

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Будзанівська І. Г.

Протокол №_____ засідання кафедри

від “_____” _____ 2023р.

**МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ВІРУСУ ВЕСНЯНОЇ
ВІРЕМІЇ КОРОПА (SVCV), ІЗОЛЯТ VN17**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія»
Тепленко Юлії Геннадіївни
Науковий керівник від кафедри
д.б.н, доц. Шевченко Т.П.

Робота виконана базі Інституту рибного господарства НААН України під керівництвом к. б. н. Рудь Ю.П.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

SVCV - Spring Viraemia of Carp Virus - (вірус весняної віремії коропа)

RNA - Ribonucleic acid - (рибонуклеїнова кислота)

CPE - Cytopathic effect - (цитопатична дія)

EPC - Epithelioma papulosum cyprini - (епітеліальна папілома коропа)

RT-qPCR - Quantitative reverse transcription PCR - (Кількісна ПЛР зворотної транскрипції)

TCID - Tissue Culture Infectious Dose - Інфекційна доза культури тканин

PFR - pike fry rhabdovirus - (рабдовірус мальків щуки)

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay - (імуноферментний аналіз)

МЕБ - Міжнародне епізоотичне бюро

LAMP - Loop-mediated isothermal amplification - (Петльова опосередкована ізотермічна ампліфікація)

PD - Proportionate distance - (Пропорційна відстань)

ED - Exponential of dilution - (Експонента розведення)

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика вірусу весняної віремії коропа.....	7
1.1. Молекулярно-біологічна характеристика SVCV.....	7
1.2. Епідеміологія SVCV.....	11
1.3. Діагностика SCVC.....	13
1.4. ПЛР діагностика вірусу весняної віремії коропа.....	16
1. 5. Філогенетика SVCV.....	20
1.6. SVCV у культурі клітин.....	23
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження.....	28
2.1. Матеріали дослідження.....	28
2.2. Методи дослідження.....	28
2.2.1. Отримання очищеної вірусної суспензії шляхом диференційного центрифугування	28
2.2.2. Зараження та культивування вірусу весняної віремії коропа у культурі клітин EPC.....	29
2.2.3. Визначення інфекційного титру вірусу у культурі клітин	30
2.2.4. Електронна мікроскопія.....	32
2.2.5. ЗТ-ПЛР та подальше секвенування гену глікопротеїну.....	33
2.2.6. Методи генетичного аналізу.....	34
2.2.7. Методи філогенетичного аналізу.....	35
РОЗДІЛ 3. Результати та їх обговорення.....	36
3.1 Вивчення цитопатичної дії ізоляту VN17 SVCV на культурі клітин EPC.....	36
3.2. Визначення інфекційного титру вірусу у культурі клітин EPC.....	40
3.3 Вивчення морфології віріона ізоляту VN17 SVCV.....	42
3.4 Філогенетичний аналіз гену G вірусу весняної віремії коропа.....	43

3.5. Генетична характеристика гену G ізоляту вірусу весняної віремії коропа та його філогенетичний аналіз.....	45
ВИСНОВКИ.....	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	52

ВСТУП

На сьогодні аквакультура є однією з найбільш перспективних галузей тваринництва. Це пояснюється швидким темпом її розвитку та тим, що аквакультура може забезпечити приблизно 40% світового постачання рибної продукції. Загалом, на сьогодні у рибній промисловості Європи зайнято близько 100 000 осіб, а бюджет цієї галузі становить біля 7 мільярдів євро. За рахунок цього рибництво стає все більш цінним для харчової промисловості напрямком, який потенційно може задовольнити потребу у важливому для людини тваринному білку, при цьому не завдаючи шкоди природним ресурсам. На тлі збільшення населення світу це має особливе значення [1,2].

Проте інфекційні хвороби є одним з найбільших обмежувальних факторів у виробництві риби, а наслідки захворювань можуть коштувати сектору до 20% вартості продукції. Серед коропових риб вірус весняної віремії коропа (SVCV) є особливо небезпечним. Ця хвороба є ендемічною в Європі, Америці та кількох азіатських країнах, де вона зумовлює значну захворюваність і смертність серед риб. Згідно з класифікацією Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ), SVCV належить до особливо небезпечних вірусів риб. У аквакультурі спалахи захворювання виникають навесні на фоні техногенних стресів. При цьому загибель риби, особливо цього- та дволіток, може сягати від 30 до 90% в залежності від різних умов [1].

На жаль, SVCV не можна ефективно лікувати або запобігти хворобі за допомогою вакцини, тому важливо контролювати спалахи захворювання та вивчати характеристики та властивості цього вірусу. Також через тісний контакт риб, як один з одним в межах аквакультури, так і з навколишнім середовищем, існує вірогідність виникнення складних епізоотичних ситуацій, які в свою чергу можуть вплинути на рибництво. Таким чином, вірусні захворювання можуть мати доволі значний економічний вплив на рибне господарство. Так наприклад, у період між 1998 та 2002 роками було

зафіксовано спалахи SVCV в рибних господарствах Європи та Америки, які зрештою призвели до значних економічних збитків[]. Але незважаючи на високий вплив епізоотій на рибне виробництво, на сьогоднішній день інформація про механізми патологічного процесу, передачі, фактори вірулентності, імуногенності та молекулярно-біологічні властивості вірусу весняної віремії коропа риб є недостатньою.

Отже, метою роботи було вивчити молекулярно-біологічні властивості вірусу весняної віремії коропа (SVCV), ізоляту VN17.

Для досягнення цієї мети, потрібно було вирішити наступні завдання:

1. Дослідити біологічні властивості ізоляту VN17 на культурі клітин епітеліальної папіломи коропа EPC;
2. Визначити морфологію та розміри віріонів ізоляту VN17;
3. Провести філогенетичний аналіз гену G вірусу весняної віремії коропа.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ ВЕСНЯНОЇ ВІРЕМІЇ КОРОПА

1.1. Молекулярно-біологічна характеристика SVCV

Весняна віремія коропа - це хвороба, яка вражає карпових риб, зокрема коропа звичайного (*Cyprinus carpio*), та супроводжується різноманітними геморагічними симптомами, що може призвести до летальних наслідків у до 90% випадків [1]. Ця хвороба є ендемічною у Європі, Америці та кількох азіатських країнах, і становить значну загрозу для рибництва, оскільки може спричинити значну захворюваність та смертність риб, що зрештою призводить до економічних втрат [3]. Весняна віремія коропа є однією з дев'яти вірусних хвороб риб, які визнані Міжнародним епізоотичним бюро як значущі хвороби тварин. На жаль, на сьогоднішній день не існує ефективних препаратів для лікування цієї хвороби [4].

Збудником весняної віремії коропа є вірус весняної віремії коропа (SVCV), який належить до роду *Vesiculovirus* та родини *Rhabdoviridae*. Цей вірус має кулевидну морфологію та розміри 80-180 нм в довжину та 60-90 нм в діаметрі. Геном SVCV складається з лінійної одноланцюгової РНК негативного сенсу (-ssRNA) довжиною близько 11 кб. Лідерна послідовність з 56 нуклеотидів знаходиться на 3'-кінці геному, за якою слідує універсальний консенсусний старт-сигнал для початку транскрипції. Геном SVCV кодує п'ять структурних білків - нуклеопротеїн (N), фосфопротеїн (P), матричний білок (M), глікопротеїн (G) та РНК-залежну РНК-полімеразу (L) - в наступному порядку: 3'-N-P-M-G-L-5' (Рис. 1.1)[4].

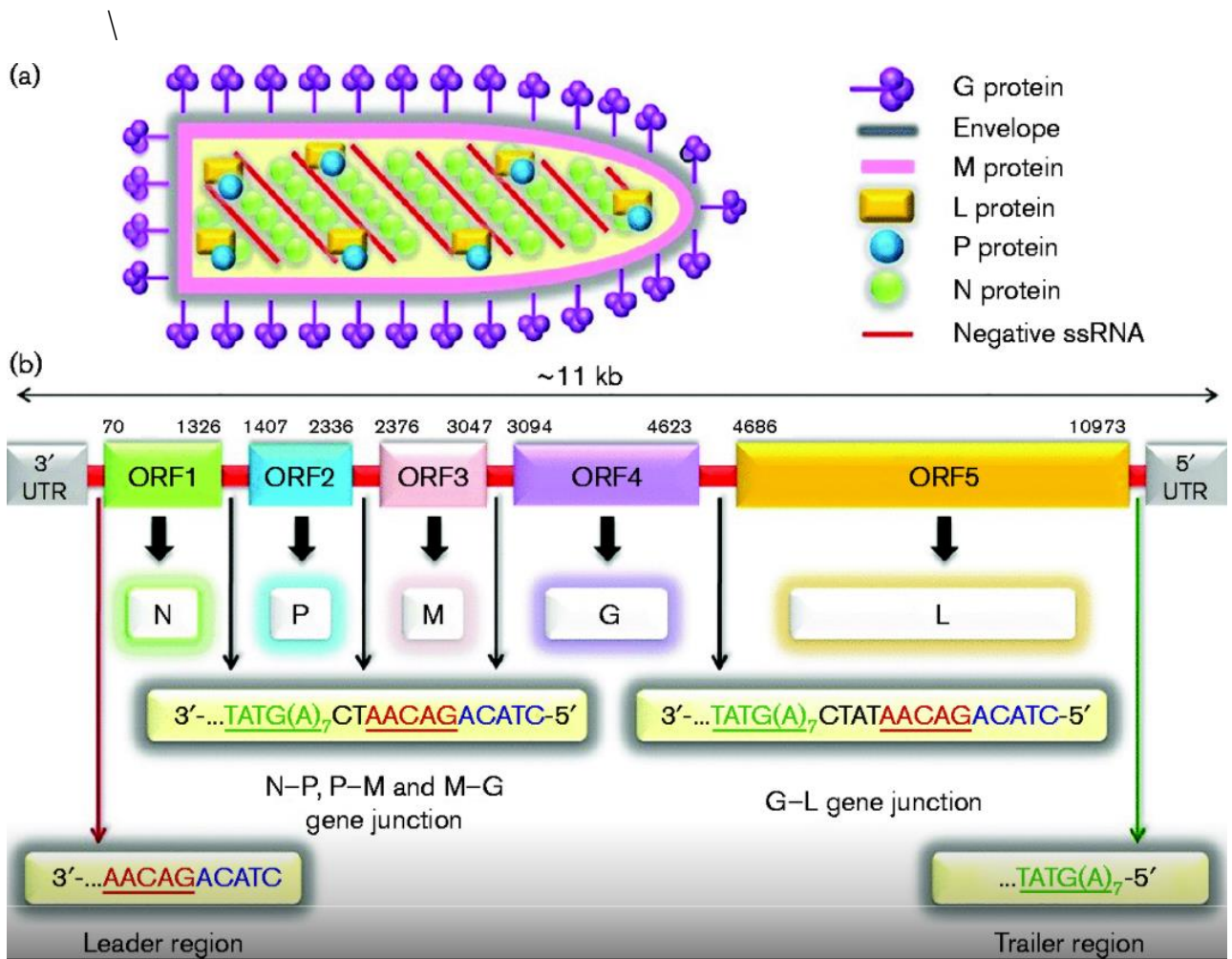


Рис. 1.1. Схема будови віріону SVCV та його геному. А - модель будови віріону, В - організація геному [4].

Білки ж, що заковані у вірусному геномі, виконують різноманітні функції, деякі з яких ще достеменно невідомі [4-10]:

- Білок N (нуклеопротеїн)

Нуклеопротеїн є найбільш поширеним білком віріону, який взаємодіє з вірусною РНК, утворюючи спіральну структуру нуклеокапсиду, а також відіграє важливу роль у модуляції транскрипції. Близько 1/3 білка N пов'язано з вірусною РНК. Окрім цього нуклеопротеїн утворює комплекс із РНК-залежною РНК-полімеразою вірусу та фосфопротеїном, утворюючи нуклеокапсид віріону, також цей комплекс потрібен для нормальної транскрипції геному під час інфекції.

- Білок Р (фосфопротеїн)

Протеїн Р є поліфункціональним та бере участь у різноманітних процесах під час інфекції. Складається він з центрального, N- та С-кінцевих доменів (Рис. 1.2). Фосфопротеїн SVCV бере участь у транскрипції та реплікації вірусного геному. Окрім цього фосфопротеїн допомагає вірусу уникнути імунної відповіді організму хазяїна, зокрема через інтерферон. Так, у роботі [6] було показано що порушення димеризації центрального демену Р протеїну зменшувало інгібування синтезу IFN ϕ 1 та IFN ϕ 3 при інфекції SVCV.

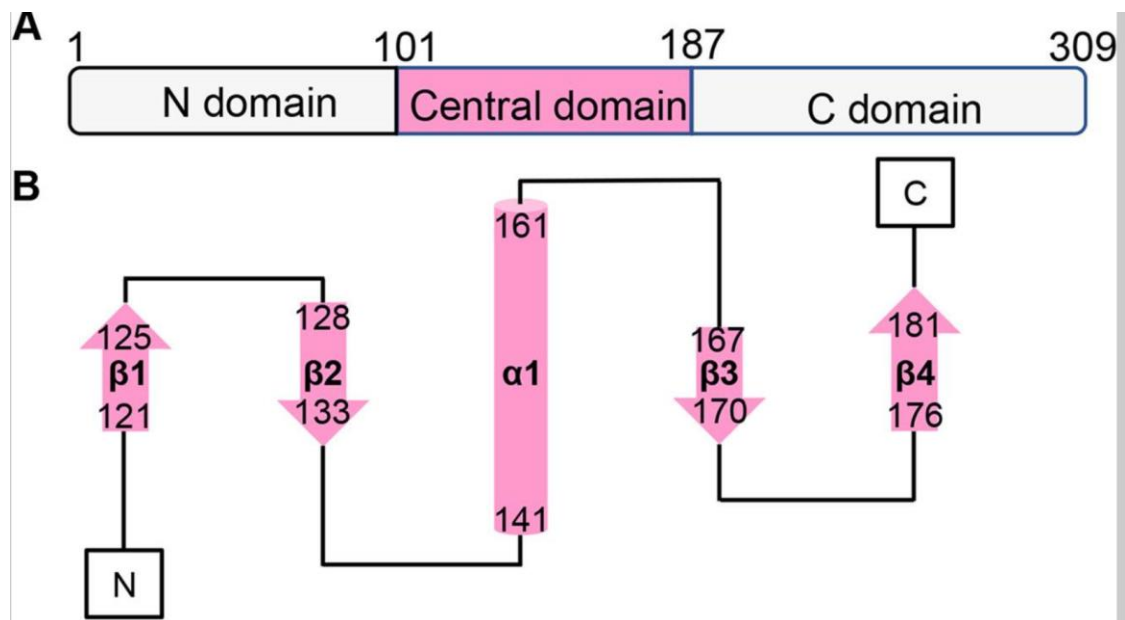


Рис.1. 2. Структура SVCV протеїну Р. (А) Доменна організація білка SVCV Р. (В) Топологічна схема фосфопротеїну SVCV [6].

