

М. І. Майстренко, Ю. П. Рудь, Н. М. Матвієнко, Л. С. Холодна,
Л. П. Бучацький

Ідентифікація вірусу CyHV-3 методами електронної мікроскопії та полімеразної ланцюгової реакції

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говоруном)

Досліджено герпесвірус корошових риб третього типу (CyHV-3), який викликає висококонтагіозну інфекцію у декоративного коропа кої та у коропа звичайного (Cyprinus carpio). Були застосовані ПЛР-діагностика та електронномікроскопічне дослідження морфології та репродукції CyHV-3 методом ультратонких зрізів. При електронномікроскопічному дослідженні очищених віріонів CyHV-3 виявлено вірусні частки такого ж діаметра, що й на ультратонких зрізах уражених клітин. Ці препарати використано як контроль при адаптації методу ПЛР для діагностики CyHV-3. Показано, що досліджені пари олігонуклеотидних праймерів, специфічних до гена тимідинкінази CyHV-3, ампліфікують фрагмент ДНК вірусу розміром близько 400 пар нуклеотидів. Ці праймери можуть бути використані для експрес-діагностики CyHV-3 в рибних господарствах та річках України.

Герпесвірус корошових риб третього типу (CyHV-3) викликає висококонтагіозну емерджентну інфекцію як у звичайного (*Cyprinus carpio*), так і у декоративного коропа кої. Вперше він був виділений у кої, тому раніше його позначали як вірус герпесу кої (KHV). Цей вірус поширений у всьому світі і завдає великої шкоди рибним господарствам — смертність риб від цієї інфекції сягає 80–100% [1]. CyHV-3 зустрічається як в аквакультурі, так і в озерах та річках. Спалахи вірусної інфекції у корошів відбуваються навесні та восени при температурі води від 18 до 28 °C [2]. Смертність у корошів розпочинається через 5–6 діб після інфікування, ще через дві доби після того відбувається їх масова загибель і цей рівень смертності зберігається протягом 10–12 діб. До вірусу більш сприйнятливі мальки коропа (віком 1–3 місяці), ніж дорослі риби (масою понад 230 г). Клінічні ознаки захворювання у риб виявляються вже через 3 доби після інфікування. Інфіковані короши втрачають координацію, плавають хаотично, зазвичай вони знаходяться біля поверхні води. У інфікованих корошів також спостерігається некроз зябер, запалість очей, наявність на шкірі білих цяток [3].

CyHV-3 має вузьку видову специфічність — інші представники корошових до цього вірусу несприйнятливі. В експериментальних умовах до CyHV-3 виявились нечутливими білий амур (*Ctenopharyngodon idella*), сріблястий карась (*Carassius auratus gibelio*), товстолобик (*Hypophthalmichthys molitrix*), тілапія (*Oreochromis niloticus*) тощо [4]. Сріблястий карась (*Carassius auratus gibelio*) може інфікуватись CyHV-3 без проявів симптомів захворювання, проте його гібриди з кої мають типові ознаки хвороби.

Для діагностики CyHV-3 у багатьох країнах використовують полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), імуноферментний аналіз (ELISA) та метод електронної мікроскопії. На сьогодні ПЛР є найбільш точним та чутливим методом діагностики вірусних захворювань риб. Метод дає змогу виявити наявність збудника, навіть якщо в пробі присутні лише де-

кілька молекул його ДНК. Чутливість цієї реакції перевищує таку в імунохімічному та інших методах, а принцип методу дозволяє діагностувати наявність інфекцій зі значною антигенною мінливістю. Важливі відомості про структуру та морфогенез вірусів дає також метод електронної мікроскопії.

Метою дослідження було застосування ПЛР-діагностики та електронномікроскопічного дослідження морфології та репродукції СуНВ-3 в печінці та нирках звичайного коропа методом ультратонких зрізів.

Матеріали та методи. Біопробу ставили в лабораторних умовах шляхом введення 0,2 мл вірусомісного розчину у черевину звичайного коропа. Риб утримували в ваннах при кімнатній температурі протягом 10 діб.

