

На правах рукописи

УДК 619:639.3.091:577.2



КОЛБАСОВ НИКИТА ВЛАДИМИРОВИЧ

**Идентификация возбудителя вирусной
геморрагической септицемии рыб методом
полимеразной цепной реакции**

03.00.06 - вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Покров, 2008

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ).

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Цыбанов Содном Жамьянович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
кандидат ветеринарных наук

Пономарев Виктор Николаевич

Пичугина Татьяна Дмитриевна


Ведущее учреждение – ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г.Владимир

Защита диссертации состоится **20 июня 2008 г.** в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 006.003.01 при ГНУ Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии по адресу: 601120, Владимирская обл., г.Покров, ГНУ ВНИИВВиМ. Тел./ факс: (49243) 62125.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИИВВиМ.

Автореферат разослан «13» мая 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук

 Савукова В.Я.

2008А
5977

1. Общая характеристика работы

1.1. Актуальность темы

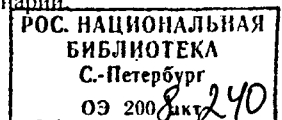
Вирусная геморрагическая септицемия (ВГС) рыб - заразная болезнь, поражающая пресноводных и морских рыб. Гибель рыб, в зависимости от возраста, может достигать 50 - 70%.

Переносчиками возбудителя являются беспозвоночные. Распространению заболевания способствует ввоз живой икры и мальков из эпизоотически неблагополучных зон. Этиологический агент, вызывающий ВГС рыб, относится к роду *Novirhabdovirus* семейства *Rhabdoviridae*. По классификации Международного эпизоотического бюро ВГС рыб относится к категории особо опасных, декларируемых болезней рыб.

Возбудитель вирусной геморрагической септицемии распространен на территории США, Канады и ряда европейских стран, таких как Дания, Финляндия, Норвегия, Швеция и в странах Балтии. Резервуары инфекции существуют в Балтийском и Северном морях, а так же в Тихом океане. ВГС рыб была широко распространена на Украине, отмечена в Прибалтике и Грузии. Сегодня ВГС рыб в России не установлена, однако угроза заноса инфекции вполне реальна в связи с ввозом рыбы из мест, неблагополучных по данному заболеванию.

Диагноз на ВГС рыб ставят на основании выполнения комплекса исследований, включающих: анализ эпизоотологических данных, клинических признаков заболевания и патологоанатомических изменений, результаты вирусологических исследований по выделению и серологической идентификации вируса с последующей постановкой биопробы.

Высокая контагиозность и смертность рыб при данной вирусной инфекции обуславливают необходимость разработки экспресс методов диагностики ВГС рыб с целью быстрого и своевременного принятия карантинных мер и профилактических мероприятий. Одним из таких методов является полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая уже нашла применение в диагностических исследованиях в ветеринарии.



Избирательная амплификация отдельных участков вирусного генома с помощью полимеразной цепной реакции, дополняя серологические и вирусологические методы, открывает новые возможности для быстрой идентификации возбудителя ВГС рыб.

1.2. Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлась идентификация генома возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб на основе полимеразной цепной реакции.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить культуральные и биологические свойства штамма ЧФ 1.2/К возбудителя ВГС рыб в различных перевиваемых клеточных линиях и на годовиках радужной форели. Депонировать данный штамм в коллекцию микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ;
2. Провести сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов структурных белков различных штаммов и изолятов возбудителя ВГС рыб, подобрать специфические праймеры для идентификации данного возбудителя;
3. Отработать методы выделения суммарной рибонуклеиновой кислоты (РНК) из инфицированных культур клеток и проб органов экспериментально зараженных ВГС рыб, оптимизировать условия синтеза кДНК и постановки ПЦР для выявления и дифференциации возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб от штаммов близкородственных представителей рабдовирусов рыб;
4. Разработать тест-систему на основе ПЦР для идентификации возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб и оценить ее пригодность для диагностики болезни;
5. Провести филогенетический анализ отечественного штамма ЧФ 1.2/К ВГС рыб.

1.3. Научная новизна работы

Изучены культуральные и биологические характеристики отечественного штамма ЧФ 1.2 возбудителя ВГС рыб, который депонирован в коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ под названием штамм ЧФ 1.2/К.

Подобраны праймеры, комплементарные различным участкам генома возбудителя ВГС рыб, позволяющие выявлять и дифференцировать его от близкородственных представителей рабдовирусов рыб (вирусов весенней виремии карпа и инфекционного некроза гемопоэтической ткани) методом ПЦР.

Проведенный филогенетический анализ участка гена штамма ЧФ 1.2/К возбудителя ВГС рыб показал, что уровень гомологии этого участка с таковыми европейских генотипов ВГС рыб составляет 96-99%.