- Білок L

Білок L є РНК-залежною РНК-полімеразою, та здійснює транскрипцію та реплікацію вірусу SVCV, він складається з 2095 амінокислот з молекулярною масою 238 кДа [7].

- Білок G

Білок G утворює тримерні пепломери або шипи на поверхні вірусу, які зв'язуються з клітинними рецепторами, та індукують вірусний ендоцитоз. Він також містить нейтралізуючі епітопи і є потенційною мішенню для ДНК-вакцин. Поки що білки G діють як найважливіший антиген для визначення

серологічних властивостей рабдовирусів. G-білок є імунозахисним антигенним білком для SVC, ген кодуєчий білок G використовується для ідентифікації генотипу SVCV [4].

- Білок M

Білок M є білком що утворює матрикс віріону та складається з 223 амінокислот. Попередні дослідження повідомляли, що білок M може викликати апоптоз та відігравати важливу роль у цитопатичному ефекті. Окрім цього білок M також може пригнічувати транскрипцію клітин-хазяїв та передбачається що він бере участь у самозбирці вірусу [9].

Життєвий цикл вірусу хоч ще не досить вивчений, але проходить за наступними основними етапами [4]:

- Прикріплення G протеїну до вірусних глікопротеїнів до рецепторів опосередковує клатрин-опосередкований ендцитоз вірусу в клітину-хазяїна.
- Злиття вірусної мембрани з мембраною везикул; звільнення нуклеокапсиду в цитоплазму.
- Послідовна транскрипції, вірусні мРНК кеповані і поліаденільовані за допомогою полімеразного “буксування” в цитоплазмі.
- Реплікація ймовірно починається, коли у цитоплазмі накопичується достатня кількість нуклеопротеїнів для інкапсидзації ново-синтезованих антигеномів і геномів.
- Рибонуклокасид зв'язується з білком матриксу і брунькується через хазяйські ESCRT комплекси з плазматичної мембрани, звільняються нові віріони

1.2. Епідеміологія SVCV

Вірус SVCV є вірусом риб, який признаний Міжнародним епізоотичним бюро як здатний викликати помітні хвороби тварин. Тому, в разі виявлення цього вірусу, відповідно до правил Міжнародного епізоотичного бюро, повідомлення про це повинно бути здійснене протягом 48 годин. З огляду на те, що SVCV може заражати як промислові, так і декоративні види риб, його поширення може призвести до значних економічних втрат. Вірус був виявлений у різних країнах, зокрема в США, Великобританії, Данії, Німеччині, Нідерландах, Австрії, Іспанії, Франції, Чехії, Україні, Китаї та інших[11].

Існує низка факторів, які можуть впливати на ризик зараження риб та тяжкість перебігу хвороби, серед них: [12]:

- Вікова структура популяції риб
- Щільність популяції
- Сезон
- Температура
- Імунітет хазяїна
- Стресові фактори
- Наявність переносників
- Та інше.

Спалахи весняної віремії коропа зазвичай спостерігаються в період весни, коли температура води починає підвищуватися після холодної зими. Так, риби зазвичай інфікуються, коли температура води знаходиться в діапазоні від 10 до 17 градусів. Саме в цьому діапазоні температур зафіксовано найвищий рівень смертності риб, при чому серед молодих риб цей показник може сягати 70-90%, у той час як у дорослих це число становить приблизно 30%[12].

SVCV має різні резервуари в природі, серед яких хворі риби, коропа, що пережили епізоотію, та інші види риб, які можуть служити переносниками

вірусу. Вірус може передаватись від зараженої риби через її фекалії та сечу, а також через кровоссальних паразитів, таких як п'явки чи коропові воші. Крім того, інфекція SVCV може розповсюджуватись через фоміти та паразитичних безхребетних. Це призводить до того, що SVCV є дуже стійким до знищення та важко піддається контролю після того, як він з'явився в водоймах. Навіть знищення всіх водних організмів не може гарантувати повного знищення вірусу. Окрім того, існує ризик передачі вірусу через обладнання на рибних підприємствах[1].

Заголом, інфекція SVC супроводжується різноманітними внутрішніми та зовнішніми симптомами у заражених риб У коропа найбільш поширеними зовнішніми ознаками зараження SVCV є [8, 12]:

- Петехіальні крововиливи в шкіру, зябра;
- Екзотальмія;
- Здуття живота;
- Зміни у поведінці;
- Бліді зябра;
- Запалений або набряклий отвір.
- Перитоніт;
- Асцит;
- Катаральний і геморагічний ентерит;
- набряк нутрощів;
- Петехіальні крововиливи внутрішньої стінки плавального міхура та скелетних м'язів .



Рис. 1. 3. SVCV-інфікований короп з петехіальними крововиливами в м'язах, плавальному міхурі, збільшеній селезінці, набряклих органах і бліді зябрах з крововиливами [12].

Фактори, що можуть впливати на вираженість симптомів та рівень смертності від SVC, можуть бути різноманітними. Серед них вторинні та супутні бактеріальні або паразитарні інфекції, фактори зовнішнього середовища, а також неспецифічний імунітет, такий як інтерферон, або специфічний імунітет, такий як гуморальні антитіла та клітинний імунітет хазяїна. [4].

Отже, зважаючи на епідемічні та патогенні характеристики вірусу весняної віремії коропа, поширення SVCV на нові території та господарські сектори може становити значну загрозу не тільки для промисловості з торгівлі морепродуктами та декоративної риби, але й для місцевих популяцій диких риб.

1.3. Діагностика SCVC

Оскільки SCVC є висококонтагіозною хворобою з доволі великим відсотком смертності серед молодняка коропа та підлягає звіту МЕБ, її

діагностика є важливою. Вона може мати велике значення як для окремих рибних господарств, так і для прийняття рішень щодо торгівлі та надання статусу щодо захворювання на рівні країни чи певного регіону. Якщо лабораторія не володіє необхідними методами, які здатні достеменно підтвердити випадок зараження весняною віремією коропа, вона повинна звернутися за порадою до відповідної референс-лабораторії МЕБ. У випадках, коли зразки, що отримані в країні чи регіоні вільному від патогену, виявляються позитивними на вірус, то рекомендується негайно їх направити до референс-лабораторій МЕБ [12].

Загалом, методи що доступні для діагностування весняної віремії коропа на цей час, можуть забезпечувати моніторинг явно здорових популяцій та підтвердження випадків зараження.

Для того щоб ідентифікувати підозру на SVCV можна використати наступні методи [12-16]:

- Традиційна RT-PCR;
- ELISA;
- Імуногістохімічне дослідження;
- Використання культур клітин;

Для первинної діагностики також можна використати наявність клінічних ознак у риби, що можуть включати різноманітні зовнішні симптоми (екзотальмія, здуття живота, крововиливи на очах тощо), зміни у поведінці (швидкість плавання та частота дихання поступово сповільнюються, млявість і т.п.) та гістопатологію (набряковий периваскуліт в печінці та судинах, перикардит та інфільтрація міокарда та ін.). Цього може бути достатньо для того щоб звузити коло можливих діагнозів, але оскільки подібна клінічна картина характерна і для інших захворювань (так наприклад краснуха коропа, що включає скуйовдження луски, водянку, екзофтальмію, геморагії на поверхні тіла, може викликатись окрім весняної віремії також бактеріями роду *Aeromonas* чи *Pseudomonas*), а у деяких риб навіть при наявності вірусу в

організмі може бути не повний спектр симптомів, то більш повна діагностика потребує застосування лабораторних методик, які напряму підтвердили наявність вірусу [4, 8, 12, 16].

Інші групи методів ж мають як певні переваги, так і недоліки. Так, серологічні методи що включають ІФА, РН, РІФ тощо, не дивлячись на відносну зручність при рутинній діагностиці, через схожість антигенних детермінат вірусу весняної віремії коропа з іншими рабдовірусами риб, а особливо рабдовірусом мальків щуки, можуть давати хибнопозитивні результати [16, 17]. Через це ці методи потребують підбору підходящої сироватки. Також серологічні методи підходять для виявлення в організмі антитіл до SVCV, що можна використовувати у епідеміологічних дослідженнях та/чи моніторинзі, але не є прямим свідчення наявності безпосередньо вірусу у риб [16, 18].

Молекулярні методики навпаки, хоч і є трудомісткими та потребують стерильності, є більш специфічними та чутливими. Але через те що, рабдовіруси мають доволі великий рівень генетичної мінливості, результат ПЛР може виявитись хибнонегативним через мутації в ділянках геному до якої приєднується праймер [16, 19].

Найбільш надійним і рекомендованим МEB є метод виділення вірусу в культурах клітин EPC чи FHM. Так, моношар клітин інокують розведенням гомогенату органу отриманого від хворої риби, інкубують та моніторять протягом 7 днів. Позитивним результат буде вважатися при наявності характерної ЦПД, а саме відшаруванням та лізисом клітин. Якщо протягом 7 днів ЦПД не було виявлено, при потребі остаточно впевнитись у відсутності чи наявності вірусу, культуру клітин заражену вірусом залишають ще на 7 днів. Після цього для ідентифікації використовують ЗТ-ПЛР та подальший сіквенс отриманого продукта ампліфікації. Лише після цього випадок зараження вірусом весняної веремії коропа вважається повністю підтвердженим [16].

1.4. ПЛР діагностика вірусу весняної віремії коропа

ПЛР представляє собою молекулярний метод, що дозволяє швидко ампліфікувати велику кількість копій ДНК з вихідного фрагменту нуклеїнової кислоти. Принцип методу полягає у використанні праймерів - невеликих фрагментів ДНК, комплементарних до потрібної ділянки гену, як з 3'-, так і з 5'-кінця, - та ДНК-полімерази, яка використовує місця спайки праймера та цільового фрагменту ДНК, як затравки для початку ферментативної реакції, внаслідок якої між двом ділянками з комплементарно приєднаними праймерами, утворюється новий ланцюг. Для того щоб праймери змогли комплементарно приєднатися до потрібної ділянки, вихідна ДНК має денатурувати на два окремі ланцюги, саме тому ПЛР складається з повторюваних температурних циклів, кожен з яких ділиться як правило на 3 основні стадії [17].

Оскільки ПЛР можливо використовувати для ідентифікації навіть невеликої кількості нуклеїнових кислот, цей метод є доволі широко використовуваним у вірусології, як для дослідницьких, так і для діагностичних цілей. ПЛР дозволяє швидко і високоспецифічно діагностувати інфекційні захворювання викликані вірусами, шляхом детекції вірусної ДНК, за умови використання специфічних праймерів. Окрім цього вона також здатна ідентифікувати вірусну РНК, завдяки варіанту ПЛР - ЗТ-ПЛР, де фермент зворотної транскриптази використовується для створення послідовності на матриці РНК відповідної ДНК, яка вже потім ампліфікується у класичному ПЛР [18-21]. Так, Висока чутливість ПЛР дозволяє виявити вірус незабаром після зараження і навіть до початку захворювання, що допомагає моніторингу поширення збудника хвороби серед популяцій домашніх або диких тварин. Також ПЛР може використовуватись для накопичення матеріалу для секвінування, що є корисно як для

фундаментальних, так і для епідеміологічних досліджень, для наприклад вивчення походження того чи іншого штаму вірусу на певній території, тощо [20].

Для ідентифікації SVCV рекомендованим ОІЕ методом є комбінація ЗТ-ПЛР з гніздовою ПЛР націленою на ген G, що кодує поверхневі тримерні пепломери вірусного капсиду. Гніздова ПЛР це модифікація класичної ПЛР, яка проходить у два етапи, у яких використовуються дві різні пари праймерів. Так, перший етап виконується з праймерами, які охоплюють як цільовий ген, так і певну ділянку біля гену, яка при цьому фланкує обидва кінці цільової послідовності. У другому ж етапі беруть участь амплікони, що є продуктами першої реакції ПЛР, але тепер з ними зв'язується пара праймерів, яка охоплює лише цільову послідовність. Дана модифікація зменшує ступінь неспецифічного зв'язування, внаслідок того що значна кількість продуктів реакції першого етапу містить переважно цільовий фрагмент з фланкуючою його ділянкою, що врешті збільшує чутливість та специфічність методу [21-23].

Для детекції вірусу за допомогою ПЛР використовується або супернатант отриманий з клітинних культур, що демонструють характерне для вірусної інфекції СРЕ, або гомогенат тканини риби у якої є підозра на інфекцію. Загалом, якщо вірусний СРЕ є яскраво вираженим, то для ідентифікації SVCV можна використати і звичайний варіант ЗТ-ПЛР, який проводиться із використанням праймерів SVCV F1 та SVCV R2. У випадку коли СРЕ у культурі невеликий чи коли треба остаточно впевнитись у відсутності вірусу, після використання ЗТ-ПЛР рекомендується використовувати додатково напівгніздовий аналіз із використанням праймерів SVCV F1 та SVC R4. Комбінований метод проводиться із позитивними та негативними контролями на кожному з етапів, та через свою багато

стадійність та чутливість до контамінації потребує проведення окремих, просторово розділених ділянок для кожного з етапів аналізу [22].

Окрім звичайної ЗТ ПЛР та ЗТ-ПЛР комбінованої з гніздовою ПЛР, для детекції SVCV можна використовувати і інші молекулярні методики. Хоча ОЕІ не рекомендує їх використовувати, оскільки вони не є достатньо валідованими, вони можуть бути доволі перспективними та мати певні переваги над вже вище згаданими методиками. Серед подібних методів LAMP та кількісна Real Time PCR [25-27].

