

УДК 578(035)

Н. Н. МАТВИЕНКО, Л. П. БУЧАЦКИЙ

ПАТОГЕННОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА ДЛЯ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ

Институт рыбного хозяйства НААН, Украины,
e-mail: marine73@mail.ru

(Поступила в редакцию 05.03.2012)

Введение. Водные бирнавирусы (род *Aquabirnavirus*) – крупнейшая группа вирусов, вызывающих болезни у разных видов рыб и беспозвоночных. Вирус инфекционного некроза поджелудочной железы (IPNV) впервые обнаружен в Норвегии в 1975 г. [7]. К настоящему времени этот вирус выделен в Северной и Центральной Америке, Европе и Юго-Восточной Азии [4]. Вирус вызывает эпизоотии с высоким уровнем смертности молоди лососевых рыб при их искусственном воспроизведении. Атлантический лосось (*Salmo salar*) наиболее чувствителен к этому вирусу в морской воде, при этом его смертность может достигать 70 % и более. В пресноводной аквакультуре наиболее чувствительны к действию вируса радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*) и голец (*Salvelinus fontinalis*) [5].

Существует как горизонтальный, так и вертикальный пути передачи вируса. Рыбы, которые перенесли заболевание, часто становятся бессимптомными вирусоносителями. Развитие патологического процесса зависит от штамма вируса, возраста рыбы и условий среды [7].

Несмотря на активное развитие форелевого рыбоводства в Украине, заболевания инфекционной природы среди этих рыб изучены недостаточно. По данным мониторинговых исследований, которые проводятся сотрудниками лаборатории ихтиопатологии ИРХ НААН Украины, были выявлены локальные вспышки вирусного панкреатического некроза у молоди форели. Нами была впервые проведена изоляция вируса [8]. Есть вероятность того, что вирус был завезен в Украину с оплодотворенной икрой из хозяйств соседних стран, в частности Польши.

Цель данного исследования – установить патогенность выделенных изолятов IPNV 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 ИРХ НААН Украины.

Вирусы: бирнавирус инфекционного некроза поджелудочной железы референтный штамм-RF (8,0 lg ТЦД50/см³); изоляты – VF-11(6,8 lg ТЦД50/см³), VF-08 (инфекционная активность – 6,2 lg ТЦД50/см³), изоляты из хозяйств в Польше PI-1(6,5 lg ТЦД50/см³) и PI-2 (5,8 lg ТЦД50/см³). Вирусы поддерживали в лабораторной коллекции ИРХ НААН Украины.

Перевиваемые культуры клеток рыб: хвостовой стебель черного толстоголова (*Pimephales promelas*) (FHM) [M. Gravell, R. C. Malsberger, 1965], гонады радужной форели *O. mykiss* RTG-2 [Wolf & Quimby, 1962].

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

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

Для выделения IPNV доставленный в лабораторию материал (20 проб по 5 рыб/проба) был исследован в соответствии с требованиями национальных и международных нормативных до-

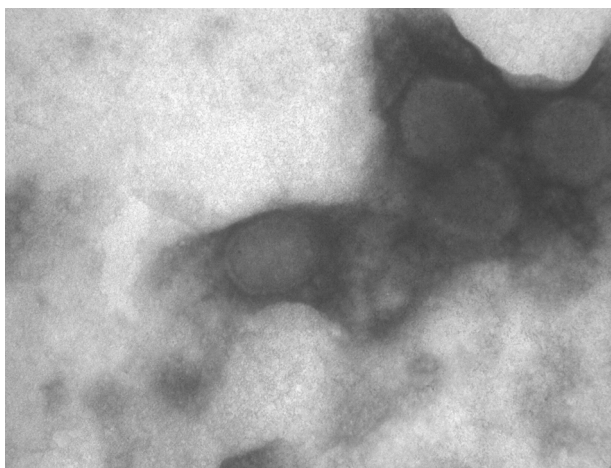


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение IPNV. Негативное контрастирование, инструментальное увеличение 30 000

кументов по вирусологическим исследованиям рыб. Количество инфекционного вируса определяли методом титрования по Риду и Менчу [9].

Морфологию выделенных изолятов изучали на электронном микроскопе ПЕМ 100М при инструментальном увеличении 30 000, используя метод негативного контрастирования [1].

Опыты по искусственному заражению рыб проводились в лабораторных условиях ИРХ НААН в ваннах объемом 40 дм³. Температура воды – от 9 до 11 °С. При этом были сформированы группы-аналоги сеголеток радужной форели по 20 экз. (вес до 10 г). Использовали метод комбинированного заражения: путем внутривентральных инъекций и внесением вируса в воду, предварительно вводя рыбу в состояние стресса. Для заражения использовали

культуральную жидкость, содержащую IPNV различных пассажей. Продолжительность эксперимента составляла 31 день.

