторів клітинної загибелі внаслідок сукупного впливу ряду факторів, зокрема накопичення у клітинах вільних радикалів і подальшої активації за їх участі процесів пероксидного окиснення ліпідів та активації фосфоліпази [150]. Підвищення проникності мембран також може бути пов'язано з внутрішньолізосомальними чинниками, наприклад, з акумуляцією всередині лізосом сфінгозину – речовини, що володіє вираженими лізосомотропними властивостями і подібно до детергентів викликає порушення цілісності лізосом [151].

Слід відмітити, що ступінь пошкодження лізосомальних мембран є одним із факторів, які визначають спрямованість клітинної загибелі шляхом апоптозу чи некрозу. Так, при незначних пошкодженнях лізосом спостерігається апоптотична загибель, в той час як при значному порушенні цілісності мембран, обумовленому, зокрема розвитком у клітинах оксидативного стресу відбувається надмірне надходження у цитоплазму лізосомальних гідролітичних ферментів і індукція некрозу [138].

Вірус інфекційного панкреатичного некрозу стимулює некротичні зміни у панкреатичній залозі форелі. Експериментальні дослідження свідчать про те, що смерть IPNV інфікованих клітин ініціюється апоптозом [152]. Апоптоз вважається фізіологічним процесом, який відбувається в процесі ембріогенезу, старіння і регресії пухлин. Вірусні інфекції також можуть слугувати тригерними механізмами апоптозу. Більшість катепсинів здатні ініціювати та посилювати апоптоз. Таким чином, на сьогодні найбільш ймовірною, на наш погляд, є модель лізосомальної теорії програмованої загибелі клітин під впливом IPNV, яка деталізується шляхом доповнення, розширення і отримання нових експериментальних підтверджень. У результаті дії як поза- так і внутрішньолізосомальних факторів відбувається порушення цілісності лізосомальних мембран і гідролітичні ферменти, які вивільнилися з лізосом можуть: по-перше, прямо атакувати мітохондрії з подальшим надходженням проапоптотичних факторів (у тому числі і цитохром с, AIF та інші) у цитоплазму. У цьому процесі суттєва роль належить білку Bid, який після протеолізу запускає

каскад мітохондріально-опосередкованої клітинної загибелі, і по-друге – активує літичні ферменти (наприклад, фосфоліпазу А<sub>2</sub>), дія яких направлена на дестабілізацію мітохондріальних та лізосомальних мембран.

Важливо зазначити, що визначна роль у регуляції подій в печінці райдужної форелі, ураженої IPNV, належить також аденозинтрифосфату (АТФ), оскільки масивна втрата АТФ або пригнічення його синтезу в клітині призводить до набухання мітохондрій, порушенням плазматичної мембрани, виходом вмісту клітини в навколишнє середовище і розвитком запальної реакції [153]. Різка втрата клітиною енергії в результаті блокування мітохондріального дихання та/або гліколітичного утворення АТФ з подальшим зниженням пулу цитозольного АТФ є одним з механізмів некрозу.

Проведенні дослідження та аналіз отриманих результатів підтверджують участь лізосомальних ферментів у розвитку відповідної реакції організму на дію IPNV, та укладаються в логіку того, що ступінь впливу на організм вірусів залежить від ефективності захисних і відновлювальних клітинних механізмів, до яких можна віднести систему внутрішньоклітинного протеолізу.

*Висновок.* Розпад білків, викликаний вірусною інфекцією, обумовлений посиленням автолітичних процесів, до яких залучені лізосомальні протеїнази, однією з яких є катепсин В. Пошкодження цілісності лізосомальної мембрани під впливом IPNV призводить до вивільнення та зміни у функціонуванні тіолзалежних протеїназ.

#### 4.2.6. Вивчення можливих носіїв IPNV (штам «Карпати»)

В умовах лабораторії вивчали вплив IPNV (штам «Карпати») на організм чужорідних хазяїв: струмкової форелі (*Salmo trutta*), полосатого даніо (*Danio rerio*), прісноводного молюска беззубки (*Anodonta cygnea*), та на широкопалого рака (*Astacus astacus*) [116]. Робота виконана в рамках наукової програми «Вивчення екологічних особливостей та біоіндикаторних властивостей різних організмів та їх угруповань в умовах трансформованого середовища для розв'язання проблем біобезпеки України» (2006-2010 рр., номер держреєстрації: 0106U005749).

Беззубки виявилися стійкими до IPNV. Під час експерименту беззубки рухалися, активно відкриваючись та фільтруючи воду в акваріумі і не виявляли ніяких ознак захворювання відповідно до візуальних спостережень. Наприкінці експерименту інфіковані беззубки, а також ті, що перебували у контрольній групі, продовжували рухатися, були активними та не виявляли жодних ознак захворювання.

Патогенність IPNV була доведена для однорічок струмкової форелі та даніо. Активний розвиток інфекції у форелі розпочався на 5-12 д.п.і. а більшість риб загинула упродовж 12-18 п.п.і. (рис. 2). Смертність форелі склала  $76,6 \pm 6,6\%$ . Було відзначено такі ознаки інфекції, як потемніння тіла, типове кругове плавання та екзофтальм. Спостерігався некроз печінки, нирок та травного тракту, що призвело до руйнування всіх органів і тканин. У заражених даніо біля грудних плавників спостерігалися крововиливи та некроз. Перед смертю інфіковані даніо не харчувалася і не реагувала на зовнішні стимули і гинули упродовж 10-15 д.п.і. Смертність даніо становила  $40,0 \pm 3,3\%$  (рис. 2).

За допомогою ЗТ-ПЛР було виявлено IPNV у всіх експериментальних тварин. Усі експериментально заражені особини були позитивними щодо IPNV. Присутність вірусу було показано на 7, 14, 21, 28 або 35 д.п.і. Це свідчить про те, що вірус може накопичуватися і зберігатися в організмах піддослідних тварин. З метою визначення інфекційного титру IPNV у всіх дослідних тварин зразки збирали кожні 7 днів упродовж всього експерименту.

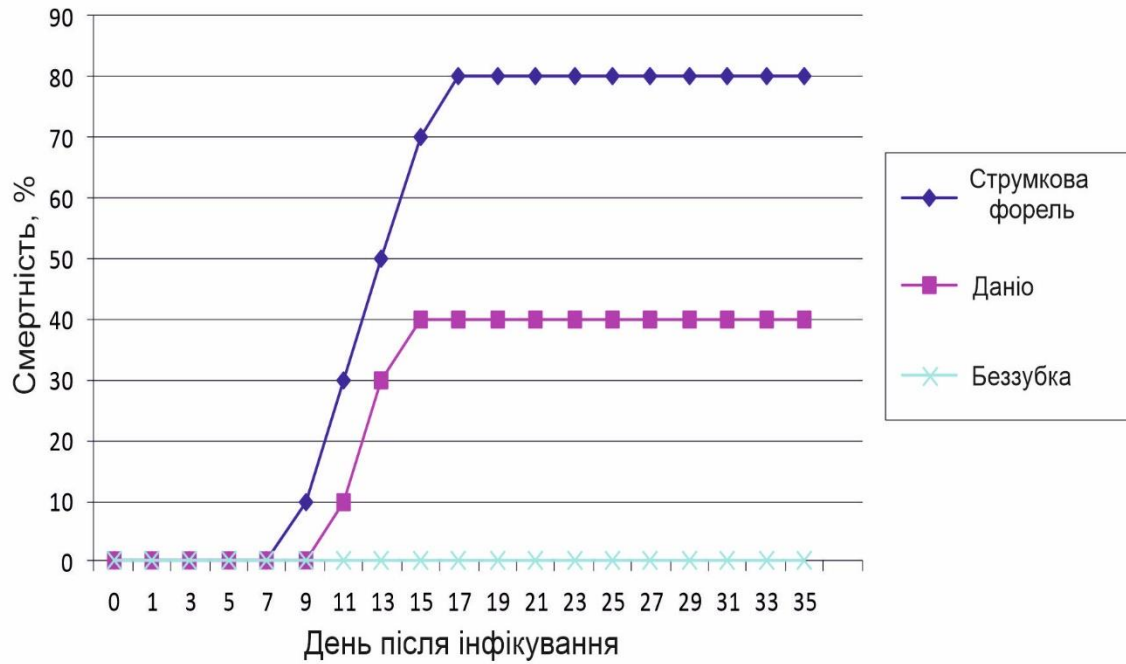


Рис.4.9 Кумулятивна смертність інфікованих тварин, інфікованих IPNV в дозі  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/мл<sup>-1</sup>.

Інфекційний титр вірусу визначали в клітинах RTG-2 та додатково з використанням 10-кратного серійного розведення зразків РНК в аналізі ЗТ-ПЛР. Десятикратне серійне розведення тканинних гомогенатів піддослідних тварин практично було тотожним вірусному титру в культурі клітин RTG-2. Висока кореляція ( $r = 0,84$ ) спостерігалася між даними, отриманими з ЗТ-ПЛР та вірусним титром у клітинній культурі, інфікованій зразками зі струмкової форелі, данію та беззубки. Тобто десятикратні розведення зразків РНК вірусу з тканин органів інфікованих експериментальних тварин відповідали концентрації вірусу в культуральному середовищі інфікованих клітин і були тотожними. ЗТ-ПЛР показала достовірну кореляцію з титром вірусу при вимірюванні в культурі клітин, і може бути корисним інструментом для подальших досліджень, спрямованих на вивчення вірусного навантаження та патогенезу захворювання за допомогою методу ЗТ-ПЛР. Кількість вірусу в організмі струмкової форелі зросла в 1000 разів до свого максимуму -  $10^6$  ID<sub>50</sub> / мл<sup>-1</sup> на 21 д.п.і., що корелює з клінічним розвитком захворювання та масовою загибеллю риби (табл. 4.2). Данію виявилася чутливим видом до українського

ізоляту IPNV, оскільки інфекційний титр вірусу збільшився в десять разів до  $10^4$  ID<sub>50</sub> / мл-1. Такий титр вірусу спостерігався на 14 д.п.і., потім рівень вірусу знизився. Наприкінці експерименту IPNV все ще був присутній у смугастого данію, що свідчить про пересестенцію вірусу. Скоріше за все в організмі полосатого данію було активовано кілька факторів, що почали обмежувати розмноження вірусу, оскільки рівень IPNV знизився на кінець експерименту, а смертність риби була не такою високою, як у струмкової форелі. Для підтвердження нашої думки в майбутньому заплановано вивчення експресії антивірусних генів (vlg-1/viregin або Mx), але характер інфекції, помірний вірусний титр та невисока смертність можуть свідчити саме про захисні механізми.