1.4. Практическая значимость

Практическая ценность работы состоит в том, что на основании экспериментальных данных разработана тест-система для идентификации возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб методом полимеразной цепной реакции, которая успешно прошла комиссионные испытания. Акт комиссионных испытаний рассмотрен на заседании ученого совета (протокол № 6 от 14.07.2006) и утвержден директором института 18.07.2006.

Предложенная тест-система рекомендована для включения в схему лабораторных исследований при диагностике болезни, в настоящее время используется в практической работе и позволяет обнаруживать РНК возбудителя ВГС рыб в инфицированных культурах клеток и пробах органов от больных рыб.

Депонированный в коллекции микроорганизмов института штамм ЧФ 1.2/К ВГС рыб (инв. №2601 от 10.02.2005) используют в ГНУ ВНИИВВиМ при проведении НИР.

1.5. Основные положения, выносимые на защиту

1. Культуральные и биологические свойства штамма ЧФ 1.2/К возбудителя ВГС рыб, репродуцированного в культурах клеток ЕРС (перевиваемая линия клеток эпидермальных новообразований больного оспой карпа) и RTG2 (перевиваемая линия клеток гонад радужной форели);
2. Специфичность ПЦР с использованием подобранных праймеров к участку генов для обнаружения и идентификации возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб;
3. Результаты филогенетического анализа отечественного штамма ЧФ 1.2/К вируса ВГС рыб;

1.6. Личный вклад соискателя

Представленные в диссертационной работе экспериментальные исследования, анализ полученных результатов выполнены автором самостоятельно. В проведении исследований диссертации практическую и консультативную помощь оказывали сотрудники ГНУ ВНИИВВиМ: заведующий лабораторией «Здоровье гидробионтов», кандидат биологических наук Щелкунов И.С. (раздел Определение патогенности вируса) и старший научный сотрудник этой же лаборатории Щелкунова Т.И. (раздел Репродукция возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб); старший научный сотрудник лаборатории «Биофизика», кандидат биологических наук Жигалева О.Н. (раздел Филогенетический анализ штамма ЧФ 1.2/К возбудителя ВГС рыб).

1.7. Апробация результатов исследований

Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на: заседаниях ученого совета ГНУ ВНИИВВиМ в 2004-2007 гг.; международной научно-практической конференции «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» (ВНИТИБП, Щелково, 2005).

1.8. Публикации научных исследований

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 1 в журнале «Ветеринария».

1.9. Структура и объем работы

Диссертация изложена на 105 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, в т.ч. результаты исследований и обсуждение, выводы, практические предложения, дополнена приложением. Список литературы включает 147 источника. Работа иллюстрирована 8 рисунками и 16 таблицами. В приложении представлены 3 документа, подтверждающие достоверность результатов работы, ее научную и практическую значимость.

2. Собственные исследования

2.1. Материалы

Вирусы:

- ✓ *Культуральный вирус вирусной геморрагической септицемии рыб*: штамм «DK-5151», штамм «DK-5131», штамм «DK-9695303», штамм «DK-F1», штамм «DK-3592B», штамм «DK-8076», штамм «RU-F P18», штамм «FR-23/75», штамм «9695377», штамм «DK-5727», штамм «ЧФ 1.2/К».
- ✓ *Культуральный вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани*: изолят «№18», изолят «№17», штамм «FU1», штамм «ФР1/00».
- ✓ *Культуральный вирус весенней виремии карпа*: штамм «ZL-4», штамм «Fijan».

Вирусы болезней рыб были любезно представлены И.С. Щелкуновым из ВНИИПРХ (г. Дмитров);

- ✓ Вакцинный штамм вируса бешенства «ТС-80», полученный из музея микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ (инв.№ 1033).

Органный материал. Суспензия селезенки, жабр и других интактных органов годовиков радужной форели; суспензия селезенки и пула органов годовиков радужной форели, инфицированных вирусом ВГС рыб (изолят ЧФ 1.2/К).

Ферменты. M-MLV обратная транскриптаза (АмплиСенс), Таq-полимераза, «Fermentas», «СибЭнзим», Москва.

Культуры клеток. Для культивирования и титрования вирусов использовали перевиваемые культуры клеток: эпидермальных новообразований большого оспой карпа (ЕРС), полученную из ВНИИПРХ (г. Дмитров) и гонад радужной форели (RTG2), которая получена из лаборатории Культуры клеток с музеем клеточных штаммов ГНУ ВНИИВВиМ (кат. №50).

2.2.Методы

2.2.1.Культивирование вируса

Клетки RTG2, ЕРС выращивали при 20 – 21 °С на питательной среде Игла MEM (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Москва) с добавлением 10% фетальной сыворотки крови теленка. Инокулированные вирусом клетки инкубировали при 15°С.

