

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Майстренко Марія Ігорівна

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

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

03.00.06.- вірусологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Науковий керівник доктор біологічних наук, професор
Бучацький Леонід Петрович,
Інститут рибного господарства НААН України,
провідний науковий співробітник

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, доцент
Недосєков Віталій Володимирович,
Національний університет біоресурсів і
природокористування України,
професор кафедри епізоотології, мікробіології і
вірусології

кандидат біологічних наук
Білявська Любов Олексіївна,
Інституту мікробіології і вірусології НАН України,
старший науковий співробітник відділу репродукції
вірусів

Захист відбудеться «11» травня 2021 року о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26. 001. 14 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект академіка Глушкова 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, спеціалізована вчена рада Д 26. 001 14

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12.

Автореферат розісланий 30 березня 2021 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради

В.В. Джаган

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 (CyHV-3). Особливо небезпечним для рибництва є CyHV-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 (МЕБ) 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. 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).

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

1. Провести виділення та ідентифікацію емерджентних вірусів коропа (*Cyprinus carpio*) та форелі (*Oncorhynchus 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 CyHV-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 риб.
6. Оцінити можливих хазяїв IPNV (штам «Карпати») у природних водоймах.

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

Предмет дослідження: біологічна характеристика IPNV (штам «Карпати») та герпесвірусу CyHV-3, які є емерджентними для території 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 риб з Київського зоопарку був виділений високопатогенний вірус герпеса третього типу (CyHV-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 емерджентних вірусів риб (IPNV (штам «Карпати») та CyHV-3).

Результати проведених досліджень розширюють уявлення про особливості перебігу інфекційного процесу в 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 України.

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

Особистий внесок здобувача. 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 (CyHV-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 Рудь 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 щирю подяку усім співавторам публікацій за темою дисертації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювалися 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, (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). 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури, який складається з двох підрозділів, наведені дані щодо біологічних властивостей герпесвірусів, зокрема родини аллогерпесвірусів, а також бірновірусів риб, загальна будова віріонів, фізико-хімічних властивостей, структури геному та особливостей життєвих циклів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для проведення досліджень використовувались наступні матеріали:

При роботі *in vitro* з вірусом інфекційного панкреатичного некрозу ізоляту «Карпати» використовували культури клітин RTG-2 (Rainbow Trout Gonad Tissue), FHM (Fat Headminnow) та EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) – які мають широкий спектр чутливості до вірусів риб.

Для виділення РНК IPNV використовували набір GenJet™ RNA Purification Kit (Thermo Scientific). Для синтезу кДНК 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) згідно з протоколом 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. Секвенування проводили в Інституті Молекулярної біології та генетики НАН України.

Для підбору олігонуклеотидних праймерів до українського ізоляту IPNV, визначення їхньої специфічності та фізичних властивостей використовували програмне забезпечення VectorNT110. Крім того, специфічність праймерів перевіряли за допомогою онлайн-сервісу BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Аналіз послідовностей нуклеотидів проводили за допомогою алгоритмів ClustalW в програмному забезпеченні MEGA 5.2 та BLASTN.

Для проведення досліджень використовувались наступні методи:

1. Очистка вірусу та електронно-мікроскопічні дослідження вірусної суспензії.

2. Біопроба. Постановка біопроби здійснювалась у лабораторних умовах шляхом введення 0,2 мл вірусомісного розчину у черевину форелі чи звичайного коропа.

3. Ідентифікація герпесвірусу (CyHV3). Загальну ДНК виділяли із зябер та нирок інфікованих риб. Для ідентифікації вірусу методом ПЛР використовували олігонуклеотидні праймери, специфічні до ділянки гену тимідинкінази CyHV3. Послідовності олігонуклеотидів були такими:

For 5'- TACGAGGTGATGCAGCGTCTGGAGGAATAC -3'

Rev 5'- CTGAGAGATTCTGACGGTGAAGGGTGCG -3'

4. Ідентифікація вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) ампліфікація здійснювалась з використанням трьох пар олігонуклеотидних праймерів, специфічних до генів VP2 та NS. Ампліфікацію проводили на термоциклері «96 Universal Gradient PEQ STAR» (PEQLAB, Німеччина). Результати електрофорезу спостерігали під ультрафіолетовим транслюмінатором. 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.

5. Визначення нуклеотидних послідовностей інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати»). Нуклеотидні послідовності трьох ампліфікованих фрагментів сегмента А українського ізоляту IPNV (штам «Карпати») (150 п.н. для гену NS та 175 і 480 п.н. для N- і С-кінцевих ділянок гену VP2 відповідно) були аналізовані в автоматичному ДНК-секвенаторі Genetic Analyser 3130.