Таблиця 4.2

Інфекційний титр IPNV в організмі струмкової форелі, смугастого данію та беззубки

Експериментальна тварина	Інфекційний титр вірусу (ID <sub>50</sub> /ml <sup>-1</sup> ) / дні після інфікування						Смертність, %
	0	7	14	21	28	35	
Беззубка ( <i>Anodonta cygnea</i> )	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	0
Струмкова форель ( <i>Salmo trutta</i> )	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	76,6 ± 6,6%
Смугастий данію ( <i>Danio rerio</i> )	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	40,0 ± 3,3%

Інфекційний титр IPNV поступово знижувався у беззубки, що призвело до неможливості виявити його титр методом культури клітин. Натомість високочутливий метод ЗТ-ПЛР дозволив виявити вірус на 35 д.п.і. (рис.4.10), що свідчить про вищу чутливість методу ЗТ-ПЛР в діагностиці вірусу, ніж за

використання культури клітин. Це вказує на поступове виведення вірусу з організму беззубки і, в той же час, на його тривалу стійкість і персистенцію.

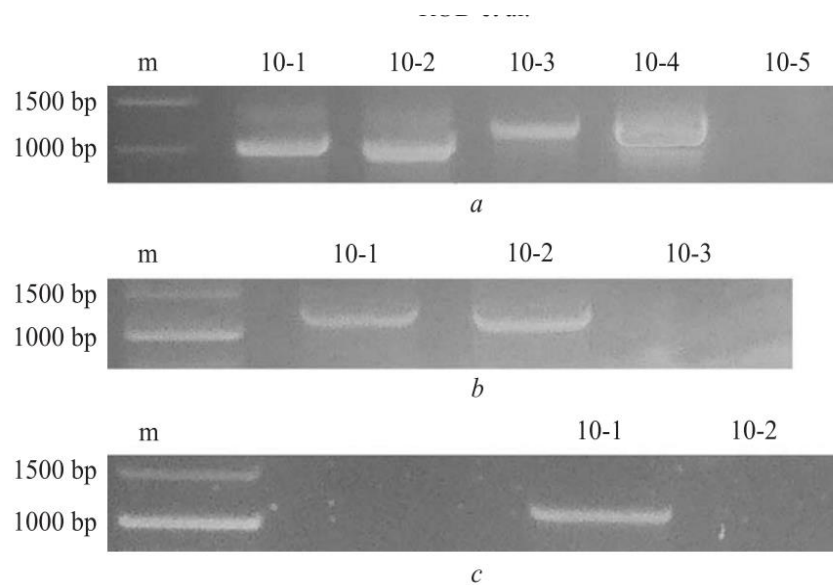


Рис.4.10 Виявлення IPNV методом RT-PCR із використанням 10-кратних розведень РНК та використанням праймерів PrA у експериментально інфікованих струмкової форелі (а), полосатого данію (b) та беззубки (с) через 35 днів після інфікування.

Таким чином, титри вірусу наприкінці експериментів були вищими, ніж початкові дози вірусу у струмкової форелі та данію рерію, що свідчить про розмноження вірусу. Беззубка стійка до IPNV, але може бути вектором і тимчасовим резервуаром для вірусу. Результати наших досліджень свідчать про можливість широкого розповсюдження IPNV в нових місцевостях за рахунок чутливих та векторних видів.

З метою встановлення інфекційного титру IPNV (штам «Карпати»), виділеного від райдужної форелі *O. mykiss* з річки Серет, Чернівецької області України з організму широкопалого рака упродовж досліду кожні 7 днів відбиралась гемолімфа [117]. Для експериментального інфікування широкопалого рака *A. astacus* використовували культуральну рідину інфікованої клітинної лінії RTG-2. Перед інфікуванням інокулят фільтрували через шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм (Sarstedt, Німеччина) для

відокремлення клітинних уламків та бактерій. З інокуляту робили 10-ти кратні розведення для досягнення інфекційного титру вірусу  $10^{3.0}$  ID<sub>50</sub>/мл<sup>-1</sup>. Для ін'єкції використовували 0,2 мл вірусомісного матеріалу. Контрольну групу тварин інокулювали стерильним поживним середовищем. Кількість особин широкопалого 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 підтримки кисневого режиму. Тривалість досліджу становила 35 днів. Кожні 7 днів з трьох дослідних раків прижиттєво відбирали зразки гемолімфи для ідентифікації вірусу та визначення його інфекційного титру.

Для ідентифікації вірусу упродовж досліджу використовували метод зворотної 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<sup>TM</sup> RNA Purification Kit (Thermo Scientific). Для синтезу кДНК з отриманих препаратів РНК використовували набір RevertAid<sup>TM</sup> Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). ЗТ-ПЛР здійснювали з використанням двох пар олігонуклеотидних праймерів, специфічних до гену VP2 IPNV. Послідовності праймерів були такими:

WB1 5'-CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC-3',

WB2 5'-CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG-3',

PrA1 5'-GAGATCCATTATGCTTCCAGA-3',

PrA2 5'-GACAGGATCATCTTGGCATAGT-3'.

Пару олігонуклеотидів WB використовували для ідентифікації вірусу в організмі раків, оскільки ці праймери характеризуються високою чутливістю.

Для підрахунку інфекційного титру визначали титр вірусу як в культурі клітин RTG-2, так і в гемолімфі піддослідних раків за допомогою десятикратних розведень препаратів кДНК вірусу. На початку експерименту доза інфікування становила  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/мл<sup>-1</sup>. Титр вірусу в культуральній рідині інфікованих клітин RTG-2 становив  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/мл<sup>-1</sup>. Такий високий вірусний титр в

культуральній рідині визначався в розведенні  $10^{-6}$  препарату кДНК IPNV (штам «Карпати») Тобто, десятикратні розведення гемолімфи широкопалого рака прямопропорційно відображали вірусний титр в організмах інфікованих раків.

При інфікуванні вірусом інфекційного панкреатичного некрозу широкопалого рака *A. astacus* характерні ознаки захворювання не спостерігались упродовж всього експерименту. Раки були досить активними, реагували на дотик. У експериментально інфікованих раків не змінювався колір тіла та зябер. На 17-19 день після інфікування (д.п.і.) кілька особин широкопалого рака перестали реагувати на зовнішнє подразнення, у них спостерігалась летаргія, а рух кінцівок провокувався тільки підняттям тіла з води. Загибель інфікованих особин широкопалого 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 досліджу. Таким чином смертність широкопалого рака при експериментальному інфікуванні українським ізолятом IPNV «Карпати» з урахуванням загальної кількості особин становила  $26,6 \pm 6,6\%$  (рис.4.10). Більшість піддослідних тварин по закінченню досліджу продовжували активно рухатись, реагувати на механічні подразнення і не проявляли будь-яких ознак захворювання.

Встановлено що вірус інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати») зберігає інфекційний титр в організмі широкопалого рака *A. astacus* понад 35 днів, що свідчить про потенційну можливість цих тварин бути переносниками IPNV та можливість вірусу значний період часу акумулюватись в організмі рака. Як показали результати наших досліджень, український ізолят вірусу інфекційного панкреатичного некрозу «Карпати» був ідентифікований в організмі широкопалого рака методом ЗТ-ПЛР. Усі експериментально інфіковані особини були позитивні на IPNV «Карпати», а от в контрольній групі вірус не діагностувався (рис. 4.11).

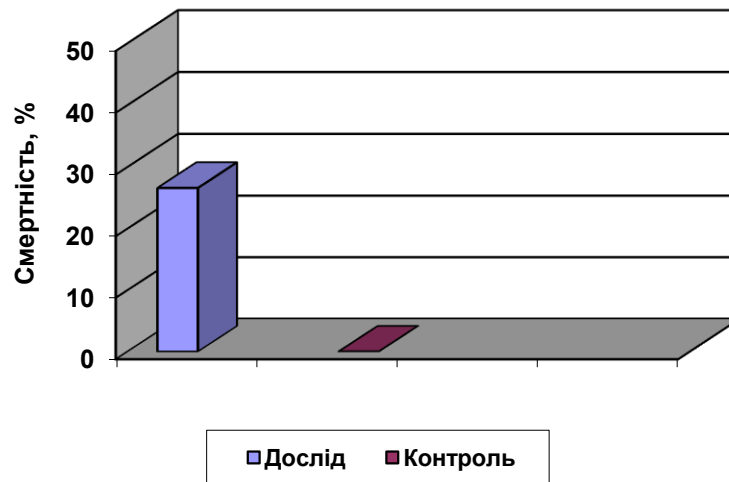


Рис. 4.11 Смертність широкопалого рака *A. astacus*, інфікованого українським ізолятом IPNV (штам «Карпати»).

Присутність вірусу в організмі рака відмічалась як на 7 д.п.і., так і на кінець досліду (35 д.п.і.). Це свідчить про можливість вірусу значний період часу акумулюватись в організмі рака та знаходитись в стані персистенції. Такий перебіг вірусної інфекції ніяк не вплинув на стан більшості піддослідних тварин.

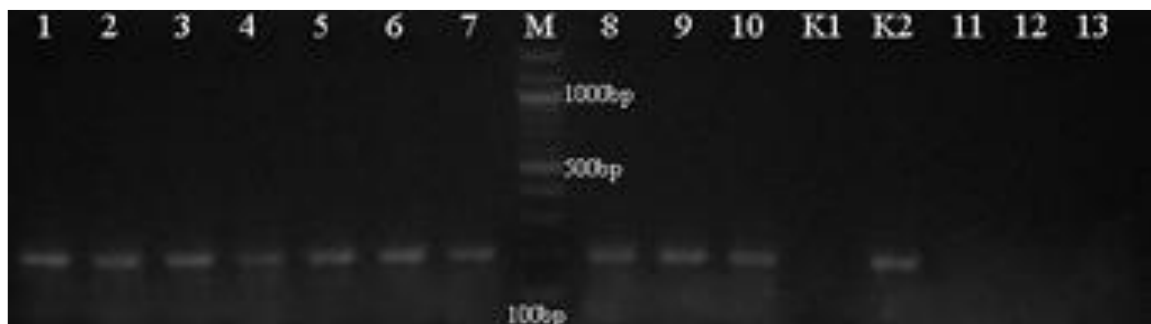


Рис. 4.12. Ідентифікація вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізолят «Карпати» в організмі широкопалого рака *A. astacus* методом ЗТ-ПЛР, де 1-10 – зразки з експериментально інфікованих раків; М-маркер; 11-13 – контрольна група неінфікованих раків; К1 – контроль реакції (всі компоненти реакції окрім кДНК); К2 – позитивний контроль, культуральна рідина клітинної лінії RTG-2, інфікованої IPNV «Карпати».

