

УДК 578 (035)

Н. Н. МАТВИЕНКО, Л. П. БУЧАЦКИЙ, М. И. МАЙСТРЕНКО

## РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСА VHSV В ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И В ОРГАНИЗМЕ СЕГОЛЕТОК РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Институт рыбного хозяйства НААН Украины, Киев, e-mail: mnarine73@mail.ru

(Поступила в редакцию 10.06.2013)

**Введение.** Вирусная геморрагическая септицемия форели – это острое высококонтагиозное заболевание пресноводных и морских видов рыб, вызываемое рабдовирусом VHSV (Viral hemorrhagic septicemia virus) [2]. Заболевание характеризуется множественными кровоизлияниями в органы и ткани, поражением печени, почек и заканчивается массовой гибелью рыбы (от 50 до 100 %). Эту болезнь впервые описал В. Шеперклаус в 1937–1939 гг. в Германии [1, 6]. Возбудителем данного заболевания является РНК-содержащий вирус, относящийся к роду *Novirhabdovirus*. Вирус геморрагической септицемии форели зарегистрирован в 28 странах мира и наносит значительный экономический ущерб рыбным хозяйствам [3, 4]. Потенциальную опасность для Украины составляют вспышки заболеваний рыб от VHSV в сопредельных странах, таких как Польша, Турция и Россия [10,13].

С началом активного развития форелевого рыбоводства в Украине количество заболеваний инфекционной природы у этих рыб увеличилось. В связи с огромной потенциальной угрозой занесения VHSV в специализированные рыбные хозяйства Украины возникла необходимость всестороннего изучения биологических особенностей этого вируса.

Цель данного исследования – установить патогенность изолятов VHSV в условиях *in vitro* на культуре клеток и *in vivo* на сеголетках радужной форели.

**Материалы и методы исследования.** Рыбы: радужная форель, выращенная на экспериментальной базе Института рыбного хозяйства НААН Украины (ИРХ НААН). Рыбы были протестированы на наличие паразитарных, бактериальных и вирусных инфекций [9].

Вирусы: вирус геморрагической септицемии форели: штамм «DN4p101»; изоляты PL-1 (6,8 lg ТЦД50/см<sup>3</sup>), PL-2 (6,2 lg ТЦД50/см<sup>3</sup>), предоставленные профессором Ежи Антиховичем (Национальный Институт ветеринарии, Пулавы, Польша), изолят М-1 (6,3 lg ТЦД50/см<sup>3</sup>) из хозяйств в России (ВИЭВ, предоставленный Е. А. Завьяловой). Вирусы поддерживали в лабораторной коллекции Института рыбного хозяйства НААН Украины.

Бирнавирус инфекционного некроза поджелудочной железы IPNV – штамм «VF-08» (7,0–8,0 lg ТЦД50/см<sup>3</sup>). Перевивные культуры клеток рыб RTG-2 были выделены из гонад радужной форели *O. mykiss* [8]. FHM – из хвостового стебля черного толстоголова (*Pimephales promelas*) [5].

Питательные среды, растворы и сыворотки: MEM BSS Хенкса, сыворотка эмбриональная (FCS), раствор трипсина (0,25 %), раствор версена (0,02 %), 1 М Нерес-буфер (pH 7,0), DMEM/F12 (Sigma).

Культивирование перевивных клеточных линий рыб проводили согласно рекомендациям, описанным авторами для каждой линии.

Титрование проб вирусного материала проводилось в культуре клеток методом конечных разведений в 96-луночных панелях при температуре 14–15 °С. Количество инфекционного вируса определяли методом титрования по Риду и Менчу [9].

Опыты по искусственному заражению рыб проводились в лабораторных условиях ИРХ НААН в ваннах объемом 40 дм<sup>3</sup>. Температура воды 9–11 °С. При этом были сформированы

однородные (вес до 10 г) группы сеголетков радужной форели по 20 экз. Экспериментальных рыб заражали путем внутривентральных инъекций и внесением вируса в воду, предварительно вводя рыбу в состояние стресса. Для заражения использовали культуральную жидкость, содержащую вирус различных пассажей. Продолжительность эксперимента составляла 25 дней.