Результаты и их обсуждение. Вирусосодержащий материал, изолированный от форели, был подвергнут электронно-микроскопическому исследованию с целью изучения морфологии выделенных изолятов. При негативном контрастировании и инструментальном увеличении 30000 были обнаружены вирионы гексагональной и округлой формы размером 65–85 нм (рис. 1).

При изучении репродукции IPNV в перевиваемых клеточных линиях RTG-2, FHM было установлено, что оптимальной для репликации вируса была температура 15–18 °С. Первые морфологические изменения наблюдали в течение 24 ч после инокуляции. Вирус репродуцировался в культуре перевиваемых клеток в течение 4–7 сут, при этом в них наступали сложные дегенеративные изменения, сопровождающиеся появлением вакуолей, зернистости, клетки сохраняли вытянутую форму или округлялись, что в конечном итоге приводило к полному разрушению монослоя (рис. 2). Инфекционный титр вируса при этом составил 10^{6,2–6,8} ТЦД 50/мл.

Патогенность выделенных изолятов IPNV для сеголеток форели устанавливали путем био-

пробы. Для сравнения в эксперименте использовали изоляты вируса, выделенные в Украине и Польше. В экспериментальных условиях при температуре воды 10 °С инкубационный период длился от 3 (для изолята VF-11) до 10 (для изолята Pl-1) дней. Активное развитие инфекции начиналось на 3–10-й день и достигало своего пика на 20–25-й день, при этом гибель сеголеток была в пределах 35 % для изолята Pl-2 и 45 % для изолятов Pl-1 и VF-11. Референтный штамм (RF) был более агрессивным, поэтому гибель рыбы была максимальной и достигла на 29-й день 60 % (рис. 3).

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. Остропротекающая инфекция носила системный характер. Развивался септический процесс, который приводил к пора-

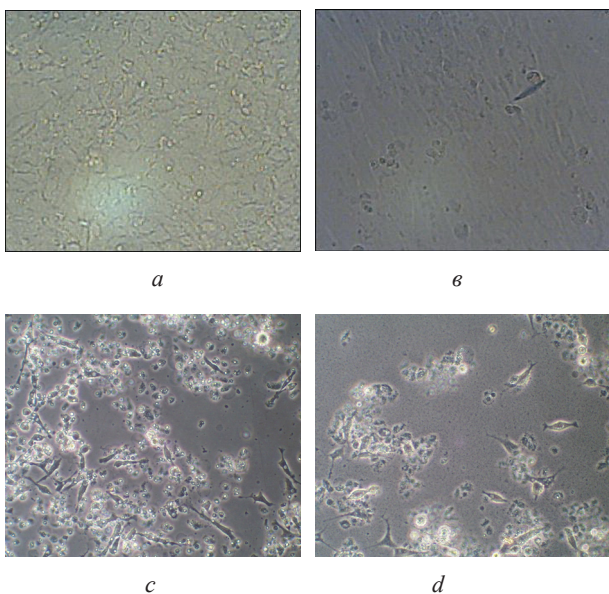


Рис. 2. Изменение монослоя клеток под действием IPNV. Нормальный монослой клеток FHM (а), RTG-2 (б). Клетки после заражения вирусом – FHM (с), RTG-2 (д)

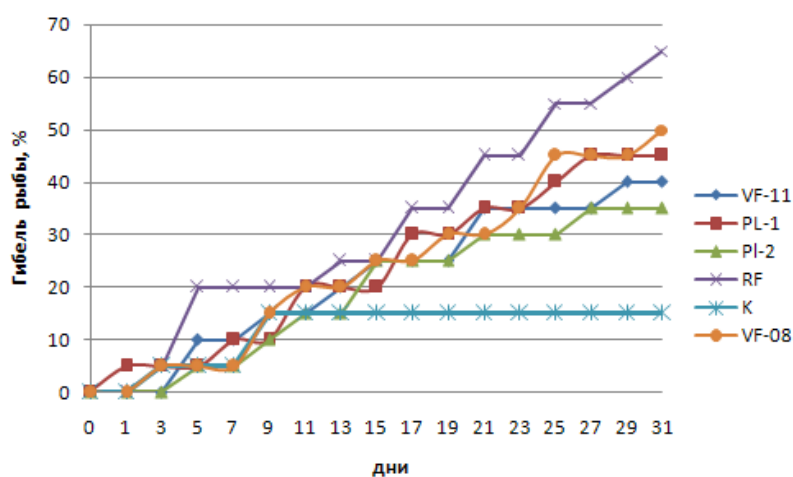


Рис. 3. Гибель сеголеток радужной форели при экспериментальном инфицировании разными изолятами IPNV

жению практически всех органов и тканей. У сеголеток больше всего была поражена поджелудочная железа (наблюдали выраженный некроз секреторных клеток), а также почки и пищеварительный тракт. Клинические проявления выражались в поражении мышц, отечности жабр, деформации внутренних органов, некрозе тканей, ведущих к нарушению водно-минерального баланса, приводящего к гибели рыб. Вирус выделяли из почек, гонад, пищеварительного тракта и мозга даже у тех сеголеток, где не было зафиксировано признаков каких-либо их изменений.

