

ВИКОРИСТАННЯ ПЛР ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСУ ВЕСНЯНОЇ ВІРЕМІЇ КОРОПА

Н. М. МАТВІЄНКО, Л. П. БУЧАЦЬКИЙ

Інститут рибного господарства НААН), м. Київ, вул. Обухівська 135
mmarine73@mail.ru

Представлені результати роботи щодо використання методу ПЛР для ідентифікації вірусу весняної віремії коропа (SVCV). З метою підбору ефективних праймерів для постановки ПЛР нами було проведено порівняльне вивчення нуклеотидних послідовностей геномів рабдовірусів різних видів риб з використанням комп'ютерних програм. При перевірці специфічності полімеразної ланцюгової реакції з підібраними праймерами в якості матриці були використані проби РНК референтних штамів та ізолятів вірусу SVCV, виділених від риб в господарствах України. Встановлено, що найбільш цінними для ПЛР-діагностики рабдовірусної інфекції є зразки мозку й ексудату хворих риб. Таким чином, підібрані пари праймерів дозволяють специфічно ідентифікувати вірус SVCV у культурі клітин і клінічному матеріалі від інфікованих риб.

Ключові слова: ПЛР, праймери, ізоляти, SVCV, культура клітин, короп

Вступ. На сьогодні аквакультура є однією з перспективних галузей тваринництва. Стрімке зростання цієї галузі насамперед пов'язане зі значним зменшенням природних запасів риби та освоєнням внутрішніх водних ресурсів. Традиційним об'єктом аквакультури України є короп. Серед коропових риб небезпечним є вірус весняної віремії коропа (SVCV), який є представником родини *Rhabdoviridae*, роду *Vesiculovirus* (Walker et al. 2000; Ahne et al. 2002). Геном SVCV кодує 5 структурних білків: нуклеопротеїд (N), фосфопропротеїн (P), білок матриксу (M), глікопротеїн (G) та вірусну РНК-залежну РНК-полімеразу (L) (Ahne et al. 2002, Hoffmann et al. 2002, Teng et al. 2007). На підставі аналізу нуклеотидних послідовностей гену G, ізоляти SVCV бути розділені на чотири підгрупи першої геногрупи: Ia, Ib, Ic і Id (Warg et al. 2007). Віруси, виділені на півдні Африки, в Англії та США були віднесені до геногрупи Ia. Геногрупи Ib і Ic містили віруси, ізольовані в Молдові (Shchelkunov, 1989), Україні (Warg et al. 2007) та Росії (Stone et al. 2003). До складу геногрупи Id входить вірус, виділений у Великобританії (Rowley et al. 2001 Adair, 1986)

SVCV може інфікувати багато видів риб. Зафіксовані природні інфекції у коропа (*Cyprinus carpio*) (Fijan, 1999), білого амура (*Stenopharyngodon idellus*) (Haenen, 1993), карася (*Carassius auratus*) (Fijan, 1984), даніо (*Danio rerio*) і інших (Wang et al. 2006, Sanders et al. 2003).

Довгий час географічне поширення SVCV було обмежене європейським континентом. Зараз цю хворобу реєструють у більшості європейських країн і деяких держав колишнього Радянського Союзу (Білорусія Грузія, Литва, Молдова, Росія та Україна). Однак, в 1998 SVCV виявили у

золоті рибки в Бразилії. В 2002 SVCV виявили в двох різних місцях в США і в 2006 році в Канаді. Виявлення вірусу в коропа в Китаї підтвердили в 2004 р (ОІЕ, 2003).

За класифікацією Міжнародного епізоотичного бюро (МІЕБ) SVCV відноситься до категорії особливо небезпечних («декларованих») вірусів риб (ОІЕ, 2003). У аквакультурі спалахи захворювання провокуються техногенними стресами і відбуваються зазвичай навесні, після пересадки риб із зимувальних у нагульні ставки. Загибель риб (переважно цьоголіток та дволіток, рідше плідників) досягає 30–40 %, а іноді і 70 % (Fijan, 1999). Захворювання проявляється у вигляді ексудативно-геморагічного синдрому («краснухи»), обумовленого ураженням вірусом ендотелію кровоносних капілярів і нирок, що приводить до порушення водно-мінерального балансу й виходу плазми й формених елементів крові в оточуючі тканини й порожнини (Васильков та ін., 1994).