LAMP (Петльова опосередкована ізотермічна ампліфікація) це відносно нова методика, яка все ще має за основу реакцію полімеризації із застосуванням полімерази, але передбачає застосування декількох наборів праймерів та проведення реакції в ізотермічних умовах. Реакція LAMP використовує пари внутрішніх і зовнішніх праймерів. Кожен із внутрішніх праймерів має послідовність, комплементарну одному ланцюгу ділянки ампліфікації на 3'-кінцях і ідентичну внутрішній ділянці того самого ланцюга на 5'-кінцях [26, 27]. Так, цей метод працює на фундаментальному принципі виробництва великої кількості продуктів ампліфікації ДНК із взаємно комплементарною послідовністю та змінною, повторюваною структурою. LAMP може ампліфікувати кілька копій ДНК. Візуалізацію ампліфікації можна здійснити неозброєним оком за допомогою барвників [26].

Так, у дослідженні [26] було розроблено діагностичний інструмент для виявлення SVCV на основі RT-LAMP. Тест був націлений на G ген вірусу, і відповідно під нього було сконструйовано 4 набори праймерів. У дослідженні підбирались умови проведення реакції, а також власне чутливість та специфічність. Так умови були оптимізовані до проведення тесту при 65 градусах впродовж 60 хвилин. Специфічність оцінювали відносно 4 різних

штамів рабдовірусів риб, які зрештою не прореагували у реакції. Крім цього RT-LAMP продемонстрував чутливість на рівні з RT-PCR та ідентифікував SVCV у всіх інфікованих зразках, що робить цей метод доволі привабливим для польової діагностики. Тим не менш, на даний час досліджень які могли б підтвердити його ефективність не так багато, до того ж конструкція та дизайн праймерів є доволі складним, особливо беручи до уваги що ген G є схильним мутацій.

Кількісна Real Time PCR є модифікацією ПЛР, яка дозволяє не тільки якісно, але і кількісно ідентифікувати РНК вірусу. Це є доволі корисним та дозволяє судити про вірулентність того чи іншого штаму, динаміку інфекції, тощо. При огляді літератури було знайдено 3 варіанти Real Time PCR для ідентифікації SVCV[19-26]:

- ПЛР націлена на G ген, продукти ампліфікації якої детектуються за допомогою флюоресцентного барвника SYBR GREEN
- ПЛР націлена на G ген, продукти ампліфікації якої детектуються за допомогою зонду TaqMan
- ПЛР націлена на N ген, продукти ампліфікації якої детектуються за допомогою флюоресцентного барвника SYBR GREEN

При цьому у роботі де порівнювали кількісна ПЛР, націлена на ген G (тест Q1G) та на ген N (тест Q2N), було продемонстровано що тест Q1G виявив всі ізоляти SVCV окрім одного, проте виключив усі ізоляти інших рабдовірусів риб, продемонструвавши високу специфічність, в той час як тест Q2N навпаки виявив всі ізоляти SVCV, але при цьому дав хибнопозитивний результат прореагувавши з ізолятом рабдовірусу мальків щуки. У дослідженні також також порівнювали ПЛР та метод культури клітин, так серед реконвалесцентних риб метод з використанням чутливих культур виявив

менше позитивних риб порівняно з тестом Q2N. Це робить RT-qPCR Q2N або Q1G потенційно більш чутливими скринінговими тестами для використання в програмах епідагляду, спрямованих на очевидно здорові популяції осіб, у яких навантаження патогенів, ймовірно, буде низьким [21].

Загалом, не дивлячись на певні недоліки, такі як складність, потреба витрачати багато часу на дослід, багатостадійність, тощо, ПЛР є доволі цінним інструментом для діагностики та моніторингу вірусу. Так, наприклад, традиційна ЗТ-ПЛР є більш специфічною, а ніж серологічні методи, які іноді перехресно реагують з іншими вірусами, по-друге, вона здатна ідентифікувати навіть дуже малу кількість РНК вірусу, що дуже важливо для вчасного виявлення інфекції в популяції, де раніше вірус не був ідентифікований. Окрім, деякі її модифікації здатні давати інформацію про вірусне навантаження у зразку, що є важливим для епідеміологічних досліджень і т.д.

1. 5. Філогенетика SVCV

На основі даних молекулярного годинника, SVCV, за оцінками, виник у 1850-х роках, і згодом варіанти геногруп Ia, Ib, Ic та Id почали розходитись на початку-середині 1900-х років. Ці чотири геногрупи могли розвинутиись від загальної популяції предків SVCV в Європі, а пізніше деякі з цих геногруп були ненавмисно введені на інші континенти через транспортування інфікованої живої риби [28-35]. Так, віруси підгеногрупи Ia були виділені з Англії та Сполучених Штатів. Геногрупи Ib та Ic містять віруси, виділені з Молдови, України та росії відповідно; а підгеногрупа Id складається з вірусних плям, виділених із Великобританії та деяких інших європейських країн. Генетична кластеризація ізолятів SVCV тісно пов'язана з географічним розташуванням, що свідчить про те, що вірус розвивався незалежно в різних географічних регіонах [36].

Крім того, різні ізоляти розвивалися з різними темпами відомо, що швидкість нуклеотидного заміщення в генах P і G геногрупи Ia приблизно в 3,5 рази вища, ніж у тих же генах групи Id (Рис. 4). Існують два можливих пояснення таких розбіжностей у частоті мутацій між цими двома геногрупами. По-перше, геногрупа Ia порівняно недавно розійшлася; отже, злегка шкідливі мутації, можливо, не були повністю очищені від вірусної популяції. Наявність незначно шкідливих мутацій у популяції, яка нещодавно розвивається, є одним із можливих пояснень такого підвищеного рівня мутацій. По-друге, підвищені швидкості заміни нуклеотидів у геногрупі Ia можуть бути пов'язані зі збільшенням кількості реплікацій вірусу на рік. Антропогенні фактори, пов'язані з інтенсивною аквакультурою коропа, які в кінцевому підсумку підвищують рівень стресу, роблять господаря більш сприйнятливим до захворювань і, таким чином, сприяють посиленню розмноження вірусу, яке в кінцевому підсумку також збільшиться вірусне генетичне різноманіття [16, 30, 31, 37-41].

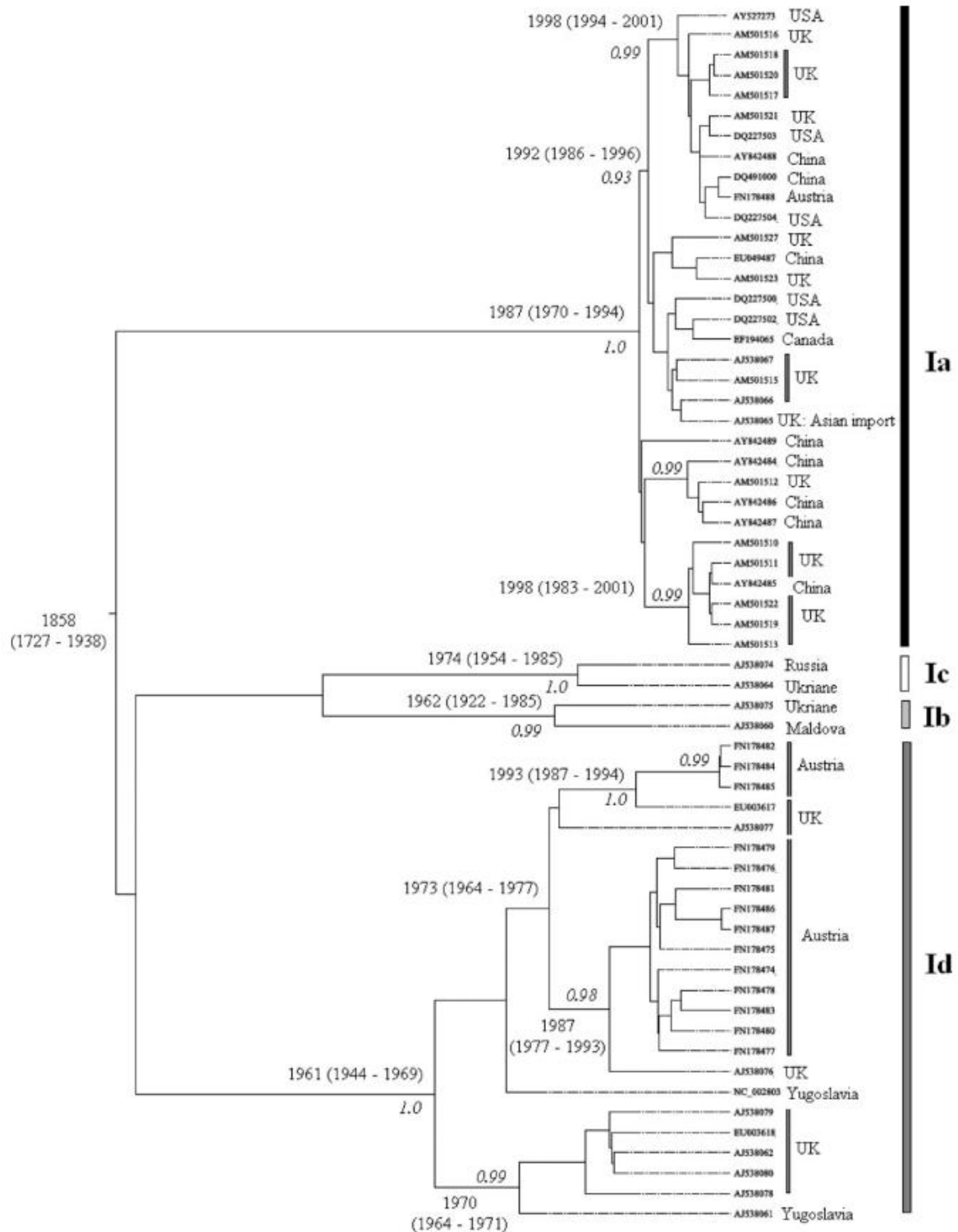


Рис. 1.4. Філогенетичні дерева ізолятів SVCV на основі 550 нуклеотидів гена G, використаних для диференціації SVCV на геногрупи [30].

Цікаво що, у період з кінця 1980-х до початку 1990-х років відбулось раптове скорочення популяції SVCV, яке може бути пов'язано з ефективними превентивними заходами, включаючи антропогенні заходи боротьби з

меншою інтенсифікацією аквакультури, яка могла пригнічувати реплікацію вірусу і, зрештою, очищені генетичні варіації. Однак у середині 1990-х років популяція відновилася і відтоді стабілізувалася. Цей відскок популяцій SVCV був зумовлений раптовим збільшенням генетичної різноманітності геногруп Ia та Id. Час цього раптового збільшення генетичного різноманіття в геногрупах Ia та Id співпав із серією спалахів SVCV, про які повідомлялося в Північній Америці та Європі з кінця 1990-х до 2007 року. Тим не менш, це раптове збільшення вірусної генетичної різноманітності свідчить про неспроможність ефективних заходів контролю/профілактики. Відомо, що деякі РНК-віруси і лентивіруси встановлюють стійку інфекцію через антигенні варіації, механізм, за допомогою якого віруси ухиляються від імунної системи хазяїна. Таким чином, антигенна варіація може бути одним із можливих пояснень недавньої повторної появи популяцій SVCV. Функціональна важливість специфічних для штаму амінокислотних замін і вставок наразі невідома. Однак ці мутації можуть відігравати роль у вірусній інфекційності, антигенності та вірулентності цих штамів. Подальші експериментальні дослідження, зосереджені на патогенезі та молекулярно-біологічних властивостях вірусу будуть важливими для оцінки можливої загрози цих вірусних штамів для аквакультури у всьому світі [41-44].

1.6. SVCV у культурі клітин

Реплікація SVCV в культурах клітин здатна відбуватись у культурах клітин риб, птахів і ссавців при температурі від 4 до 31°C. Цитопатичні ефекти (CPE), такі як межі ядерного хроматину з подальшим округленням і лізисом клітин (рис. 1.5.), з'являються в різний час інфекції залежно від температури та використовуваних клітинних ліній. Оптимальна температура реплікації вірусу *in vitro* становить від 20 до 25°C [16]. Найкращими клітинними системами для розмноження SVCV є ті, що отримані від карпових

риб (наприклад, первинні клітинні культури або встановлені клітинні лінії), такі як [16, 45]:

- EPC (клітинна лінія соскоподібного відростка)

Епітеліоподібні клітини, використовуючи коефіцієнт субкультивування 1:2-1:5 моношар формується за 24-48 годин. Температура інкубації 21-23 °C.

- FHM (клітини хвостового стебла товстоголоса чорного)

Малі, полігональні клітини, ріст починається з маленьких груп клітин, використовуючи коефіцієнт субкультивування 1:6 моношар формується за 72-96 год.

- BF-2 (хвостове стебло синьозяберного сонячника)

Короткі, веретеноподібні клітини, ростуть хрестоподібно по всьому моношару, ріст починається з вільних груп клітин, використовуючи коефіцієнт субкультивування 1:4 моношар формується за 48-56 год.

- CLC (культури лейкоцитів коропа)

Лінія клітин створена з моноклеарних клітин периферичної крові 2-річної самки коропа *Surpinus carpio*. CLC реплікують віруси риби, напр. IPNV, PFR, SVCV і VHSV. Оптимальна температура для культивування 25-28°C. Рибні клітинні лінії легко відокремлюються під час транспортування, якщо культура занадто молода.

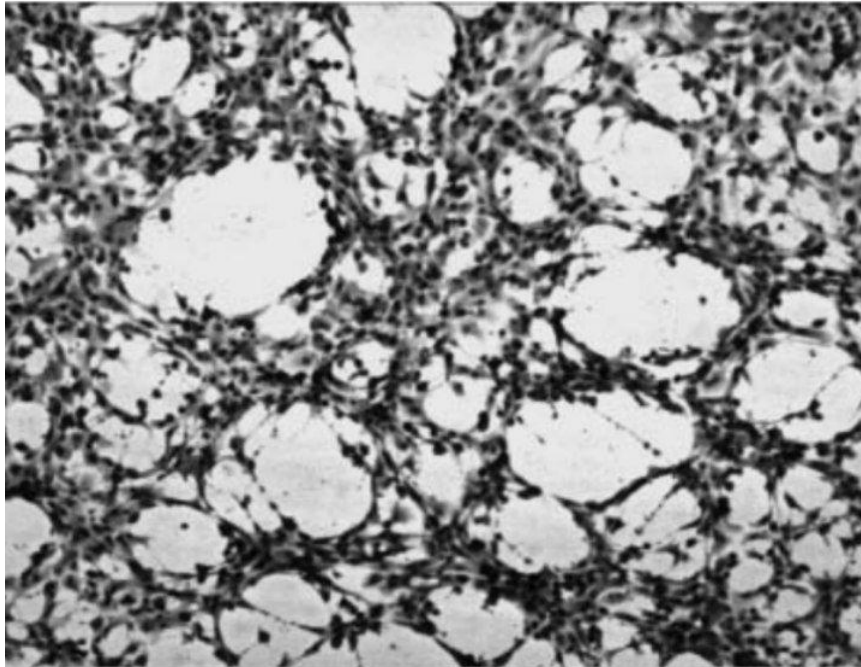


Рис. 1. 5. Цитопатичний ефект SVCV в клітинах FHM, 72 години після інфікування, при 20°C.