По закінченню експерименту дослідні раки, так як і контрольні, продовжували активно рухатись, реагувати на механічні подразнення та не проявляти будь-яких ознак захворювання.

З метою встановлення інфекційного титру IPNV «Карпати» в організмі широкопалого рака упродовж досліджу 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  $10^3$  ІД<sub>50</sub>/мл<sup>-1</sup>. Титр вірусу в культуральній рідині інфікованих клітин RTG-2 становив  $10^{7.0}$  ІД<sub>50</sub>/мл<sup>-1</sup>. Такий вірусний титр в культуральній рідині визначався в розведенні  $10^{-6}$  препарату кДНК IPNV «Карпати» (рис. 4.13). Тобто, десятикратні розведення гемолімфи широкопалого рака прямопропорційно відображали вірусний титр в організмах інфікованих раків.

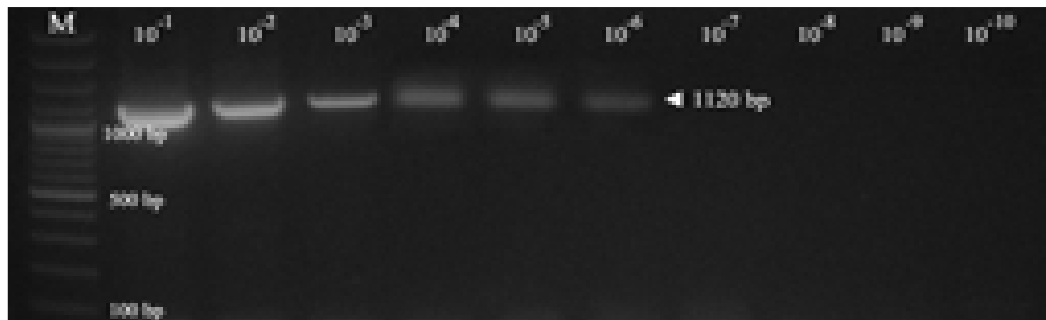


Рис. 4.13. Визначення чутливості ПЛР для ідентифікації повнорозмірного гену VP2 IPNV «Карпати» в культуральній рідині клітин RTG-2

Результати наших досліджень показали, що упродовж експерименту інфекційний титр вірусу в організмі широкопалого рака *A. astacus* був сталим і коливався в межах  $10^2$ - $10^3$  ІД<sub>50</sub>/мл<sup>-1</sup> (табл.4.3). Такі результати свідчать про довготривалу персистенцію вірусу в організмі широкопалих 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 підтримку інфекційного титру на рівні  $10^3$  ІД<sub>50</sub>/мл<sup>-1</sup>. Щоправда такий низький рівень вірусного титру може свідчити і про лімітованість чутливих клітин, в яких можуть формуватися зрілі віріони.

Таблиця 4.3.

Динаміка інфекційного титру IPNV «Карпати» в організмі широкопалого рака

*A. astacus*

День після інфікування	0	7	14	21	28	35
Інфекційний титр, ІД <sub>50</sub> /мл <sup>-1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>

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, швидше 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 широкопалий рак *A. astacus*. Вживаючи в їжу інфіковану рибу, широкопалий рак може акумулювати вірус в своєму організмі та переносити його в межах ареалу свого існування. Вірус інфекційного панкреатичного некрозу ізолят «Карпати» зберігає інфекційний титр в організмі широкопалого рака *A. astacus* понад 35 днів, що свідчить про потенційну можливість цих тварин бути переносниками IPNV.

Для встановлення внутрішньоклітинної локалізації вірусу, а отже і для доказу його репродукції в організмі широкопалого рака *A. astacus*, надалі необхідно виконати електронно-мікроскопічне дослідження ультратонких зрізів чутливих тканин. Цей метод дозволить диференціювати такі процеси, як акумуляція, персистенція та репродукція вірусу.

### Висновки.

1. Вперше на території України у риб, виловлених з природних водойм (р. Серет, Чернівецька область) був виявлений бірнаввірус IPNV (штам «Карпати»).

2. Проаналізовано первинну послідовність генів VP2 та NS вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, сконструйовано олігонуклеотидні праймери, та відпрацьовані умови постановки ПЛР, які дозволяють ідентифікувати вірус в культурі клітин та клінічному матеріалі.

3. Результати вивчення кола можливих хазяїв IPNV у природних водоймах свідчать про довготривале перебування вірусу в організмі широкопалих раків та інших організмів.

Матеріали у поданому розділі були оприлюднені автором у таких публікаціях:

1. Rud Yu, Maistrenko M., Buchatsky L. / Characterization of an infectious pancreatic necrosis virus from rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) in West Ukraine // *Virologica Sinica*. 2015. N 30. P. 231–233.

2. Rud Y. P., Maistrenko M. I., Zaloilo O. V., Liubchenko G. A., Buchatskiy L. P., Hrytsyniak I. I. / Experimental infection of brown trout (*Salmo trutta*), zebrafish (*Danio rerio*), and swanmussel (*Anodonta cygnea*) with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) // *Agricultural Science and Practice*. 2020. Vol. 7, No. 3. P. 31—39.

3. Rud Yu., Maistrenko M., Buchatsky L. Isolation of IPNV from wild-life rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Western Ukraine // *The Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kiev. Biology*. 2013. № 3(65). P. 63—65.

4. Майстренко М.І., Драган Л. П., Рудь Ю.П. Вміст катепсину В у печінці райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) в динаміці вірусної інфекції // *Біологія тварин*. 2014. Т. 16, № 3. С.85—90.

5. Майстренко М.І., Рудь Ю.П., Буцацький Л.П. Накопичення IPNV на культурах клітин риб // *Біологія тварин*. 2014.Т. 16,№ 4. С. 93—99.

6. Рудь Ю.П., Майстренко М.І., Безусий О.Л., Буцацький Л.П. / Експериментальне інфікування довгопалого річкового рака (*Pontastacus leptodactylus*) вірусом інфекційного панкреатичного некрозу // *Вісник проблем біології і медицини*. 2014. Т. 1, вип. 4. С. 70—74.

7. Драган Л.П., Майстренко М. І., Любченко Г.А., Рудь Ю.П., Буцацький Л.П. / Активність амінотрансфераз у печінці райдужної форелі (*Oncorhynchus*

*mykiss*) під впливом вірусної інфекції // Рибогосподарська наука України. 2015. № 3. С. 99—106.

8. Майстренко М.И., Драган Л.П., Рудь Ю.П. / Влияние IPNV на активность аспаратаминотрансферазы в перевиваемой культуре клеток рыб // Труды НИИЖК. – 2014. Вып. 7. Т. 2. С. 389–392.

9. Matvienko N.M. Maistrenko M.I., Buchatskyi L.P., Didenko A. / Diseases of different aetiologies in salmonids in Ukraine. // *Biologija*. 2019.v.65. N4. P.273282.

10. Рудь Ю. П., Майстренко М.И., Бучацький Л.П. / Ампліфікація та аналіз нуклеотидної послідовності генів VP2 та NS вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, виділеного в Західній Україні // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. 2013. Вип. 4 (118). С. 34–40.

## РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ ДАНИХ

Герпесвірус коропових риб третього типу (СуHV-3) та IPNV відносяться до емерджентних вірусів, які викликають напружені епізоотичні ситуації. Ці віруси виникають, або проявляються раптово, несподівано, і завдають значних економічних збитків [154]. Герпесвірус коропових риб третього типу (СуHV-3) викликає висококонтagioзну емерджентну інфекцію як у звичайного (*C. carpio carpio*), так і у декоративного коропа кої (*C. carpio koi*). Цей вірус поширений у всьому світі і завдає великої шкоди рибницьким господарствам: смертність риби від цієї інфекції сягає 80-100% [155]. СуHV-3 зустрічається як в аквакультурі, так і в озерах та річках. Спалахи вірусної інфекції у коропів відбуваються навесні та восени при температурі води 18-28°C. Смертність коропів розпочинається через 5-6 днів після інфікування, ще через два дні після цього відбувається їх масова загибель і цей рівень смертності зберігається ще 10-12 днів [156]. До вірусу більш сприйнятливі мальки коропа (віком 1-3 місяці), ніж дорослі риби вагою понад 230 гр. Клінічні ознаки захворювання у риби проявляються вже через три дні після інфікування. Інфіковані коропи втрачають координацію, плавають хаотично, зазвичай вони знаходяться біля поверхні води. У інфікованих коропів також спостерігається некроз зябер, запалість очей, наявність на шкірі білих плям.

Для діагностики СуHV-3 у багатьох країнах використовують полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), а також імуноферментний (ELISA) та електронномікроскопічний методи. На сьогоднішній день ПЛР є самим точним та чутливим методом діагностики вірусних захворювань риби. Метод дозволяє виявити наявність збудника, навіть якщо в пробі присутні лише декілька молекул ДНК збудника. Чутливість методу є більша, ніж в імунохімічних та інших методах, а принцип методу дозволяє діагностувати наявність інфекцій зі значною антигенною мінливістю. Важливі відомості про структуру та морфогенез вірусів дає також метод електронної мікроскопії. Тому метою нашої роботи було застосування ПЛР-діагностики та електронної мікроскопії ультратонких зрізів для дослідження морфології та репродукції СуHV-3 в печінці та нирках звичайного коропа [121]. Для ідентифікації вірусу методом ПЛР ми використовували олігонуклеотидні праймери, специфічні до ділянки гену тимідинкінази СуHV3 [113, 114]. Для діагностики і ідентифікації СуHV3 був використаний

і інший метод – метод електронної мікроскопії. За допомогою цього методу було показано, що в цитоплазмі уражених клітин нирок коропа, в яку із ядра проникають нуклеокапсиди, були розширені каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулума і спостерігались типові для герпесвірусу вірусні частинки розміром 120 нм, загорнуті в мембрани. Мітохондрії уражених клітин мали видовжену форму, велика кількість мітохондріальних крист була зруйнована.

За допомогою розробленого нами методу ПЛР СуНВ-3 був виявлений також у акваріумних риб Київського зоопарку, причому вперше він був виявлений у нових хазяїв – у двокольорового коропа лабео (*Labeo bicolor*) та мішкозяберного сомика (*Heteropneustes fossilis*) [113]. СуНВ-3 має вузьку видову специфічність – інші представники коропових, до цього вірусу несприйнятливі. В експериментальних умовах до СуНВ-3 виявились несприйнятливими білий амур (*Ctenopharyngodon idella*), сріблястий карась (*Carassius auratus gibelio*), товстолобик (*Hypophthalmichthys molitrix*), тиляпія (*Oreochromis niloticus*) та інші [157]. Сріблястий карась (*Carassius auratus gibelio*) може інфікуватись СуНВ-3 без проявів симптомів захворювання, проте його гібриди з кої мають типові ознаки хвороби. Тому виявлення цього вірусу у завезених з-за кордону акваріумних риб свідчить про те, що трансграничні перевезення можуть слугувати джерелом поширення емерджентних вірусів на території України.