Діагноз на SVCV ставлять на підставі виконання комплексу класичних вимог, що включають аналіз епізоотичних даних, клінічних ознак захворювання й патологоанатомічних змін. Серед діагностичних методів застосовують серологічні (імуноферментний аналіз), вірусологічні (ізоляція вірусу на чутливих перещеплювальних культурах клітин, постановка біопроби) та молекулярно-біологічні (зворотно-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ–ПЛР) методи (Щелкунов та ін. 2005)

Метою нашої роботи було надати наукове обґрунтування застосування методу ПЛР для ідентифікації вірусу весняної віремії коропа в клінічному матеріалі

Матеріали та методи. В роботі було використано референтний штаб вірусу SVCV «ЗЛ4», наданий І.С.Щелкуновим (ВНДПРГ) (Росія). Польові клінічні матеріали відбирали під час проведення планових іхтіопатологічних обстежень рибницьких господарств. В господарствах України були виділені наступні ізоляти від риб з ознаками краснухоподібного захворювання:

ВН1 (короп) – фермерське господарство Волинської області;

ВК-1 (короп) – Львівська обл.;

В-82 (карась) – господарство Рівненської області.

Для дослідження використовувались гомогенати внутрішніх органів (нирки, селезінка, мозок). Гомогенати були приготовані на середовищі Eagles MEM (буферна система – 0,1 M Tris-HCl, pH 7,6) у співвідношенні 1:5.

Для відтворення експериментальної інфекції проводили біопробу. Рибу тестували на наявність інфекційних захворювань. Досліди зі штучного інфікування риби проводили в лабораторних умовах у ваннах об'ємом 40 дм³. Для біопроби формували дві групи цюголіток коропа-дослідну і контрольну, у кількості 10 екземлярів у кожній групі, середня вага риби була 25 гр. після первинної адаптації риби. Проводили інтраперитонеальне зараження та вносили вірус безпосередньо у воду ванн, попередньо вводячи рибу у стан стресу. Як джерело вірусу використовували вірусомісну рідину, інфікованої вірусом культури клітин ЕРС, що мала ознаки яскраво вираженого ЦПД (ураження 75-100% моно шару клітин). Доза введення становила 0,1 см³. Температура води становила 17 °С.

Титрування вірусів. Готували 10-кратні розведення вірусу на живильному середовищі (Ігла MEM з подвійним набором амінокислот і вітамінів без сироватки). Облік цитопатогенної дії проводили мікроскопуванням заражених культур, починаючи з 12 годин після інокуляції і до 5-7 днів включно. Інфекційний титр вірусів визначали методом статистичного обліку Reed L.J., Muench H. A. (MaHy 1996) і виражали в тканинних цитопатогенних дозах в 1 см³ (ТЦД_{50/см3}).

У роботі з культурами використовували стандартні поживні середовища і розчини: ІГЛА MEM та RPMI з подвійним набором амінокислот і вітамінів, 0,02% розчин версену, 0,25% розчин трипсину, фетальна ембріональна теляча сироватка, розчин Хенкса, антибіотики (гентаміцин, стрептоміцин).

Для репродукції вірусу використовували перещеплювальні лінії клітин ЕРС та ФНМ. Культури клітин підтримували шляхом періодичного пасажування. Моношар культури ЕРС знімали з поверхні зростання 0,02 % розчином версену, ко-

ефіцієнт пересівання 1:2–1:5, температура інкубації 21–23 °С.

Для серологічної діагностики було використано метод класичного імуоферментного аналізу в модифікації сендвіч за стандартною методикою. Використано діагностичну тест-систему «SVCV Ag-ELISA (фірми «TestLine»), дослідження проводили згідно інструкції виробника.