2.2.2.Титрование вируса

Титр вируса определяли по ЦПД в культуре клеток RTG2, ЕРС методом конечного разведения по Риду и Менчу.

2.2.3.Выделение РНК

Из инфицированных вирусом культур клеток и проб органов экспериментально зараженных рыб суммарную РНК выделяли с использованием сорбента Silica (Gibco).

При выделении методом нуклеосорбции к пробе объемом 150 мкл добавляли 600 мкл лизирующего буфера, содержащего гуанидин тиоционат (ГТЦ). К полученной смеси добавлялся сорбент (20 мкл) и пробу инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин, после чего сорбент осаждали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 10 сек. Супернатант удаляли, сорбент ресуспендировали в отмывочном буфере, содержащем ГТЦ, после чего проводили центрифугирование при тех же режимах и супернатант удаляли. Сорбент ресуспендировали в 70% этаноле, осаждали при тех же условиях, супернатант удаляли, после чего его сушили в

пробирке с открытой крышкой при температуре 56°C в течение 5 мин. Затем к сорбенту добавляли 40 мкл деионизованной воды и выдерживали при температуре 56°C в течение 5 мин. После чего пробу центрифугировали и супернатант использовали для синтеза кДНК и постановки ПЦР.

2.2.4. Синтез кДНК

Синтез кДНК проводили с использованием наборов для синтеза кДНК фирм: «Promega», «Fermentas», ФГУ ВНИИЭ РОСПОТРЕБНАДЗОРА и «СибЭнзим», согласно рекомендациям производителя. В качестве затравок использовали олигонуклеотиды длиной 19-30 оснований, комплементарные последовательностям генов вируса.

2.2.5. Постановка ПЦР

Раствор кДНК (5 мкл) вносили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 10 pM каждого праймера, 0,1 mM смеси dNTP, 10x буфер (50 mM Трис HCl pH 8,0-9,2, 50 mM KCl, 1,0 –4,0 mM MgCl₂), 1 ед. Taq-полимеразы. Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик» ДНК-Технология (г. Москва).

2.2.6. Определение первичных нуклеотидных последовательностей

Определение первичных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием автоматического секвенатора Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer и набора BigDye Terminator v3.1 согласно инструкции производителя.

2.2.7. Анализ первичной структуры

Анализ первичной структуры генома возбудителя ВГС рыб проводили с использованием пакетов прикладных программ DNASIS/PROSIS, версия 3.00 BioEdit. Расчет вероятных схем спаривания праймеров осуществляли по методу определения оптимальных вторичных структур нуклеиновых кислот с использованием соответствующих энергетических правил по программе OLIGO 6.0.

2.3. Результаты исследований

2.3.1. Репродукция возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб

Перевиваемая линия клеток гонад радужной форели RTG 2 была получена в 1980 году из ФРГ. После 20-ти лет хранения при температуре минус 196°С культура клеток была взята нами с целью оценки ее чувствительности к возбудителю вирусной геморрагической септицемии рыб. Жизнеспособность клеток по тесту витального окрашивания трипановым синим составила 79%. При выращивании в условиях стационарного монослоя на чашках Карреля в среде Игла MEM с добавлением 10% фетальной сыворотки крови телят культура клеток восстановила основные свойства в течение трех пассажей после размораживания.

Культуру клеток RTG2 выращивали в пристеночных культурах при температуре 21°С. Для диспергирования клеточного пласта при пересевах использовали теплую смесь (37,0±1,0°С) 0,02% раствора версена и 0,25% раствора трипсина в соотношении 1:1. При пересеве этих клеток с коэффициентом 1:2-1:3 монослой формировался на 3-4 сутки культивирования и сохранялся при +4°С без смены среды до 40 дней.

Исследованиями установлено, что клетки гонад радужной форели чувствительны к вирусу ВГС рыб. На 2-3 сутки после заражения в дозе 0,1 – 0,01ТЦД₅₀ /клетка учитывали цитопатическое действие вируса, которое проявлялось в округлении клеток с последующим формированием своеобразных гроздьев, с дальнейшим образованием «окон» в монослое, гибелью клеток и отслоением их от стекла. На уровне 5-го пассажа вирус достигал максимального уровня накопления в культуральной жидкости 7,0-7,5 lg ТЦД₅₀/см³.

Перевиваемая линия клеток эпидермальных новообразований больного оспой карпа ЕРС была получена в 2004 г. из ВНИИПРХ. В соответствии с паспортными данными, представленными сотрудниками ВНИИПРХ, клетки

линии EPC культивировали в питательной среде Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (Игла 2MEM) с добавлением L-глутамина, 10 % фетальной сыворотки крови телят. В процессе подбора оптимальных условий культивирования клеточной линии EPC мы столкнулись с проблемой необходимости стабильного поддержания нужного значения pH питательной среды в течение 14 суток.