6. Визначення активності аспартатамінотрансферази (AcAT). При роботі *in vitro* з вірусом інфекційного панкреатичного некрозу використовували культуру клітин RTG-2. Ця культура перевивних клітин риб є високочутливою до інфікування IPNV. Стан культури клітин вивчали під мікроскопом за морфологічними ознаками. Активність AcAT визначали загальноприйнятим колориметричним методом Райтмана і Френкеля .

7. Визначення активності катепсину В. Для досліджень використовували цьоголіток райдужної форелі. Для біохімічних аналізів використовували 10%-ний гомогенат печінки. 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'ютерних програм «Statistica» для Windows.

8. Вивчення можливих носіїв IPNV (штам «Карпати») у природних водоймах. В умовах лабораторії вивчали вплив IPNV на організм чужорідних хазяїв: широкопалого рака (*Astacus astacus*), струмкової форелі (*Salmo trutta*), полосатого даніо (*Danio rerio*) та на прісноводного моллюска (*Anodonta cygnea*). Для експериментального інфікування використовували культуральну рідину інфікованої клітинної лінії RTG-2. Для ідентифікації вірусу упродовж дослідів використовували метод зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). РНК вірусу виділяли як з гемолімфи тварин, так і з культуральної рідини клітин RTG-2 для порівняння інфекційного титру. ЗТ-ПЛР здійснювали з використанням пари олігонуклеотидних праймерів, специфічних до гену VP2 IPNV. Послідовності праймерів були такими:

WB1 5'-CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC-3',

WB2 5'-CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG-3'

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Виділення та конструювання тест-системи для діагностики СуНВ-3

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

При електронно-мікроскопічних дослідженнях в ядрах клітин нирок хворих коропів спостерігалось ущільнення хроматинового матеріалу. В перинуклеарній зоні були виявлені віріони діаметром 120 нм. Здебільшого вірусні частки були розташовані між внутрішнім та зовнішнім листками ядерної мембрани (рис. 1А). В цитоплазмі уражених клітин нирок коропа, в яку із ядра проникають нуклеокапсиди, були розширені каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму і спостерігались вірусні частинки, загорнуті в мембрани. Мітохондрії уражених клітин мали видовжену форму (рис. 1Б), багато мітохондріальних крист були зруйновані. 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 в якості контролю при адаптації методу ПЛР для діагностики СуНВ-3.

За допомогою ПЛР СуНВ-3 нами було виявлено також у хворих акваріумних риб коропа лабео (*Labeo bicolor*) та мішкозяберного сомика (*Heteropneustes fossilis*). Дослідження було проведено з метою встановлення етіологічного агента спалаху інфекції серед акваріумних риб Київського зоопарку у 2013 р.

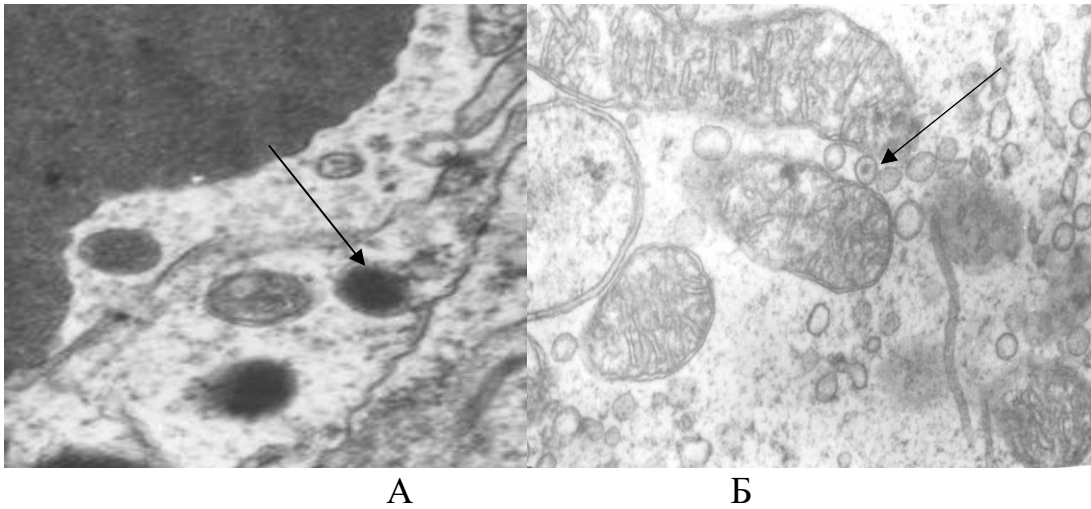


Рис. 1. Ультратонкий зріз нирок коропа кої, враженого СуНВ-3, де А – ущільнення хроматинового матеріалу в ядрі. В перинуклеарній зоні клітини розташовані вірусні частки (стрілки). Б – вірусні частки в цитоплазмі інфікованих клітин. Діаметр віріонів 120 н.