Для ПЛР-аналізу, що включав виділення РНК, синтез кДНК, ампліфікацію і детекцію результатів використовували набори «Рибозоль-А» та «Ревертаза-L» (АмпліСенсиТМ, Росія) Постановку реакції проводили згідно протоколів виробника. Детекцію результатів проводили методом електрофорезу.

Для детекції вірусу весняної віремії використовували метод гніздової ПЛР з використанням двох пар праймерів, що були рекомендовані ОІЕ (ОІЕ, 2012).

Результати досліджень та їх обговорення. Для ізоляції вірусу використовували культури чутливих клітин та серологічний тест на основі класичного імуоферментного аналізу в модифікації сендвіч за стандартною методикою з використанням комерційних тест-систем. У зв'язку з низькою чутливістю цієї тест-системи (10^{2,8}–10^{3,5} ТЦД₅₀ в 0,1 мл досліджуваної проби), попередньо проводили накопичення вірусу в культуральній системі. Для постановки серологічних тестів відбирали ті проби, які демонстрували яскраво виражену цитопатичну дію на культурах клітин впродовж 7 днів культивування. Результати цих досліджень наведені в таблиці 1.

З метою підбору ефективних праймерів для постановки ПЛР нами було проведено порівняльне вивчення нуклеотидних послідовностей геному рабдовирусів різних видів риб. Ці дослідження були здійснені за допомогою порівняльної геноміки з використанням сучасних комп'ютерних програм.

Оцінювали можливість застосування для ідентифікації вірусу SVCV праймерів F1 і R2, комплементарних гену нуклеопротеїну G (табл. 2).

Табл. 1.

Ідентифікація вірусу SVC в культурі клітин та методом ELISA

Таб. 1.

Identification of SVC virus in cell culture and by ELISA

Досліджувані ізоляти	ELISA	Титр вірусу в культуральній системі	
		ЕРС	ФНМ
ВК-1	+	5,6 lg	5,4 lg
ВН-1	+	6,2 lg	6,0 lg
В-82	+	5,4 lg	5,0 lg
Контроль + (ЗЛ4)	+	6,6 lg	6,4 lg
Контроль-	-	-	-

Sequences of primers complementary to the gene of nucleoprotein G of virus spring viremia of carp

Праймер	Орієнтація	Послідовність	Довжина продукту (п.н)	Положення на гені
F1	Прямий	5'-TCTTGGAGCCAAATAGCTCAAGTC-3'	418	573-593
R4	Зворотний	5'-CTGGGGTTTCCNCCTCAAAGYTG-3'	376	767-1182
R2	Зворотний	5'-AGATGGTATGGACCCCAATACATTACGCAT-3'	418	969-990

Використання цих праймерів призводить до синтезу ПЛР-продукту розміром 714 п.н. З метою підвищення чутливості методу застосовували методику напівгніздової ПЛР, що полягала у використанні в першому циклі реакції праймерів F1 і R2, а в другому – праймера R4 у парі із праймером F1 (ПЛР-продукт розміром 606 п.н.).

У ході оптимізації умов постановки зворотної транскрипції й ПЛР були випробувані різні об'єми реакційної суміші, буферні системи, кількість внесеної РНК і кДНК, праймерів, ферментів, концентрації іонів Mg^{+2} і дНТФ, режими ампліфікації. Розмір ампліфікованого фрагменту ДНК – 606 п.н.

Як видно з рисунка 1, в результаті тестування зразку методом ЗТ-ПЛР спостерігається утворення чітких смуг продуктів ампліфікації з розмірами, характерними для відповідних праймерів. Тому ми вважаємо, що використання обох пар праймерів в гніздовій ПЛР є оптимальними для детекції SVCV, а результати тестування ними можна вважати достовірними.