В результате проведенных исследований было установлено, что добавление 1M HEPES-буфера до конечной концентрации 0,02 M обеспечивает поддержание значения pH среды в строгих пределах 7,0-7,2. При других значениях pH клеточная линия EPC либо не образовывала сплошного монослоя, либо клетки не прикреплялись к стенкам культуральной посуды.

Пассирование клеток проводили методом последовательных пересевов в условиях стационарного монослоя с коэффициентом посева 1:4 – 1:5 каждые 10 – 14 дней. Диспергирование клеточного пласта осуществляли смесью растворов версена (0,02 %) и трипсина (0,25%) в соотношении 7:5.

Возбудитель ВГС рыб проявлял цитопатическое действие в клетках EPC на 2-4 сутки и достигал максимального уровня накопления в культуральной жидкости 8,0-8,5 lg ТЦД₅₀/см³.

2.3.2. Определение стабильности культуральных свойств возбудителя ВГС рыб при пассировании в культурах клеток EPC и RTG2

Для оценки стабильности культуральных свойств при пассировании возбудителя ВГС рыб (шт.ЧФ 1.2/К) в культуре клеток EPC и RTG2 было проведено 7 последовательных пассажей. Результаты исследований представлены в табл.1.

Таблица 1

Инфекционная активность штамма ЧФ 1.2/К возбудителя ВГС рыб в клеточных культурах в стационарном монослое

n=3

Культура клеток	Штамм вируса	Титр вируса ($\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$)		
		1 пассаж	4 пассаж	7 пассаж
ЕРС	ЧФ 1.2/К	8,0±0,11	8,25±0,15	8,5±0,12
RTG2	ЧФ 1.2/К	6,7±0,13	7,0±0,25	7,0±0,15

Из данных табл. 1 видно, что в результате проведённой работы установлено, что инфекционная активность возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб в культуре клеток ЕРС на протяжении 7 последовательных пассажей была стабильной и составила 8,0-8,5 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в культуре клеток ЕРС, а в культуре клеток RTG2 6,7 - 7,0 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Результаты исследования показали, что штамм ЧФ 1.2/К возбудителя ВГС рыб накапливается в стационарном монослое клеток ЕРС в более высоких титрах, чем в клетках RTG2.

Таким образом, при культивировании в стационарном монослое клеток RTG2 и ЕРС штамма ЧФ 1.2/К возбудителя ВГС рыб наблюдали стабильное его накопление в титрах от 7,0 до 8,5 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно в течение 7 последовательных пассажей (срок наблюдения).

2.3.3. Определение патогенности вируса

Сравнительное изучение стабильности патогенных свойств возбудителя ВГС рыб (шт. ЧФ 1.2/К), полученного в клетках ЕРС и RTG2, проводили на годовиках радужной форели путем заражения их методом ванн.

С этой целью использовали культуральный вирус (6 пассаж), полученный в клеточной линии ЕРС (ВНИИПРХ) и RTG2 (ГНУ ВНИИВВиМ). Сто годовиков форели помещали в 200-300-литровый бассейн (аквариум) с 50 литрами активно аэрируемой воды с температурой около

8°C. В воду внесли 50 мл культурального вируса с активностью $7.0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, полученного на разных культурах клеток. В этих условиях рыбу выдерживали в течение одного часа. Далее рыбу содержали при температуре воды 8-9°C при активной аэрации и кормлении карповым комбикормом с гранулами соответствующего размера в количестве 1% от ихтиомассы (за сутки в два приёма).

В результате проведённой работы установлено, что у большинства экспериментально зараженных рыб вирусом ВГС (шт. ЧФ 1.2/К), полученным как на клетках ЕРС, так и RTG2, на четвертые сутки после заражения отмечали угнетение и анорексию. Гибель рыб начиналась на 6-е сутки и продолжалась более 2-х месяцев. На начальных стадиях заболевания рыба погибала с признаками, типичными для острой формы течения ВГС рыб. От рыб с острым течением болезни вирус в титрах $5,5-6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ реизолировали из всех образцов отобранных материалов (жабры, почка, селезенка или общий пул органов). От рыб с хроническим течением и нервной формой болезни реизолировать вирус удалось спустя 45 суток только из головного мозга ($2,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$).

Таким образом, сравнительная оценка патогенных свойств на годовиках радужной форели возбудителя ВГС рыб (шт. ЧФ 1.2), полученных на клетках ЕРС и RTG2 показала, что они остаются стабильными.

2.3.4. Разработка набора препаратов для выявления возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб методом полимеразной цепной реакции

2.3.4.1. Подбор праймеров для выявления возбудителя ВГС рыб при помощи ПЦР

Специфические праймеры были подобраны на основе анализа опубликованных в GenBank первичных последовательностей геномов штаммов и изолятов ВГС рыб (рис. 1).