З метою пошуку СуНВ-3 в рибницьких господарствах нашої країни нами було проведено обстеження 11-ти риборозплідників (племінних заводів, репродукторів), а саме ВАТ «Кримрибокомбінат», ДУ «Кримський риборозплідник», ВАТ «Донрибокомбінат», ВАТ «Запорізький рибокомбінат», ВАТ «Миколаївське сільськогосподарське рибоводне підприємство», Аграрно-рибогосподарський кооператив «Придунайська Нива», рибоаграрний багатопрофільний кооператив «Новонекрасовский», ТОВ «Одесарибгосп», Виробничий кооператив «Херсонські рибалки», ВАТ «Херсонрибгосп», ТОВ «Гемма ЛТД» [120]. Результати проведених робіт показали, що в цих господарствах вірус не був виявлений.

В останні роки українські рибогосподарські підприємства ведуть активну торгівлю з форелевими господарствами східної Європи. IPNV був ідентифікований у республіках Польщі та Чехії, а отже існує велика вірогідність того, що вірус був завезений із заплідненою ікрою саме з господарств Східної Європи. Смертність об'єктів аквакультури сягає понад 70%. Перехворівши, риба залишається носієм інфекції, яка зберігається в організмі в латентному стані. Механізм передачі – вертикальний та горизонтальний, переносники (вектори) – не встановлені. Тому контроль цього захворювання має велике значення для рибогосподарських підприємств України [158]. Велике значення також має розробка високоефективних діагностикумів для ідентифікації нових штамів, які циркулюють в Україні.

Одним з основних молекулярних методів ідентифікації IPNV є ампліфікація РНК вірусу за допомогою зворотної транскрипції та ПЛР (ЗТ-ПЛР). Тому метою нашої роботи було підібрати олігонуклеотидні праймери, специфічні до українського ізоляту IPNV та оптимізувати параметри постановки реакції. До того ж, оскільки в Європі поширеними є одразу декілька штамів IPNV, з метою встановлення приналежності українського ізоляту ми проаналізували нуклеотидні послідовності ампліфікованих фрагментів геному вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, виділеного в Україні.

Проаналізувавши наукові дані, було встановлено, що найефективнішими ділянками РНК вірусу IPNV для підбору олігонуклеотидних праймерів і специфічної ампліфікації є ділянки, що кодують структурний білок VP2 та неструктурний білок NS. Але, оскільки у Європі поширеними є одразу декілька штамів цього вірусу (Ab, Sp, Te та He), які розрізняються за антигенними детермінантами структурних білків, і, відповідно, за нуклеотидними послідовностями РНК, які їх кодують, ми обрали за основу нуклеотидні послідовності неструктурного білка NS та консервативну ділянку структурного білка VP2, які є найменш варіабельними. Для ампліфікації цих фрагментів сегменту А РНК українського ізоляту IPNV ми використали нами модифіковані праймери IPN, PrD та WB, рекомендовані в доступній літературі.

Як показали результати наших досліджень, обрані олігонуклеотидні праймери, специфічні до ділянок генів неструктурного білку NS та структурного білку VP2 IPNV, ампліфікували очікувані за розміром фрагменти кДНК. Розмір ампліконів становив для праймерів IPN 620 пар нуклеотидів (п.н.), для WB близько 200 п.н., а фрагмент довжиною 175 п.н. був характерний для праймерів PrD.

За допомогою градієнтного ампліфікатора нами була проведена оптимізація постановки ПЛР [115]. Для відпалу праймерів використовували діапазон температур від 53 до 64°C. Було показано, що температура 60°C є оптимальною для всіх досліджуваних пар праймерів. Також шляхом 10-кратних розведень препаратів кДНК перевіряли ефективність досліджуваних пар праймерів. Як показали результати досліджу, найбільшу працездатність демонстрували праймери WB, які є універсальними для всіх генотипів IPNV та інших водних бірnavірусів. Аналогічна ефективність спостерігалась для праймерів PrD, але, як заповняють автори цих олігонуклеотидів, вони не здатні діагностувати деякі штами IPNV. Найнижча ефективність була характерна для праймерів IPN, реакція проходила тільки в зразках з високою концентрацією вірусної РНК. На специфічність праймерів IPN може впливати той факт, що реверс-праймер комплементарний варіабельній N-кінцевій частині білка VP2.

Нуклеотидні послідовності трьох ампліфікованих фрагментів сегмента А українського ізоляту IPNV (штам «Карпати») (150 п.н. для гена NS та 175 і 480 п.н. для N- і С-кінцевих ділянок гена VP2 відповідно) були аналізовані в автоматичному ДНК-секвенаторі Genetic Analyser 3130. Як показали результати наших досліджень, український ізолят IPNV належить до штаму Sp, вперше виділеному в Данії. Порівняння послідовності нуклеотидів ізоляту «Карпати» з нуклеотидними послідовностями з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (NCBI) показало, що ампліфіковані фрагменти кДНК на 95-99% ідентичні послідовностям генів NS и VP2 штаму Sp. Серед ізолятів штаму Sp найбільш спорідненими до українського ізоляту IPNV

виявились віруси, виділені у Великобританії, Норвегії, Франції, Туреччині та Ірані.

Таким чином, підібрані олігонуклеотидні праймери можуть бути використані для ідентифікації вірусу інфекційного панкреатичного некрозу в природних водоймах і форелевих господарствах України. Для експрес-діагностики українського ізоляту IPNV краще за все використовувати праймери WB. Проведення всеукраїнського моніторингу IPNV дозволить скласти цілісну картину розповсюдження цього вірусу в країні, а також ідентифікувати інші штами, які циркулюють у Європі.

Для експрес-діагностики вірусних інфекцій риб в польових умовах можуть бути також використані неспецифічні показники, які ґрунтуються на біохімічних змінах в організмі риб. Відомо, що активність ферменту аспартатамінотрансферази (АСТ) служить одним з показників ураження печінки як у людей, так і у тварин. Вплив IPNV на ферментативні процеси в інфікованих клітинах коропа та райдужної форелі не вивчався. Тому метою цієї роботи було вивчення впливу цього вірусу на активність аспартатамінотрансферази (АСТ) на моделі перещеплюваних клітинах риб [118]. Визначення активності АсАТ в перещеплюваних клітинах риб виявило значне підвищення активності цього ферменту під впливом IPNV в порівнянні з контролем (неінфіковані клітини). Так, вже на другу добу після інфікування клітин вірусом IPNV спостерігалось підвищення активності АсАТ з 9,24 Од/л до 18,48 Од/л. На сьомий день після інфікування активність АсАТ досягала 106,31 Од/л, тобто більш ніж в одинадцять разів в порівнянні з контролем. Активність цього ферменту в неінфікованих клітинах практично не змінювалася. Активність другого індикаторного для оцінки функціонального стану печінки ферменту, аланінамінотрансферази (АлАТ) в перещеплюваних клітинах риб була дуже низькою, що не дозволяє зробити висновки про її роль в процесі репродукції IPNV [118]. Проведені нами експериментальні дослідження [119] показали, що IPNV сприяє активації катепсину В в гомогенатах печінки райдужної форелі, що призводить до розпаду білків в інфікованих клітинах. Деградація білків

обумовлена посиленням автолітичних процесів, до яких залучені лізосомальні протеїнази, однією з яких є катепсина В.

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. 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. До того ж, перехворівши, риба залишається носієм інфекції, яка зберігається в організмі в латентному стані. 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%. Окрім риб, IPNV був виділений від водних безхребетних тварин, таких як двостулкові молюски хамагурі (*Meretrix lusoria*), мідія їстівна (*Mytilus edulis*) і морський гребінець (*Pecten maximus*), та японської тигрової креветки (*Penaeus japonicus* [157]. 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. Тому наступною метою наших досліджень було вивчення в умовах лабораторії впливу IPNV на організм чужорідних хазяїв: широкопалого рака (*Astacus astacus*), струмкової форелі (*Salmo trutta*), полосатого даніо (*Danio rerio*) та на прісноводного молюска *Anodonta cygnea* [116]. Для визначення інфекційного титру IPNV у струмкової форелі, даніо, беззубки та довгопалого рака ми досліджували зразки тканин за допомогою культури клітин та методом ЗТ-ПЛР [159]. Показано, що метод ЗТ-ПЛР є більш чутливим до виявлення вірусів. Наприклад, на 35 д.п.і. у беззубки не вдалося виявити вірус за допомогою методу культури клітин, але він був ідентифікований методом ЗТ-ПЛР.

Результати дослідів показали, що смертність струмкової форелі та полосатого данію під впливом IPNV складала 76,6 та 40,0% відповідно. При інфікуванні вірусом інфекційного панкреатичного некрозу широкопалого рака *A. astacus* характерні ознаки захворювання не спостерігались упродовж всього експерименту. Раки були досить активними, реагували на дотик. У експериментально інфікованих раків не змінювався колір тіла та зябер. На 17-19 день після інфікування (д.п.і.) кілька особин широкопалого рака перестали реагувати на зовнішнє подразнення, у них спостерігалась летаргія, а рух кінцівок провокувався тільки підняттям тіла з води. Загибель інфікованих особин широкопалого 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. Було встановлено, що вірус інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати») зберігає інфекційний титр в організмі широкопалого рака *A. astacus* понад 35 днів, що свідчить про потенційну можливість цих тварин бути переносниками IPNV. Як і слід було очікувати, струмкова форель, природний хазяїн IPNV, була дуже чутливою до інфікування [160]. Смертність форелі та інфекційний титр вірусу показали високу вірулентність штаму IPNV «Карпати», який був виділений із райдужної форелі. Більшість видів лососевих чутливі до IPNV, і струмкова форель не є винятком. Наші результати свідчать про потенційний ризик передачі IPNV між популяціями лососевих у дикій природі, а також на рибних господарствах України та сусідніх країн.

Смугастий данію виявився чутливим до IPNV. Проте, порівняно зі струмковою фореллю, інфекційний титр вірусу у смугастого данію був значно нижчим. Підвищений інфекційний титр на початку експерименту продемонстрував вихід нових віріонів IPNV, що вказує на чутливість данію до вірусу та здатність вірусу реплікуватися в організмі цього виду. Смугастий данію - це проста експериментальна модель вивчення вірусної репродукції у риб [161]. Під час нашого експерименту ми спостерігали збільшення титру вірусу у данію, що передбачає можливість розмноження вірусу. Наші дані узгоджуються з результатами американських дослідників [162].