Специфічні олігонуклеотидні праймери до гену тимідинкінази СуНВ-3 успішно ампліфікували фрагменти ДНК вірусу в обох вищевказаних зразках. Довжина ампліфікованих ПЛР продуктів, як і передбачалось, становила 264 пари нуклеотидів (рис. 2).

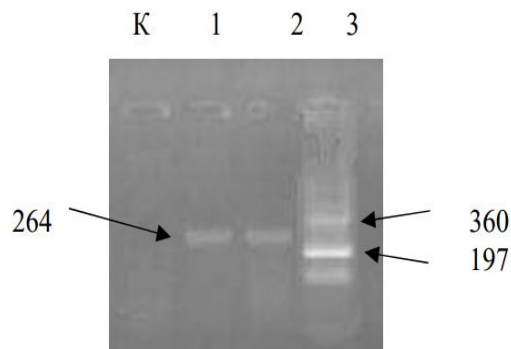


Рис. 2. Електрофореграма фрагментів ДНК СуНВ-3, ампліфікованих за допомогою праймерів, специфічних до гену тимідинкінази: ДНК виділена із зябер (1) та нирок (2) інфікованого коропа; М – ДНК-маркер

При візуальному обстеженні зябра хворих риб були гіперемовані і мали рожевий колір. У мішкозяберного сомика на розтині спостерігали порушення кольору та структури печінки, набряк нирок та переповнення жовчного міхура (рис. 3). Такі ж патологічні зміни спостерігались і в двокольорового лабео.



Рис. 3. Мішкозяберний сомик (*H. fossilis*), інфікований СуНВ-3

Як відомо, короп (*Cyprinus carpio*) є основним об'єктом товарного рибництва в Україні. Тому контроль за поширенням СуНВ-3, який спричиняє гостру хворобу коропа і викликає 90%-ву смертність риб, має важливе практичне значення. Спільно з Південною лабораторією ветеринарної медицини нами були проведені також моніторингові дослідження коропових риб у рибних господарства півдня України. Ні в одному з господарств вірус не був виявлений.

Накопичення IPNV на культурах клітин та електронна мікроскопія вірусу

Через розширення та диверсифікацію аквакультури багато зусиль вкладається у вивчення біологічних властивостей IPNV та патогенезу захворювання під назвою інфекційний панкреатичний некроз. 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 ікром'я саме з господарств Східної Європи.

У 2011 р. вірус був виявлений нами на території України у райдужної форелі *O. mykiss*, виловленої у річці Серет, Чернівецької області та названий IPNV (штам «Карпати»).

Накопичення вірусу проводили на культурах перевивних клітин риб. Віріони IPNV, отримані в культурі клітин, легше піддаються очистці, ніж у випадку виділення їх з інфікованих риб. Вже на третій день після інфікування (д.п.і.) вірусом інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати») чутливих до вірусу культур клітин спостерігалися зміни у моношарі досліджуваних культур клітин. Такі морфологічні зміни, як вакуолізація цитоплазми та округлення клітин спостерігались для культур RTG-2 та FHM на 3 д.п.і., а для ЕРС подібні ознаки з'являлись на 4 день експерименту. На 5 д.п.і. в дослідних флаконах RTG-2 та FHM спостерігалась класична цитопатична дія вірусу на культуру клітин. Більша частина клітин відшарувалась від поверхні флакону та вільно плавала в середовищі, в результаті замість суцільного клітинного моношару залишались поодинокі клітинні острівки. На 7 д.п.і. в

культури клітин RTG-2 не спостерігали прикріплених до пластику клітин. Клітини знаходились у товщі поживного середовища (рис. 4).