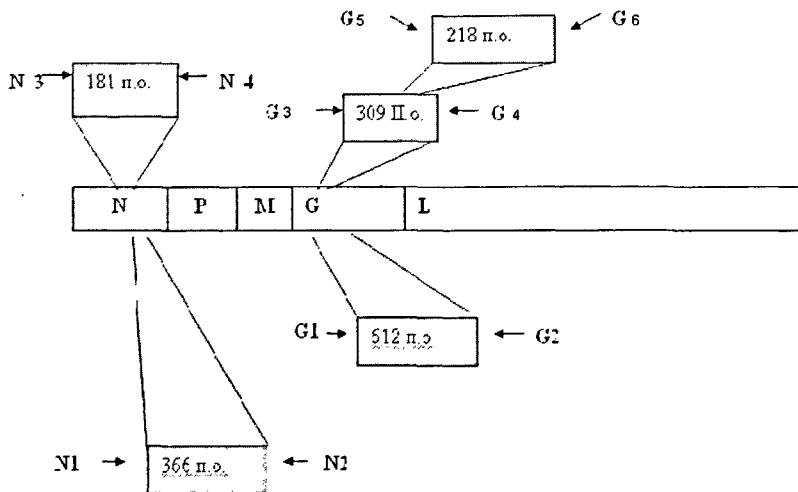


Рис. 1. Схема расположения внутренних и наружных праймеров, кодирующих участки нуклео- (N) и гликопротеин (G) генома вируса ВГС рыб

Для идентификации ВГС рыб выбраны две пары праймеров, комплементарных N-гену (ген нуклеопротеина), и три пары праймеров - G-гену (ген гликопротеина). ПЦР - продукты имели размеры от 181 до 512 п.о. При определении специфичности рассчитанных нами праймеров было установлено, что две пары праймеров (N1-N2 и N3-N4), комплементарных гену, кодирующему нуклеопротеин, взаимодействовали с РНК вирусов ВГС рыб, весенней виремии карпа (ВБК) и инфекционного некроза гемопоэтической ткани (ИНГТ), относящихся к роду *Novirhabdovirus* семейства *Rhabdoviridae*.

Праймеры (G1 - G2), комплементарные гену, кодирующему ген гликопротеина, позволяли выявлять 7 штаммов из 11 исследованных европейских штаммов ВГС рыб, но не связывались с РНК отечественного штамма ЧФ 1.2/К (табл. 2).

На основе анализа первичной последовательности гена гликопротеина штаммов BC99-001, BC99-010, ME03 и BC99-292, опубликованных в 2006 г.

в GenBank, была подобрана другая пара праймеров для постановки гнздовой ПЦР (наружные G3 - G4, внутренние G5 - G6), которые гибридизовались со всеми исследованными штаммами возбудителя ВГС рыб.

Таблица 2

Выявление РНК различных штаммов возбудителя ВГС рыб с праймерами (G1- G2)

n=3

№	Название штаммов	Результаты ПЦР с праймерами (G1- G2)
1	DK-5151	+
2	DK-5131	+
3	DK-F1	+
4	DK-3592B	-
5	DK-6137	+
6	DK-9695303	+
7	RU-F P18	+
8	FR-23/75	-
9	DK-8076	+
10	DK9695377	-
11	ЧФ 1.2/К	-

Примечание:

«+» - РНК выявлена, «-» - РНК не выявлена.

Для синтеза кДНК и постановки первого раунда ПЦР были использованы наружные праймеры (G3- G4), фланкирующие ампликон размером 309 п.о. Для исследования материалов с низким содержанием вирусной РНК проводили второй раунд ПЦР с внутренними праймерами G5- G6, синтезирующими фрагменты длиной 218 п.о.

В ходе исследований были апробированы и предложены оптимальные температурные режимы амплификации, количества и концентрации компонентов реакционной смеси.

2.3.4.2. Определение специфичности и чувствительности ПЦР

При проверке специфичности ПЦР с вышеуказанными праймерами в качестве матриц были использованы препараты РНК штаммов и изолятов возбудителя ВГС рыб, выделенные из инфицированных клеток, а также РНК, выделенная из проб органов экспериментально зараженных вирусом рыб, нуклеиновые кислоты близкородственных вирусов - вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани (ИНГТ), вируса весенней виремии карпа (ВВК), штамм «ТС-80» вируса бешенства. Результаты исследований приведены в табл. 3 и на рис. 2.