**Результаты и их обсуждение.** При изучении репродукции VHS в перевиваемых клеточных линиях RTG-2, FHM было установлено, что оптимальный температурный диапазон для репликации вируса находился в диапазоне 9–15 °С. В качестве контрольного изолята в этих же перевиваемых клеточных линиях был использован изолят VF-08 IPNV. Оптимальной для репликации этого штамма была температура 15–18 °С. Первые морфологические изменения наблюдали в течение 24 ч после инокуляции.

При репродукции изолятов VHS первые морфологические изменения наблюдали с 6–8-го дня после инокуляции. Развитие цитопатогенного действия (ЦПД) сопровождалось округлением клеток, отделением клеток от субстрата. Вирус репродуцировался в культуре перевивных клеток в течение 7–9 сут, при этом в них наступали сложные дегенеративные изменения, что в конечном итоге приводило к полному разрушению монослоя (рис. 1). Инфекционный титр вируса при этом составил  $10^{6,3-8,0}$  ТЦД 50/мл.

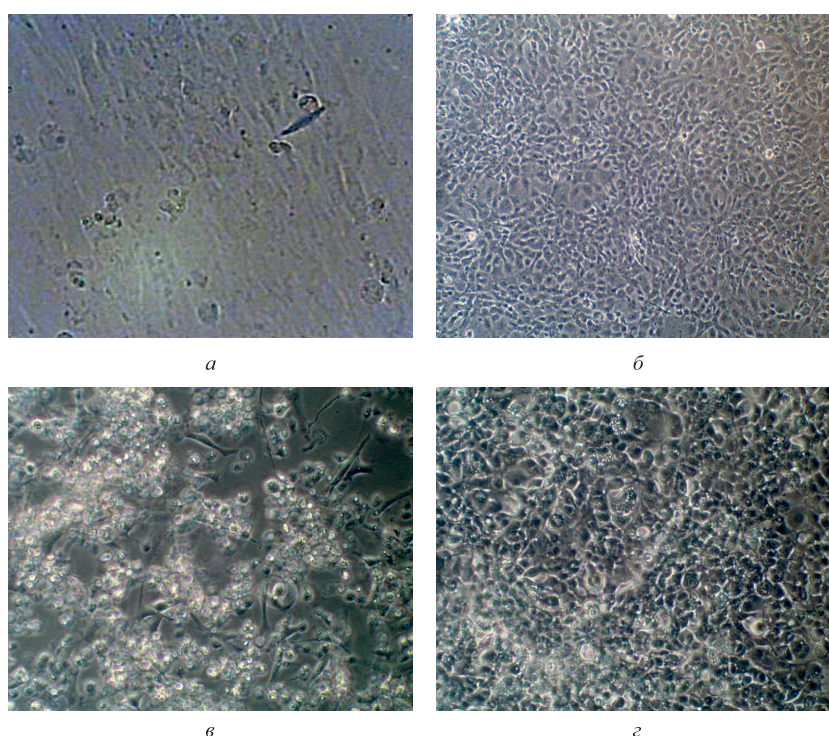


Рис. 1. Изменение монослоя клеток под действием вируса VHS. Интактный монослой клеток RTG-2 (а), FHM (б), клетки после заражения вирусом – RTG-2 (в), FHM (г)

При последующем пассаже вируса наблюдали разрушения монослоя в течение 3–4 дней, при этом инфекционный титр вируса увеличивался на 0,5–1 lg. Результаты экспериментов обобщены в таблице.

В продолжении экспериментов было установлено, что наиболее чувствительной к вирусу была культура RTG-2, менее чувствительной – культура FHM, так как с увеличением пассажей титр вируса оставался на прежнем уровне.

Патогенность исследуемых изолятов для сеголетков форели устанавливали путем постановки биопробы. Для сравнения в эксперименте использовали изоляты вируса, выделенные в России и Польше. Так, в экспериментальных условиях при температуре воды 9 °С инкубационный период длился от 3 до 7 дней в зависимости от изолятов (для изолята PL-1 он составлял 3 дня, а для изолята М-1 – 5 дней). Активное развитие инфекции начиналось на 6-й день и достигало своего пика на

Титр вирусного цитопатогенного агента (lg ТЦД 50/мл) в культурах клеток RTG-2 и FHM

Культура клеток	Штамм вируса	Титр вируса	
		I пассаж	II пассаж
RTG	RF	8,0	8,5
	PI-1	6,8	7,5
	PI-2	6,2	6,8
	M-1	6,3	6,5
FHM	RF	8,0	8,0
	PI-1	6,8	6,8
	PI-2	6,2	6,4
	M-1	6,3	6,3

20–25-й день, при этом гибель сеголетков была в пределах 35 % для штамма M-1 и 45 % для штамма PL-1. PL-2 был более агрессивным, поэтому гибель рыбы была максимальной и достигла на 25-й день 65 % (рис. 2).

