

Charakterystyka molekularna wirusa zakaźnej martwicy trzustki ryb łososiowatych i jego udział w koinfekcji

1. Cel prowadzonych badań/hipoteza badawcza

Celem badań jest charakterystyka molekularna wirusa zakaźnej martwicy trzustki ryb łososiowatych (IPN), określenie serotypów wirusa występujących na terenie Polski przy użyciu technik molekularnych oraz sekwencjonowanie wybranych izolatów w celu stworzenia drzewa filogenetycznego i scharakteryzowania pochodzenia polskich szczepów wirusa IPN, a także przeprowadzenie sekwencjonowania nowej generacji (ang. Next Generation Sequencing) genów VP1, VP2, VP3, VP5 wirusa i określenie roli tych genów w wirulencji, a także ustalenie za pomocą cytometrii przepływowej roli wirusa IPN w podwójnych infekcjach m.in. poprzez określenie apoptozy w komórkach linii komórkowych i komórkach krwi ryb łososiowatych, a także wpływ czynników takich jak interferon na zakażenia wirusowe oraz ekspresja genów receptora TLR3 w poszczególnych narządach pstrągów tęczowych w odpowiedzi na pojedyncze i podwójne zakażenie wirusowe.

2. Zastosowana metoda badawcza/metodyka:

Do badań niezbędne będą linie komórkowe BF-2 i EPC w celu namnożenia zarchiwizowanych izolatów wirusa IPN. Po pojawieniu się efektu cytotatycznego zostanie przeprowadzona izolacja materiału genetycznego wirusa IPN za pomocą komercyjnego zestawu do izolacji RNA „Total RNA” A&A Biotechnology. Następnie zostanie przeprowadzona potwierdzająca identyfikacja materiału genetycznego przy użyciu metody odwrotnej transkrypcji i odwrotnej transkrypcji w czasie rzeczywistym. Otrzymane produkty reakcji posłużą do sekwencjonowania, a otrzymane wyniki wykorzystane zostaną do badań filogenetycznych w celu poznania pochodzenia polskich szczepów wirusa IPN. Sekwencje wybranych izolatów zostaną wykorzystane do Next Generation Sequencing (metoda sekwencjonowania następnej generacji). Za pomocą odpowiedniego oprogramowania bioinformatycznego np. Geneious zostanie stworzone drzewo filogenetyczne wraz z polskimi sekwencjami oraz sekwencjami pochodzącymi z bazy Genbank. Na tej podstawie zostanie sprawdzona przynależność polskich izolatów do odpowiednich serotypów, a także do sprawdzenia ewentualnych mutacji głównie w segmencie A, genie VP2, który zawiera markery wirulencji i ma szczególnie taxonomiczne znaczenie do genotypowania oraz w genie VP5, VP4, VP3. Linie komórkowe BF-2, EPC, CHSE-214 oraz RTG (komórki gonad pstrąga tęczowego) zostaną zakażone wybranymi szczepami wirusa IPN (różne serotypy), a następnie zakażone wirusami IHN, VHS, SAV w celu określenia apoptozy komórek linii komórkowych podczas koinfekcji oraz sprawdzenia mechanizmów obronnych jakie zachodzą w komórce – indukcja interferonu pod wpływem zakażenia wirusowego (metoda molekularna – real time PCR). W badaniach koinfekcji in vivo analizowane będą komórki krwi oraz narządy wewnętrzne pstrągów tęczowych – apoptoza metodą cytometrii przepływowej oraz ekspresja genu interferonu oraz receptora TLR3 metodą real time PCR.

3. Wpływ spodziewanych rezultatów na rozwój nauki

Powodem podjęcia danej tematyki badawczej był brak informacji odnośnie stale pojawiających się szczepów wirusa zakaźnej martwicy trzustki w Polsce. Można jedynie wysnuć wnioski na temat czy występujące na terenie Polski szczepy są patogenne czy nie, lecz nie wiadomo czy należą do izolatów europejskich (A2-A5), czy może pomiędzy nimi występują izolaty ze Stanów Zjednoczonych (A1) i Kanady (A6-A9). Pomiedzy różnymi serotypami/serogrupami występuje wysoki poziom antygenowej różnorodności i różnic w wirulencji i patogenności. Główną rolę w wirulencji odgrywa gen VP2, jednakże przypisuje się ją również innym genom np. VP1, VP3 i VP5. Poznanie tych informacji pozwoliłoby scharakteryzować polskie szczepy wirusa IPN i przyporządkować je do odpowiedniej serogrupy/serotypu. Ponadto poznanie mechanizmów jakie są indukowane podczas zakażenia podwójnego (koinfekcji) z udziałem wirusa zakaźnej martwicy trzustki ryb łososiowatych (IPNV), a wirusami zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego ryb łososiowatych (IHNV), wirusowej posocznicy krwotocznej ryb łososiowatych (VHSV), śpiączki ryb łososiowatych (SAV), miałyby ogromne znaczenie dla stanu zdrowotnego ryb, ponieważ zakażenie wirusem IPN prawdopodobnie chroni nosicieli przed namnażaniem innego wirusa. Jest to temat niezwykle istotny z punktu widzenia hodowców ryb łososiowatych (czyli m.in. hodowców pstrągów tęczowych, których w Polsce jest znaczna ilość), którzy borykają się z wyżej wymienionymi jednostkami chorobotwórczymi.