Беззубка виявилася стійкою до вірусу і смертність не спостерігалася. Молюски можуть відігравати вирішальну роль в інтегрованих системах мультитрофної аквакультури (ІМТА), використовуючи органічні поживні речовини, пов'язані з фільтруванням. Як біоакумулюючі організми, вони також можуть підвищувати ризик захворювання на фермах, слугуючи резервуарами для важливих збудників риби, таких як IPNV. Показана здатність блакитної мідії біоакумулювати та передавати IPNV смолтам атлантичного лосося. Хоча передача IPNV відбувалася від мідій до смолтів з низькою частотою, результати показують, що вірус, такий як IPNV, може накопичуватися в мідіях і передаватися чутливим видам риб [163].

У беззубки вірусний титр поступово знижувався, але вірус все ще був присутній на 35 д.п.і., що свідчить про потенціал цих тварин як носіїв IPNV, оскільки концентрація IPNV залишалася стабільною упродовж експерименту. Потрапивши в організм, вірус може бути усунений захисними механізмами, і його інфекційний титр може знизитися. Натомість, наші результати продемонстрували стабільний інфекційний титр ( $10^3 \text{ ID}_{50} / \text{мл}^{-1}$ ) упродовж всього експерименту. Однак, такий низький вірусний титр може свідчити про обмежену кількість чутливих клітин для репродукції зрілих віріонів. Оскільки райдужна форель та прісноводні раки часто утримуються разом в одному біотопі, раки можуть інфікуватися IPNV, харчуючись інфікованою райдужною фореллю і передавати вірус до мальків райдужної форелі.

## ВИСНОВКИ

У роботі наведені матеріали по розробці методів діагностики емерджентних для України вірусів герпеса коропа третього типу (СуHV-3) та бірнавірусу IPNV (штам «Карпати»). Проаналізовано первинну послідовність генів VP2 та NS вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, сконструйовано олігонуклеотидні праймери, та відпрацьовані умови постановки ПЛР, які дозволяють ідентифікувати вірус в культурі клітин та клінічному матеріалі.

1. Вперше в Україні від коропа кої та коропа лабео виділено емерджентний для України вірус герпеса риб третього типу. Розроблений на основі ПЛР діагностикум може бути ефективним для виявлення цієї висококонтагіозної інфекції в рибницьких господарствах.
2. Вперше в Україні у риб, виловлених з природніх водойм (річка Серет) був виявлений бірнавірус IPNV (штам «Карпати»).
3. Проаналізовано первинну послідовність генів VP2 та NS IPNV, на основі проведеного філогенетичного аналізу встановлена ідентичність штаму «Карпати» з штамом Sp.
4. Сконструйовані олігонуклеотидні праймери в реакції ПЛР дозволяють ідентифікувати IPNV як в культурі клітин, так і в клінічному матеріалі.
5. Проведені біохімічні дослідження свідчать про значну зміну під впливом бірнавірусу IPNV (штам «Карпати») активностей аспаратамінотрансферази та катепсину В.
6. Результати вивчення кола хазяїв IPNV свідчать про довготривале перебування вірусу в організмі струмкової форелі, широкопалих раків та інших водяних організмів.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Complete genome sequence and taxonomic position of anguillid herpesvirus 1 / Van Beurden S. J. et al. // Gen. Virol. 2010. Vol. 91. P. 880—887.
2. Isolation and characterization of a new herpesvirus from eel // Pathology in Marine Sciences / eds. Sano H. et al. San Diego : Academic Press, 1990. P. 15—31.
3. Sano T., Fukuda H., Furukawa M. *Herpesvirus cyprini*: biological and oncogenic properties // Fish Pathol. 1985. Vol. 20. P. 381—388.
4. *Herpesvirus cyprini*: lethality and oncogenicity / Sano T. et al. // J. Fish Dis. 1991. Vol. 14. P. 533—543.
5. Jung S. J., Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.) // J. Fish Dis. 1995. Vol. 18. P. 211—220.
6. Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (cyprinid herpesvirus 2) in the USA: Molecular confirmation of isolates from diseased fish / Goodwin A. E. et al. // Aquat. Anim. Health. 2006. Vol. 18. P. 11—18.
7. Goodwin A. E., Merry G. E., Sadler J. Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent (cyprinid herpesvirus 2) in moribund and healthy goldfish: Validation of a quantitative PCR diagnostic method // Dis. Aquat. Org. 2006. Vol. 69. P. 137—143.
8. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp / Hedrick R. P. et al. // J. Aquat. Anim. Health. 2000. Vol. 12. P. 44—57.
9. Hanson L., Dishon A., Kotler M. Herpesviruses that Infect Fish // Viruses 2011. Vol. 3. P. 2160—2191.
10. Fijan N. N., Welborn T. L. J., Naftel J. P. An Acute Viral Disease of Channel Catfish // U. S. Fish and Wildlife Service Technical bulletin. 1970. № 43.
11. Wolf K., Darlington R. W. J. Channel catfish virus: A new herpesvirus of ictalurid fish // Virol. 1971. Vol. 8. P. 525—533.
12. Isolation of an herpesvirus in breeding catfish (*Ictalurus melas*) / Alborali L. et al. // Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 1996. P. 134—137.

13. Herpes-like virus in catfish *Ictalurus melas* (Italy) differs from ictalurid herpesvirus 1 (North America) / Hedrick R. P. et al. // Systemic Dis. Aquat. Org. 2003. Vol. 55. P. 85—92.
14. Hedrick R. P., Groff J. M., McDowell T. S. Isolation of an epitheliotropic herpesvirus from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) // Dis. Aquat. Org. 1991. Vol. 11. P. 49—56.
15. Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and subadult white sturgeon *Acipenser transmontanus* / Watson L. R. et al. // Dis. Aquat. Org. 1995. Vol. 22. P. 199—210.
16. Herpesvirus salmonis: Characterization of a new pathogen of rainbow trout / Wolf K. et al. // J. Virol. 1978. Vol. 27. P. 659—666.
17. Studies on a new virus (omv) from *Oncorhynchus masou*—I. Characteristics and pathogenicity / Kimura T. et al. // Fish Pathol. 1981. Vol. 15. P. 143—147.
18. Sano T. Viral diseases of cultured fishes in Japan // Fish Pathol. 1976. Vol. 10. P. 221—226.
19. McAllister P. E., Herman R. L. Epizootic mortality in hatchery-reared lake trout *Salvelinus namaycush* caused by a putative virus possibly of the herpesvirus group // Dis. Aquat. Org. 1989. Vol. 6. P. 113—119.
20. Epizootic epitheliotropic disease of lake trout (*Salvelinus namaycush*) / Bradley T. M. et al. // Dis. Aquat. Org. 1989. Vol. 7. P. 195—201.
21. Characterization of a novel alloherpesvirus from atlantic cod (*Gadus morhua*) / Marcos-Lopez M. et al. // J. Vet. Diagn. Invest. 2012. Vol. 24, № 1. P. 65—73.
22. Comparative analysis of a conserved gene block from the genome of the members of the genus ictalurivirus / Doszpoly A. et al. // Intervirology. 2011. Vol. 54. P. 282—289.
23. Molecular detection of a virus, pilchard herpesvirus, associated with epizootics in australasian pilchards *sardinops sagax neopilchardus* / Crockford M. et al. // Dis. Aquat. Org. 2005. Vol. 68. P. 1—5.

24. Epizootic mortality in the pilchard *sardinops sagax neopilchardus* in Australia and New Zealand in 1995 / Whittington R. J. et al. // *Dis. Aquat. Org.* 1997. Vol. 28. P. 1—16.
25. Epizootic mortality in the pilchard *sardinops sagax neopilchardus* in Australia and New Zealand in 1995 / Hyatt A. D. et al. // *Dis. Aquat. Org.* 1997. Vol. 28. P. 17—29.
26. Viral encephalitis of tilapia larvae: Primary characterization of a novel herpes-like virus / Shlapobersky M. et al. // *Virology.* 2010. Vol. 399. P. 239—247.
27. Characterization of herpes virus vitreum isolated from hyperplastic epidermal tissue of walleye, *Stizostedion vitreum vitreum* (Mitchill) / Kelly R. K. et al. // *J. Fish Dis.* 1983. Vol. 6. P. 249—260.
28. Yamamoto T., Kelly R. K., Nielsen O. Epidermal hyperplasias of Northern pike (*Esox lucius*) associated with herpesvirus and c-type particles // *Arch. Virol.* 1984. Vol. 79. P. 255—272.
29. Buchanan J. S., Madeley C. R. Studies on herpesvirus scophthalmi infection of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) ultrastructural observations // *J. Fish Dis.* 1978. Vol. 1. P. 283—295.
30. Subclinical herpesvirus infection in farmed turbot *scophthalmus maximus* / Hellberg H. et al. // *Dis. Aquat. Org.* 2002. Vol. 49. P. 27—31.
31. Viral diseases of fish: First report of carp pox in golden ide (*Leuciscus idus*) in North America / McAllister P. et al. // *J. Wildl. Dis.* 1985. Vol. 21. P. 199—204.
32. McArn G. E., McCain B., Wellings S. R. Skin lesions associated virus in pacific cod (*Gadus macrocephalus*) in the bering sea // *Fed. Proc.* 1978. Vol. 37. P. 937.
33. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // *The American journal of clinical hypnosis.* 1938. Vol. 27. P. 493—497.
34. Skin infection of the sheatfish (*Silurus glanis* L.) caused by a herpes virus / Bekesi L. et al. // *Fish, Pathogens, and Environment in European Polyculture Szarvas.* 1981. P. 58—69.