При перевірці специфічності полімеразної ланцюгової реакції з вищевказаними праймерами в якості матриці були використані проби РНК референтних штамів та ізолятів вірусу SVCV, РНК, виділена з патматеріалу від заражених вірусом риб. В результаті РНК вірусу SVCV була виявлена у всіх інфікованих пробах культурального матеріалу й пробах органів заражених риб. Культуральний вірус виявлявся в обох раундах ПЛР, тоді як при тестуванні клінічних матеріалів від риб, що мали ознаки гострої форми захворювання, вірусспецифічні продукти у першому, й навіть у другому раунді, виявлялися не завжди. (табл.3).

Чутливість виявлення вірусу SVCV у культурі клітин ЕРС визначали тестуванням серійних 10-кратних розведень вірусної суспензії. У першому (праймери F1 і R2) та другому раунді (праймери R4 і F1) ПЛР для трьох випробуваних вірусних ізолятів чутливість була приблизно однаковою як для освітлених зразків культурального вірусу, так і його 10-кратного концентрату.

Чутливість виявлення вірусу ВВК у патологічному матеріалі визначали тестуванням серій-

них 10-кратних розведень РНК, виділеної з різних тканин трьох заражених вірусним штамом риб, що мали ознаки гострої форми захворювання.

Встановлено, що чутливість методу ПЛР-діагностики була аналогічною для матеріалів від досліджуваних риб і залежала від виду клінічного матеріалу. Отже, діагностично найбільш цінними для ПЛР-діагностики вірусної інфекції є зразки мозку й ексудату хворих риб, тоді як у пробах нирки вірус виявляли не завжди.

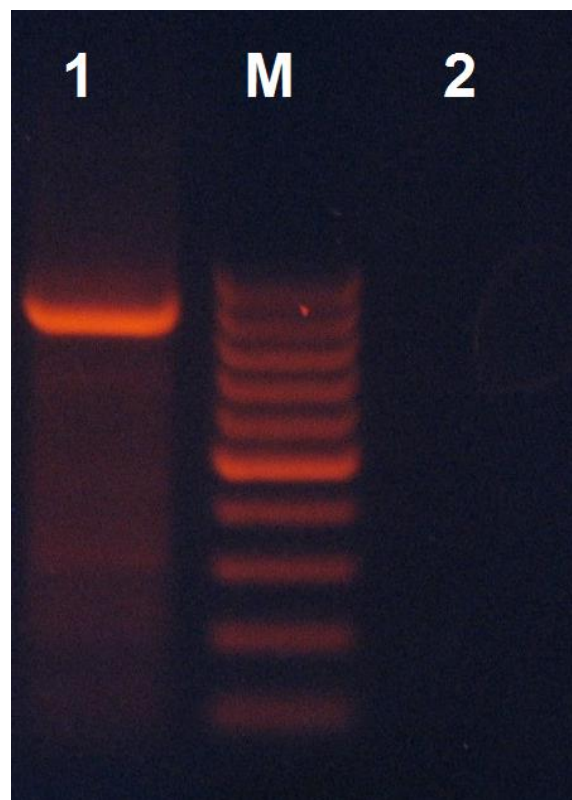


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ЗТ-ПЛР.

Примітка: М – маркер «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1 – референтний штам SVCV «ЗЛ4» в культурі клітин ЕРС; 2 – негативний контроль.

Figure. 1. Electrophoretic analysis in 1.5% agarose gel of RT-PCR products:

Примітка: М - marker «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1 - reference strain SVCV «ZL4» in cell culture (epidermal neoplasm of carp) EPC; 2 - negative

control.

Існує реальна небезпека подальшого поширення SVCV територією України, що створює загрозу значних матеріально-економічних втрат у майбутньому, коли вітчизняне рибництво знову запрацює на повну силу.

