

УДК: 597-12:576.85.08

**МОЛЕКУЛЯРНА ДІАГНОСТИКА РНК-ВМІСНИХ
ВІРУСІВ РИБ УКРАЇНИ****Рудь Ю. П.***Інститут рибного господарства НААН, м. Київ, Україна, e-mail: rud_yuriy@ifr.com.ua***Бучацький Л. П.***Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ, Україна*

У статті представлено результати розробки діагностичних тест-систем на основі полімеразної ланцюгової реакції для ідентифікації РНК-вмісних вірусів риб в Україні, а саме вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) та вірусу весняної віремії коропа (SVCV). Підбір діагностикумів проведено згідно рекомендацій Міжнародного Епізоотичного Бюро для об'єктів сучасної аквакультури. Розроблені тест-системи апробовані в лабораторії біотехнологій у рибництві ІРГ НААН. Показано специфічність, ефективність та переваги запропонованих тест-систем.

Ключові слова: молекулярна діагностика, ПЛР, інфекційні хвороби риб

Інфекційні захворювання риб – це економічно важливий аспект рибного господарства. Попри високу значимість епізоотій в рибництві, на сьогоднішній день бракує інформації про механізми патологічного процесу, передачу, фактори вірулентності та імуногенність більшості збудників інфекційних хвороб риб. Тому заходи профілактики та попередження захворювання, до яких відноситься експрес-діагностика, є єдиним доступним та ефективним способом боротьби з патогенами риб в умовах сучасної аквакультури [1].

Розвиток ДНК технологій, спрямованих на безпосереднє виявлення генетичного матеріалу збудників хвороб різної етіології (вірусів, бактерій, грибів та ендопаразитів), поступово витісняє трудомісткі бактеріологічні, серологічні та гістологічні методи діагностики. Новітні методи геноміки та протеоміки успішно використовуються у вивченні властивостей інфекційних агентів, які можуть змінюватись під час мутацій. Нині найпопулярнішим методом в ДНК діагностиці інфекційних хвороб риб є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [2].

Метою наших досліджень було розробити діагностичні тест-систем на основі ПЛР для ідентифікації РНК-вмісних вірусів риб, що циркулюють в Україні і за даними Міжнародного Епізоотичного Бюро (ОІЕ) є найбільш небезпечними для об'єктів сучасної аквакультури [3].

Матеріали та методи. Відбір, приготування та зберігання патологічного матеріалу, а також накопичення вірусів в культурі клітин проводили відповідно до міжнародних нормативних документів [4]. Накопичення ізоляту IPNV «Карпати» проводили на культурі клітин RTG-2. Штам вірусу SVCV культивували на культурі клітин EPC. Культури культивували при температурі 20 °С в поживному середовищі MEM (PAA, Австрія) з додаванням 10 % FBS Gold (PAA, Австрія) та антибіотиків.

Для виділення РНК вірусів використовували набір GenJet™ RNA Purification Kit. Для синтезу кДНК з отриманих препаратів РНК використовували набір RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific).

Для підбору олігонуклеотидних праймерів, визначення їхньої специфічності та фізичних властивостей використовували програмне забезпечення Vector NTI 10. Крім того, специфічність праймерів перевіряли за допомогою онлайн-сервісу BLAST. Ампліфікацію здійснювали з використанням чотирьох пар олігонуклеотидних праймерів, специфічних до генів VP2 та NS вірусу інфекційного панкреатичного некрозу та набору з трьох праймерів, специфічних до глікопротеїну G SVCV, для напівгніздової ПЛР.

ПЛР проводили на термоциклері 96 Universal Gradient PEQ STAR (PEQLAB) з використанням реагентів DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X). Продукти ПЛР аналізували в 2 % агарозному гелі TopVisison Agarose в 50X TAE. Виділення ДНК з гелю здійснювали за допомогою набору Silica Bead DNA Gel Extraction Kit відповідно 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. Аналіз послідовностей нуклеотидів проводили за допомогою алгоритмів ClustalW в програмному забезпеченні MEGA 6.0 та BLASTN.

Результати роботи. Проаналізувавши літературні 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. Як показали результати наших досліджень, використання обраних олігонуклеотидних праймерів, специфічних до ділянок генів NS та VP2 IPNV, призводило до ампліфікації очікуваних за розміром фрагментів кДНК. Розмір ампліконів становив для праймерів IPN 620 пар нуклеотидов (п.н.), для WB 204 п.н., для PrA 1120 п.н., а фрагмент довжиною 175 п.н. був характерний для праймерів PrD (таблиця).