35. Anders K., Moller H. Spawning papillomatosis of smelt, *Osmerus eperlanus* L., from the elbe estuary // J. Fish Dis. 1985. Vol. 8. P. 233—235.
36. Jakob N., Kehm R., Gelderblom H. A novel fish herpesvirus *Osmerus eperlanus* // Virus Genes. 2010. Vol. 41. P. 81—85.
37. Morrison C. M., Leggiadro C. T., Martell D. J. Visualization of viruses in tumors of rainbow smelt *Osmerus mordax* // Dis. Aquat. Org. 1996. Vol. 26. P. 19—23.
38. Leibovitz L., Lebovitz S. S. A viral dermatitis of the smooth dogfish, *Mustelus canis* (Mitchill) // J. Fish Dis. 1985. Vol. 8. P. 273—279.
39. Shchelkunov I. S., Karaseva T. A., Kadoshnikov Y. U. P. Atlantic salmon papillomatosis: Visualization of herpesvirus-like particles in skin growths of affected fish // Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 1992. Vol. 12. P. 28—31.
40. Mellergard S., Bloch B. Herpesvirus-like particles in angelfish pterophyllum altum // Dis. Aquat. Org. 1988. Vol. 5. P. 151—155.
41. Kent M. L., Myers M. S. Hepatic lesions in a redstriped rockfish (*Sebastes proriger*) suggestive of a herpesvirus infection // Dis. Aquat. Organ. 2000. Vol. 41. P. 237—239.
42. The capsid architecture of channel catfish virus, an evolutionarily distant herpesvirus, is largely conserved in the absence of discernible sequence homology with herpes simplex virus / Booy F. P. et al. // Virology 1996. Vol. 215. P. 134—141.
43. McGeoch D. J., Rixon F. J., Davison A. J. Topics in herpesvirus genomics and evolution // Virus Res. 2006. Vol. 117. P. 90—104.
44. Davison A. J. Channel catfish virus: A new type of herpesvirus // Virology. 1992. Vol. 186. P. 9—14.
45. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide / Aoki T. et al. // J. Virol. 2007. Vol. 81. P. 5058—5065.
46. Partial genome characterization of acipenserid herpesvirus 2: Taxonomical proposal for the demarcation of three subfamilies in *Alloherpesviridae* / Doszpoly A. et al. // Arch. Virol. 2011. Vol. 156, № 12. P. 229—2296.

47. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts / Davison A. J. et al. // *J. Gen. Virol.* 2005. Vol. 86. P. 41—53.
48. The order herpesvirales / Davison A. et al. // *Arch. Virol.* 2009. Vol. 154. P. 171—177.
49. Davison A. J. Evolution of the herpesviruses // *Vet. Microbiol.* 2002. Vol. 86. P. 69—88.
50. Phylogenetic relationships in the family alloherpesviridae / Waltzek T. B. et al. // *Dis. Aquat. Org.* 2009. Vol. 84. P. 179—194.
51. A broadly applicable method to characterize large DNA viruses and adenoviruses based on the DNA polymerase gene / Hanson L. A. et al. // *Virol. J.* 2006. Vol. 3. P. 28.
52. Davison A. J. The genome of salmonid herpesvirus 1 // *J. Virol.* 1998. Vol. 72. P. 1974—1982.
53. First report of newly emerging viral disease of *Cyprinus carpio* species in Israel / Ariav R. et al. // *EAFP 9-th International Conference : proceed.* Rhodes, Greece, 1998. P. 36.
54. Hedrick R., Gilad O., Yun S. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult Koi, a strain of common carp // *J. Aqua. Anim. Health.* 2000. Vol. 12. P. 44—57.
55. Майстренко М. І. Біологічні властивості бірнавірусів // *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка.* Тернопіль : ТНПУ, 2013. Вип. 4 (57). С. 96—102. (Сер. Біологія).
56. Майстренко М. І. Емерджентна хвороба коропа // *Рибогосподарська наука України.* 2011. № 1. С. 104—106.
57. Hoffmann R. W., El-Matbouli M., Soliman H. Detection and isolation of RHV in Continental Europe // *International Workshop on koi herpesvirus : report.* London, 2004. P. 11.
58. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus / Pikarsky E. et al. // *Journal of Virology.* 2004. Vol. 78. P. 9544—9551.

59. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide / Aoki T. et al. // *Journal of Virology*. 2007. Vol. 81. P. 5058—5065.
60. The genome of cyprinid herpesvirus 3 encodes 40 proteins incorporated in mature virions / Michel B. et al. // *Gen. Virol.* 2010. Vol. 91. P. 452—462.
61. Ilouze M., Dishon A., Kotler M. Down regulation of the Cyprinid herpesvirus-3 annotated genes in cultured cells maintain at restrictive high temperature // *Virus Res.* 2012. Vol. 169. P. 289—295.
62. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis / Bercovier H. et al. // *BMC Microbiology*. 2005. Vol. 5. P. 13.
63. Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine / Perelberg A. et al. // *Vaccine*. 2005. Vol. 23. P. 3396—3403.
64. Miva S., Ito T., Sano M. Morphogenesis of koi herpesvirus observed by electron microscopy // *J. Fish Dis.* 2007. Vol. 30. P. 715—722.
65. Studies on a new virus (omv) from oncorhynchus masou—i. Characteristics and pathogenicity / Kimura T. et al. // *Fish Pathol.* 1981. Vol. 15. P. 143—147.
66. Koi herpesvirus: do acipenserid restitution programs pose a threat to carp farms in the disease-free zones / Kempter J. et al. // *Acta ichthyologica piscatoria*. 2009. Vol. 2. P. 119—126.
67. Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton / Minamoto T. et al. // *Researche in Veterinary Science*. 2010. Vol. 7. P. 6—11.
68. Siwicki A. K., Majewska T. Herpeswirusy a szczególnie koi herpes virus (KHV) nowe zagrozenie w hodowli karpia // *Choroby ryb*. 2002. P. 368— 371.
69. Differential resistance to koi herpes virus (KHV)/carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains and crossbreds / Shapira Y. et al. // *Aquaculture*. 2005. Vol. 245. P. 1—11.
70. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio* / Ronen A. et al. // *Vaccine*. 2003. Vol. 21. P. 4677—4684.

71. Evaluation of channel catfish virus latency on fingerling production farms in Mississippi / Thompson D. J. et al. // *J. Aquat. Anim. Health*. 2005. Vol. 17. P. 211—215.
72. Dixon R. A. F., Farber F. E. Channel catfish virus: Physicochemical properties of the viral genome and identification of viral polypeptides // *Virology*. 1980. Vol. 103. P. 267—278.
73. Chousterman S., Lacasa M., Sheldrick P. Physical map of the channel catfish virus genome: Location of sites for restriction endonucleases *eco* ri, *hind* iii, *hpa* i, and *xba* i // *J. Virol.* 1979. Vol. 31. P. 73—85.
74. Hanson L. A., Kousoulas K. G., Thune R. L. Channel catfish herpesvirus (ccv) encodes a functional thymidine kinase gene: Elucidation of a point mutation that confers resistance to *ara-t* // *Virology*. 1994. Vol. 202. P. 659—664.
75. Pope R. K., Scheetz R. W. Channel catfish virus: Interaction with the cytoskeleton // *J. Fish Dis.* 1998. Vol. 21. P. 433—442.
76. Productive infection of continuous lines of channel catfish leukocytes by channel catfish virus / Chinchar V. G. et al. // *Virology*. 1993. Vol. 193. P. 989—992.
77. Isolation of an IPN-like virus from adult kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) / Bovo G. et al. // *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 1984. Vol. 4(2). P. 21-25.
78. Histopathology and electron microscopy of channel catfish virus in infected channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) / Plumb J. A. et al. // *J. Fish. Biol.* 1974. Vol. 6. P. 661—664.
79. Wolf K., Herman R. L., Carlson C. P. Fish viruses: Histopathologic changes associated with experimental channel catfish virus disease // *J. Fish. Res. Board Can.* 1972. Vol. 29. P. 149—150.
80. Plumb J. A., Bowser P. R. Recent developments in channel catfish virus research // *Mar. Fish. Rev.* 1978. Vol. 40. P. 12—13.
81. Plumb J. A., Hilge V., Quinlan E. F. Resistance of the european catfish (*Silurus glanis*) to channel catfish virus // *J. Appl. Ichthyol.* 1985. Vol. 1. P. 87—89.

82. Boon J. H., McDowell T., Hedrick R. P. Resistance of the african (*Clarias gariepinus*) and asian catfish (*Clarias batrachus*) to channel catfish virus // *Aqua* (Oxf.). 1988. Vol. 74. P. 191—194.
83. Silverstein P. S., Bosworth B. G., Gaunt P. S. Differential susceptibility of blue catfish, *Ictalurus furcatus* (Valenciennes), channel catfish, *I. punctatus* (Rafinesque), and blue channel catfish hybrids to channel catfish virus // *J. Fish Dis.* 2008. Vol. 31. P. 77—79.
84. Kancharla S. R., Hanson L. A. Production and shedding of channel catfish virus (ccv) and thymidine kinase negative ccv in immersion exposed channel catfish fingerlings // *Dis. Aquat. Org.* 1996. Vol. 27. P. 25—34.
85. Isolation of channel catfish virus from channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), broodstock / Bowser R. P. et al. // *J. Fish Dis.* 1985. Vol. 8. P. 557—561.
86. Wise J. A., Bowser P. R., Boyle J. A. Detection of channel catfish virus in asymptomatic adult channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) // *J. Fish Dis.* 1985. Vol. 8. P. 485—493.
87. Detection of channel catfish virus DNA in latently infected catfish / Gray W. L. et al. // *J. Gen. Virol.* 1999. Vol. 80. P. 1817—1822.
88. Protective immunity induced by DNA vaccination of channel catfish with early and late transcripts of the channel catfish herpesvirus (ihv-1) / Nusbaum K. E. et al. // *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002. Vol. 84. P. 151—168.
89. Arnizaut A. B., Hanson L. A. Antibody response of channel catfish after channel catfish virus infection and following dexamethasone treatment // *Dis. Aquat. Org.* 2011. Vol. 95. P. 189—201.
90. Bandin I., Dopazo C. P. Host range, host specificity and hypothesized host shift events among viruses of lower vertebrates // *Veterinary Research.* 2011. Vol. 42. P. 67—83.
91. Noga E. J., Hartmann J. X. Establishment of walking catfish (*Clarias batrachus*) cell lines and development of a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) virus vaccine // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1981. Vol. 38. P. 925—929.

92. Zhang H. G., Hanson L. A. Deletion of thymidine kinase gene attenuates channel catfish herpesvirus while maintaining infectivity // *Virology*. 1995. Vol. 209. P. 658—663.
93. Vanderheijden N., Martial J. A., Hanson L. A. Channel catfish virus vaccine // *US*. 2001. Vol. 6. P. 322—793.
94. Harbottle H., Plant K. P., Thune R. L. DNA vaccination against channel catfish virus results in minimal immune response and is not efficacious against challenge // *J. Aquat. Anim. Health*. 2005. Vol. 17. P. 251—262.
95. Diseases of different aetiologies in salmonids in Ukraine / Matvienko N., Maistrenko M., Buchatsky L., Didenko A. // *Biologija*. 2019.v.65, N4. P.273—282.
96. VP1, the putative RNA — dependet RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles / Lombardo E. et al. // *J. Virol*. 1999. № 73. P. 6973—6983.
97. Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyplody dsRNA virus / Luque D. et al. // *Proc.Natl Acad. Sci*. 2009. № 106. P. 2148—2152.
98. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses / Coulibaly F. et al. // *Cell*. 2005. № 120. P. 761—722.
99. Pan J., Vakharia V. N., Tao Y. J. The structural of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology // *Proc. Natl Acad. Sci*. 2007. № 104. P. 7385—7390.
100. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequencws of genome segment A cDNA / Blake S. et al. // *Dis. Aquat Organ*. 2001. № 45. P. 89—102.
101. Biophysical and biochemical properties of an unusual birnavirus pathogenic for rotifers / Comps M. et al. // *Journal of General Virology*. 1991. № 72. P. 1229—1236.