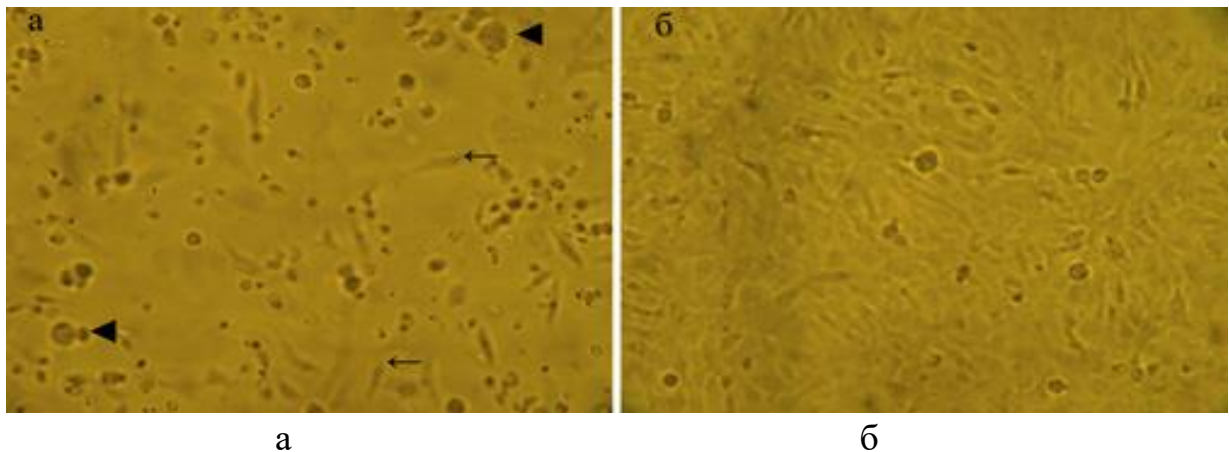


Рис. 4. Репродукція вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати») в культурі клітин RTG-2 (світлова мікроскопія $\times 200$), де а – абсолютна руйнація моношару клітин на 7 д.п.і.; б – контрольний варіант; \blacktriangleleft – великі округлі клітини; \leftarrow – поодинокі прикріплені клітини.

Така ж картина була характерна і для культури клітин FHM, щоправда вона наступала на 8 д.п.і. (рис. 5).

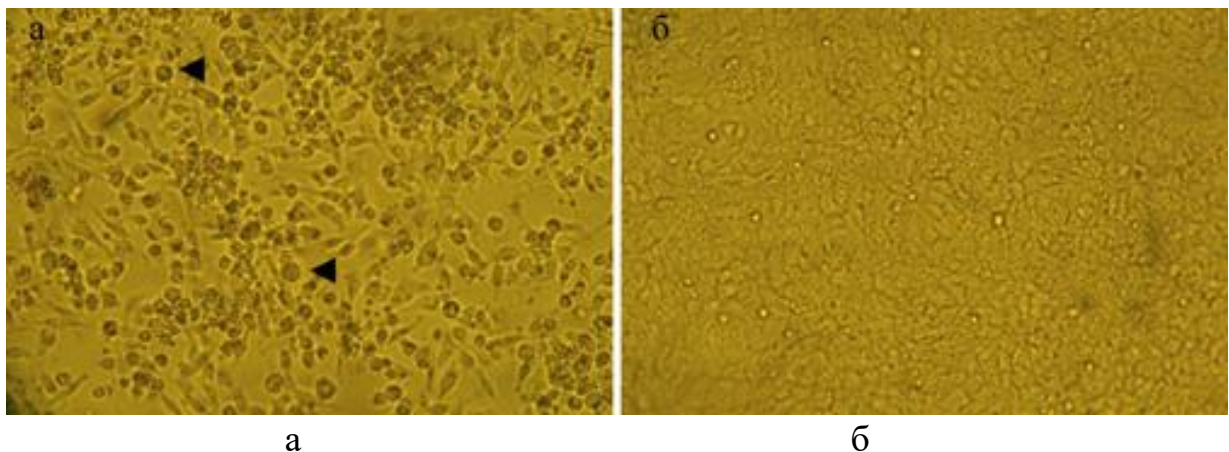


Рис. 5. Репродукція вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізолят «Карпати» в культурі клітин FHM (світлова мікроскопія $\times 200$), де а – цитопатична дія вірусу на 5 д.п.і. і часткова руйнація клітинного моношару; б – контрольний варіант; \blacktriangleleft – великі округлі клітини.

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. 6).