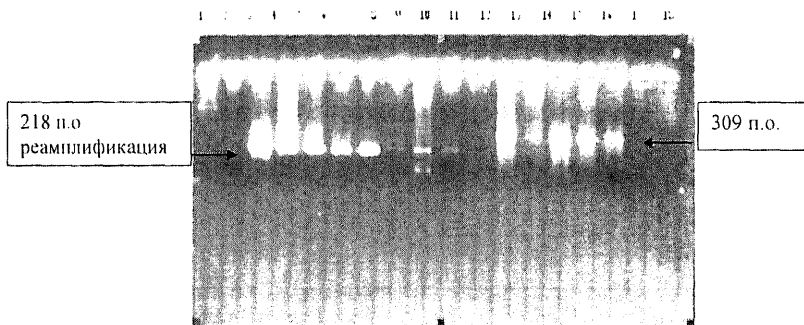


Рис.2. Результаты определения специфичности метода ПЦР

Треки: 1-11 - внутренние праймеры; 12-18 - наружные праймеры.

Треки: 1 - Незараженная культура клеток RTG-2; 2 - Незараженная культура клеток EPC; 3 - ВГС рыб шт. ЧФ 1.2/К; 4 - ВГС рыб шт. DK-5131; 5 - ВГС рыб шт. DK-9695303; 6 - ВГС рыб шт. RU-F P18; 7 - ВГС рыб шт. FR-23/75; 8 - жабры зараженных ВГС рыб; 9 - пул органов зараженных ВГС рыб; 10 - жаберные крышки зараженных ВГС рыб; 11 - вирус некроза гемопозитической ткани шт. FR2/00; 12 - ВГС рыб шт. DK-8076; 13 - ВГС рыб шт. DK-5151; 14 - ВГС рыб шт. ЧФ 1.2/К; 15 - ВГС рыб шт. RU-F P18; 16 - ВГС рыб шт. DK-9695303; 17 - вирус весенней виремии карпа шт. ZL 4; 18 - вирус бешенства, шт. ТС-80.

Таблица 3

Результаты определения специфичности праймеров, комплементарных гену гликопротеина

n=3

Образцы вирусного материала	Результаты ПЦР	
	Внешние праймеры G3-G4	Внутренние праймеры G5-G6
Культуральный вирус ВГС		
DK-5151	+	+
DK-5131	+	+
DK-F1	+	+
DK-3592B	+	+
DK-6137	+	+
DK-9695303	+	+
RU-F P18	+	+
FR-23/75	+	+
DK-8076	+	+
DK9695377	+	+
ЧФ 1,2/К	+	+
Контрольные образцы		
ВВК шт. ZL 4	-	-
ВВК изолят M2	-	-
ИНГТ шт. FR2/00	-	-
ИНГТ изолят №18	-	-
Вирус бешенства шт.ТС-80	-	-
Культура клеток RTG-2	-	-
Культура клеток EPC	-	-

Примечание:

«+» - РНК выявлена, «-» - РНК не выявлена.

Представленные данные (табл.3 и рис.2) свидетельствуют о том, что рассчитанные праймеры, комплементарные гену гликопротеина, специфически амплифицируют фрагменты генома размерами 309 и 218 п.о. и позволяют проводить идентификацию всех исследованных штаммов возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб.

С образцами РНК, выделенной из близкородственных вирусов, неинфицированных клеток EPC и пула органов неинфицированных рыб, данные праймеры не гибридизуются.

Для определения чувствительности метода была использована серия последовательных 10-ти кратных разведений препаратов культурального вирусосодержащего материала отечественного штамма ЧФ 1.2/К и европейского штамма DK-5151 с исходным титром $8,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Из полученных проб выделяли РНК согласно разработанным и утвержденным Методическим указаниям по выявлению возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб методом полимеразной цепной реакции. Методические указания рассмотрены ученым советом ГНУ ВНИИВВиМ, 14.07.2006, протокол №6. Пределом чувствительности считали последнее разведение, при котором регистрировали положительный результат в обратнотранскриптной (ОТ) ПЦР. Чувствительность тест-системы для выявления РНК ВГС рыб методом ОТ-ПЦР составляла $100 \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и выше.

Тест-система была испытана для обнаружения вирусной РНК в пробах органов экспериментально зараженных рыб (почки, селезенка, кишечник, жабры, и общий пул органов). Было показано, что РНК возбудителя ВГС рыб выявлялась во всех исследованных органах. Установлено, что наиболее пригодными образцами для обнаружения РНК возбудителя ВГС рыб являются пробы селезенки, жаберных крышек, либо их пул.

Таким образом, в результате оптимизации условий проведения ОТ-ПЦР для определения РНК ВГС рыб, была создана чувствительная и специфичная тест-система для выявления и дифференциации возбудителя ВГС рыб в инфицированных культурах клеток и различных пробах органов, полученных от экспериментально зараженных рыб.

