

УДК 576.858

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ІНФІКУВАННЯ КОРОПА ІРИДОВІРУСОМ КОМАРА

Ю.П. Рудь¹, Л.П. Буцацький²

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка

² Інститут рибного господарства УААН, м. Київ

*Представлено результати експериментального інфікування коропа (*Cyprinus carpio*) іридовірусом комара (*Aedes flavescens*). Встановлено, що при внутрішньочеревній ін'єкції іридовірус комара спричиняє смертність коропа, яка сягає 60–100% протягом 8–14 днів. Інфікована риба не харчується та не реагує на механічні подразнення, вона малорухлива. Зябра, нирки та печінка ураженої риби характеризуються некротичними запаленнями. Електронна мікроскопія показала наявність вірусу в уражених органах інфікованого коропа, в яких він був реізолюваний на личинках великої вощиної молі (*Galeria mellonella*).*

Кровосисні комарі, які, як відомо, мешкають у багатьох водоймах, є джерелом поживи для прісноводних риб. З їхніх личинок були ізолювані іридовіруси, якими експериментально інфікували коропа.

Іридовіруси — це великі ДНК-вмісні віруси тварин, репродукція яких відбувається в цитоплазмі. Очищені віріони іридовірусів, а інколи й інфіковані організми безхребетних тварин, мають характерне кольорове забарвлення з райдужним відтінком. Звідси і походить назва цієї родини вірусів [1].

Значення іридовірусів в інфекційній патології риб зростає з кожним роком. За останні 10–15 років в умовах аквакультури та природних водоймах було ідентифіковано велику кількість іридовірусів риб. Ізоляція їх тісно пов'язана зі збільшенням обсягів ведення світової аквакультури. Іридовіруси спричиняють масову загибель риб і завдають великих збитків промисловому рибництву [2].

Іридовірус комара (MIV) — це ДНК-вмісний ікосаедричний цитоплазматичний вірус, що уражує комарів родів *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*. Середній діаметр віріонів становить 200 нм. MIV відрізняється від інших іридовірусів високою видовою специфічністю і характеризується політропністю щодо тканин господаря [3].

За морфологією та морфогенезом MIV нагадує іридовірус жаберного некрозу коропа, що спричиняє широко розповсюджену хворобу — бранхіонекроз коропа [4]. Однак віруси відрізняються за чутливістю до специфічних перевивних культур клітин та характеру цитопатичної дії (ЦПД).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

MIV. Іридовірус комара культивували на личинках великої вощиної молі *Galeria mellonella*. Личинки інфікували вірусомісним матеріалом та інкубували за температури 20–22°C. Через 20 днів з личинок виділяли MIV [5].

Для приготування інокуляту з інфікованих личинок великої вощиної молі готували гомогенат. Низькошвидкісне центрифугування гомогенату проводили за швидкості 5000 об/хв протягом 5 хв на центрифугі К-24. Частина надосадової рідини (НР1) фільтрували через мікрофільтр з діаметром пор 450 нм. Для інокуляції риб використовували фільтрат та його розведення 10^{-1} , 10^{-2} та 10^{-3} . Іншу частину НР1 нашаровували на 30% розчин сахарози (5 мл сахарози ХЧ, на 0,05 М трис-НСІ буфері рН 7,2) і центрифугували за швидкості 20000 об/хв протягом 40 хв на ультрацентрифугі Beckman L5-50В у роторі SW-40. Характерний блакитний

осад свідчив про наявність віріонів MIV. Осад ресуспендували у мінімальній кількості 0,05 М трис-НСІ буфера (рН-7,2) і освітляли на центрифугі К-24 за швидкості 5000 об/хв протягом 5 хв. Надосадову рідину (НР2) використовували для інокуляції риб як концентрований вірусомісний матеріал. Перед інфікуванням в інокулят додавали антибіотики пеніцилін (100 од/мл) та стрептоміцин (100 мкг/мл) і витримували 2 год за температури 27°C. Після експозиції інокулят перевіряли на наявність мікроорганізмів шляхом бактеріологічних посівів на МПА [6].