У статті [46] використовуючи ці клітинні лінії, регулярно отримували титри інфекційності близько 10^8 TCID₅₀ мл⁻¹. Вірус утворює чітко виражені бляшки в пермісійних клітинах через 72 години після зараження. Одноетапна крива росту, проведена в клітинах FHM при 20°C, показала, що перше потомство вірусу синтезується через 4-6 год після зараження. Один цикл росту вірусу триває 8-10 год при 20°C. В іншому дослідженні (Рис.1.6.) [47] чутливості культур клітин FHM, EPC, BF-2 до вірусу весняної віремії коропа було показано появу ЦПД (заокруглення та відшарування клітин, утворення «вікон») у продовж першої доби та деструкцію моношару клітин на 5-7 добу. При цьому було відмічено, що найбільш для репродукції вірусу SVCV підходить саме EPC, оскільки вона менш вибаглива до умов культивування а ніж BF-2 та FHM,.

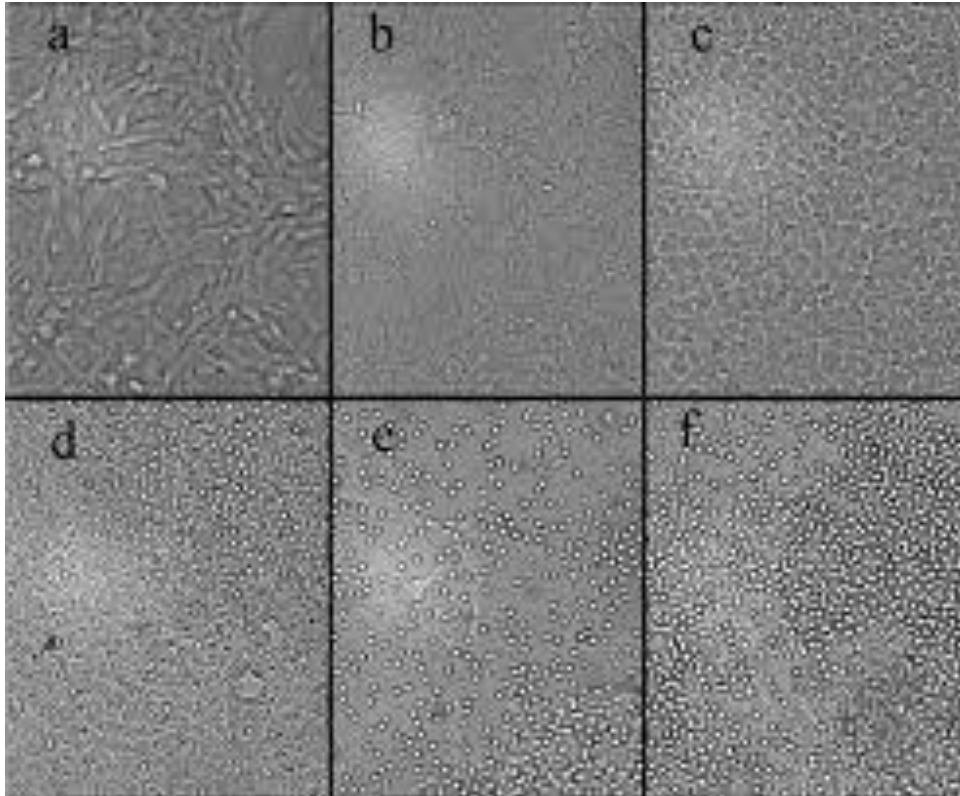


Рис. 1.6. Цитопатологія досліджуваних клітинних ліній після зараження SVCV. Нормальний моношар BF-2 (a), FHM (b), EPC (c) клітин та після зараження вірусом SVC (BF-2 (d), FHM (e), EPC (f) [45]

Лінія клітин EPC була створена в 1970-х роках і стала одним з найбільш широко використовуваних інструментів для дослідження вірусів риб та діагностики захворювань риб. Більшість вірусів, що викликають системні інфекції сімейств риб і земноводних, можуть поширюватися в клітинах EPC. SVCV також реплікується в фібробластах курячого ембріона та клітинах ссавців, таких як ВНК 21 (сирійський хом'як), нирка теляти плоду (велика рогата худоба), НЕР-2 (людина), MDCK (собака), SK (свиняча), Vero (мавпа) і в кількох клітинних лініях рептилій, за умови використання температури інкубації від 20 до 22°C [48].

У різноманітних дослідженнях [47-49] було продемонстровано, що апоптоз бере участь у загибелі клітин EPC, викликаній інфекцією SVCV. Морфологічні зміни, такі як зменшення об'єму клітини, утворення бульбашок і утворення апоптичних тілець, з'являються через 36 год після інфікування

клітин. Приблизно через 40 годин понад 70% клітин EPC, інфікованих SVCV, є апоптозованими. Ймовірно, що запрограмована загибель клітин, інфікованих SVCV, залежить від реплікації та виробництва вірусу-потомства. Окрім цього дослідження SVCV [47] на культурах клітин дозволяють досліджувати різноманітні процеси які викликає інфекція. Так у [48] за допомогою RT-qPCR було досліджено профіль транскрипції різноманітних генів клітин EPC після інфікування вірусом, що дозволило судити про особливості зміну клітині, що відбуваються при інфекції вірусом SVCV - окисний стрес, індукований апоптоз, регуляція цитоскелету та індукція інтерферону внаслідок інфекції.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали дослідження

У роботі використовувався ізолят вірусу весняної віремії коропа (SVCV) VN17 виділений у Черкаській області в 2021 році. Для перевірки цитопатичної дії штаму були використані культури клітин EPC. Для філогенетичного аналізу використовували сіквенс гену G ізоляту вірусу весняної віремії коропа (SVCV) VN17.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Отримання очищеної вірусної суспензії шляхом диференційного центрифугування

1. Біоматеріал гомогенізують в ступках зі скляним піском або в спеціальних приладах–гомогенізатор
2. Одержаний гомогенат розливають в центрифужні пробірки, які перед поміщенням у центрифугу зважують.
3. Пробірки з гомогенатом розміщують в центрифужному барабані один навпроти одного; барабан закривають запобіжною кришкою.
4. Здійснюють центрифугування об'єктів за наступними циклами: Перший цикл – низькошвидкісний –5-10 тис. об/хв, 15-30 хв. Надалі на Другий цикл – високошвидкісне центрифугування - 30 тис. об/хв. При цьому все, що є в суспензії, осідає на дно пробірки.
5. Після цього отриманий осад, що містить концентрований вірус, розчиняють (ресуспендують) у мінімальному об'ємі буфера, який надалі знову центрифугують на малих швидкостях для видалення не очищених раніше клітинних компонентів.

2.2.2. Зараження та культивування вірусу весняної віремії коропа у культурі клітин EPC

Для дослідження репродукції та ЦПД вірусу були використані наступні матеріали та обладнання:

- Перещеплювана культура клітин EPC
- Вірусвмісний матеріал,
- Пластиковий матрац
- Газові та спиртові горілки,
- 96% етиловий спирт,
- Склянки для інструментів,
- Лабораторний посуд (пробірки, колби),
- Гумові рукавички
- Дезінфікуючий розчин
- Середовище DMEM
- 10 % сироватка крові ембріонів корів
- Термостат
- Холодильник
- Світловий мікроскоп
- Розчин Хенкса та інше.

Зараження культур клітин вірусом весняної віремії коропа :

1. Перед зараженням культури клітин дослідили під мікроскопом та в залежності від стану культури (цілісність та сформованість моношару, відсутність ознак контамінації) обрали для подальшого експерименту.
2. Перед внесенням вірусовмісного матеріалу живильне середовище росту злили, а моношар промили розчином Хенкса.

3. Два послідовних десятикратних розведень ізоляту вірусу розвели 1:10 у середовищі клітинної культури та перенесли 200 мкл кожного з цих двох розведень до клітинного моношару.
4. Дали адсорбуватися протягом 0,5–1 години при 10–15°C, забрали посівний матеріал і додали середовище для культури клітин, забуферену при рН 7,6 та доповнену фетальною сироваткою (FCS). Інкубували при 15°C. Як підтримувальне середовище використовували EMEM з 10 % сироваткою кровю великої рогатої худоби.
5. Слідкували за перебігом інфекції у позитивних контролях та інших інокульованих культурах клітин шляхом мікроскопічного дослідження при $\times 100$ -кратному збільшенні протягом 7 днів.
6. При цьому рН середовища для культивування клітин на підтримували на рівні від 7,3 до 7,6 під час інкубації .
7. Ступінь дегенерації клітин оцінювали методом крестів: (4+) – деструкція всіх клітин (100%); (3+) – більшості клітин (75%); (2+) – половини клітин (50%).

2.2.3. Визначення інфекційного титру вірусу у культурі клітин

Для дослідження інфекційного титру вірусу були використані наступні матеріали та обладнання:

- Перещеплювана культура клітин EPC
- Вірусвмісний матеріал,
- Пластиковий матрас
- Газові та спиртові горілки,
- 96% етиловий спирт,
- Склянки для інструментів,
- Лабораторний посуд (пробірки, колби),
- Гумові рукавички
- Дезінфікуючий розчин

- Середовище DMEM
- Середовище DMEM/F-12 з NEPES
- Пластикові стерильні планшети на 48 лунок
- 24-годинні культури з суцільним моношаром клітин
- Розчин Трипсин-ЕДТА
- 10 % сироватка крові ембріонів корів
- Термостат
- Холодильник
- Світловий мікроскоп
- Розчин Хенкса та інше.

1. Досліджуваний ізолят у лінії клітин EPC культивували в пластикових культуральних флаконах об'ємом 50 см³ зі стандартною кришкою при температурі 16⁰С.

2. Для розмноження клітин використовували поживні середовища EMEM. До середовища додавали 10% ембріональної сироватки теляти.

3. Коефіцієнт субкультивування для клітин використовували в пропорції 1:2. Клітини пересівали за допомогою розчину Трипсин-ЕДТА .

4. Для інфікування клітин використовували 24-годинні культури з суцільним моношаром клітин (заповнення флакону не менше ніж 95%).

5. Для визначення титру вірусу в культурі клітин використовували пластикові стерильні планшети на 48 лунок. Для планшетів використовували поживне середовище DMEM/F-12 з NEPES. Для приготування одного планшету використовували один флакон культури клітин з суцільним моношаром.

6. До суспендованих клітин додавали 18 мл культурального середовища, ретельно перемішали та додали до кожної лунки по 180 мкл суспензії. Під час титрування вірусу в перший ряд лунок додавали 20 мкл вірусомісного матеріалу, зібраного з культуральних флаконів з суцільною цитопатичною дією (перший ряд), де вірусний титр був максимальний (Таблиця 2.1).

Таблиця 2.1.

Схема титрування вірусів на культурі клітин в планшетах на 48 лунок

Розведення	Культура клітин ЕРС					
10^0	ЦПД	ЦПД	ЦПД	ЦПД	ЦПД	ЦПД
10^{-1}	+20	+20	+20	+20	+20	+20
10^{-2}	+20	+20	+20	+20	+20	+20
10^{-3}	+20	+20	+20	+20	+20	+20
10^{-4}	+20	+20	+20	+20	+20	+20
10^{-5}	+20	+20	+20	+20	+20	+20
10^{-6}	+20	+20	+20	+20	+20	+20
10^{-7}	+20	+20	+20	+20	c*	c

C*-контроль, лунка без вірусу

7. Лунки, в яких фіксували ЦПД через 7 днів після інфікування (д.п.і.) використовували для обрахунку титру вірусу.

8. Розрахунок титру вірусу відбувався методом Ріда-Менча за формулою:

$$PD \text{ (Proportionate distance)} = \frac{\% \text{ Інфекції вище } 50\% - 50\%}{\% \text{ Інфекції вище } 50\% - \% \text{ Інфекції нижче } 50\%}$$

$$ED \text{ (Exponential of dilution)} = PD \times (ED \text{ Інфекції нижче } 50\% - ED \text{ Інфекції вище } 50\%) + ED \text{ Інфекції нижче } 50\%$$

2.2.4. Електронна мікроскопія

Електронно-мікроскопічні дослідження проводили в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного.

Матеріали та обладнання:

- Предметні скельця,
- Склянка (об'єм 50 мл),
- Дистильована вода,
- 2% розчин формвару на хлороформі,
- Спирт,

- Мідні сіточки для електронної мікроскопії,
- Пінцети,
- Фільтрувальний папір,
- Шестиканальні саплери (об'ємом 20-200 мкл),
- Кінцівки для саплерів,
- Препарати вірусів,
- 2% розчин фосфорно-вольфрамової кислоти,
- Парафільм.

Приготування препаратів для електронної мікроскопії:

1. Чисте предметне скельце занурили в розчин формвару, через 5-10 с скло витягли та підсушити (сушили 40-60 с до зникнення запаху розчинника).
2. Отриману плівку підрізали лезом бритви, та зняли плівку на воду (повільно зануривши скло у воду під кутом 45⁰). Сітки з плівкою висушили.
3. На сітку з плівкою нанесли краплю суспензії вірусних часток. Рідину відбиралі фільтрувальним папером через 30-60 с, та висушили сітку.
4. На сіточку нанесли краплю контрастуючої речовини і через 1 хв відібрали рідину; після просушування препарат був готовий для дослідження.
5. Дослідили препарат в електронному мікроскопі.

2.2.5. ЗТ-ПЛР та подальше секвенування гену глікопротеїну

Ампліфікацію фрагмента кДНК SVCV проводять з використанням праймерів, отриманих із послідовностей ділянки, що кодує ген глікопротеїну: прямого SVCV F1 5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR-RTC-3' і двох зворотних праймерів SVCV R2 5'.