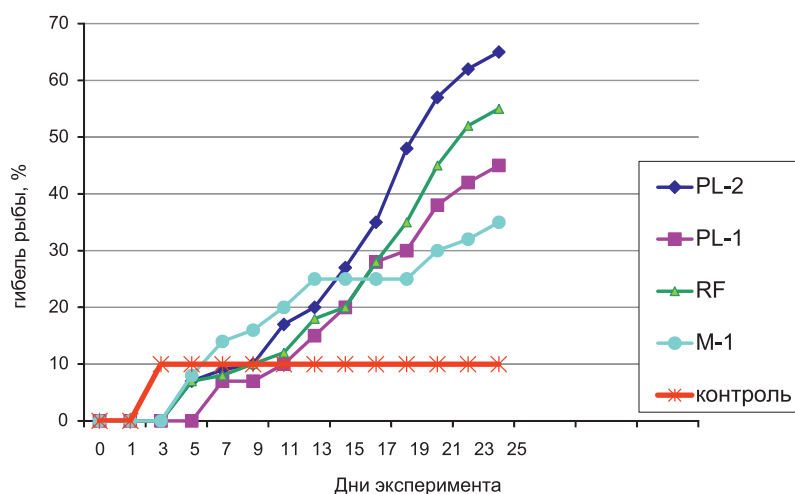


Рис. 2. Гибель сеголетков радужной форели при экспериментальном инфицировании разными изолятами VHS

Визуальные проявления развития инфекции заключались в потемнении окраски тела рыб, в нарушении двигательных функций, которые проявлялись в нетипичных кругообразных движениях форели на одном месте, экзофтальмии. При патолого-анатомическом вскрытии были выявлены рассеянные кровоизлияния в мускулатуре, перивисцеральной жировой ткани, плавательном пузыре, брюшине, сердце и др. Развивался септический процесс, который приводил к поражению практически всех органов и тканей. У сеголетков больше всего были поражены почки и печень.

В результате проведения эксперимента было установлено, что исследованные изоляты вируса оказались патогенными для сеголетков форели и вызвали заболевание и гибель от 35 до 65 % зараженных рыб.

От экспериментально зараженной форели, у которой проявились клинические признаки болезни, реизолировали вирус, который при последовательных пассажах на клеточных культурах проявлял ярко выраженное цитопатическое действие. Результаты наших исследований согласуются с данными зарубежных исследователей [1, 6, 7].

В середине прошлого столетия в Украине было несколько сообщений о клинических проявлениях заболевания лососевых рыб, подобных геморрагической септицемии форели. Первое сообщение о заболевании невыясненной этиологии среди молоди лососевых рыб было опубликовано сотрудниками лаборатории ихтиопатологии УКРНПХ [14]. В этот период ими было проведено выделение инфекционного агента на накопление в культуре клеток. Был морфологически исследован вирус, который по результатам электронно-микроскопических исследований был отнесен к группе рабдовирусов. В 80-х годах прошлого столетия при эпизоотическом обследовании форелевых хозяйств вирус геморрагической септицемии был выявлен в 5 форелевых хозяй-

ствах Украины. В ходе этих исследований было установлено, что источником инфекции являются производители рыб и выделенный вирус имеет антигенное родство с вирусом, выделенным на Северном Кавказе в хозяйстве «Черная река», и относится к серотипу F-1. Были разработаны меры по ликвидации заболевания и оздоровлению хозяйств [11, 12]. В связи со снижением темпа развития форелеводства в 90-х годах многие хозяйства были реорганизованы, хотя этот факт не исключает попадания вируса в естественные водоемы.