Біопроба. Досліди з вивчення інфекційності MIV для риби проводили на однорічках коропа *Cyprinus carpio*. Риб інфікували шляхом уведення вірусомісного матеріалу в очеревину (0,2 мл) і утримували в 50-літрових ваннах за температури 18–20°C та годували комбікормом. Перед інфікуванням риб досліджували на наявність патогенної мікрофлори, паразитів та гельмінтів [6]. Всі риби були здорові.

Реізоляція MIV. Для реізоляції іридовірусу комара використовували зябра, нирки, селезінку та печінку загиблих риб. Гомогенат внутрішніх органів та зябер фільтрували та центрифугували 5 хв за швидкості 5000 об/хв на центрифугі К-24. Супернатант використовували для ін'єкції інтактних личинок *Galeria mellonella* в розведеннях 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} та 10^{-4} . Личинок інкубували за температури 20–22°C. Через 20 днів з них виділяли MIV. Очищення іридовірусу комара проводили в градієнті щільності сахарози (10–50%), як описано вище.

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

Виділення ДНК. До 200 мкл очищеного іридовірусу комара, виділеного з личинок *Galeria mellonella* та загиблої риби, додавали 355 мкл лізуючого буфера (10мМ Tris-НСІ, 10мМ NaCl, 20 мМ EDTA, рН=8,2), 30 мкл 10% SDS та 15 мкл Proteinase K (20 мг/мл), суміш перемішували на центрифугі Vortex та інкубували 1 год за 37°C. Для екстракції ДНК

використовували суміш фенол — хлороформ-ізоаміловий спирт (25:24:1) з наступним осадженням ДНК холодним (–20°C) етанолом 8–10 год при — 20°C. ДНК розчиняли в ТЕ буфері (10мМ Tris-НСІ, 1мМ EDTA, рН=7,5).

Рестрикційний аналіз. При постановці рестрикційного аналізу використовували ендонуклеази рестрикції EcoRI, BamHI, XbaI та HindIII (Fermentas, Литва) та ДНК MIV виділеного з личинок *Galeria mellonella* та загиблої риби. В мікропробірку вносили 4 мкл ДНК, 4 мкл 10× буфера та 2 мкл ферменту. Сумарний об'єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Реакційну суміш залишали на ніч у термостаті за 37°C.

Електрофорез. Для електрофорезу використовували 0,7% агарозу в TAE буфері. До ДНК додавали фарбу (6X Loading Dye Solution) у розрахунку 1 мкл фарби на 5 мкл ДНК. Зразки наносили на платівку гелю та проводили електрофорез, використовуючи силу струму 65 мА та напругу 100 В. Як маркер був ДНК-маркер фагу лямбда. По закінченні електрофорезу гель фарбували бромистим етидієм 2–3 хв та спостерігали результати під ультрафіолетовим транслюмінатором.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При інфікуванні MIV однорічок коропа перші ознаки захворювання виникали в різних особин у різний час, в основному, з 6-го по 10-й день після інфікування (таблиця). У інфікованих риб колір зябер змінювався з темно-червоного на бурий. Край зяберних дуг мав пухку структуру та був забарвлений в коричневий колір. По всій площині зябер утворювались некротичні осередки з крововиливами розміром 1–2 мм (рис. 1). Картина нагадувала характерну зяброву мозаїку, що спостерігається під час захворювання риб, пов'язаного з збудниками вірусної етіології [9]. Нирки та печінка характеризувалися світло-рожевим забарвленням з осередками некротичного запалення, тоді як у контрольних риб спостерігали темно-вишневий колір цих органів без ознак некрозу. Загибель інфікованих риб спостерігалась з 7-го по 14-й день після інфікування. За появи перших ознак захворювання інфікована риба