Для очистки СуНВ-3 застосовували метод ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози. Очищений вірус був використаний для розробки діагностики герпесвірусної інфекції коропових риб на основі ПЛР.

Електронномікроскопічне дослідження. Для виготовлення ультратонких зрізів нирки та печінку хворих риб фіксували в 1%-му розчині OsO_4 , доведеному до рН 7,0 за допомогою 0,1 М фосфатного буфера. Після фарбування 0,5%-м водним розчином уранілацетату матеріал зневоднювали, проводили крізь етанол та ацетон і вміщували в епоксидну смолу. Ультратонкі зрізи фарбували цитратом свинцю. Одержані таким чином препарати вивчали на електронному мікроскопі JEM-100B при інструментальному збільшенні 20000 разів.

Виділення ДНК. Загальну ДНК виділяли із зябер та нирок інфікованих коропів. До 100 мкл приготовленого на фосфатному буфері (рН 7,4) гомогенату додавали 500 мкл лізуючого буферу (10 мМ *трис*-HCl, рН 8,0, 0,1 М NaCl, 25 мМ ЕДТА, 0,5% ДСН) та протеїназу К, ретельно перемішували та інкубували 2 год при 37 °С. ДНК екстрагували фенолом та центрифугували 5 хв при 13 000 об/хв. Надосадову рідину відбирали та проводили повторну екстракцію ДНК сумішшю хлороформ — ізоаміловий спирт (24 : 1). Потім надосадову рідину відбирали та додавали 0,1 об'єм розчину 3 М ацетату натрію (рН 5,2) та 2,5 об'єми охолодженого до –20 °С абсолютного етанолу. Преципітацію ДНК проводили при кімнатній температурі протягом 1 год. Після цього осаджували ДНК на мікроцентрифузі при 13 000 об/хв протягом 10 хв. Осад ДНК промивали 70% етанолом. ДНК розчиняли в ТЕ-буфері (10 мМ *трис*-HCl, 1 мМ ЕДТА, рН 7,5) або у деіонізованій воді [5].

Для ідентифікації вірусу методом ПЛР використовували олігонуклеотидні праймери, специфічні до ділянки гена тимідинкінази СуНВ-3 [6]. Послідовність олігонуклеотидів була такою: TKf 5'-GGGTTACSTGTACGAG-3' та TKr 5'-CACCCAGTAGATTATGC-3'. Визначення специфічності праймерів та їхніх фізичних властивостей проводили за допомогою програмного забезпечення VectorNTI10 та онлайн-сервісу BLAST.

Ампліфікація ділянки гена тимідинкінази СуНВ-3 включала один цикл попередньої денатурації ДНК при 94 °С протягом 5 хв, 40 циклів денатурації при 95 °С (1 хв), віджигу праймерів при 55 °С (1 хв), синтезу при 72 °С (1 хв) та додатковий цикл синтезу в кінці реакції при 72 °С (10 хв). Після ампліфікації продукти реакції аналізували в 2% агарозному гелі. По закінченні електрофорезу гель фарбували бромистим етидієм та спостерігали результати під ультрафіолетовим транслюмінатором.

Результати та обговорення. Інфіковані СуНВ-3 коропи при візуальному обстеженні мали виснажений вигляд, на шкірі у них були наявні яскраво виражені білі плями. Очі в уражених риб були запалі, риби інтенсивно виділяли у воду слиз. У хворих коропів відмічено інтенсивний некроз зябер (рис. 1). На розтині у них виявився нефрит та інші патологічні ознаки, обумовлені вторинними бактеріальними інфекціями.