1. Загальну РНК екстрагували зі 100 мкл супернатанту клітинних культур, що демонструють СРЕ, розчинили у 40 мкл води, вільної від ДНКаз та РНКаз.
2. Для синтезу кДНК реакцію зворотної транскрипції проводять при 37°C протягом 1 години з використанням суміші, що складається з 1М-MLV RT реакційного буфера (50 мМ Tris, рН 8,3, 75 мМ КСl, 10 мМ DTT, 3 мМ

MgCl₂), що містить 1 mM dNTP, 100 пмоль праймера SVCV R2, 20 одиниць зворотної транскриптази M-MLV.

3. ЗТ-ПЛР виконується в 50 мкл реакційного об'єму 1 × буфер для ПЛР (50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 9,0 і 0,1% Triton X-100), що містить 2,5 mM MgCl₂, 200 мкМ dNTP, 50 пмоль кожен з праймерів SVCV R2 і SVCV F1, 1,25 одиниць ДНК-полімерази Taq і 2,5 мкл суміші реакції зворотної транскрипції.

4. Реакційну суміш піддають 35 температурним циклам: 1 хвилина при 95°C, 1 хвилина при 55°C і 1 хвилина при 72°C з наступною стадією остаточного розширення 10 хвилин при 72°C.

5. Ампліфіковану ДНК аналізували за допомогою електрофорезу в 2,0% агарозному гелі.

6. Для екстракції ДНК з агарозного гелю використовували набір Silica Bead DNA Extraction Kit (Thermo Scientific).

7. Секвенування проводили на генетичному аналізаторі 3130 (Applied Biosystems).

8. Отримані послідовності аналізували за допомогою програмного забезпечення BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Geneious Prime ver. 2023.1.2 та MEGA ver. 10.2.5.

2.2.6. Методи генетичного аналізу

Послідовності, що мали найбільший відсоток ідентичності із отриманим сіквенсом, були завантажені у форматі FASTA. Далі за допомогою алгоритма ClustalW до послідовностей було застосовано множинне вирівнювання. Далі, сіквенси було трансльовано у амінокислотну послідовність та проаналізовано за допомогою програмного забезпечення Geneious Prime ver. 2023.1.2, SWISS-MODEL, PyMOL ver. 2.0 Schrödinger, LLC.

2.2.7. Методи філогенетичного аналізу

Філогенетичний аналіз послідовностей був виконаний у програмному забезпеченні MEGA ver. 10.2.5. Множинне вирівнювання та bootstrap аналіз виконувалися там же. Філогенетичні дерева будувалися методами максимальної правдоподібності та методом приєднання сусідів для оцінки різниці нуклеотидного складу різних послідовностей та їх еволюційного походження. За загальноприйнятою методикою, результат філогенетичного аналізу вважався достовірним при значенні bootstrap 70 та більше.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Вивчення цитопатичної дії ізоляту VN17 SVCV на культурі клітин EPC

Культуру клітин EPC інфікували ізолятом вірусу весняної віремії коропа VN17, який був виділений у Черкаській області в 2021 році. Очищену суспензію ізоляту отримали шляхом диференційованого центрифугування та інфікували нею культуру клітин EPC. Після зараження кожні 24 години впродовж тижня проводили моніторинг стану культури із застосування світлової мікроскопії зі збільшенням $\times 40$ та $\times 200$ (Табл. 3.1). При цьому виражена ЦПД спостерігалась уже на 3 день після зараження (Рис.3.1.).

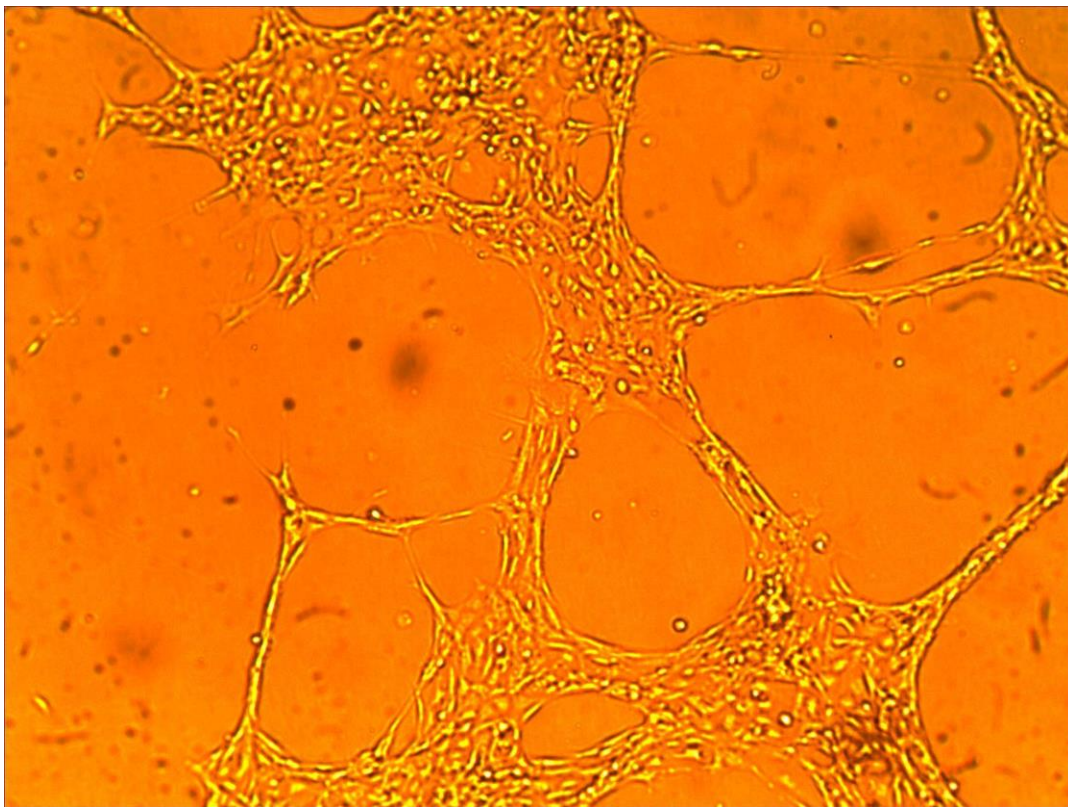


Рис.3.1. Цитопатична дія SVCV на культуру клітин EPC через 72 години після зараження, збільшення $\times 200$

Зокрема, спостерігалась виражена круглоклітинна дегенерація, що також супроводжувалася:

- Заокругленням клітин;

- Зморщуванням клітин;
- Деформацією клітин, що була виражена у зміни форми на веретеноподібну;
- Місцями деякі клітини почали частково зливатись та утворювати синцитій.

При цьому, не дивлячись на різноманітно виражену цитопатичну дію більша частина клітин ще зберігала нормальну морфологію.

Але через 144 години після зараження вже спостерігається тотальна круглоклітинна дегенерація (Рис.3.2.) та відокремлення від поверхні майже всіх клітин культури ЕРС.

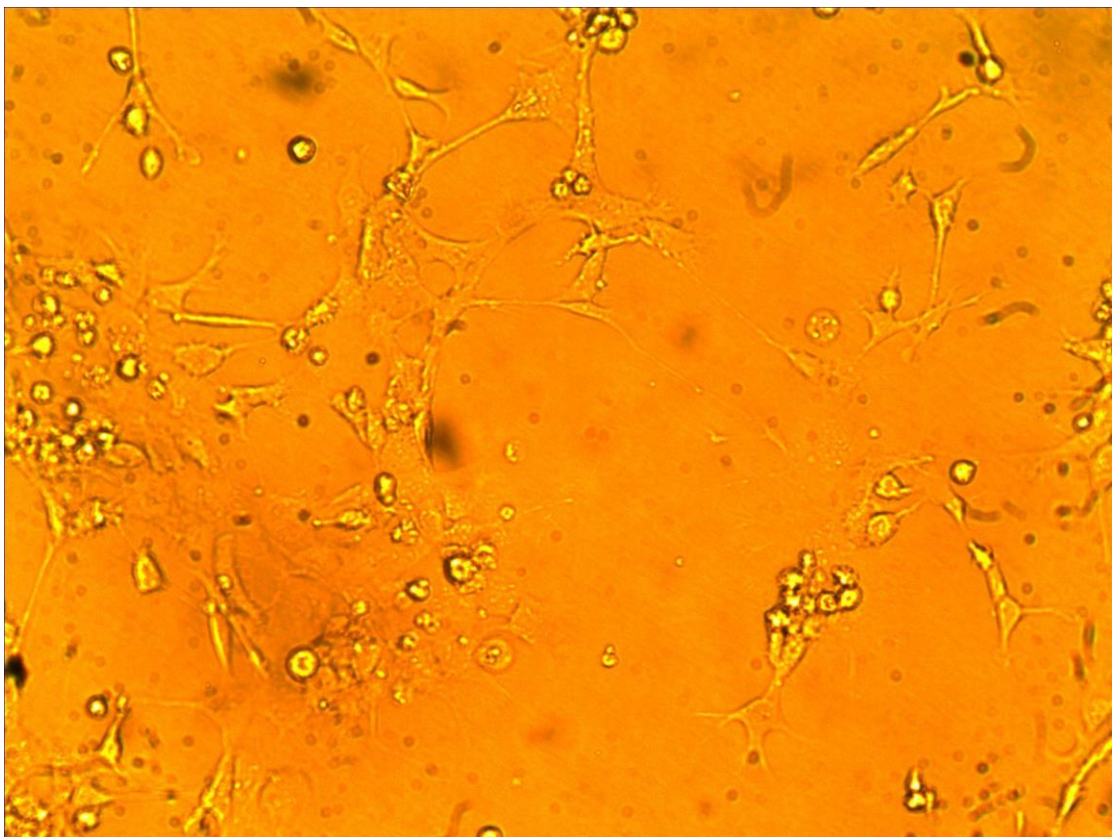


Рис. 3.2. Цитопатична дія SVCV на культуру клітин ЕРС через 144 години після зараження, збільшення x200

Контроль же впродовж тижня, зберігав нормальну морфологію клітин та не виявляв ознак контамінації чи “вікової” дегенерації (Рис. 3.1.3.)

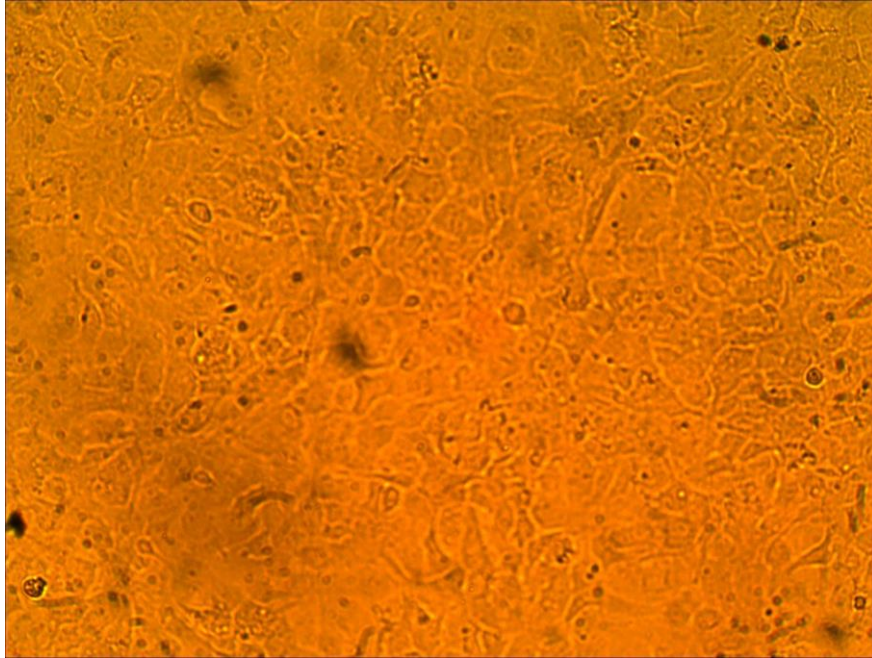
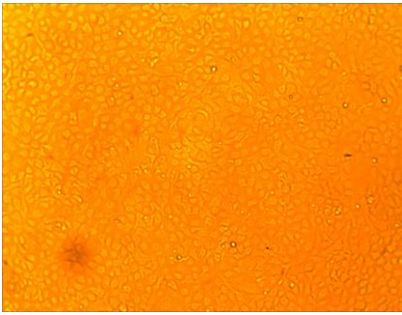


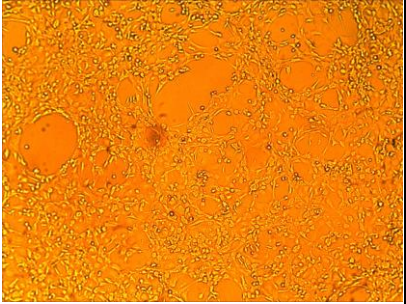
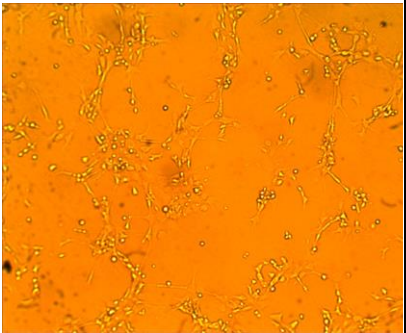
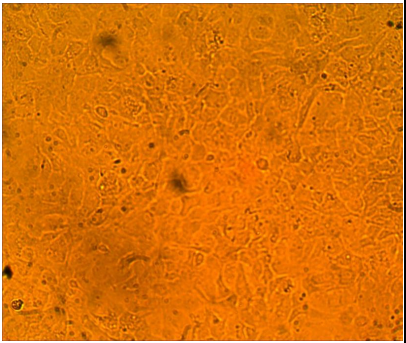
Рис. 3.3. Контроль культури клітин ЕРС

Загалом , дегенерація клітин та їх відокремлення від поверхні з подальшим заокругленням і утворення “вікон” є характерним для SVCV та співвідноситься з іншими дослідженнями вірусу весняної веремії коропа, що проводились на культурі клітин ЕРС. Також з літературними даними збігається швидкість чіткого проявлення ЦПД (72 години після зараження) та майже повної деструкції клітин (5-7 діб).