Смертність риб, інфікованих іридовірусом комара

Розведення вірусу	Кількість риб на початок дослідження	День після інфікування									
		6	7	8	9	10	11	12	13	14	
10^{-3}	5	0	0	1	1	1	3	4	5	5	
10^{-2}	5	0	0	0	1	1	1	5	5	5	
10^{-1}	5	0	0	0	0	0	4	4	4	4	
НР1	5	1	2	2	2	2	3	3	3	3	
НР2	5	0	0	2	2	2	2	2	2	2	
Контроль*	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

* Стерильний фізіологічний розчин.

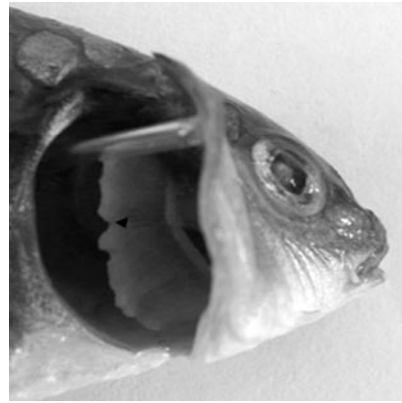


Рис. 1. Осередки некротичного запалення на зябрах інфікованого коропа (зліва); пошкодження краю зяберної дуги (справа)

не харчувалась, а за 1–2 дні до смерті не реагувала на механічні подразнення та була млявою.

Іридовірус комара був реїзольований на личинках *Galeria mellonella*. Як показали результати експериментів, вірус у розведеннях 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} був здатний накопичуватись у личинках великої вошиної молі. Після диференційного ультрацентрифугування спостерігали характерний блакитний осад, що свідчить про наявність вірусу. Електронно-мікроскопічні дослідження виявили вірус у зразках уражених органів інфікованої риби. Віріони мали гексагональну форму з діаметром 200 нм (рис. 2).

Рестрикційний аналіз показав, що сайти рестрикції ендонуклеаз EcoRI, BamHI, XbaI та HindIII ДНК іридовірусу комара виділеного як з інфікованої риби, так і з личинок *Galeria mellonella*, були однаковими для обох зразків ДНК (рис. 3).

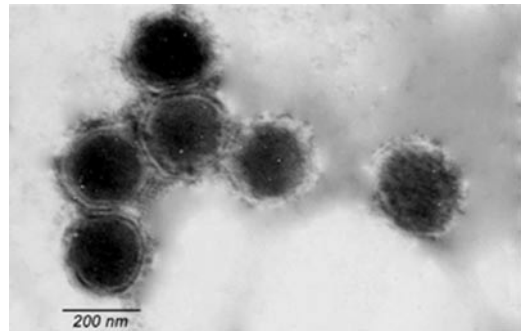


Рис. 2. Вірус райдужності комара (Розмір віріону — 200 нм)

За даними Міжнародного комітету по таксономії вірусів, до складу родини *Iridoviridae* входить 5 родів: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Ranavirus* і *Megalocytivirus*. Віруси риб належать до трьох родів: *Lymphocystivirus*, *Ranavirus* і *Megalocytivirus* [3]. Багато нових іридовірусів ще недостатньо вивчені, не кла-

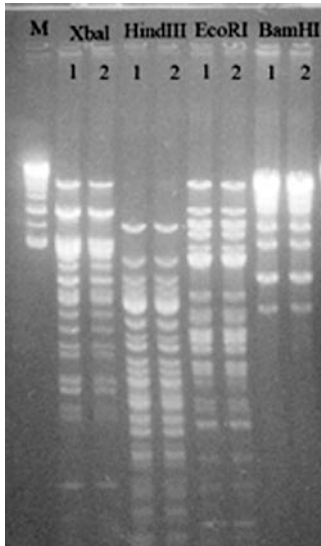


Рис. 3. Рестрикційний аналіз ДНК іридовірусу комара: 1 — ДНК МІВ, виділений від загиблого коропа; 2 — ДНК МІВ, виділений з личинок *Galeria mellonella*; М — λ маркер

сифіковані і вважаються емерджентними (від англ. emerging, тобто ті, що з'явилися недавно). Нині в багатьох вірусологічних лабораторіях світу проводиться ідентифікація цих вірусів, яка включає вивчення фізико-хімічних властивостей віріонів, аналіз послідовностей їх ДНК та розробку діагностикумів.