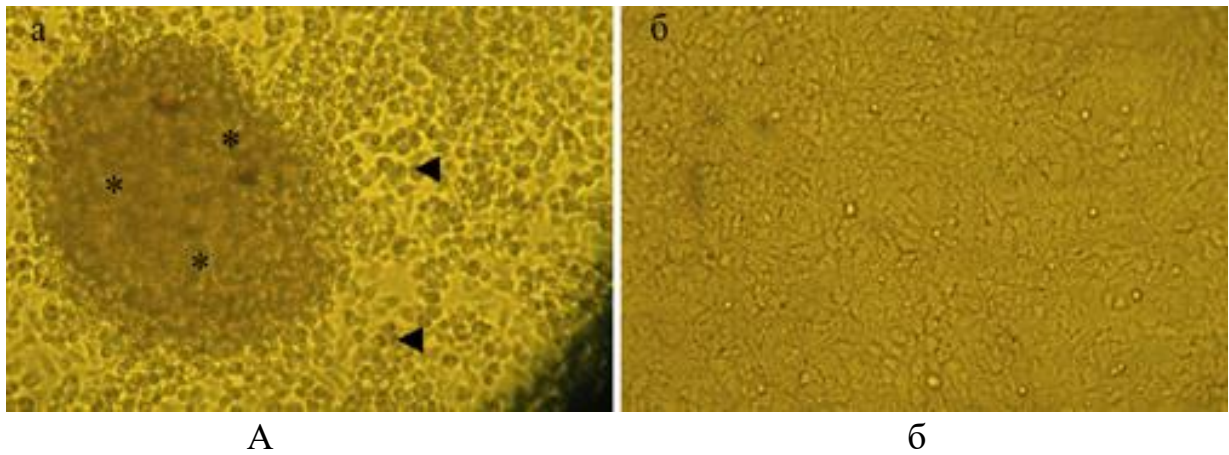


Рис. 6. Репродукція вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати») в культурі клітин EPC (світлова мікроскопія $\times 200$), де а – цитопатична дія вірусу на 9 д.п.і.; б – контрольний варіант; \blacktriangle – великі округлі клітини; * - ущільнені клітинні скупчення.

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, який становив $10^{5,5-5,8}$ TCID₅₀/мл⁻¹. Можливо такий інфекційний титр є наслідком повільної репродукції IPNV «Карпати» в клітинах EPC. В культурі клітин FHM інфекційний титр вірусу становив $10^{6,2-6,5}$ TCID₅₀/мл⁻¹ і це фактично на порядок вище ніж в культурі EPC. Найвищий інфекційний титр IPNV «Карпати» спостерігався в культурі RTG-2 і становив $10^{6,9-7,4}$ TCID₅₀/мл⁻¹. Культура RTG-2 є однією з спеціалізованих клітинних ліній під вірус інфекційного панкреатичного некрозу. А з огляду на високу контагіозність досліджуваного вірусу такий високий інфекційний титр цілком закономірний. Результати інфікування культур клітин RTG-2, FHM та EPC представлені у таблиці 1.

Загалом спостерігалась однакові морфологічні зміни та ЦПД вірусу на клітини для всіх досліджуваних культур. 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. Таким чином, усі три досліджувані культури клітин виявились чутливими до вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати»).

Таблиця 1

Репродукція вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати») в культурах клітин риб

Назва культури клітин	Ознаки ЦПД, д.п.і.				Інфекційний титр, TCID ₅₀ /мл ⁻¹
	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

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

Ампліфікація та аналіз нуклеотидної послідовності генів VP2 та NS вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (штам «Карпати»)

Одним з основних молекулярних методів ідентифікації IPNV є ампліфікація РНК вірусу за допомогою зворотної транскрипції та ПЛР (ЗТ-ПЛР). Було підбрано олігонуклеотидні праймери, специфічні до українського ізоляту IPNV та оптимізовано параметри постановки реакції. До того ж, оскільки в Європі поширеними є одразу декілька штамів IPNV, з метою встановлення приналежності українського ізоляту було проаналізовано 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 (штам «Карпати») ми використали модифіковані нами праймери IPN, PrD та WB, рекомендовані Pryde et al., Blake et al. та Williams et al.

Обрані олігонуклеотидні праймери, специфічні до ділянок генів неструктурного білку NS та структурного білку VP2 IPNV, ампліфікували очікувані за розміром фрагменти РНК вірусу. 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.7).