Были проведены внутриинститутские комиссионные испытания тест-системы, разработанные методические рекомендации утверждены директором института 18 июля 2006 г. и академиком-секретарем отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии А.М. Смирновым (протокол №3 от 27 сентября 2007 г.).

2.3.4.3. Филогенетический анализ штамма ЧФ 1.2/К возбудителя ВГС рыб

Фрагмент в 309 нуклеотидных пар, соответствующий участку гена гликопротеина штамма ЧФ 1.2/К, был амплифицирован при помощи наружных праймеров (G3-G4). Полученный ПЦР-продукт был очищен методом гель-электрофореза и использован для секвенирования.

При сравнительном анализе нуклеотидной последовательности гена гликопротеина исследованного штамма ЧФ 1.2/К с последовательностями, опубликованными в различных базах и банках данных, было установлено, что уровень гомологии участка гена гликопротеина данного штамма с таковыми европейскими штаммов составляет от 96 до 99%.

Таблица 4

Уровень гомологии гена гликопротеина штамма ЧФ 1.2/К возбудителя ВГС рыб с последовательностями, опубликованными в генбанке

Кластер	Уровень гомологии, (%)	Изоляты
ЧФ 1.2/К	99	JP96KRRV9601, SE-SVA32, DK-6p403, DK-5e59, SE-SVA14, strain Cod Ulcus, NO-A16368G
	97	Hededam, NO-A16368G, DK-4p37, DK-2835
	96	DK-4p37, FiA15.02, FI-ka422, DK-3946, 23-75 France, DK-9895174, AU-8/95

Из данных, представленных в табл. 4, видно, что отечественный штамм ЧФ 1.2/К возбудителя ВГС рыб относится к европейскому генотипу и наиболее близок к изолятам JP96KRRV9601, SE-SVA32, DK-6p403, DK-5e59, SE-SVA14, strain Cod Ulcus, NO-A16368G.

ВЫВОДЫ

1. При изучении чувствительных к возбудителю ВГС рыб клеточных систем установлено, что наиболее перспективной для получения вирусного материала является перевиваемая культура клеток ЕРС (эпидермальных новообразований больного оспой карпа);
2. Инфицирование перевиваемых клеточных линий RTG2 (гонад радужной форели) и ЕРС (эпидермальных новообразований больного оспой карпа) в дозе 0,1-0,01 ТЦД₅₀/клетка обеспечивает накопление на 2-4 сутки штамма ЧФ 1.2/К возбудителя ВГС рыб в титрах 6,7-7,0 и 8,0-8,5 lg ТЦД₅₀/мл соответственно;
3. Установлено, что при пассировании в течение 7 последовательных пассажей в чувствительных клеточных системах патогенные для годовиков радужной форели свойства штамма ЧФ 1.2/К возбудителя ВГС рыб сохраняются;
4. Отработаны оптимальные условия постановки полимеразной цепной реакции с использованием праймеров, комплементарных нуклеотидным последовательностям гена гликопротеина, позволяющие при температуре отжига 54 °С выявлять РНК возбудителя ВГС рыб;
5. Разработанная «Тест-система для идентификации РНК возбудителя ВГС рыб методом ПЦР» обеспечивает минимальную чувствительность 100 ТЦД₅₀/см³;
6. На основании филогенетического анализа участка генома отечественного штамма ЧФ 1.2/К с последовательностями, опубликованными в генбанках, установлено, что он относится к европейскому генотипу при уровне гомологии 96-99%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Разработаны и утверждены директором ГНУ ВНИИВВиМ и академиком-секретарем отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии А.М. Смирновым «Методические рекомендации по применению тест-системы для выявления РНК возбудителя ВГС рыб методом полимеразной цепной реакции»;
2. Разработанная тест-система на основе полимеразной цепной реакции может быть использована для идентификации штаммов и полевых изолятов возбудителя ВГС рыб и рекомендована для включения в схему лабораторных исследований при диагностике болезни;
3. Депонированный отечественный референс-штамм ЧФ 1.2/К в коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ (инв. №2601 от 10 февраля 2005 г.), может использоваться для проведения научно-исследовательской работы.