Таблиця 3.1

Розвиток ЦПД у культурі клітин ЕРС, зараженої SVCV

Час	Фото	ЦПД	Опис	Ступінь дегенерації клітин
0 годин		-	Нормальний моношар, клітини чіткої форми	-

72 години		Круглокліт инна дегенераці я	Клітини моношару зморщуються, значно зменшуються у розмірі, деякі клітини деформуються та сильно вітягуються, формуються “вікна”	++
144 години		Тотальна круглокліт инна дегенераці я	Спостерігається майже повна дегенерація більшості клітин	++++
Контроль		-	Нормальний моношар, клітини чіткої форми	—

3.2. Визначення інфекційного титру вірусу у культурі клітин EPC

Інфекційний титр (кількість вірусу, яка міститься в одиниці об'єму матеріалу) визначався у культурі клітин. Для цього використали 24-годині культури EPC у 48-лунковому планшеті. При цьому було 8 розведень та 6 повторюваностей. Для розведення до 180 мкл клітинної суспензії додавали 20 мкл вірусомісного матеріалу із культури клітин з суцільним ЦПД із подальшим піпетуванням за схемою (Табл. 2.1.). Як позитивний результат зараховували лунку, де більше 50% моношару клітин демонстрували ЦПД.

У результаті було продемонстровано, що вірус уразив культуру клітин в усіх повторностях при розведенні 10^0 , 10^{-1} , та 10^{-2} . В розведенні 10^{-3} було уражено 5 повторностей, при 10^{-4} позитивний результат демонстрували 4 повторності, а 10^{-5} - 3. Розведення 10^{-6} , 10^{-7} та два контролю не продемонстрували ЦПД (Табл. 3.2). Визначення інфекційного титру вірусу вимагає визначення ефективну дозу вірусу, яка здатна спричинити інфекційний ефект, в даному випадку ЦПД у 50% системи яку заразили. Так, для визначення ED_{50} у культурі клітин використовують показник $TCID_{50}$ - 50% інфекційної дози культури тканини.

Таблиця 3.2.

Результати титрування вірусів на культурі клітин в планшеті на 48 лунок

Розведення	Повторюваність					
	1	2	3	4	5	6
10^0	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+		+	+	+	+

10^{-4}	+	+	+	+		
10^{-5}	+			+	+	
10^{-6}						
10^{-7}					С	С

TCID₅₀ може розраховуватися методом Ріда-Менча. Він ґрунтується на інтерполяції фактичних результатів титрування й отриманні кумулятивних даних. Це дає змогу штучно збільшити кількість тест-об'єктів, виходячи із логічного припущення, що культура клітини у лунці, які вижили при зараженні високою дозою вірусу, тим більше виживуть від меншої дози. І навпаки, ті клітини, що загинули від низької дози вірусу, загинуть від високої дози інфекції. Для подальшого визначення цим методом, отримані дані переводили у кумулятивні значення та вираховували відсоток інфікованих культур у кожному розведенні (Табл. 3.3.). Так, найближче розведення, яке викликало інфікування більше 50% клітин це 10^{-4} , а найближче розведення яке викликало інфікування менше 25% - 10^{-5} .

Таблиця 3.3.

Розрахунок титру вірусу у мишей за методом Ріда-Менча

Розведення	Результати тесту		Кумулятивне значення		Відношення інфікованих культур	Відсоток інфікованих культур, %
	К-ть інфікованих культур	К-ть не інфікованих культур	Інфікованих	Не інфікованих		
			о	но		

10^0	6	0	30	0	30/30	100
10^{-1}	6	0	24	0	24/24	100
10^{-2}	6	0	18	0	18/18	100
10^{-3}	5	1	12	1	12/13	92,3
10^{-4}	4	2	6	3	6/9	66,6
10^{-5}	3	3	2	6	2/8	25
10^{-6}	0	6	0	12	0/12	0
10^{-7}	0	6	0	18	0/18	0

Для розрахунку $TCID_{50}$ Використовували наступні формули:

$$PD \text{ (Пропорційна відстань)} = \frac{\% \text{ Інфекції вище } 50\% - 50\%}{\% \text{ Інфекції вище } 50\% - \% \text{ Інфекції нижче } 50\%} = \frac{66,6 - 50}{66,6 - 25} = \frac{16,6}{41,6} = 0,40.$$

$$ED \text{ (Експонента розведення)} = PD \times (ED \text{ Інфекції нижче } 50\% - ED \text{ Інфекції вище } 50\%) + ED \text{ Інфекції нижче } 50\% = 0,40 \times (-5 - (4)) + (-4) = -0,40 - 4 = -4,40.$$

Таким чином, виходячи з того, що експонента розведення складає -4,40 - титр вірусу складає $10^{4,40} TCID_{50} / 20$ мкл або $10^{6,1} TCID/мл$, що в цілому співвідноситься із літературними даними.

3.3 Вивчення морфології віріона ізоляту VN17 SVCV

Для вивчення морфології віріону за допомогою електронної мікроскопії, було зроблено фотографію (Рис. 3.4.) препарату отриманого з суспензії виділеного ізоляту VN17, масштаб світлин складав 1 см - 50 нм. Як можна бачити з фото форма віріона вар'юється від плеоморфної до кулеподібної, а

його довжина відповідно складає від 70 до 110 нм, діаметр від 60 до 90, що збігається із літературними даними.

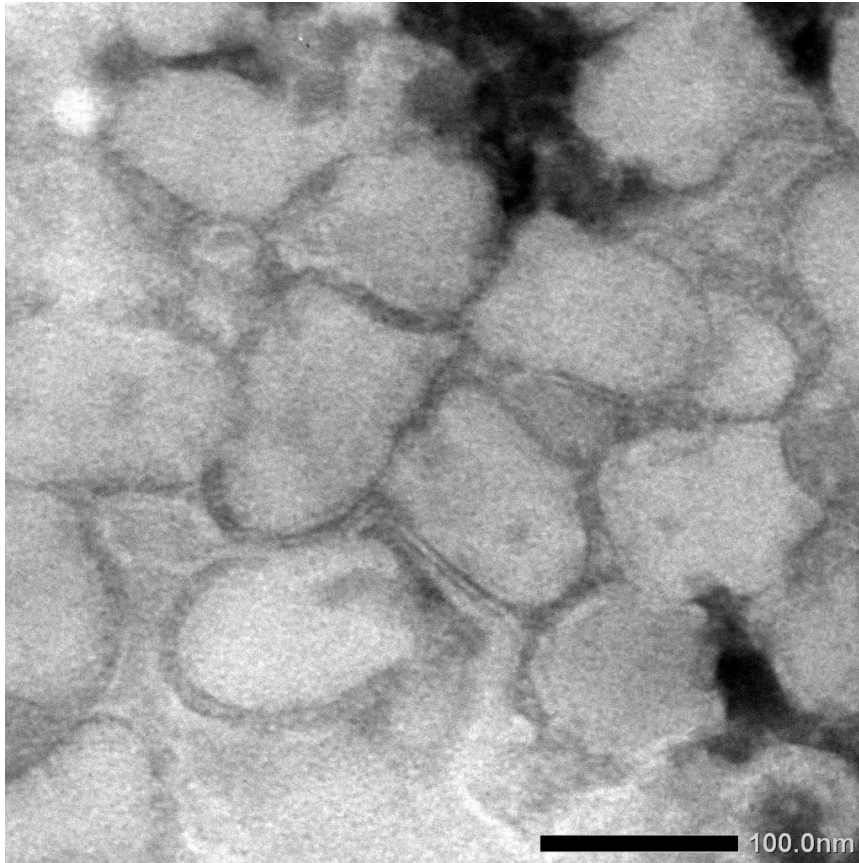


Рис. 3.4. Електронномікроскопічне зображення ізоляту VN17 вірусу SVCV

Як можна бачити з фото форма віріона вар'юється від плеоморфної до кулеподібної, а його довжина відповідно складає від 70 до 110 нм, діаметр від 60 до 90, що збігається із літературними даними. Різноманітна форма та відносно велика варіативність довжини та діаметру між різними віріонами швидше за все зумовлена особливістю приготування препарату.

3.4 Філогенетичний аналіз гену G вірусу весняної віремії коропа

Для філогенетичного аналізу було відібрано 13 послідовностей у базі даних NCBI BLAST, які мали найбільший відсоток ідентичності із вивчаємим сіквенсом. Після було проведено множинне вирівнювання, використовуючи алгоритм ClustalW у програмному забезпеченні MEGA ver. 10.2.5 (Рис. 3.5.).

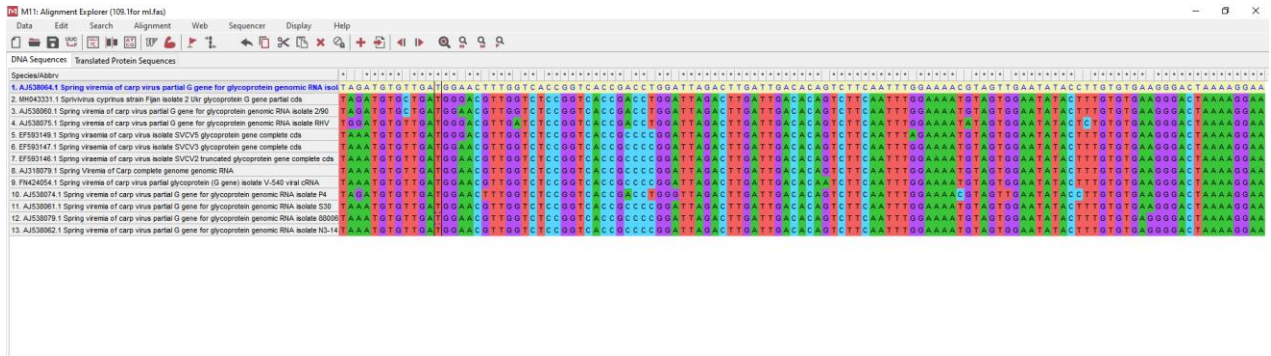


Рис. 3. 5. Множинне вирівнювання фрагментів гену глікопротеїну ізолятів вірусу весняної віремії коропа у застосунку MEGA ver. 10.2.5

Далі для проведення філогенетичного аналізу використовували метод максимальної правдоподібності для визначення походження досліджуваного ізоляту. У результаті аналізу гену глікопротеїну, було виявлено, що він належав до східно-європейського кластеру ізолятів та утворював кладу з двома іншими ізолятами 2/90 з Молдови та RHV з України та належав до геногрупи *b*, що традиційно включає ізоляти зі Східної Європи (Рис.3.6.).

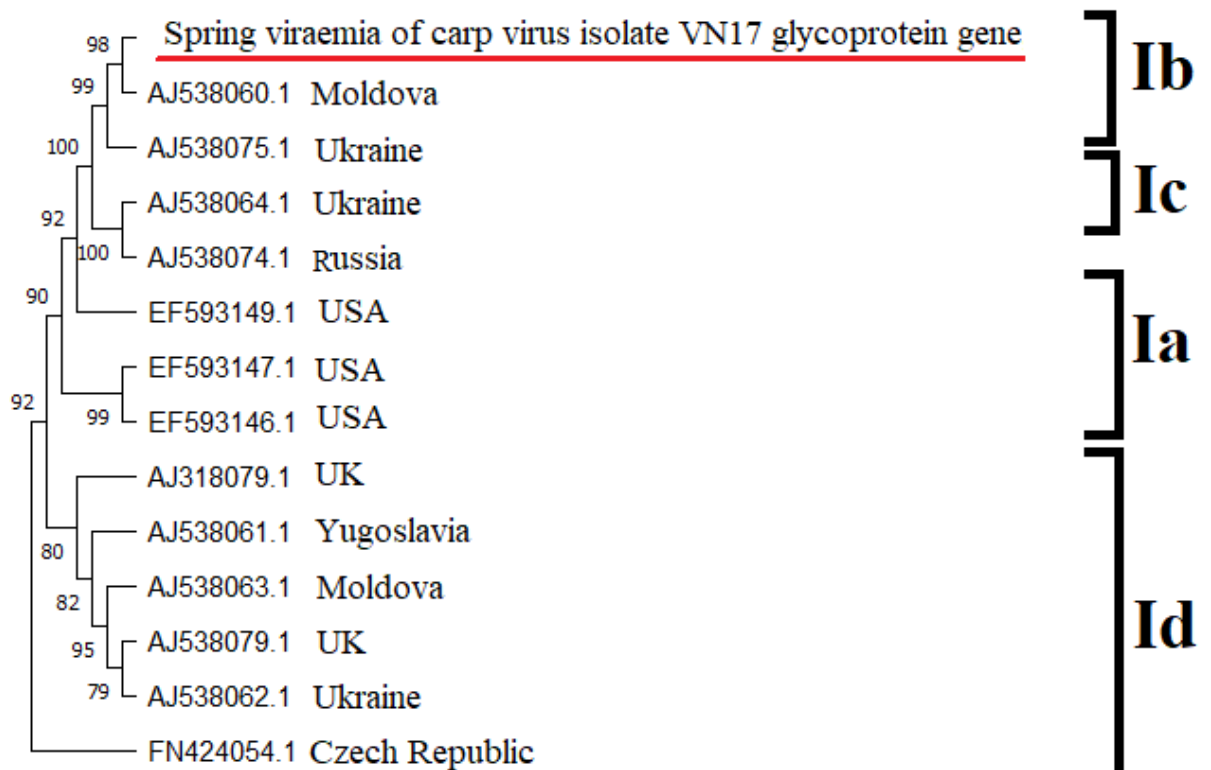


Рис. 3.6. Філогенетичні відносини ізолятів SVCV. Дерево побудоване за геном G методом ML. Досліджуваний ізолят відмічений червоним.

Так, було продемонстроване типове розподілення ізолятів на 4 підгрупи, в залежності від їх географічного розповсюдження. Досліджуваний ізолят разом із ізолятами 2/90 з Молдови та RNV були віднесені до геногрупи b. Вони містили спільні нуклеотидні заміни в порівнянні з іншими ізолятами в сайтах 33, 192, 223, 224, 238, 252, 270, 285, 306, 363.

3.5. Генетична характеристика гену G ізоляту вірусу весняної віремії коропа та його філогенетичний аналіз

Для подальшого аналізу досліджуваний сіквенс перевели у амінокислотну послідовність та порівняли її з амінокислотними послідовностями інших фрагментів генів з якими проводився філогенетичний аналіз (Рис. 3.7.), та окремо з ізолятами, які опинилися в одному філогенетичному кластері, а саме ізоляти: 2/90 з Молдови та RNV з України (Рис.3.8.). Загальна подібність нуклеотидних послідовностей усіх 14 фрагментів гену складала 83%, тоді як амінокислотна - 89%. При порівнянні VN17 з ізолятами з його кластеру, генетичні послідовності були ідентичними на 96%, а амінокислотна - на 98%. Зокрема, не дивлячись на те, що в генетичній послідовності між ізолятом VN17 та 2/90 з Молдови було 5 нуклеотидних замін, їх амінокислотні послідовності були ідентичні.