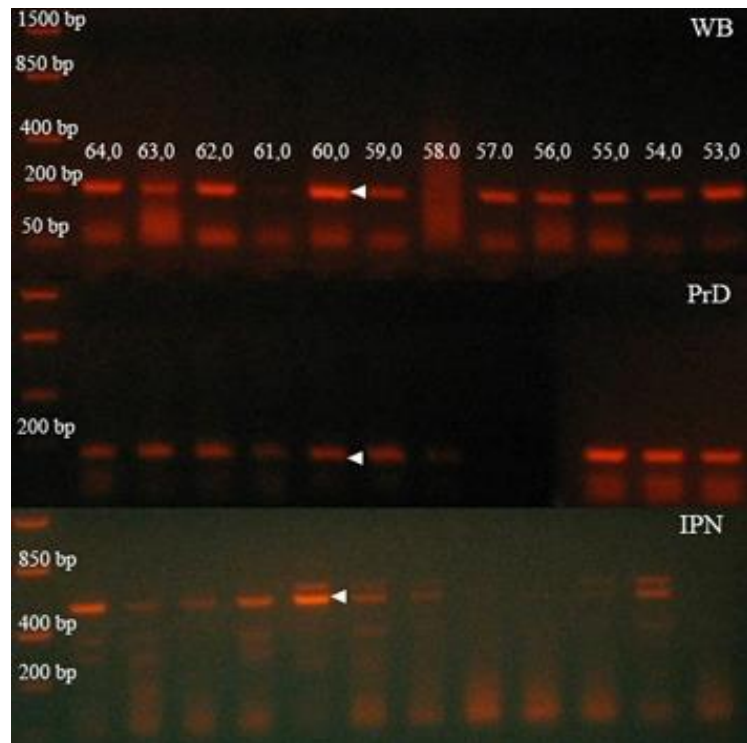


Рис. 7. Ампліфікація фрагментів генів VP2 (праймери IPN та WB) та NS (праймери PrD) українського ізоляту IPNV (штам «Карпати»). Найкращий результат показано ◀; зліва нанесено ДНК маркер FastRuler™ (Thermo Scientific); діапазон температур відпалу праймерів складав 53-64° С.

Найбільшу працездатність демонстрували праймери WB, які є універсальними для всіх генотипів IPNV та інших водних бірнавірусів. Аналогічна ефективність спостерігалась для праймерів PrD, але 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.

Таким чином, підібрані олігонуклеотидні праймери можуть бути використані для ідентифікації вірусу інфекційного панкреатичного некрозу в природних водоймах і форелевих господарствах України. Проведення всеукраїнського моніторингу IPNV дозволить скласти цілісну картину розповсюдження цього вірусу в країні, а також ідентифікувати інші штами, які циркулюють у Європі.

Філогенетичний аналіз IPNV (штам «Карпати»)

Нуклеотидні послідовності трьох ампліфікованих фрагментів сегменту 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. Порівняння послідовності нуклеотидів ізоляту «Карпати» з нуклеотидними послідовностями з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (NCBI) показало, що ампліфіковані фрагменти на 95-99% ідентичні послідовностям генів NS і VP2 штаму Sp. Серед ізолятів штаму Sp найбільш

спорідненими до українського ізоляту IPNV виявились віруси, виділені у Великобританії, Норвегії, Франції, Туреччині та Ірані.

Вплив IPNV (штам «Карпати») на активність АсАТ

Відомо, що активність цього ферменту служить одним з показників ураження печінки як у людей, так і у тварин. Тому метою стало вивчення впливу цього вірусу на активність аспартатамінотрансферази (АСТ) в модельній системі - перещеплюваних клітинах риб.

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 11 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 дозволяло зробити висновки про її роль в процесі репродукції IPNV.

Вплив IPNV (штам «Карпати») на активність катепсину

Враховуючи, що рН цитозольного середовища клітин риб наближене до нейтрального, а за дії IPNV відбувається його закислення, то доцільно було визначити особливості активаційного каскаду катепсинів в цих умовах, а саме катепсину В, оскільки йому належить провідна роль у різних моделях програмованої клітинної загибелі і він є найбільш стабільним ферментом при фізіологічних рН за дії різних чинників. Проведені експериментальні дослідження показали (рис. 8), що IPNV сприяє активації катепсину В в гомогенатах печінки райдужної форелі. Активація цього ферменту виникає в результаті пошкодження цілісності лізосомальної мембрани і зміни функцій тілзалежних протеїназ. Таким чином, внаслідок дії вірусу можуть створюватися умови для часткового виходу катепсинів із лізосом з активацією подальшого розпаду білкових структур, що призводить до порушення численних метаболічних процесів у клітині.