Для діагностики SVCV було обрано метод напівгніздової ПЛР з специфічними праймерами до гену глікопротеїну G. Результати наших досліджень свідчать про те, що у випадку високої концентрації РНК-мішені вірусу в досліджуваному зразку, продукти ампліфікації візуалізуються вже на першому етапі ПЛР. Але при низькій концентрації вірусу, у випадку латентної інфекції, тільки за використання другого етапу напівгніздової ПЛР стає можливим ідентифікувати генетичний матеріал вірусу. ПЛР продукти ампліфікації фрагменту гена G мали розмір 714 та 606 п.н. відповідно у першому та другому етапах напівгніздової ПЛР (таблиця).

Нуклеотидні послідовності ампліфікованих фрагментів українських ізолятів IPNV та SVCV були проаналізовані в автоматичному ДНК-секвенаторі Genetic Analyser 3130. Як показали результати наших досліджень, український ізолят IPNV належить до штаму Sp, а SVCV виявився близькоспорідненим зі штамом Fejip, що масово поширений в країнах Центральної та Східної Європи.

Таблиця – Результати досліджень

Вірус	Назва праймерів	Мішень (ген)	Довжина продуктів, п.н.
IPNV	PrA_f + PrA_r	VP2 (full length)	1120
	PrD_f + PrD_r	NS	175
	IPN_f + IPN_r	VP2	620
	WB1 + WB2	VP2	204
SVCV	SVCVF1 + SVCVR2	G	714
	SVCVF1 + SVCR4	G	606

В Інституті рибного господарства НААН працює ПЛР лабораторія спрямована на діагностику інфекційних захворювань риб. За час існування лабораторії, співробітниками були розроблені діагностичні системи на основі ПЛР для ідентифікації вірусних, бактеріальних та паразитарних захворювань риб. При розробленні діагностиків, зверталась увага на тенденції розвитку вітчизняного рибництва та інфекційні агенти, які циркулюють в Україні або можуть проникнути у вітчизняні рибогосподарські підприємства із сусідніх країн. Неабияка роль відводилась й генетичній мінливості збудників інфекційних захворювань риб. Адже один і той же патоген може характеризуватись різним ступенем вірулентності, що зумовлена виключно його генетичною інформацією [5].

Поруч з діагностикою гостро виникає питання визначення вірулентності штамів. У вирішенні цієї проблеми допомагає аналіз нуклеотидної послідовності геномів збудників інфекційних захворювань риб. Тільки за наявності послідовностей ДНК вірусів і бактерій, їх генів, що відповідають за вірулентність, остаточно стане можливим вивчення патогенезу захворювання [6].

З огляду на все більш поширене явище резистентності до антибіотиків, основним напрямком боротьби з інфекційними хворобами риб має бути попередження захворювання і профілактика. Першими кроками в цьому мають бути суворе виконання правил ведення аквакультури, а саме дотримання санітарно-епідеміологічних норм, щільності посадки риби та якості води. Вакцини, хіміотерапія та пробіотики — також багатообіцяючі напрямки профілактики. Перспективним є культивування видів риб, стійких до бактерій та вірусів і може бути використане як альтернатива.

Висновки. Запропоновані методи ПЛР є більш точними, легкими у використанні та економічними у порівнянні з традиційними серологічними або культуральними. Експрес-діагностика даних збудників інфекційних захворювань риб відбувається упродовж одного дня.

Список літератури

1. Woo P.T.K., Bruno D.W. 2011. Fish Diseases and Disorders. Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI, 944 pp.
2. Rud Yu., Maistrenko M., Buchatsky L. Isolation of Infectious pancreatic necrosis virus from wild-life rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* in Western Ukraine Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology. - 2013. - Vol. 65. - P. 63-65.
3. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. URL: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/>
4. OIE Aquatic animal health code 12th Edition // World Organisation for Animal Health (www.oie.int). – 2009. – 288 p.
5. Matvienko N.M., Rud Yu., Buchatsky L.P. Partial nucleotide sequences of glycoprotein gene of Ukrainian strains of Spring viraemia of carp virus // Zoology and Ecology. - 2014. - Vol. 24 (1). - P. 70-74.
6. Rud Yu.P., Maistrenko M.I., Buchatskiy L.P. Characterization of an infectious pancreatic necrosis virus from rainbow trout fry (*Onchorhynchus mykiss*) in West Ukraine // Virologica Sinica. – 2015. – Vol 30 (3). – P. 231-233