Іридовірус комара належить до роду *Chloriridovirus*. Незважаючи на те, що характерним господарем для МІВ є комари родів *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, результати досліджень свідчать про високу інфекційність цього вірусу для представника

віддаленої таксономічної категорії — коропа *Suipinus carpio*. Було встановлено, що при внутрішньочеревній ін'єкції МІВ спричиняє смертність коропа, яка сягає 60–100%, протягом 8–14 днів (рис. 4). В інфікованій риби спостерігали зниження харчової активності, вона не реагувала на механічні подразнення, була малорухливою, млявою. Цікаво відзначити, що симптоматика внутрішніх органів та зябер ураженої риби, а саме некротичні осередки, нагадувала характерні ознаки захворювання, спричинене іридовірусами риб, які належать до родів *Ranavirus* та *Megalocytivirus* [3].

Ohba, Aizawa (1982) показали, що внутрішньочеревне введення інтактного та інактивованого УФ-опроміненням іридовірусу комах *Chilo iridescent* (CIV) спричиняло смертність мишей, тоді як інактивованій нагріванням вірус не був токсичним [10]. Kirn et al. (1972) повідомляють, що при внутрішньочеревному введенні значної дози іридовірусу жаби (FV3), виділеного від *Rana pipiens*, спостерігали швидку загибель мишей за відсутності розмноження вірусу [11]. Автори досліджень пов'язують смертність лабораторних тварин з наявністю у складі віріонів CIV та FV3 токсичних білкових факторів.

Таким чином, патоморфологічне дослідження токсичності іридовірусу комара для коропа показало, що органом-мішенню для токсичного фактора МІВ є зябра та печінка.

Більш детальне вивчення інфекційності іридовірусу комара щодо коропа ви-

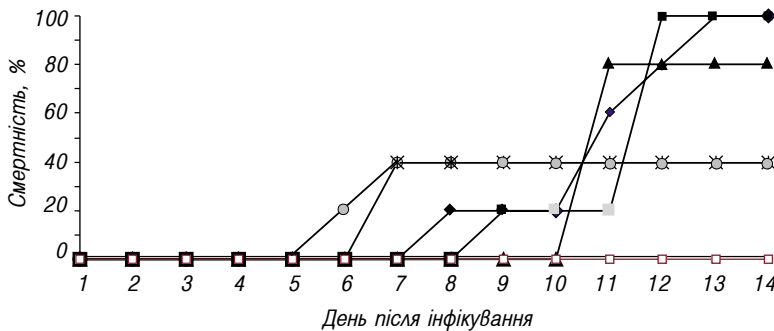


Рис. 4. Смертність риб, інфікованих іридовірусом комара: ● — НР1 (надсадова рідина 1, профільтована через мікрофільтр); ▲ — розведення 10⁻¹; ■ — розведення 10⁻²; ◆ — розведення 10⁻³; * НР2 (МІВ сконцентрований ультрацентрифуванням); □ — контроль (фізіологічний розчин)

магає застосування методу ультратонких зрізів для дослідження внутрішньоклітинної локалізації вірусу, використання методів ІФА та ПЛР для розробки експрес-діагностики цього вірусу в господарствах.

ВИСНОВКИ

У результаті проведеного дослідження було встановлено, що за внутрішньочеревної ін'єкції іридовірус комара спричиняє смертність коропа, яка сягає 60–100% протягом 8–14 днів.