Рис 8. Активність катепсину В у печінці райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*), ураженої IPNV (достовірно по відношенню до контролю; $P \leq 0,05$).

Вивчення можливих носіїв IPNV (штам «Карпати») у природних водоймах

В умовах лабораторії вивчали вплив IPNV на організм чужорідних хазяїв: широкопалого рака (*A. astacus*), струмкової форелі (*S. trutta*), полосатого даніо (*D. rerio*) та на прісноводного молюска (*A. cygnea*). Результати дослідів показали, що смертність струмкової форелі та полосатого даніо під впливом IPNV складала 76,6 та 40,0% відповідно (рис.9). Мідія була стійкою до вірусу, але вірус в її організмі накопичувався і підтримувався на значному рівні (до 10^2 ID₅₀ / мл⁻¹) протягом всього експерименту (35 днів). Інфекційний титр в організмі полосатого даніо сягав $10^{4,5}$ ID₅₀ / мл⁻¹. Найвищий інфекційний титр виявлений у струмкової форелі (10^6 ID₅₀ / мл⁻¹).

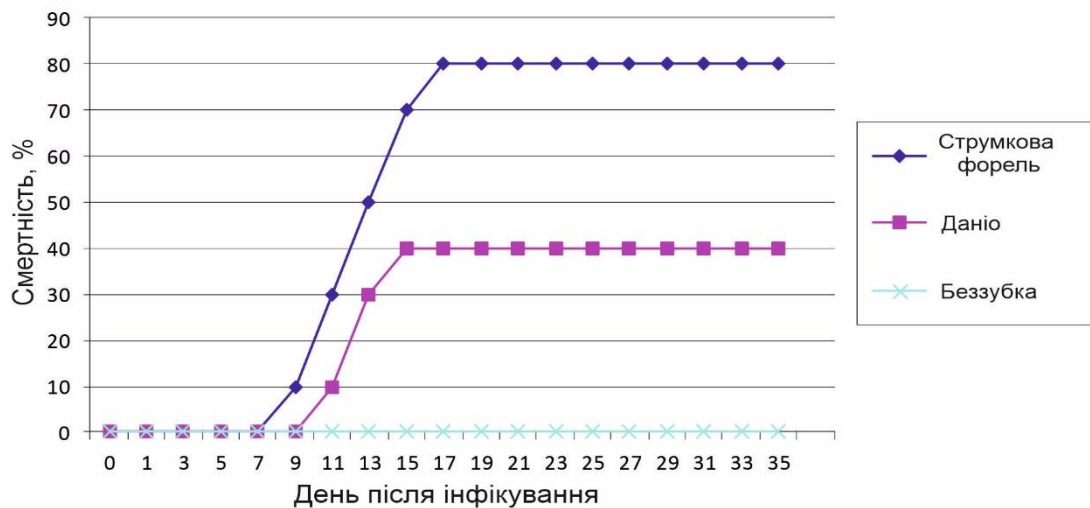


Рис. 9. Кумулятивна смертність інфікованих тварин, інфікованих IPNV (штам «Карпати») в дозі 10^3 TCID₅₀/мл⁻¹.

При інфікуванні IPNV широкопалого рака *A. astacus* характерні ознаки захворювання не спостерігались упродовж всього експерименту. 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 TCID₅₀/мл⁻¹. Титр вірусу в культуральній рідині інфікованих клітин RTG-2 становив $10^{7,0}$ TCID₅₀/мл⁻¹. 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. Раки були досить активними, реагували на дотик. У експериментально інфікованих раків не змінювався колір тіла та зябер. Більшість піддослідних тварин по закінченню дослідів 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.

Упродовж експерименту інфекційний титр вірусу в організмі широкопалого рака *A. astacus* був сталим і коливався в межах 10^2 - 10^3 TCID₅₀/мл⁻¹ (табл.2).

Таблиця 2

Динаміка інфекційного титру IPNV (штам «Карпати») в організмі широкопалого рака *A. astacus*

День після інфікування	0	7	14	21	28	35
Інфекційний титр, TCID ₅₀ /мл ⁻¹	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ²	10 ²

Такі результати свідчать про довготривале перебування 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 ID₅₀/мл⁻¹. Такий низький рівень вірусного титру може свідчити про лімітованість чутливих клітин, в яких можуть формуватися зрілі віріони.

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 діагностичум може бути ефективним для виявлення цієї висококонтагіозної інфекції в рибницьких господарствах.

2. Вперше в Україні у риб, виловлених з природних водойм (р. 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 аспартатамінотрансферази та катепсину В.

