

of chickens vaccinated with a commercial vaccine (group 4) and experimental vaccines №2 (group 2, adjuvant – «aluminum hydroxide + saponin») and №3 (group 3, adjuvant – «Montanid ISA 70») and infected with control strains of the pathogen was not noted

Keywords: *Avibacterium paragallinarum*, poultry

УДК 619:616.98:578.82/.83[IPNV]:597.552.51

DOI 10.36016/VM-2023-109-16

ДОСЛІДЖЕННЯ РЕПРОДУКЦІЇ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ (IPNV) В УМОВАХ *IN VITRO*

Рудь Ю. П.^{1,2}, Залоїло О. В.¹, Грициняк І. І.¹, Буцацький Л. П.^{1,2}

¹ Інститут рибного господарства Національної академії аграрних наук України, Київ, Україна, e-mail: rudziknew@ukr.net

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Метою роботи було вивчити репродукцію нових емерджентних ізолятів вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) в умовах *in vitro* для визначення вірулентних властивостей. В роботі досліджували нові ізоляти IPNV, виділені у форелевих господарствах України упродовж 2021-2022 років. При роботі з вірусом використовували культуру клітин RTG-2, на якій визначали інфекційний титр вірусу та прояв ознак ЦПД. Інфекційний титр виділених ізолятів в культурі клітин RTG-2 коливався в межах від $1,1 \times 10^3$ до $1,0 \times 10^7$ TCID₅₀/мл. Виділені ізоляти IPNV спричиняли низький ($\leq 25\%$), помірний ($\leq 50\%$) та високий ($\geq 70\%$) рівні смертності у малька лососевих. На основі біологічних властивостей та показників інфекційного титру досліджувані ізоляти VN11, VN18 та VN29 були визначені як низьковірулентні, а ізоляти VN20, VN30, VN32 і VN39 віднесено до високовірулентних. Серед високовірулентних ізолятів, VN32 мав найвищий титр $1,0 \times 10^7$ TCID₅₀/мл та спричиняв смертність у райдужної форелі, середня вага якої становила 100 г. Виділений від палії ізолят вірусу IPNV мав інфекційний титр $1,58 \times 10^6$ TCID₅₀/мл, а смертність малька коливалась в межах 15-25%. Кількість виявлених ізолятів та їх культуральні властивості свідчать про біорізноманіття ізолятів і штамів вірусу інфекційного панкреатичного некрозу в Україні. Скільки нововиявлених ізолятів вірусу належать до того чи іншого штаму треба ще визначити. Для цього буде проведено дослідження нуклеотидної послідовності гена, що кодує капсидний білок VP2, на основі якого також буде можливість визначити вірулентність за змінами в амінокислотах

Ключові слова: культура клітин, інфекційний титр, Salmonidae

Вірус інфекційного панкреатичного некрозу (*Infectious pancreatic necrosis virus* або IPNV) спричиняє висококонтагіозне інфекційне захворювання у лососевих (Salmonidae). Вірус належить до роду *Aquabirnavirus*, родина Birnaviridae. Віріони IPNV мають ікосаедричний капсид діаметром близько 65 нм, в середині якого розміщено два сегменти дволанцюгової РНК (А і В) розміром 3100 і 2784 пари нуклеотидів (п.н.) відповідно [1].

В Україні захворювання інфекційний панкреатичний некроз зустрічається у палії (*Salvelinus fontinalis*), струмкової форелі (*Salmo trutta*) та райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) [2-4]. Через значний економічний вплив вірусу на галузь аквакультури, великі зусилля в усьому світі приділяють контролю захворювання за допомогою різних підходів: рання діагностика та оцінка біологічних ризиків, контроль торгівлі об'єктами аквакультури, скринінг природних популяцій та вивчення генотипів вірусу і розробка вакцин [1].

Забезпечення біологічної безпеки та біологічного захисту рибництва в Україні є пріоритетним напрямом досліджень Інституту рибного господарства НААН. Тому в умовах актуальної проблеми щодо емерджентних захворювань в аквакультурі, ми обрали за мету наших досліджень вивчити репродукцію нових ізолятів IPNV в умовах *in vitro* для визначення вірулентних властивостей ізолятів, виділених у форелевих господарствах України упродовж 2021-2022 років.

Матеріали та методи. При роботі з вірусом інфекційного панкреатичного некрозу в умовах *in vitro* використовували культуру клітин RTG-2 (Rainbow Trout Gonad Tissue, ECACC 90102529). Клітин RTG-2 культивували на поживному середовищі DME/F-12-HEPES (Euroclone, ЕСМ0095L) з додаванням 10-% інактивованої ембріональної телячої сироватки NBCS (Gibco, 16010-167) та розчину антибіотиків та антимікотика (HyClone, SV30079.01). Клітини культивували у вигляді моношарових культур у пластикових флаконах Cellstar (Greiner Bio-One, 690160) площею 25 см² при температурі 15°C з інтервалом субкультивування 6-7 днів. Для визначення інфекційного титру вірусу використовували 96-луночні планшети Cellstar (Greiner Bio-One, 655180) з 24-годинною культурою клітин [3]. Підрахунок інфекційного титру ізолятів вірусу проводили за загальноприйнятим методом [5]. В роботі використовували ізоляти вірусу IPNV, виділені у період з 2021 по 2022 рік, а саме VN11 (Харківська обл.), VN18 (Волинська обл.), VN20 (Закарпатська обл.), VN29 (Рівненська обл.), VN30 і VN32 (Волинська обл.), VN39 (Львівська обл.) та контрольний штам вірусу VN1 (штам «Карпати» [6], Чернівецька обл.). Упродовж експерименту проводили щоденну перевірку стану дослідних та контрольних планшетів з метою виявлення ознак цитопатичної дії (ЦПД) вірусу на клітини.