102. The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral RNA-dependent RNA polymerases of an ancient lineage / Gorbalenya A. E. et al. // *J. Mol. Biol.* 2002. № 324. P. 47—62.

103. Apoptosis Precedes Necrosis of Fish Cell Line with Infectious Pancreatic Necrosis Virus Infection / Hong J-R., Lin T-L., Hsu Y-L., Wu J-L. // *Virology.* 1998. № 250. P. 76—84.

104. Incomplete dsRNA Genomes in Purified Infectious Pancreatic Necrosis Virus / Kordyban S. et al. // *Virology.* 1997. № 239. P. 62—70.

105. Mundt E., Vakharia V. N. Synthetic transcripts of double-stranded birnavirus genome are infectious // *Proc. Natl Acad. Sci.* 1996. № 93. P. 1131—1136.

106. Genome and polypeptides characterization of telline virus 1 reveals a fifth genetic cluster in the *Birnaviridae* family / Nobrion I. et al. // *Virology.* 2008. № 371. P. 350—361.

107. Pedersen T. Skjesol A., Jorgensen J. B. VP3, a Structural Protein of Infectious Pancreatic Necrosis Virus, Interacts with RNA-Dependent RNA Polymerase VP1 and with Double-Stranded RNA // *Journal of Virology.* 2007. № 12. P. 6652—6663.

108. Structure of birnavirus-like particles determined by combined electron cryomicroscopy and X-ray crystallography / Pous J. et al. // *Journal of General Virology.* 2005. № 86. P. 2339—2346.

109. Isolation of *Streptococcus agalactiae* and an aquatic birnavirus from doctor fish / Ruane N. M. et al. // *Irish Vet. Journal.* 2013. № 66. P. 16—19.

110. Espirito Santos virus: a new birnavirus that replicates in insect cells / Vancini R. et al. // *J. Virol.* 2012. № 86 (5). P. 2390—2399.

111. Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs / Wu Q. et al. // *Proc. Natl Acad. Sci.* 2010. № 107. P. 1606—1611.

112. Нові хазяї вірусу герпеса коропа третього типу (CyHV-3) / Гаврилова І. П., Майстренко М. І., Римар В. І., Рудь Ю. П., Бучацький Л. П. // *Наукові записки Тернопільського Ун-ту.* 2014. № 1. С. 16—20. (Серія Біологія).

113. Rud Yu. P., Maistrenko M. I., Buchatsky L. P. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from wild-life rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* in Western Ukraine // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Biology. 2013. Vol. 64. P. 63—65.

114. Rud Yu., Maistrenko M., Buchatsky L. Polymerase chain reaction for identification of Cyprinid Herpesviruses in Ukraine // Biotechnologia acta. 2018. Vol. 11, № 1. P. 58—63.

115. Рудь Ю. П., Майстренко М. І., Бучацький Л. П. Ампліфікація та аналіз нуклеотидної послідовності генів VP2 та NS вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, виділеного в Західній Україні // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. 2013. Вип. 4 (118). С. 34—40.

116. Experimental infection of brown trout (*Salmo trutta*), zebrafish (*Danio rerio*), and swan mussel (*Anodonta cygnea*) with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) / Rud Y. P., Maistrenko M. I., Zaloilo O. V., Liubchenko G. A., Buchatskiy L. P., Hrytsyniak I. I. // Agricultural Science and Practice. 2020. Vol. 7, No. 3. P. 31—39.

117. Експериментальне інфікування довгопалого річкового рака (*Pontastacus leptodactylus*) вірусом інфекційного панкреатичного некрозу / Рудь Ю. П., Майстренко М. І., Безусий О. Л., Бучацький Л. П. // Вісник проблем біології і медицини. 2014. Т. 1, вип. 4. С. 70—74.

118. Осадчая Л. М. Определение активности аминотрансфераз в тканях // Методы биохимических исследований (липидный обмен) / ред. Прохорова М. И. Ленинград : Ленинград. ун-т, 1982. С. 246—250.

119. Шатерников В. А. Унифицированные клинические лабораторные методы исследования // Лабораторное дело. 1976. № 12. С. 748—752.

120. Мальцев В. Н., Рудь Ю. П., Майстренко М. И. Результаты вирусологического инспектирования карповых рыбопитомников южных областей Украины // Біоресурси і віруси : конф. : матер. Київ, 2013. С. 51.

121. Viva S., Sano M. Morphogenesis of koi herpesvirus observed by electron microscopy // J. Fish Dis. 2007. Vol. 30, № 12. P. 715—722.

122. Майстренко М. І., Матвієнко Н. М., Бучацький Л. П. Електронна мікроскопія клітин нирок коропа (*Cyprinus carpio*), уражених СуHV-3 // Рибогосподарська наука України. 2012. № 1 (19). С. 97—100.

123. Ronen A., Perelberg A., Abramovitz J. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio* // Vaccine. 2003. P. 4677—4684.

124. KHV-sytuacja epizootyczna w Europie / Matras M. et al. // Chow karpia w Europie. Stan obecny, trudności, perspektywy. Olsztyn, 2011. P. 43—48.

125. Siwicki A. K., Terech-Majewska E. Herpeswirusy a szczególnie koi herpes virus (KHV) nowe zagrożenie w hodowli karpia // Choroby ryb. 2002. P. 368—373.

126. Ідентифікація вірусу СуHV3 методами електронної мікроскопії та полімеразної ланцюгової реакції / Майстренко М. І., Рудь Ю. П., Матвієнко Н. М., Холодна Л. С., Бучацький Л. П. // Доповіді НАН України. 2013. № 4. С. 139—143.

127. Major diseases of salmonids in Ukraine / Matvienko N., Maistrenko M., Buchatsky L., Didenko A. // FAO, International symposium on fisheries and aquatic science. 2016. P. 46.

128. Rud Yu., Maistrenko M., Buchatsky L. Characterization of an infectious pancreatic necrosis virus from rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) in West Ukraine // Virologica Sinica. 2015. № 30. P. 231—233.

129. Майстренко М. І., Рудь Ю. П., Бучацький Л. П. Накопичення IPNV на культурах клітин риби // Біологія тварин. 2014. Т. 16, № 4. С. 93—99.

130. Espinoza J. C., Cortés-Gutiérrez M., Kuznara J. Necrosis of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infected cells rarely is preceded by apoptosis // Virus Research. 2005. Vol. 109. P. 133—138.

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

132. 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) / Das B. K. et al. // Fish & Shellfish Immunology. 2007. Vol. 23. P. 825—830.

133. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay / Blake S. L. et al. // J. Clin. Microbiol. 1995. Vol. 33(4). P. 835—839.

134. Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses / Williams K. et al. // J. Clin. Microbiol. 1999. Vol. 37(12). P. 4139—4141.

135. Vestergaard-Jørgensen P. E., Bregnballe F. Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Denmark // Nord. Vet.-Med. 1969. Vol. 22.

136. Livingstone D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms // Mar. Pollut. Bull. 2001. 42, № 8. P. 656—666.

137. Berti P. J., Storer A. C. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases // J. Mol. Biol. 1995. Vol. 246. P. 273—283.

138. Fehrenbacher N., Jäättelä M. Lysosomes as targets for cancer therapy // Cancer Res. 2005. Vol. 65. P. 2993—2995.

139. Brunk U. T., Neuzil J., Eaton J. W. Lysosomal involvement in apoptosis // Redox Report. 2001. Vol. 6. P. 91—97.

140. Forghsgaard L., Wissing D., Mauch D. Cathepsin B act as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor // Cell Biol. 2001. Vol. 153, №5. P. 999—1010.

141. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases / Isahara K. et al. // Neuroscience. 1999. Vol. 91. P. 233—249.

142. Zhou Q., Salvesen G. S. Activation of pro-caspase-7 by serine proteases includes a noncanonical specificity. // Biochem. J. 1997. Vol. 324. P. 361—364.

143. Moore M. N. / Molecular and cellular pathology: summary // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1992. Vol. 91. P. 117—119.

144. Turk B., Turk D., Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers // Biochim. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1477. P. 98—111.

145. Roberg K., Kagedal K., Olinger K. Mikroinjection of cathepsin D induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts // *Am. J. Pathol.* 2002. Vol. 161. P. 89-96.
146. Lysosomal Protease Pathways to Apoptosis Cleavage of Bid, not Pro-Caspases, is the most likely route / Stoka V. et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 3149—3157.
147. Ostefeld M. S., Fehrenbacher N., Hoyer-Hansen M. Effective tumor cell death by  $\sigma$ -2 receptor ligand siramesine involves lysosomal leakage and oxidative stress // *Cancer Res.* 2005. Vol. 65. P. 8975—8983.
148. Lysosomal Membrane Permeabilization Induces Cell Death in a Mitochondrion-dependent Fashion / Boya P. et al. // *J. Exp. Med.* 2003, Vol. 197, P.1323-1334.
149. Guicciardi M. E., Leist M., Gores G. J. Lysosomes in cell death // *Oncogene.* 2004. Vol. 23. P. 2881—2890.
150. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non small lung cancer cells / Bröker L. et al. // *Cancer Res.* 2004. Vol. 64. P. 27—30.
151. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases / Kagedal K. et al. // *J. Biochem.* 2001. Vol. 359. P. 335—343.
152. Stage-specific expression of TNF regulates Bad/Bid—mediated apoptosis and secondary necrosis in birnavirus-infected fish cells / Wang W-L. et al. // *Plos one.* 2011. Vol. 6, iss. 2. e16740.
153. Nishimura Y., Kawabata T., Kato K. Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing *in vitro* // *Biochem. Biophys.* 1988. Vol. 261. P. 64—71.
154. Эпизоотологический метод исследования / Макаров В. В. и др. Санкт-Петербург : Лань, 2009. 224 с.
155. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi / Gilad O., et al. // *J.Gen. Virol.* 2003. Vol. 84. P. 2661–2668.

156. Hedrick R., Gilad O., Yun S. A herpes virus associated with mass mortality of juvenile and adult Koi, a strain of common carp // *J. Aqua. Anim. Health*. 2000. Vol. 12. P. 44—57.

157. Koi herpes virus: do acipenserid restitution programs pose a threat to carp farms in the disease-free zones? / Kempter J. et al. // *Acta ichthyologica piscatoria*. 2009. Vol. 2. P. 119—126.