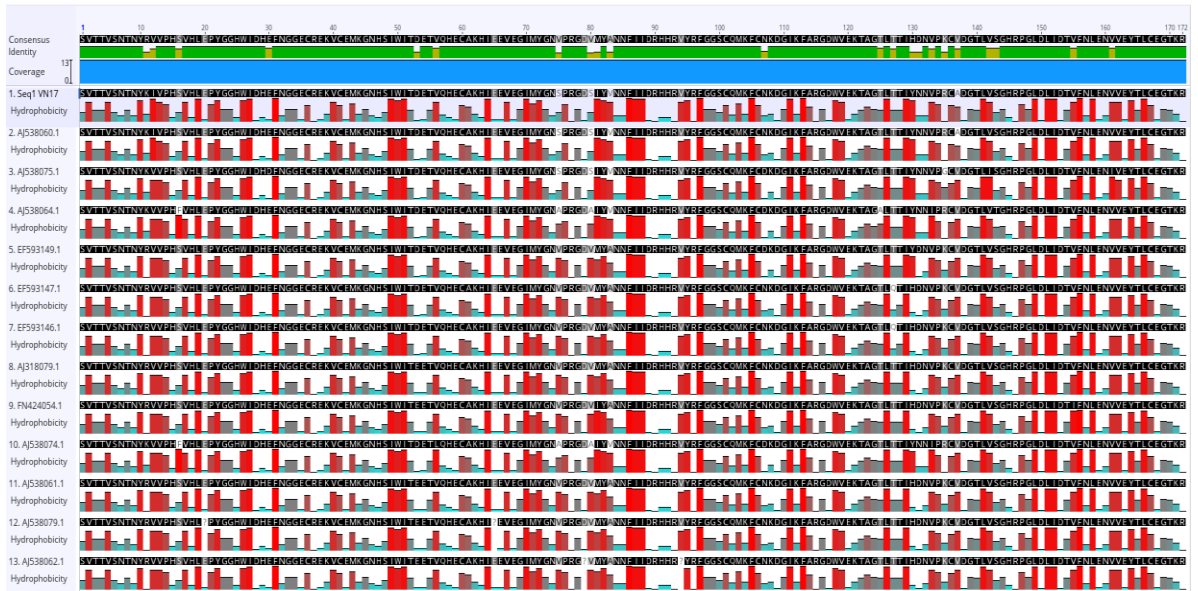


Рис. 3.7. Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей ізолятів вірусу весняної віремії коропа.

При порівнянні ізолятів VN17 та 2/90 з RHV було виявлено 7 амінокислотних замін в положеннях: 12 (V→I), 30 (D→E), 107 (D→N), 135 (G→R), 137 (V→A), 142 (I→V), 161 (I→V). Амінокислоти, які були замінені мали більш менш схожі властивості, окрім мутації в 135 положенні, де гліцин змінився на менш гідрофобний аргінін.

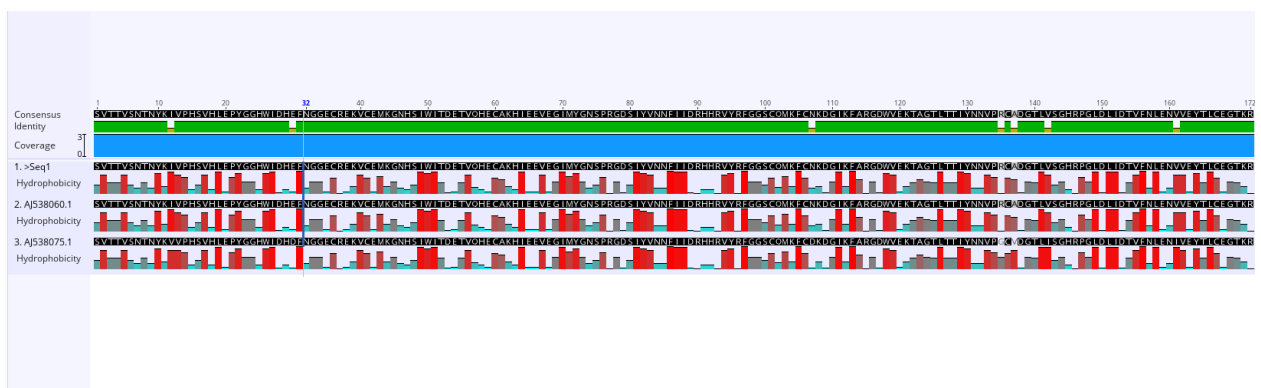


Рис. 3.8. Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей ізолятів VN17, 2/90 та RHV

Далі, для того щоб дізнатись розташування амінокислотних замін безпосередньо в просторі, за допомогою інструмента SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) на основі наявних амінокислотних послідовностей глікопротеїну було створено та відібрані моделі 3D структури білку, які було в подальшому візуалізовано та співставлено за допомогою програмного забезпечення PyMOL ver. 2.0 Schrödinger, LLC.

Так, була отримана 3D модель фрагменту глікопротеїна ізоляту VN17 (Рис.3. 9. А) та RHV (Рис. 3. 9. Б). Кожна з моделей містила 3 α -спіралі та 10 β -листіків з'єднаних один з одним не впорядкованими ділянками.

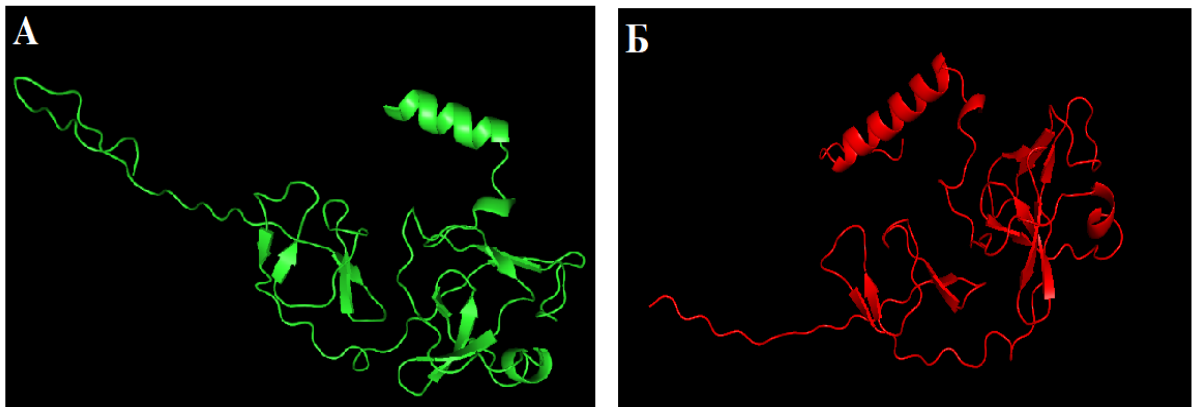


Рис.3. 9. Модель фрагментів гену глікопротеїну вірусу весняної віремії коропа (SVCV) ізолятів VN17 (А) та RHV (Б).

Для того щоб зрозуміти чи є відмінності в розташуванні вторинної структури моделей двох ізолятів, їх послідовності вирівняли, а 3D-візуалізацію наклали одна на одну (Рис.3.10.). При цьому відмітивши на отриманому зображенні амінокислотні заміни між двома ізолятами, було виявлено, що 6 з них були розташовані в неупорядкованих ділянках, і одна на місці великої α -спіралі, а саме заміна в положенні 161 (I→V). Не дивлячись на це загальна топологія вторинних структур обох ізолятів була ідентична та накладалась одна на одну.

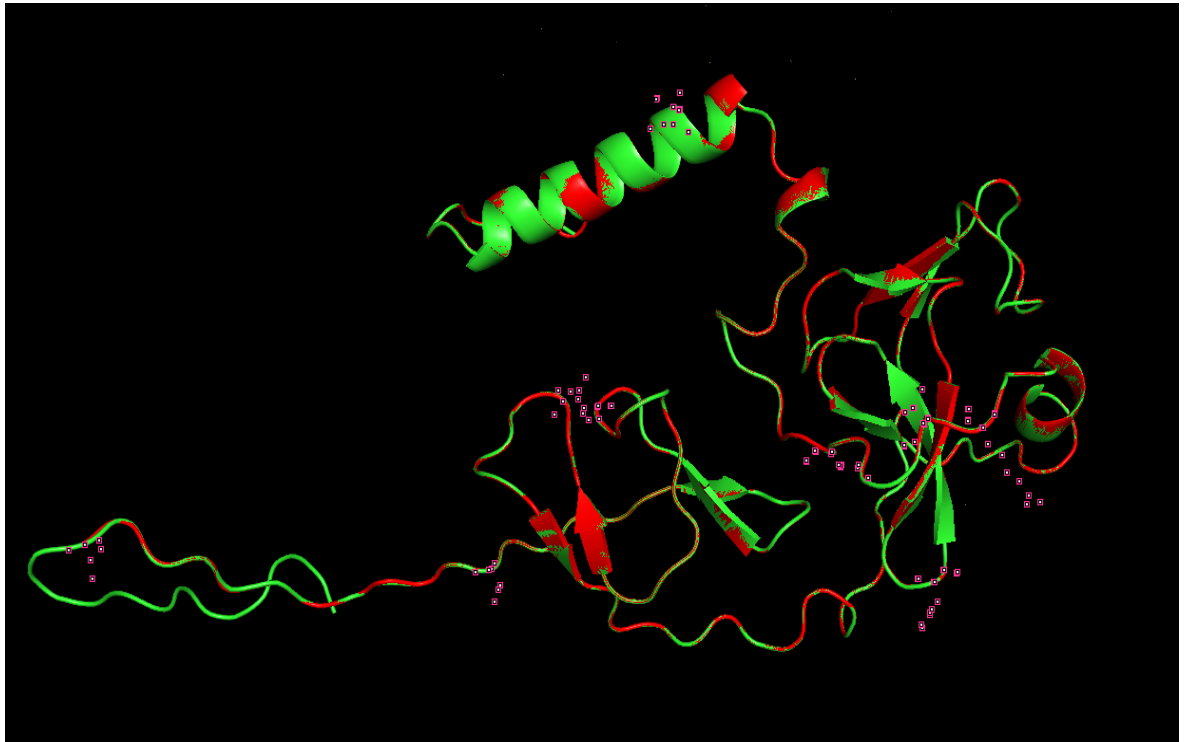


Рис. 3. 10. Порівняння 3D-моделей фрагменту гену глікопротеїну ізолятів VN17 та RHV з відміченими амінокислотними змінами.

Отже, отримані під час виконання роботи результати будуть використані в майбутніх дослідженнях молекулярно-біологічних особливостей ізоляту VN17, що є важливим для розуміння розповсюдження вірусу в Україні та патологічних механізмів вірусу в організмі чутливого хазяїна, що в свою чергу надасть можливість для розробки більш ефективних засобів профілактики та діагностики весняної віремії коропа.

Стрімкий розвиток рибного господарства та інтенсифікація міжнародної торгівлі в наш час, можуть слугувати факторами, що могли б сприяти ширшому географічному розповсюдженню різноманітних штамів SVCV. Це в свою чергу може сприяти більшому генетичному різноманіттю вірусу, що зрештою може ускладнити епізоотичну ситуацію та призвести до великого спалаху захворювання серед риб та, в результаті, економічну чи навіть екологічну шкоду. Так, наразі одними із потенційно небезпечних в

плані стрімкого збільшення кількості генетичних мутацій є ізоляти геногрупи Ia, що включають ізоляти зі США та деяких інших країн, мають щонайменше в 5 разів вищий коефіцієнт нуклеотидних замін ніж в представників інших геногруп. Все це обумовлює важливість розуміння впливу тих чи інших генетичних змін на біологічну властивості вірусу.

Виділений в 2021 році в Черкаській області ізолят VN17 продемонстрував здатність розмножуватись в культурі клітин EPC з інфекційним титром - $10^{6,1}$ TCID₅₀/мл. При цьому він демонструє різноманітну цитопатичну дію: субтотальна круглоклітинна дегенерація, відокремлення від поверхні майже всіх клітин культури та формування так званих “вікон”, тощо. Перший прояв ЦПД був зафіксований на 3 день, а від моменту інфікування до смерті майже всіх клітин моношару пройшло 6 діб. Морфологія віріону вар’ювалася від кулеподібної до плеоморфної. Останнє пояснюється швидше за все особливістю приготування препарату для електронного мікроскопіювання. Загалом продемонстровані результати відповідають літературним даним.

Для філогенетичного аналізу використовувався сіквенс фрагменту гена глікопротеїна, який традиційно використовується для віднесення ізоляту до тої чи іншої підгрупи. Аналіз послідовності та філогенетичні дослідження ізоляту SVCV VN17 свідчать про те, що він найбільш тісно пов’язані з іншими східно-європейськими ізолятами SVCV. Дані про нуклеотидні та виведені амінокислотні послідовності для частини гена G показали, що VN17 разом з 2/90 з Молдови та RHV з України згруповані в геногрупі Ib SVCV. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей і виведених амінокислот цих ізолятів показало високий ступінь гомології послідовності - 95% для нуклеотидної послідовності та 98% для амінокислотної. При цьому амінокислотні послідовності VN17 та 2/90 були ідентичними, не дивлячись на наявність 5 замін в нуклеотидній послідовності. При порівнянні VN17 та 2/90 з RHV було виявлено 7 амінокислотних замін, 6 з яких демонстрували заміни

амінокислот із схожими властивостями. В той час як у положенні 135 гліцин з аліфатичним радикалом був замінений на менш гідрофобний аргінін. При візуалізації елементів вторинної структури було також виявлено, що майже всі заміни припали на впорядковану ділянку білку, крім заміни в 107 положенні, яка припала на α -спіральну ділянку. Але загалом топологія вторинних структур ізолятів VN17 та 2/90 була ідентична RNV та накладалась одна на одну.

Отримані дані свідчать про необхідність подальшого дослідження молекулярно-біологічних властивостей вірусу весняної віремії коропа, зокрема того як саме ті чи інші зміни в геномній або амінокислотній послідовності здатні впливати на різноманітні характеристики вірусу, його здатність до зараження, вірулентність, імуногенність тощо.