Електронно-мікроскопічні дослідження виявили вірус у зразках уражених органів інфікованої риби.

Рестрикційний аналіз показав, що сайти рестрикції ендонуклеаз EcoRI, BamHI, XbaI та HindIII ДНК іридовірусу комара, виділеного як з інфікованої риби, так і з личинок *Galeria mellonella*, були однаковими для обох зразків ДНК.

Патоморфологічне дослідження інфекційності іридовірусу комара для коропа виявило, що органом-мішенню для MIV є зябра та печінка.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бучацький Л.П. Иридовирусы. — К.: Вища школа, 1981. — 120 с.
2. Essbauer S., Ahne W. Viruses of Lower Vertebrates // J. Vet. Med. — 2001. — В 48. — Р. 403–475.
3. Chinchar V.G., Essbauer S., He J.G., Hyatt A., Miyazaki T., Seligy V., Williams T. Family Iridoviridae. In Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 150–162 / Ed. by C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L.A. Ball. — San Diego: Elsevier / Academic Press — 2005.
4. Попкова Т.И., Щелкунов И.С. Выделение вируса от карпов, больных жаберным некрозом. — М.: ВНИИПРХ Рыб. хоз. — 1978. — № 4. — С. 34–38.
5. Бучацький Л.П., Канюка В.Ю., Лебединець Н.М. Чутливість великої вощиної молі до вірусу райдужності комара // Мікробіологічний журнал. — 1976. — Т. 38, № 5. — С. 605–607.
6. Мусселиус В.А., Ванятинский В.Ф., Вихман А.А. и др. Лабораторный практикум по болезням рыб. — М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. — 296 с.
7. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных: Справочник. — М.: Агропромиздат, 1986. — 351 с.
8. Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. — 3rd ed. — New York: Cold Spring Harbour, 2001.
9. Бучацький Л.П. Вирусные инфекции морских и пресноводных животных. — К.: УДЖ “Ноосфера”, 1994. — 131 с.
10. Ohba M., Aizawa K. Mammalian toxicity of an insect iridoviruses // Acta Virol. — 1982. — 26. — Р. 165–168.
11. Kirn A., Gut GP., Bingen A., Hirth C. Acute hepatitis produced by frog virus 3 in mice // Arch. Ges. Virusforsch. — 1972. — 36. — Р. 394–397.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИНФИЦИРОВАНИЕ КАРПА ИРИДОВИРУСОМ КОМАРА

Ю.П. Рудь, Л.П. Бучацький

Представлены результаты экспериментального инфицирования карпа (*Cyprinus carpio*) иридовиром комара (*Aedes flavescens*). Показано, что при внутрибрюшинном введении иридовірус комара вызывает смертность карпа, которая достигает 60–100% на протяжении 8–14 дней. Инфицированная рыба не реагирует на механические воздействия, она малоподвижна. Жабры, почки и печень характеризуются очагами некротического воспаления. Электронная микроскопия показала присутствие вируса в пораженных органах инфицированной рыбы, в которых он был реизолирован на личинках большой вощиной моли *Galeria mellonella*.

EXPERIMENTAL INFECTION OF THE CARP BY MOSQUITO IRIDOVIRUS

Y. Rud, L. Buchatsky

Experimental infection indicate that mosquito iridovirus (MIV), a chloriridovirus, is pathogenic for carp *Cyprinus carpio*. The cumulative mortality reached up to 60–100% within 8–14 d. Symptoms of inoculated carp included cessation of feeding and decreased ventilation. Just prior to death, the fish were lethargic. The infection was characterized by focal necrosis of the gill, kidney and liver. In inoculated carp, MIV was reisolated on larva *Galeria mellonella* from gill, kidney, spleen and liver. This is the first time that a virus isolated from a mosquito has been shown to cause mortalities in a fish species.