Рис. 1. Зябра коропа кої, уражені СуНВ-3



a



б

Рис. 2. Ультратонкий зріз нирок коропа кої, ураженого СуНВ-3.

a — ущільнення хроматинового матеріалу в ядрі, в перинуклеарній зоні розташовані вірусні частки (стрілки); *б* — вірусні частки в цитоплазмі інфікованих клітин, діаметр віріонів 120 нм

При електронномікроскопічних дослідженнях в ядрах клітин нирок хворих коропів спостерігалось ущільнення хроматинового матеріалу. В перинуклеарній зоні виявлені віріони діаметром 120 нм. Здебільшого вірусні частки були розташовані між внутрішнім та зовнішнім листками ядерної мембрани (рис. 2, *a*).

У цитоплазмі уражених клітин нирок коропа, в яку із ядра проникають нуклеокапсиди, були розширені каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулума і спостерігались вірусні частки, загорнуті в мембрани. Мітохондрії уражених клітин мали видовжену форму (див. рис. 2, *б*), багато мітохондріальних крист були зруйновані.

Для вірусів герпесу встановлено, що реплікація вірусної ДНК відбувається в ядрі, після чого вона вмонтовується у вірусний капсид і залишає ядро шляхом вип'ячування через внутрішню ядерну мембрану. При цьому віріони розташовуються в перинуклеарній зоні. Після цього первинна оболонка вірусу зливається із зовнішнім листком ядерної мембрани і віріони опиняються в цитоплазмі [7]. На наступному етапі вони одягають на себе ще одну

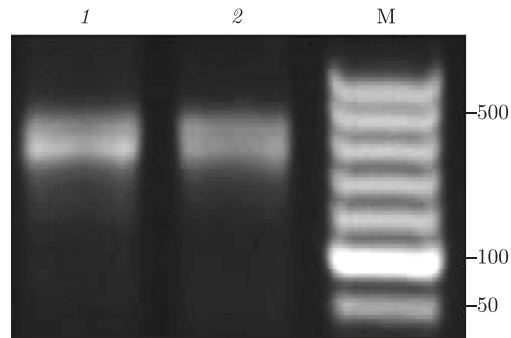


Рис. 3. Електрофореграма фрагментів ДНК CyHV-3, ампліфікованих за допомогою праймерів, специфічних до гена тимідинкінази: ДНК виділена із зябер (1) та нирок (2) інфікованих коропів; М — ДНК-маркер

оболонку, яка походить із везикул Гольджі. Отримані нами результати свідчать про те, що репродукція CyHV-3 відбувається за сценарієм, схожим для всіх вірусів герпесу.

При електронномікроскопічному дослідженні очищених віріонів CyHV-3 були виявлені вірусні частки такого ж діаметра, що й на ультратонких зрізах уражених клітин. Ці препарати були використані нами як контроль при адаптації методу ПЛР для діагностики CyHV-3.

Як показали результати досліджень, вибрані пари олігонуклеотидних праймерів, специфічних до гена тимідинкінази CyHV-3, ампліфікували фрагмент ДНК вірусу розміром близько 400 пар нуклеотидів. За допомогою ПЛР було ідентифіковано вірус у зразках зябер та нирок інфікованого коропа (рис. 3).

Відомо, що своєчасне виявлення симптомів у хворої риби та проведення експрес-діагностики запобігають епізоотіям та масовій смертності об'єктів аквакультури. На сьогодні ПЛР є найбільш точним та чутливим методом діагностики вірусних інфекцій. Швидке поширення в останні роки CyHV-3 по всьому світу обумовлене тим, що декоративний короп має широкий попит серед акваріумістів і є предметом інтенсивної торгівлі [8]. Незважаючи на те що на фірмі KoVax Ltd (Ізраїль) розроблена вакцина для профілактики CyHV-3 [9], він продовжує поширюватись по всьому світі. В останні роки цей вірус виявлений у сусідніх країнах — Польщі, Румунії та Чехії [8], і він являє собою реальну загрозу для рибних господарств нашої країни.

Тому вибрані олігонуклеотидні праймери можуть бути використані для експрес-діагностики CyHV-3 в рибних господарствах та річках України. Профілактична вакцинація здорової риби дозволить уникнути значних економічних втрат у рибних господарствах.