ВИСНОВКИ

1. Ізолят VN17 вірусу SVCV репродукується на культурі клітин EPC та призводить до суцільного руйнування моношару клітин на 6 день після інфікування.
2. При інфікуванні клітин EPC ізолятом VN17 SVCV, на шостий день культивування спостерігалась субтотальна круглоклітинна дегенерація, відокремлення від поверхні майже всіх клітин культури, що є характерним для SVCV згідно літературних даних. При цьому титр вірусу становив $10^{6,1}$ TCID₅₀/мл.
3. Електронномікроскопічне дослідження ізоляту VN17 SVCV, встановило плеоморфну, кулеподібну форму віріонів довжиною від 70 до 110 нм та діаметром від 60 до 90, що характерно для представників роду *Sprivivirus*, родини *Rhabdoviridae*.
4. Філогенетичний аналіз встановив приналежність ізоляту VN17 SVCV до геногрупи b, поруч з ізолятами 2/90 з Молдови та RNV з України. При цьому амінокислотні послідовності VN17 та 2/90 були ідентичними, не дивлячись на наявність 5 замін в нуклеотидній послідовності.
5. При порівнянні VN17 та 2/90 з RNV було виявлено 7 амінокислотних замін, 6 з яких демонстрували заміни амінокислот із схожими властивостями. Лише у 135 положенні гліцин був замінений на менш гідрофобний аргінін. При цьому візуалізуючи вторинну структуру, 6 замін були розташовані в невідсортованих ділянках глікопротеїну, і одна в межах α -спіралі. Не дивлячись на це загальна топологія вторинних структур обох ізолятів була ідентична.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ю. П. Рудь, Л. П. Бучацький, Н. Й. Тушницька, І. І. Грициняк (2021). Молекулярна діагностика вірусних захворювань риб. Науково-технічний вісник Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних медичних препаратів і кормових добавок та Інституту біол, 22 (2), сс. 323-330.
2. N. Kharkavlyuk, N. Matvienko, O. Kovbasiuk (2014). Factors affecting transmission and spread of the virus spring viremia of carp (*cyprinus carpio*). *Ribogospod. nauka Ukr.*, 3(29): 88-97
3. Zhang, Nian Zhi et al (2009). “Molecular analysis of spring viraemia of carp virus in China: a fatal aquatic viral disease that might spread in East Asian.” *PloS one* vol. 4,7
4. Ashraf U, Lu Y, Lin L, Yuan J, Wang M, Liu X (2016). Spring viraemia of carp virus: recent advances. *J Gen Virol.* 97(5):1037-105
5. Ahne, W., Bjorklund, H., Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G., & Winton, J. (2002). Spring viremia of carp (SVC). *Diseases of Aquatic Organisms*, 52, 261–272.
6. Wang, Zhao-Xi et al (2020). “Structural and Functional Characterization of the Phosphoprotein Central Domain of Spring Viremia of Carp Virus.” *Journal of virology* vol. 94,15 e00855-20.
7. Warg, J.V., Dikkeboom, A.L., Goodwin, A.E. et al (2007). Comparison of multiple genes of spring viremia of carp viruses isolated in the United States. *Virus Genes* 35, 87–95.
8. Михайлюк О.П., Хохлов С.М., (2010). 3 Лікувально-профілактичні заходи, щодо краснухи коропа. *Аграрний вісник Причорномор'я*. Випуск 54.

9. Li Z, Zhang Q, Luo P, Liu G, Wang M, Liu X (2015). Monoclonal antibody against M protein of spring viremia of carp virus. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*; 34(2):122-5.
10. Acheson, N. H. (2011). *Fundamentals of molecular virology* / Nicholas H. Acheson.—2nd ed. Hoboken, New Jersey: J. Wiley and Sons Inc.
11. Y. Teng; H. Liu; J. Q. Lv; W. H. Fan; Q. Y. Zhang; Q. W. Qin (2007). Characterization of complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China. , 152(8), 1457–1465. doi:10.1007/s00705-007-0971-8
12. Ahne, W., Bjorklund, H., Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G., & Winton, J. (2002). Spring viremia of carp (SVC). *Diseases of Aquatic Organisms*, 52, 261–272.
13. Misk, Ehab; Tubbs, Lincoln; Garver, Kyle; Isaac, Shelby; Wright, Elizabeth; Al-Hussinee, Lowia; Lumsden, John S. (2017). Spring viremia of carp virus: A RT-qPCR assay and surveillance in Ontario from 2008 to 2012. *Journal of Great Lakes Research*, 43(3), 127–131. doi:10.1016/j.jglr.2017.03.017
14. Ortega C, Cañas-Lopez L, Irgang R, Fajardo R, Poblete-Morales M, Valladares-Carranza B, Tapia-Cammas D, Avendaño-Herrera R. (2019) First detection of spring viraemia of carp virus in common carp (*Cyprinus carpio* L.) affected by a septicemic disease in Mexico. *J Fish Dis*. May;42(5):667-675. doi: 10.1111/jfd.12969. Epub 2019 Mar 15. PMID: 30874321; PMCID: PMC7166541.
15. Ip HS, Lorch JM, Blehert DS. (2016) Detection of spring viraemia of carp virus in imported amphibians reveals an unanticipated foreign animal disease threat. *Emerg Microbes Infect*. Sep 7;5(9):e97. doi: 10.1038/emi.2016.94. PMID: 27599472; PMCID: PMC5113056.
16. S. LaPatra, E. Misk, L. Al-Hussinee, J.S. Lumsden, (2016). Chapter 18 - Rhabdoviruses of Fish, Editor(s): Frederick S.B. Kibenge, Marcos G. Godoy,

- Aquaculture Virology, Academic Press, , Pages 267-297, ISBN 9780128015735, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801573-5.00018-8>.
17. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* Mar 15;30(6), 1292-305. doi: 10.1093/nar/30.6.1292. PMID: 11884626; PMCID: PMC101343.
 18. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. (2020). PCR past, present and future. *Biotechniques.* Oct;69(4):317-325. doi: 10.2144/btn-2020-0057. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32815744; PMCID: PMC7439763.
 19. Clouthier SC, Schroeder T, Bueren EK, Anderson ED, Emmenegger E (2021) Analytical validation of two RT-qPCR tests and detection of spring viremia of carp virus (SVCV) in persistently infected koi *Cyprinus carpio*. *Dis Aquat Org* 143,169-188. <https://doi.org/10.3354/dao03564>
 20. Shimahara, Y; Kurita, J; Nishioka, T; Kiryu, I; Yuasa, K; Sakai, T; Oseko, N; Sano, M; Dixon, P (2016). Development of an improved RT-PCR for specific detection of spring viraemia of carp virus. *Journal of Fish Diseases*, 39(3), 269–275. doi:10.1111/jfd.12357
 21. Shao, Ling; Xiao, Yu; He, Zhengkan; Gao, Longying (2016). An N-targeting real-time PCR strategy for the accurate detection of spring viremia of carp virus. *Journal of Virological Methods*, 229, 27–34. doi:10.1016/j.jviromet.2015.12.008
 22. Zhiqin Yue; Yong Teng; Chengzhu Liang; Xiayang Xie; Biao Xu; Laihua Zhu; Zhiwen Lei; Junqiang He; Zongxiao Liu; Yulin Jiang; Hong Liu; Qiwei Qin (2008). Development of a sensitive and quantitative assay for spring viremia of carp virus based on real-time RT-PCR. , 152(1-2), 43–48. doi:10.1016/j.jviromet.2008.05.031
 23. Zongxiao Liu; Yong Teng; Hong Liu; Yulin Jiang; Xiayang Xie; Huifang Li; Jiangqiang Lv; Longying Gao; Junqiang He; Xiujie Shi; Feiyan Tian; Jingshun Yang; Congxin Xie (2008). Simultaneous detection of three fish

- rhabdoviruses using multiplex real-time quantitative RT-PCR assay. , 149(1), 103–109. doi:10.1016/j.jviromet.2007.12.017
- 24.Misk, Ehab; Tubbs, Lincoln; Garver, Kyle; Isaac, Shelby; Wright, Elizabeth; Al-Hussinee, Lowia; Lumsden, John S. (2017). Spring viremia of carp virus: A RT-qPCR assay and surveillance in Ontario from 2008 to 2012. *Journal of Great Lakes Research*, 43(3), 127–131. doi:10.1016/j.jglr.2017.03.017
- 25.Kim HJ. (2012). Improved diagnosis of spring viremia of carp by nested reverse-transcription PCR: development of a chimeric positive control for prevention of false-positive diagnosis. *J Virol Methods*. Oct;185(1), 39-42. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.05.027. Epub 2012 Jun 5. PMID: 22677224
- 26.Shivappa RB, Savan R, Kono T, Sakai M, Emmenegger E, Kurath G, Levine JF. Detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in koi carp, *Cyprinus carpio* L. *J Fish Dis*. 2008 Apr;31(4):249-58. doi: 10.1111/j.1365-2761.2007.00894.x. PMID: 18353016.
- 27.Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T.(2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. Jun 15;28(12):E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
- 28.Goodwin, Andrew. (2009). Spring Viremia of Carp Virus (SVCV) Global Status of Outbreaks, Diagnosis, Surveillance and Research. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*. 61, 180-187. 10.46989/001c.20561.
- 29.Zhang NZ, Zhang LF, Jiang YN, Zhang T, Xia C. (2009). Molecular analysis of spring viraemia of carp virus in China: a fatal aquatic viral disease that might spread in East Asian. *PLoS One*. Jul 22;4(7). doi: 10.1371/journal.pone.0006337.
- 30.Abinash Padhi; Bindhu Verghese (2012). Molecular evolutionary and epidemiological dynamics of a highly pathogenic fish rhabdovirus, the spring viremia of carp virus (SVCV). , 156(1-2), 54–63. doi:10.1016/j.vetmic.2011.10.005

31. D. M. Stone¹, et al. (2003). Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups, Published in *DAO* Vol. 53, No. 3.
32. Gao LY, Liu H, Shi XJ, He JQ, Jiang YL. (2009). Comparison of characteristics of SVCV strains isolated in China and in Europe. *Bing Du Xue Bao*. Jan;25(1), 47-51.
33. Yu Xiao, Ling Shao, Chongwen Zhang, Wei An, (2014). Genomic evidence of homologous recombination in spring viremia of carp virus: A negatively single stranded RNA virus, *Virus Research*, Vol. 189, , Pages 271-279, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.005>.
34. Janet V. Warg; Audrey L. Dikkeboom; Andrew E. Goodwin; Kevin Snekvik; John Whitney (2007). Comparison of multiple genes of spring viremia of carp viruses isolated in the United States. , 35(1), 87–95. doi:10.1007/s11262-006-0042-3
35. Misk, Ehab; Tubbs, Lincoln; Garver, Kyle; Isaac, Shelby; Wright, Elizabeth; Al-Hussinee, Lowia; Lumsden, John S. (2017). Spring viremia of carp virus: A RT-qPCR assay and surveillance in Ontario from 2008 to 2012. *Journal of Great Lakes Research*, 43(3), 127–131. doi:10.1016/j.jglr.2017.03.017
36. Abinash Padhi, Bindhu Verghese, (2012). Molecular evolutionary and epidemiological dynamics of a highly pathogenic fish rhabdovirus, the spring viremia of carp virus (SVCV), *Veterinary Microbiology*, Vol. 156, 54-63, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.005>
37. Kim, MJ., Lee, S., Godahewa, G.I. et al. (2018). Complete genome sequence and phylogenetic analysis of spring viremia of carp virus isolated from leather carp (*Cyprinus carpio nudus*) in Korea in 2016. *Arch Virol* 163, 2917–2919 . <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3919-2>

38. Xiao Y, Shao L, Zhang C, An W. (2014). Genomic evidence of homologous recombination in spring viremia of carp virus: a negatively single stranded RNA virus. *Virus Res.*;189:271-9. doi: 10.1016/j.virusres.2014.06.005.
39. Matvienko, Natalya; Rud, Yuriy; Buchatsky, Leonid (2014). Partial nucleotide sequences of glycoprotein gene of Ukrainian strains of Spring viraemia of carp virus. *Zoology and Ecology*, (1), 1–5. doi:10.1080/21658005.2014.889939
40. Abinash Padhi; Bindhu Verghese (2012). Molecular evolutionary and epidemiological dynamics of a highly pathogenic fish rhabdovirus, the spring viremia of carp virus (SVCV). *Vet Microbiol.*, 156(1-2), 54–63. doi:10.1016/j.vetmic.2011.10.005
41. Yuan, Junfa et al (2014). “Transcriptome analysis of epithelioma papulosum cyprini cells after SVCV infection.” *BMC genomics* vol. 15,1 935. 25
42. Gong XY, Zhang QM, Gui JF, Zhang YB (2019). SVCV infection triggers fish IFN response through RLR signaling pathway. *Fish Shellfish Immunol.*;86:1058-1063.
43. Padhi A, Verghese B (2012). Molecular evolutionary and epidemiological dynamics of a highly pathogenic fish rhabdovirus, the spring viremia of carp virus (SVCV). *Vet Microbiol.*156(1-2):54-63.
44. Warg, J. V., Dikkeboom, A. L., Goodwin, A. E., Snekvik, K., & Whitney, J. (2006). Comparison of multiple genes of spring viremia of carp viruses isolated in the United States. *Virus Genes*, 35(1), 87–95.
45. Матвієнко Н.М., Харкавлюк Н.Є. (2011). Використання перещеплювальних культур клітин в іхтіовірусології. *Ветеринарна медицина* вип. 95. сс. 119-121.
46. Yuan, Junfa et al (2014). “Transcriptome analysis of epithelioma papulosum cyprini cells after SVCV infection.” *BMC genomics* vol. 15,1 935. 25
47. Li, Shun et al. (2019). “Spring viraemia of carp virus modulates p53 expression using two distinct mechanisms.” *PLoS pathogens* vol. 15,3

48. Zhao L, Qi L, Li C, Li L, Jin L, Yuan J. (2018). SVCV impairs mitochondria complex III resulting in accumulation of hydrogen peroxide. *Fish Shellfish Immunol.* 2018 Apr;75:58-65.
49. Bøgwald, Jarl, and Roy A Dalmo (2021). “Protection of Teleost Fish against Infectious Diseases through Oral Administration of Vaccines: Update 2021.” *International journal of molecular sciences* vol. 22(20)