MOLECULAR DIAGNOSIS OF FISH RNA-VIRUSES IN UKRAINE

Rud Yu. P.*Institute of Fisheries of the NAAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine***Buchatskiy L. P.***Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine*

The paper presents the results of the development of diagnostic test systems based on the polymerase chain reaction to identify the most common viral infections of fish in Ukraine, such as Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and Spring viraemia of carp virus. The goal of current research was to show the importance of PCR diagnostics in prevention of fish infections. Developed diagnostic systems were tested in the laboratory of biotechnology in aquaculture of IF NAAS. Briefly, for DNA or RNA extraction, cDNA synthesis, PCR and sequencing the commercial kits were used. For primer selection we concerned to OIE recommendations and applied the Vector NTI 11, on-line service BLAST and MEGA 6.0 software. Selection of diagnostics was performed using the OIE recommendations for the most popular aquaculture species. The specificity, efficiency and benefits of the proposed methods comparing with serological and histological methods of diagnosis of fish pathogens were shown. Consequently the PCR assays mentioned in this research are more accurate, easy to use and economical than traditional serological or cell culture methods. The assays can be rapidly conducted such that under ideal conditions, data can be generated and returned to the fish-farming site within a single day.

Keywords: molecular diagnostics, PCR, fish infectious diseases

УДК: 619:616-078:57.083.33:636

**ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ВІДБОРУ «СУХОЇ КРАПЛИНИ КРОВІ»
ДЛЯ ЕПІЗООТОЛОГІЧНОГО МОНІТОРИНГУ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТА ДИКИХ ПТАХІВ****Рула О. М., Стегній Б. Т., Музика Д. В., Стегній А. Б., Усова Л. П.**

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: alex.ru75@inbox.ru*

Відбір «сухої краплини крові» на фільтрувальний папір являє собою мінімально-інвазивний спосіб збору, транспортування та довгострокового зберігання проб, придатних для серологічно-ретроспективної діагностики. У даній статті представлені результати щодо відбору в польових умовах проб крові від сільськогосподарської та дикої птиці на фільтрувальний папір, подальшої обробки матеріалу в лабораторних умовах, постановки РЗГА з використанням отриманого супернатанту в порівнянні з аналогічними пробами крові отриманими класичними методами. У результаті проведених досліджень було доведено, що запропонований метод є високоефективним та суттєво не впливає на результати серологічних досліджень.

Ключові слова: кров, птахи, інфекційні захворювання, антитіла

Природним резервуаром збудників багатьох інфекційних хвороб, що становлять небезпеку для тварин і людини, є дикі птахи. При цьому найбільше значення мають представники перелітних видів, які розповсюджують інфекції за рахунок сезонних міграцій [1, 2, 3, 4, 5].

Загальновізнано, що еколого-географічні особливості території є найважливішим фактором у розвитку епізоотичного процесу. У цьому відношенні південь України є територією, на якій у весняно-осінній період зосереджується багатомільйонне поголів'я пернатих мігрантів з різних куточків світу. Таким чином, моніторинг інфекційних хвороб у місцях перебування диких птахів на зазначеній території вельми актуальний в науковому та практичному відношенні, як з епізоотичної, так і епідеміологічної точки зору. Одним із складових моніторингу є проведення постійних серологічних досліджень, які направлені на виявлення особин позитивно реагуючих до відповідних інфекцій, у тому числі особливо небезпечних, таких як високопатогенний грип птиці та ньюкаслська хвороба.

Збір відібраних проб крові в польових умовах, їх подальше зберігання та транспортування до лабораторій проводиться в замороженому стані на льоду або в рідкому азоті. За рахунок впливу температури навколишнього середовища дані хладогени потребують постійного контролю та поповнення, що створює деякі труднощі в даних умовах.

Фільтрувальний папір з плямами висушеної крові, зібраної у природному осередку від людини і тварин, давно використовується в епідеміологічних дослідженнях [6]. Переваги цього підходу до відбору зразків перед класичними очевидні. Насамперед, вони