Комерційні набори для швидкого виявлення вірусу за допомогою полі- і моноклональних антитіл виготовляють фірми Чехії, Німеччини й Бельгії, однак ці набори недостатньо специфічні. Молекулярно-генетичні методи діагностики SVCV (зондового антирибонуклеазного захисту, гібридизації *in situ* і зворотної гібридизації), що розробляються за кордоном, при всіх їхніх перевагах мають ряд недоліків (необхідність використання культур клітин риб, радіоізотопів і ін.), що обмежують їхнє використання на практиці (Einer-Jensen et al. 2002).

Табл. 3.

Визначення специфічності ПЛР з праймерами F1 і R2 і R4, комплементарними гену нуклеопротеїну G, n = 5

Табл. 3.

The determination of PCR specificity with primers F1 and R2 and R4, complement to nucleoprotein G gene, n = 5

Зразки матеріалу	Постановка ПЛР		Культура ЕРС
	праймери F1 і R2	праймери F1 і R4	Титр вірусу, lg ТЦД ₅₀
Культуральний вірус SVCV			
ВН-1 ізол., вихідна суспензія	+	+	6,2
ВК-1 ізол., вихідна суспензія	+	+	5,6
ЗЛ4 ізол., 10-кратний концентрат	+	+	8,1
ЗЛ4 ізол. вихідна суспензія	+	+	6,6
В-82 ізол. 10-кратний концентрат	+	+	6,0
В-82 ізолят вихідна суспензія	+	+	5,3
Патматеріал від коропів, заражених штамом ВК-1 вірусу SVCV			
ексудат	+	+	5,35
нирки	-	+	3,7
мозок	+	+	4,7
Контрольні зразки			
селезінка	-	-	-
нирки	-	-	-
мозок	-	-	-

Примітка: «+» - позитивний результат, «-» - негативний результат

Дослідження останніх років показали, що вибірка ампліфікація ділянок вірусного геному за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), доповнюючи серологічні методи, здатна значно розширити можливості виявлення вірусу SVCV безпосередньо в клінічних зразках риб (Stone et al. 2003, Shchelkunov et al. 2005).

Висновки. Підібрані пари праймерів дозволяють специфічно ідентифікувати вірус SVCV в матеріалах різного походження (патологічний, культуральний, тощо).

Список літератури

1. Болезни рыб: Справочник Васильков Г.В., Грищенко Л.И., Енгашев В.Г. Под редакцией Осетрова В. С. Изд 2-е переработ. и дополненное – М. Агропромиздат 1989. – С.65
2. Щелкунов, И.С., Орешкова, С.Ф., Попова, А.Г., Щелкунова, Т.И., Блинова, Н.Н., Ильичев, А.А. Выявление вируса весенней виремии карпа в материалах от рыб путем выделения на культуре клеток и методом ПЦР // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: материалы Междунар. научно- практич. конф., посв. 35-летию института, Щелково, 26-27 мая 2005. – Щелково, 2005. – С. 243-247.
3. Adair B.M . Isolation of pike fry rhabdovirus from brown trout (*Salmo trutta*). // Bull Eur Assoc Fish Pathol. – 1986. – P. 6.
4. Ahne W, Bjorklund H.V., Essbauer S., Fijan N., Kurath G., et al. Spring Comparison of multiple genes of spring viremia of carp viruses isolated in the United States. // Virus Genes. – 2007. – V 35. – P. 87–95.
5. complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China. // Arch Virol. – 2007. – V. 152. – P. 1457–1465.
6. Einer-Jensen, K., Bjorklund, H., Oreshkova, S.F., Shchelkunov, I.S., Vesely, T., Lorenzen, N. Detection and typing of fish viruses // Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. – 2002. – Vol. 22, N.2. – P.158-165.
7. Fijan N. Vaccination of fish in European pond culture: prospects and constraints. // Symp Biol Hung. – 1984. – V. 23. – P. 233–241.
8. Haenen OLM, D.A Comparative pathogenicity of two strains of pike fry rhabdovirus and spring viremia of carp virus for young roach, common carp, grass carp and rainbow trout. // Dis Aquat Organ. – 1993. – V.15. – P. 87–92.
9. Hoffmann B., Schutze H., Mettenleiter T.C. Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of Spring Viremia of Carp, a fish rhabdovirus. // Virus Res. – 2002. – V.84. – P. 89–100.
10. Mahy B. W. Virology Methods: manual / B. W. J Mahy., H. O Kangro.-London: Academic Press, – 1996. – P. 514–521.
11. OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals Fourth Edition, – 2003. <http://www.oie.int/doc/ged/D6505.PDF>