Проведенный анализ свидетельствует о потенциальной опасности вспышки вирусных инфекций лососевых рыб в специализированных хозяйствах Украины. Сейчас остро стоит вопрос о профилактике этих инфекций и разработке методов ранней диагностики, чтобы избежать тяжелых экономических последствий для рыбоводческих хозяйств. Этот вопрос приобретает особое значение в связи с завозом посадочного материала и производителей рыб в Украину, что может повлечь распространение вирусных инфекционных заболеваний.

**Заключение.** Было установлено, что исследованные изоляты вируса геморрагической септицемии форели обладали различной патогенностью по отношению к сеголеткам радужной форели и вызвали гибель от 35 до 65 %.

При репродукции этих изолятов в клеточных линиях FHM, RTG-2 наступали сложные дегенеративные процессы, сопровождающиеся появлением в клетках вакуолей, зернистости, клетки округлялись, теряли способность к адгезии, что в конечном итоге приводило к полному разрушению монослоя.

При экспериментальном заражении было установлено, что заболевание носило системный характер, у форели развивался септический процесс, который приводил к поражению практически всех органов и тканей. У форели больше всего были поражены почки.

## Литература

1. *Antychowicz J.* // Choroby ryb srodladowych. Warszawa: Panstwowe Wydawnictwo Rolnicze i Lesne, 2007. P. 447.
2. *Crane M., Williams L.* Viruses of Salmonids: Virus Isolation in Fish Cell Lines. 2001. [http://www.affa.gov.au/corporate\\_docs/publications/pdf/animalplanthealth/aquatic/virusisolation.pdf](http://www.affa.gov.au/corporate_docs/publications/pdf/animalplanthealth/aquatic/virusisolation.pdf)
3. *Deryabin O., Gaidei O., Golovko A.* Monitoring of Viral Haemorrhagic Septicaemia of Rainbow Trout in Ukraine // The 91st Annual Meeting of the CRWAD, Emerging and Re-Emerging Zoonotic Pathogens. Chicago, Illinois. 2010.
4. *Einer-Jensen K., Ahrens P., Forsberg R.* // Journal of General Virology, 2004. Vol. 85. P. 1167–1179.
5. *Gravell M., Hdalsberger R. G.* // A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965. Vol. 126. P. 555–565.
6. *Schaperclaus W.* // Fischkrankheiten. Berlin: Akademie-Verlag., 1979. P. 297–309.
7. *Viral haemorrhagic septicemia* // Manual of diagnostic test for Aquatic animals, adopt 03.2009. O.I.E.
8. *Wolf K. and Quimby M. C.* // Established eurythermic line of fish cells in vitro. Science (Washington DC). 1962. Vol. 135. P. 1065.
9. Вирусология. Методы / Под ред. Б. Мейхи. М., 1988. С. 182–184.
10. *Зуев Н.Л., Юрков В.В., Курносков С.Г. и др.* // Ветеринарная жизнь. 2004. № 5. С. 4–5.
11. *Наконечная М.Г., Темниханов Ю.Д., Нестеренко В.С., Литвиненко В.В.* Методы диагностики вирусных болезней рыб // Материалы секции ихтиопатологии и охраны гидробионтов отделения ветеринарии ВАСХНИЛ. М., 1986. С. 28–30.
12. *Наконечная М.Г., Нестеренко В.С.* // Рыбное хозяйство. Киев, 1989. Вып. 43. С. 60–62.
13. *Пичугина Т.Д., Завьялова Е.А.* // Ветеринарная медицина: Междунар. темат. науч. сб. Вып. 85. Харьков, 2005. Т. 2. С. 906–912.
14. *Осадчая Е.Ф.* // Биологические основы рыбоводства: паразиты и болезни рыб. М., 1984. С. 28–46.

*N. N. MATVIENKO, L. P. BUCHATSKIY, M. I. MAYSTRENKO*

## REPRODUCTION VHSV VIRUS IN CONTINUOUS CELL LINES AND ORGANISMS FINGERLING RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

### Summary

The results of the study of the biological characteristics of the virus VHSV in connection with a huge potential threat of entry of the virus into specialized fish farms of Ukraine. Determined by the pathogenicity of these isolates to rainbow trout fingerlings (*Oncorhynchus mykiss*). It is established that the studied isolates of the virus of hemorrhagic septicemia of trout had different pathogenicity in relation to rainbow trout fingerlings, and caused the death of 35 to 65 %. Studied the reproduction of these isolates in cell lines FHM, RTG-2.