Результати досліджень та їх обговорення. Упродовж періоду з 2021 по 2022 рік нами було виділено 7 ізолятів вірусу інфекційного панкреатичного некрозу зі спеціалізованих рибогосподарських підприємств. У переважній більшості випадків спалахи захворювання фіксували у малька райдужної форелі. Смертність риби сягала від 20 до 70 %, що значною мірою впливало на функціонування підприємств. Три з семи ізолятів вірусу було виявлено у малька форелі, який вирощувався з імпортованої заплідненої ікри, а два ізоляти було ідентифіковано як повторні спалахи на господарствах, на яких дане захворювання відмічалось раніше. Ще два ізоляти вірусу було виявлено на господарствах, на яких використовується власний рибопосадковий матеріал, що може свідчити про хронічне інфікування плідників або потрапляння вірусу через систему водопостачання з відкритих джерел.

За результатами проведених досліджень можна стверджувати, що на території досліджуваних нами господарств циркулюють штами вірусу IPNV з різними культуральними властивостями. Так титр виділених ізолятів в культурі клітин RTG-2, яка є однією з найбільш чутливих до даного вірусу, коливався в межах від $1,1 \times 10^3$ до $1,0 \times 10^7$ TCID₅₀/мл (таблиця). Така різноманітність у властивостях виявлених ізолятів вірусу IPNV може свідчити про циркуляцію як ослаблених штамів вірусу, так і надходження нових більш вірулентних форм вірусу з імпортованим рибопосадковим матеріалом. Низький (≤ 25 %) або помірний (≤ 50 %) рівень смертності риби на господарстві характеризував виділений ізолят вірусу як низьковірулентний та з низьким титром вірусу в культурі клітин. До таких ізолятів можна віднести віруси, виявлені в Харківській (VN11), Волинській (VN18) на Рівненській (VN29) областях. Послаблення вірулентних властивостей вірусу може відбуватися за рахунок довготривалої персистенції вірусу на господарствах, зміни властивостей віронів (мутації) та вироблення імунітету у хазяїна [7].

Таблиця — Титр вірусу інфекційного панкреатичного некрозу в культурі клітин RTG-2

Ізолят	Рік виділення	Область виділення вірусу	Хазяїн	Вага риби, г	Титр вірусу, TCID ₅₀ /мл
VN1	2013	Чернівецька	Райдужна форель	1-2	$3,6 \times 10^4$
VN11	2021	Харківська	Райдужна форель	4-5	$7,2 \times 10^4$
VN18	2021	Волинська	Райдужна форель	2-4	$2,8 \times 10^3$
VN20	2021	Закарпатська	Райдужна форель	2-3	$2,4 \times 10^6$
VN29	2022	Рівненська	Райдужна форель	4-5	$1,1 \times 10^3$
VN30	2022	Волинська	Палія	2-4	$1,58 \times 10^6$
VN32	2022	Волинська	Райдужна форель	100	$1,0 \times 10^7$
VN38	2022	Львівська	Райдужна форель	1-2	$2,1 \times 10^6$

До високовірулентних ізолятів вірусу, які спричиняли високу смертність мальків форелі і палії та мали високий титр в культурі клітин, можна віднести ізоляти VN20, VN30, VN32 та VN38, виділені у Волинській, Закарпатській та Львівській областях. Серед виявлених високовірулентних ізолятів вірусу були ті, що ймовірно завезли разом з імпортованою

заплідненою ікрою на господарство, так і ті, що могли потрапити через систему водопостачання або внутрішню торгівлю рибопосадковим матеріалом. Підвищення вірулентності вірусу може також відбуватися за рахунок мутацій, наприклад реасортації сегментів РНК, на господарствах з інтенсивним виробництвом та обігом рибопосадкового матеріалу [8].

Слід зазначити, що ізолят VN32 мав найвищий інфекційний титр в культурі клітин RTG-2. Даний ізолят було виділено від райдужної форелі, середня вага якої становила 100 г. З огляду на помірну смертність (40 %) і наважку інфікованої риби на господарстві, можна стверджувати, що у ізолята змінилися властивості у бік підвищення його патогенності. Також слід зауважити, що вірус IPNV (VN30) було діагностовано у палії, об'єкті аквакультури, який зараз стає все більш популярним, в першу чергу через стійкість до вірусних захворювань. Смертність палії коливалась в межах 15-25 %, а от титр вірусу в культурі клітин був високим і становив $1,58 \times 10^6$ TCID₅₀/мл. Випадок з палією також може свідчити про зміну вірулентних властивостей вірусу, до того ж це один з перших випадків діагностики IPNV у палії в Україні.