1. Hedrick R., Gilad O., Yun S. A herpes virus associated with mass mortality of juvenile and adult Koi, a strain of common carp // *J. Aqua. Anim. Health.* – 2000. – **12**. – P. 44–57.
2. Ariav R., Timan S., Paperna I., Bejerano I. First report of newly emerging viral disease of *Cyprinus carpio* species in Israel // *EAFP 9-th International Conference.* – Rhodes, Greece, 1998. – P. 36.
3. Бучацький Л. П. Епізоотологічний моніторинг хвороб в аквакультурі. Вірус нефрита та зяберного некроза коропа // *Вет. медицина України.* – 2006. – № 4. – С. 19–20.
4. Perelberg A., Smirnov M., Hutoran M. et al. Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured cyprinus carpio in Israel // *Isr. J. Aquaculture–Bamidgeh.* – 2003. – **55**. – P. 5–12.
5. Sambrook J., Russell D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual.* – 3rd ed. – New York: Cold Spring Harbour, 2001. – 2344 p.
6. Bercovier H., Fishman Y., Nahary R. et al. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis // *BMC Microbiol.* – 2005. – **5**. – P. 1–9.

7. Viva S., Sano M. Morphogenesis of koi herpesvirus observed by electron microscopy // J. Fish. Dis. – 2007. – **30**, No 12. – P. 715–722.
8. Siwicki A. K., Terech-Majewska E. Herpeswirusy a szczególnie koi herpes wirus (KHV) nowe zagrożenie w hodowli karpia // Choroby ryb. – 2002. – P. 368–373.
9. Ronen A., Perelberg A., Abramovitz J. et al. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio* // Vaccine. – 2003. – **21**. – P. 4677–4684.

Інститут рибного господарства
НААН України, Київ
Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 11.09.2012

**М. І. Майстренко, Ю. П. Рудь, Н. Н. Матвиенко, Л. С. Холодная,
Л. П. Буцацкий**

Идентификация вируса CyHV-3 методами электронной микроскопии и полимеразной цепной реакции

Исследован герпесвирус карповых рыб третьего типа (CyHV-3), который вызывает высококонтагиозную инфекцию у декоративного карпа кои и у карпа обычного (Cyprinus carpio). Применяли ПЦР-диагностику и электронномикроскопическое исследование морфологии и репродукции CyHV-3 методом ультратонких срезов. При электронномикроскопическом исследовании очищенных вирионов CyHV-3 обнаружены вирусные частички такого же диаметра, как и на ультратонких срезах пораженных клеток. Эти препараты использованы в качестве контроля при адаптации метода ПЦР для диагностики CyHV-3. Показано выбранные пары олигонуклеотидных праймеров, специфических к гену тимидинкиназы CyHV-3, амплифицировали фрагмент ДНК вируса размером примерно 400 пар нуклеотидов. Эти праймеры могут быть использованы для экспресс-диагностики CyHV-3 в рыбных хозяйствах и речках Украины.

M. I. Maistrenko, Y. P. Rud, N. M. Matvienko, L. S. Holodna, L. P. Buchackii

Identification of CyHV-3 virus by the methods of electron microscopy and PCR

The carp herpes virus type III (CyHV-3), which causes the highly contagious infection of ornamental koi carp and common carp (Cyprinus carpio), is investigated. The goal of this research was to use the method of PCR for virus diagnostics and electron microscopy of purified virions and ultrathin sections of infected tissue for the investigation of CyHV-3 morphology and reproduction. It is shown that purified CyHV-3 viral particles have the same size as that in ultrathin sections of infected cells. These samples were used as a control in PCR for CyHV-3 diagnostics. We selected a pair of oligonucleotide primers specific to the thymidine kinase gene of CyHV-3, which amplified virus DNA fragment of approximately 400 base pairs. These primers can be used for the CyHV-3 virus rapid diagnostics at fish farms and rivers of Ukraine.