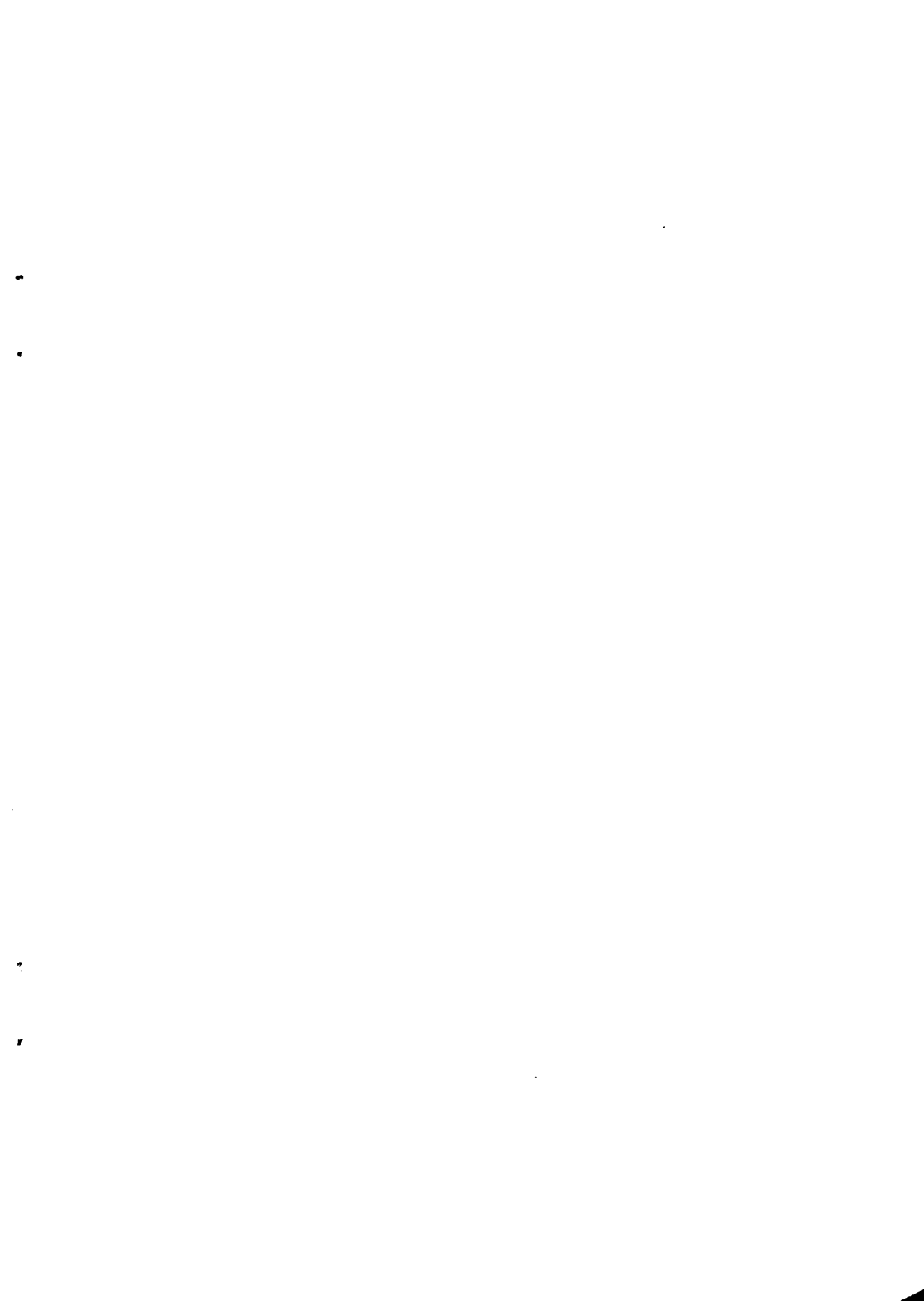
СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Колбасова, О.Л. Очистка и выделение РНК возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб / О.Л. Колбасова, Л.Ю. Апасова, Н.В. Колбасов // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 35-летию института, 26-27 мая 2005 г. / ГНУ ВНИИВВиМ. - Щелково, 2005.- С.233-236.
2. Жигалева, О.Н. Обнаружение возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб методом ПЦР / О.Н. Жигалева, Н.В. Колбасов // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: материалы Междунар. науч.-практ. конф. / ГНУ ВИЭВ.-М.: Изографъ, 2006.- С.218-219.
3. Апасова, Л.Ю. Получение вируснейтрализующей антисыворотки против возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб / Л.Ю. Апасова, Н.В. Колбасов, О.Л. Колбасова //Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: материалы Междунар. науч.-практ. конф. / ГНУ ВИЭВ.-М.: Изографъ, 2006.- С. 154-155.

4. Культивирование вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани в культуре клеток ЕРС / Л.Ю. Апасова, Н.В. Колбасов, О.Н. Жигалева, Ю.С. Дармасва // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных: материалы Междунар. науч. конф. / Ульяновская ГСХА.- Ульяновск, 2006.- С.25-27.
5. Выявление РНК возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб методом ПЦР/О.Н. Жигалева, О.Л. Колбасова, С.Ж. Цыбанов, Н.В. Колбасов, И.С. Щелкунов, Т.И. Щелкунова // Ветеринария.-2006.-№9.-С.24-26.

Отпечатано в типографии ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ,
г.Покров Владимирской области.

Тираж 75 экз.



№ - 5977

2008A

5977