В результате было установлено, что исследованные изоляты вируса оказались патогенными для сеголеток форели и вызвали заболевание и гибель от 30 до 60 % рыб. От зараженной форели, у которой проявились клинические признаки болезни, реизолировали IPNV. При последовательных пассажах на клеточных культурах этот вирус проявлял ярко выраженное цитопатическое действие. Аналогичные результаты на культурах тканей получены и зарубежными исследователями [5–7].

В середине прошлого столетия в Украине было несколько сообщений о заболевании лососевых с клиническими признаками, подобными инфекционному панкреатическому некрозу. Первое сообщение о заболевании невыясненной этиологии среди молоди лососевых рыб было опубликовано сотрудниками лаборатории ихтиопатологии УКРНИРХ [3]. Был выделен инфекционный агент, но он не был идентифицирован и не доказана его роль в развитии патологии молоди лососевых. Более позднее сообщение было сделано специалистами Керченской зональной лаборатории ветеринарной медицины о клинических проявлениях заболевания радужной форели в специализированных хозяйствах Крымского полуострова [2].

Проведенные исследования свидетельствуют о потенциальной опасности вспышки IPNV в специализированных хозяйствах Украины. Сейчас остро стоит вопрос о профилактике этой инфекции, разработке методов ранней диагностики с целью предотвращения больших экономических потерь для рыбоводческих хозяйств. Это приобретает особое значение в связи с завозом посадочного материала и производителей рыб в Украину, что может повлечь распространение IPNV на территории нашего и сопредельных государств.

Заключение. Впервые в Украине от радужной форели выделены изоляты IPNV, обладающие высокой патогенностью в отношении молоди радужной форели. Было установлено, что исследованные изоляты IPNV обладали различной патогенностью по отношению к сеголеткам радужной форели, вызывая их гибель в пределах 30–60 %.

При репродукции этих изолятов в клеточных линиях FHM и 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 экспериментальной инфекции было установлено, что заболевание носило системный характер, у форели развивался септический процесс, который приводил к поражению практически всех органов и тканей. Больше всего поражалась поджелудочная железа, почки и пищеварительный тракт.

Литература

1. Вирусология. Методы / Под ред. Б. Мейхи. М., 1988. С. 182–184.
2. Мальцев В. Н. Об этиологии заболевания радужной форели в Крымском природном заповеднике: Материалы III междунар. ихтиол. науч.-практ. конф. Днепропетровск, 2010. С. 99–102.
3. Осадчая Е. Ф. Биологические основы рыбоводства: паразиты и болезни рыб. М., 1984. С. 28–46.
4. Ahne W., Negele R. D. Fish and Shellfish Pathology / Ed. A. E. Ellis. London: Academic Press, 1985. P 262–270.
5. Bootland L. M., Dobos P., Stevenson R. M. // Diseases of Aquatic Organisms. 1991. Vol. 10. P. 13–21.
6. Chen M. M., Kou G. H. & Chen S. N. // Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica. 1993. Vol. 32. P. 265–272.
7. Dorson M. Fish and Shellfish Pathology / Ed. A. E. Ellis. London: Academic Press, 1985. P. 251–260.
8. Matvienko N. N., Buchatsky L. P., Deryabin O. N. Isolation of IPN virus from rainbow trout in the Ukraine // Diseases of Fish and Shellfish, Split, September 12–16. 2001, abstract book. P. 363.
9. Reed L., Muench H. // Amer. J. Hygiene. 1938. Vol. 27. P. 493–497.

N. N. MATVIYENKO, L. P. BUCHATSKY

THE PATHOGENICITY OF THE DIFFERENT ISOLATES OF THE VIRUS OF INFECTIOUS NECROSIS PANCREATIC IN RAINBOW TROUT

Summary

There are presented the results of infectious pancreatic necrosis virus investigation isolated from rainbow trout in western Ukraine. It has been established that by clinical and morphological dates such isolates classified under birnavirus group. The pathogenicity of different isolates for one-years trout *Oncorhynchus mykiss* was determinated. It was found that experimental infection lead to the deaths of up to 60% of one-years trout with characteristic clinical signs of an infectious pancreatic necrosis.