12. OIE.. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases 3 th Edition, Paris, Word Organization for Animal Health (Chapter 2.3.8.). – 2012 http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.08_SVC.pdf
13. Rowley H., Graham D.A., Campbell S., Way K., Stone D.M., et al. (2001) Isolation and characterisation of rhabdovirus from wild common bream *Abramis brama*, roach *Rutilus rutilus*, farmed brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Northern Ireland // *Dis Aquat Organ.* –2001. – V 48. – P. 7–15.
14. Sanders G.E, Batts W.N, Winton J.R. Susceptibility of zebrafish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viremia of carp virus. *Comp Med.* –2003. –P. 53.
15. Shchelkunov I.S., Popova A.G., Shchelkunova T.I., Oreshkova S.F., Pichugina T.D., Zavyalova E.A., Borisova M.N. First Report Of Spring Viremia Of Carp Virus In Moscow Province, Russia // *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 25 (5) 2005. – P. 203-211.
16. Shchelkunov I.S. Rhabdovirus carpio in herbivorous fishes: isolation, pathology and comparative susceptibility of fishes. / In: Ahne W, Kurstak E, eds. *Viruses of lower vertebrates.* Heidelberg: Springer Verlag. – 1989. – P. 333–348.
17. Shchelkunov, I.S., Oreshkova, S.F., Popova, A.G., Nikolenko, G.N., Shchelkunova, T.I., Ilyichev, A.A. Development of PCR-based techniques for routine detection and grouping of spring viremia of carp virus // *Health and Diseases of Aquatic Organisms: Bilateral Perspectives* / R.C. Cipriano, I.S. Shchelkunov, M. Faisal (Eds.). – East Lansing, Michigan: Michigan State University, 2005. – P. 260-284.
18. Stone D.M., Ahne W., Denham K.L., Dixon P.F., Liu C.T, et al. Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. // *Dis Aquat Organ.* – 2003. – V 53. – P.203–210.
19. Teng Y., Liu H., Lv J.Q., Fan W.H., Zhang Q.Y, et al. Characterization of viremia of carp (SVC) // *Dis Aquat Organ.* –2002. – V52. – P. 261–272.
20. Walker P.J., Calisher C.H., et al. Family Rhabdoviridae. // In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB and 7 others, eds. *The Seventh Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses-San Diego, CA: Academic Press.* – 2000. – P. 563–583.
21. Wang L, Zhang H.X, Zhang J.H, Chen W.H, Ruan X.F, et al. In vitro effects of recombinant zebrafish IFN on spring viremia of carp virus and infectious hematopoietic necrosis virus. // *J Interferon Cytokine Res.* – 2006. – V. 26. – P. 256–259.

APPLICATION OF PCR FOR SPRING VIREMIA VIRUS DIAGNOSTIC IN CARP

N. M. Matvienko, L. P. Buchatsky

Results of work concerning selection of specific primers and optimization of PCR for identification of spring viremia virus of carp (SVC-virus) are presented. To design effective primers for PCR we have performed comparative analysis of genomic sequences of rhabdoviruses isolated from different fish species using modern computer programs. In order to check specificity of the PCR primers RNA of SVC-virus referential strains and of isolates obtained from Ukrainian fish farms have been used as templates. It has been found that diagnostic samples of brain and extravasate sick of fishes represent the most valuable material for PCR-diagnostic of SCV-infection. Thus, selected primers allow specific identification of SCV-virus in the infected culture of cages and clinical material from fishes.

Keywords: PCR, primers, isolates, SVCV, cell culture, carp