Висновки та перспективи подальших досліджень. В Україні нині циркулює щонайменше один штам вірусу інфекційного панкреатичного некрозу, це штам Spajapur (Sp) (серогрупа A2). У Європі окрім широко поширеного штаму Sp, циркулюють також штами West Vuxton (WB) та Abild (Ab), які теоретично можуть потрапити на спеціалізовані господарства України разом з рибопосадковим матеріалом. Очевидно, що різний рівень інфекційного титру ізолятів вірусу в культурі клітин та смертність, яку вони спричиняють на господарствах, свідчать про біорізноманіття ізолятів і штамів вірусу інфекційного панкреатичного некрозу в Україні. Скільки нововиявлених ізолятів вірусу належать до того чи іншого штаму треба ще визначити. Для цього буде проведено дослідження нуклеотидної послідовності гена, що кодує капсидний білок VP2, на основі якого також буде можливість визначити вірулентність за змінами в амінокислотах. Генетична інформація щодо нових ізолятів вірусу дозволить проводити прогнозування ризиків нових спалахів інфекційного панкреатичного некрозу на форелевих господарствах, що є важливим у контексті продовольчої безпеки країни.

Список літератури

1. Бучацький Л. П., Рудь Ю. П., Пастиря А. С. Бірнаввіруси : монографія. Київ : ДІАБ, 2022. 211с.
2. Matvienko N. M., Rud Yu. P., Buchatskiy L. P. Replication of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in different cell lines and in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Arch. Polish. Fish.* 2014. Vol. 22. P. 127–133. DOI: <https://doi.org/10.2478/aopf-2014-0012>.
3. Rud Y. P., Maistrenko M. I., Buchatskiy L. P. (2015). Characterization of an infectious pancreatic necrosis virus from rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) in West Ukraine. *Virologia Sinica*. 2015. Vol. 30, No 3. P. 231–233. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3513-z>.
4. Rud Yu. et al. Experimental infection of brown trout (*Salmo trutta*), zebrafish (*Danio rerio*), and swan mussel (*Anodonta cygnea*) with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Agricultural Science and Practice*. 2020. Vol. 7, No 3. P. 31–39. DOI: <https://doi.org/10.15407/agrisp7.03.031>.
5. Lei C. et al. On the calculation of TCID₅₀ for quantitation of virus infectivity. *Virologia Sinica*. 2021. Vol. 36, No 1. P. 141–144. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9020094>.
6. Рудь Ю. П., Майстренко М. І. Штам вірусу інфекційного панкреатичного некрозу ізолят «Карпати» (IPNV «Карпати»), 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.
7. Dorazo C. P. The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and its virulence determinants: what is known and what should be known. *Pathogens*. 2020. Vol. 9, No 2. P. 94. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9020094>.
8. Tapia D. et al. Infectious pancreatic necrosis virus in salmonids: Molecular epidemiology and host response to infection. *Rev Aquac.* 2022. Vol. 14. P. 751–769. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12623>.

STUDY OF *IN VITRO* REPRODUCTION OF INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS (IPNV)

Rud Yu. P.^{1,2}, Zoloto O. V.¹, Hrytsyniak I. I.¹, Buchatskiy L. P.^{1,2}

¹ Institute of Fisheries of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

The aim of the work was to study the *in vitro* reproduction of new emergent isolates of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in purpose to determine virulence properties. The new strains of IPNV isolated from trout farms in Ukraine during 2021-2022 were investigated. For this purpose, RTG-2 cell line was used, on which the infectious titer of the virus and the manifestation of CPE signs were determined. The infectious titer of selected isolates in RTG-2 cell line ranged from 1.1×10^3 to 1.0×10^7 TCID₅₀/ml. Isolated IPNV strains caused low ($\leq 25\%$), moderate ($\leq 50\%$) and high ($\geq 70\%$) mortality rates in trout fry. Based on biological properties and indicators of infectious titer, the investigated isolates VN11, VN18 and VN29 were determined as with low

virulence, and isolates VN20, VN30, VN32 and VN39 were classified as highly virulent. Among the highly virulent isolates, VN32 had the highest titer of 1.0×10^7 TCID₅₀/ml and caused mortality in rainbow trout with an average weight of 100 g. The IPNV strain isolated from the brook trout had an infectious titer of 1.58×10^6 TCID₅₀/ml and caused fry mortality ranged from 15 to 25 %. The number of detected isolates and their cultural properties testify to the biodiversity of strains for the Infectious pancreatic necrosis virus in Ukraine. How many newly discovered isolates of the IPNV belong to one or another genotype remains to be determined. For this, a study of the nucleotide sequence of the gene encoding the capsid protein VP2 will be conducted, on the basis of which it will also be possible to determine virulence by changes in amino acids sequences

Keywords: cell culture, infectious titer, Salmonidae