6. Результати вивчення кола можливих хазяїв IPNV у природних водоймах свідчать про довготривале перебування вірусу в організмі струмкової форелі, широкопалих раків та інших водяних організмів.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті в рецензованих журналах, що індексуються Scopus та Web of Science:

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 (*Surginus 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 рыбопитомников 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 IPNVна 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 // FABA, International symposium on fisheries and aquatic science. 2016. P. 46.

АНОТАЦІЯ

Майстренко М.І. Емерджентні вірусні інфекції коропа (*Cyprinus carpio*) та райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) – Рукопис.

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

Дисертаційна робота присвячена діагностиці та вивченню деяких біологічних особливостей висококонтагіозних емерджентних для України вірусних інфекцій коропа (*Cyprinus carpio*), а саме вірусу герпесу коропа 3-го типу (СuHV-3) та бірновірусу риб - вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*). Було досліджено розповсюдження даних вірусів в Україні, проведено виділення та ідентифікацію, досліджено характер прояву клінічних ознак захворювання, молекулярно-біологічні властивості, філогенетичний аналіз для розробки засобів діагностики і профілактики вірусних захворювань цінних видів риб, вивчено вплив на активність ферментів в організмі інфікованих риб. Вірус накопичено на культурах клітин риб для підтримання штамів в лабораторії, подальшої очистки та розробки діагностичних систем.

За результатами проведених нами дослідів по вивченню впливу вірусу на активність деяких ферментів показано, що найбільш інформативною є аспартатамінотрансфераза (АСТ). З огляду на простоту виконання аналізу визначення її активності цей метод може стати ефективним експрес-методом виявлення IPNV в форелевих господарствах.

В умовах лабораторії вивчали вплив IPNV (штам «Карпати») на організм чужорідних хазяїв: струмкової форелі (*Salmo trutta*), полосатого данію (*Danio rerio*), прісноводного молюска беззубки (*Anodonta cygnea*), та на широкопалого рака (*Astacus astacus*).

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

АННОТАЦИЯ

Майстренко М.И. Эмерджентные вирусные инфекции карпа (*Cyprinus carpio*) и радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*). – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.06. — вирусология. — Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2021.

Диссертационная работа посвящена диагностике и изучению некоторых биологических особенностей высококонтагиозных эмерджентных для Украины вирусных инфекций карпа (*Cyprinus carpio*), а именно вируса герпеса карпа 3-го типа (СuHV-3) и бирнавируса рыб – вируса инфекционного панкреатического некроза (IPNV) радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*). Было исследовано распространение данных вирусов в аквакультуре, проведено выделение и идентификация из разных регионов Украины, изучен характер проявления клинических признаков заболевания, молекулярно-биологические свойства,

филогенетический анализ для разработки методов диагностики и профилактики вирусных заболеваний ценных видов рыб, изучено влияние на активность ферментов в организме инфицированных рыб. Вирус накоплен на культурах клеток рыб для поддержания штаммов в лаборатории, дальнейшей очистки и разработки диагностических систем.

По результатам проведенных нами опытов по изучению влияния вируса на активность некоторых ферментов показано, что наиболее информативной является аспаратаминотрансфераза (АСТ). Учитывая простоту выполнения анализа определения ее активности этот метод может стать эффективным экспресс-методом выявления IPNV в форелевых хозяйствах.

В условиях лаборатории изучали влияние IPNV (штамм «Карпаты») на ораним чужеродных хозяев: ручьевой форели (*Salmo trutta*), полосатого данио (*Danio rerio*), пресноводного моллюска беззубки (*Anodonta cygnea*), и на широкопалого рака (*Astacus astacus*).

Используя новые разработанные методы диагностики на основе ПЦР можно уменьшить потери от болезней, существенно улучшить эпизоотическую ситуацию и повысить рыбопродуктивность в рыбных предприятиях.

Ключевые слова: вирус инфекционного панкреатического некроза форели, вирус герпеса карпа, диагностика, тест-система ПЦР, перевиваемые культуры клеток рыб, электронная микроскопия.

SUMMARY

Maistrenko M.I. Emerging of 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 (*Cyprinus carpio*), specifically cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) and fish birnavirus – infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

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*).

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. 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. 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. 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. 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.

According to the results of our experiments to study the effect of the virus on the activity of some enzymes, it is shown that the most informative is aspartate aminotransferase (AST). Given the simplicity of the analysis to determine its activity, this method can be an effective rapid method of detecting IPNV in trout farms.

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.

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