158. Майстренко М.І., Бучацький Л.П. Біологія герпесвірусів риб // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. 2014. Вип. 3 (123). С. 19–35.

159. Effects of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus and Infectious Pancreatic Necrosis Virus Infection on Hematopoietic Precursors of the Zebrafish / LaPatra S. E. et al. // *Blood Cells Mol Dis*. 2000. Vol. 26. P. 445—452.

160. Dopaza C. P. The Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and its virulence determinants: What is known and what should be known // *Pathogens* 2020. Vol. 9. P. 94. doi:10.3390/pathogens9020094.

161. Xu X., Zhang L., Weng S. A zebrafish (*Danio rerio*) model of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) infection // *Virology*. 2008. Vol. 376. P. 1—12.

162. Study of the viral interference between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / Byrne N. et al. // *Fish Shellfish Immunol*. 2008. Vol. 24. P. 489—497.

163. Experimental transmission of Infectious Pancreatic Necrosis Virus from the Blue Mussel, *Mytilus edulis*, to cohabitating Atlantic Salmon (*Salmo salar*) smolts / Molloy S. D. et al. // *Appl Environ Microbiol*. 2013. Vol. 79(19). P. 5882—5890.

Додаток 1.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ  
ДИСЕРТАЦІЇ

**Статті в рецензованих журналах, що індексуються Scopus та Web of**

1. Characterization of an infectious pancreatic necrosis virus from rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) in West Ukraine // Yu. Rud, M. Maistrenko, L. Buchatsky // *Virologica Sinica*. 2015. N 30. P. 231–233. (Особистий внесок здобувача: Накопичення вірусу на культурах клітин, підбір та аналіз праймерів, постановка ПЛР, проведення електрофорезу).

2. Experimental infection of brown trout (*Salmo trutta*), zebrafish (*Danio rerio*), and swan mussel (*Anodonta cygnea*) with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) / Rud Y. P., Maistrenko M. I., Zaloilo O. V., Liubchenko G. A., Buchatskiy L. P., Hrytsyniak I. I. // *Agricultural Science and Practice*. 2020. Vol. 7, No. 3. P. 31—39. (Особистий внесок здобувача: інфікування раків та молюсків, підрахунок інфікованих тварин, проведення ПЛР).

**Статті у наукових фахових виданнях України  
(які входять до переліку ВАК/МОН України)**

1. Майстренко М.І. Емерджентна хвороба коропа / М.І. Майстренко // Рибогосподарська наука України. 2011. № 1. С. 104–106.

2. Майстренко М.І. Електронна мікроскопія клітин нирок коропа (*Cyprinus carpio*), уражених СуНВ-3 // М.І. Майстренко, Н.М. Матвієнко, Л.П. Бучацький // Рибогосподарська наука України. 2012. №1 (19). С. 97–100. (Особистий внесок здобувача: Проведення розтинів риб, розрізання нирок на частинки, фіксація препаратів для електронної мікроскопії, фотографування зображень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті для опублікування).

3. Майстренко М.І. Ідентифікація вірусу СуНВ3 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. (Особистий внесок здобувача: Проведення розтинів риб, розрізання нирок на частинки, фіксація препаратів для електронної мікроскопії, фотографування зображень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті для опублікування).

4. Майстренко, М. І. Біологічні властивості бірнаврусів / М. І. Майстренко // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Сер. Біологія. – Тернопіль : ТНПУ, 2013. Вип. 4 (57). С. 96–102.

5. Rud Yu., Maistrenko M., Buchatsky L. Isolation of IPNV from wild-life rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Western Ukraine // *The Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kiev. Biology*. 2013. № 3(65). P. 63—65. (Особистий внесок здобувача: Очистка вірусу, електронна мікроскопія, аналіз зображень).

6. Майстренко М. І., Драган Л. П., Рудь Ю. П. Вміст катепсину В у печінці райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) в динаміці вірусної інфекції // Біологія тварин. 2014. Т. 16, № 3. С. 85—90. (Особистий внесок здобувача: інфікування риб, постановка біохімічної реакції, підготовка статті для опублікування).

7. Майстренко М. І., Рудь Ю. П., Бучацький Л. П. Накопичення IPNV на культурах клітин риб // Біологія тварин. 2014. Т. 16, № 4. С. 93—99. (Особистий

*внесок здобувача: проводила культивування IPNV на культурах клітин риб різного походження, підготовка та стерилізація посуду, виготовлення фотографій, аналіз отриманих даних).*

8. Експериментальне інфікування довгопалого річкового рака (*Pontastacus leptodactylus*) вірусом інфекційного панкреатичного некрозу / Рудь Ю. П., Майстренко М. І., Безусий О. Л., Бучацький Л. П. // Вісник проблем біології і медицини. 2014. Т. 1, вип. 4. С. 70—74. *(Особистий внесок здобувача: інфікування раків, підрахунок інфікованих тварин, проведення ПЛР, підготовка статті для публікації).*

9. Нові хазяї вірусу герпеса коропа третього типу (CyHV-3) / І.П. Гаврилова, М.І. Майстренко, В.І. Римар, Ю.П. Рудь, Л.П. Бучацький // Наукові записки Тернопільського Ун-ту. Серія Біологія. 2014. №1. С. 16–20. *(Особистий внесок здобувача: доставка риб до лабораторії, проведення ПЛР, аналіз отриманих результатів, підготовка статті для публікації, підготовка патенту на винахід).*

10. Активність амінотрансфераз у печінці райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) під впливом вірусної інфекції / Драган Л. П., Майстренко М. І., Любченко Г. А., Рудь Ю. П., Бучацький Л. П. // Рибогосподарська наука України. 2015. № 3. С. 99—106. *(Особистий внесок здобувача: інфікування риб, постановка біохімічної реакції, підготовка статті для опублікування).*

11. Polymerase chain reaction for identification of Cyprinid Herpesviruses in Ukraine / Yu. Rud, M. Maistrenko, L. Buchatsky // Biotechnologia acta. 2018. Vol. 11. №1. P. 58–63. *(Особистий внесок здобувача: Підбір та аналіз праймерів, постановка ПЛР, проведення електрофорезу).*

#### **Статті в іноземних виданнях:**

1. Майстренко М.І. Влияние IPNV на активность аспаратаминотрансферазы в перевиваемой культуре клеток рыб / М.И. Майстренко, Л.П. Драган, Ю.П. Рудь // Труды НИИЖК. – 2014. Вып. 7. Т. 2. С. 389–392. *(Особистий внесок здобувача: інфікування риб, постановка біохімічної реакції, підготовка статті для опублікування).*

2. Matvienko N., Maistrenko M., Buchatsky L., Didenko A. / Diseases of different aetiologies in salmonids in Ukraine. // Biologija. 2019.v.65. N4. P.273282. *Особистий внесок здобувача: збір матеріалу, обробка результатів та підготовка статті для опублікування).*

#### **Статті в інших виданнях:**

1. Бучацький Л.П. Застосування ПЛР для діагностики вірусу герпесу коропа кої / Л.П. Бучацький, Н.М. Матвієнко, М.І. Майстренко, І.П. Гаврилова, В. Панасенко // Ветеринарна медицина України. 2011. № 1. С. 38–39. *(Особистий внесок здобувача: доставка риб до лабораторії, проведення ПЛР, аналіз отриманих результатів, підготовка статті для публікації, підготовка патенту на винахід).*

2. Рудь Ю.П. Ампліфікація та аналіз нуклеотидної послідовності генів VP2 та NS вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, виділеного в Західній Україні /

Ю.П. Рудь, М.І. Майстренко, Л.П. Бучацький // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. 2013. Вип. 4 (118). С. 34–40. (*Особистий внесок здобувача: інфікування риб, постановка ПЛР, підготовка статті для опублікування*).

3. Майстренко М.І. Біологія герпесвірусів риб / М.І. Майстренко, Л.П. Бучацький // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2014. – Вип. 3 (123). – С. 19–35. (*Особистий внесок здобувача: підбір та аналіз літератури, підготовка статті для опублікування*).

#### **Патенти:**

1. Бучацький Л.П., Матвієнко Н.М., Майстренко М.І. Штам герпесвірусу Коі (KHV) ІМВ V-4 для отримання вакцини проти вірусу герпеса Коі : патент України на корисну модель № 79945; заявл. 26.10.2012; опубл. 13.05.2013, Бюл. № 9.

2. Рудь Ю.П., Майстренко М.І. Штам вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізолят «Карпати» (IPNV “Karpaty”), для отримання вакцини проти інфекційного некрозу підшлункової залози лососевих : патент України на корисну модель №88693; заявл.06.11.2013; опубл. 25.03.2014, Бюл. № 6.

#### **Матеріали конференцій та тези доповідей:**

1. Майстренко М.І. Електронна мікроскопія клітин нирок коропа, уражених герпесвірусом коі / М.І. Майстренко, Л.П. Бучацький // Збірник тез Міжнар. наук. конф. «Молодь і поступ біології». Львів, 2012. С. 233–239.

2. Рудь Ю.П. Аналіз нуклеотидних послідовностей фрагментів сегменту А українського ізоляту вірусу інфекційного панкреатичного некрозу. / Ю.П. Рудь, М.І. Майстренко, Н.М. Матвієнко, Л.П. Бучацький // Тези доповіді конф. «Біоресурси і віруси». – Київ, 2013. – С. 57.

3. Мальцев В.Н. Результати вірусологічного інспектирування карпових рыбовитомников южных областей Украины. Мальцев В.Н., Рудь Ю.П., Майстренко М.І. «Біоресурси і віруси». – Київ, 2013. – С. 51.

4. Рудь Ю.П. Филогенетический анализ вируса инфекционного панкреатического некроза, выделенного в естественных водоемах западной части Украины / Ю.П. Рудь, М.І. Майстренко, Н.М. Матвієнко, Л.П. Бучацький // Материалы 4-й научно-практической конференции «Современные проблемы и перспективы рыбохозяйственного комплекса». – Москва, 2013. С.106–108.

5. Рудь Ю.П. Диагностика вируса инфекционного панкреатического некроза методом полимеразной цепной реакции / Ю.П. Рудь, М.І. Майстренко, Л.П. Бучацький. // Труды научной конф. «Водные биоресурсы аквакультура и экология водоемов». – 2013. – Калининград. С. 278–281.

6. Драган Л.П., Майстренко М.І., Рудь Ю.П. / Вплив IPNV на вміст катепсину В у печінці райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*). // Матеріали III міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих учених Донецьк. 2014. С.110.

7. Matvienko N., Maistrenko M., Buchatsky L., Didenko A. / Major diseases of salmonids in Ukraine. // FAO, International symposium on fisheries and aquatic science. 2016. P. 46.

