

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА ВЕСЕННЕЙ ВИРЕМИИ КАРПА В ЦЕНТРАЛЬНОМ РЕГИОНЕ РОССИИ

Мороз Н.В., Рыбаков С.С., Еремеева Т.Б., Апасова Л.Ю., Пыльнов В.А.,
Калинкина Т.Ю.

ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ ВНИИЗЖ),
г. Владимир, Россия

В 2008 г. в ходе проведения эпизоотологического мониторинга на наличие возбудителей вирусных болезней рыб проведено выделение вируса весенней виремии карпа (ВВК) из патологического материала, отобранного от карповых видов рыб из рыбных хозяйств центрального региона России. При исследовании проб из Владимирской, Кировской и Калужской областей на культурах клеток было выявлено цитопатическое действие вируса.

Выделенные изоляты были идентифицированы как вирус ВВК с помощью ИФА с использованием коммерческих диагностических наборов фирмы «Test-line» (Чехия), РИФ, РН, иммуноэнзимного метода с использованием коммерческих наборов PEROX фирмы «Supress» (Бельгия) и ПЦР.

Наиболее чувствительными к выделенным изолятам вируса ВВК были культуры клеток ЕРС и FHM.

В последнее время в связи с расширением промышленного производства рыбы и рыбопродуктов в мире возрастает необходимость проведения ветеринарными службами мер по предотвращению распространения болезней рыб. В общей инфекционной патологии рыб на первое место выходят вирусные болезни [1, 2, 5]. В кодексе МЭБ по водным животным 2007 г. перечень болезней промысловых видов рыб, по которым необходимо проведение мониторинга с целью определения эпизоотического статуса водоемов и территорий составляет 9 наименований, 7 из них – вирусной этиологии [6, 8, 9].

Основным способом борьбы с вирусными заболеваниями являются санитарно-карантинные мероприятия, необходимым условием которых является регулярный мониторинг болезней в популяциях рыб, находящихся в прудовых хозяйствах и естественных водоемах [7]. Практическая часть программ мониторинга заключается в регулярном отборе проб патологического материала рыб и их лабораторном исследовании вирусологическими, гистологическими, иммунологическими и молекулярно-биологическими методами.

Целью данной работы было выделение вируса на культуре клеток из патматериала, взятого от карповых видов рыб, выращиваемых в рыбхозах центральной части России, с его последующей идентификацией.

Материалы и методы. В 2008 г. были исследованы пробы от карповых видов рыб из рыбных хозяйств Владимирской, Кировской, Калужской и Тверской областей.

Для выделения вируса были использованы культуры клеток ЕРС (эпидермальные новообразования большого оспой карпа), BF-2 (хвостовой стебель синежаберного солнечника), FHM (хвостовой стебель толстоголова), RTG-2 (гонады радужной форели). Для изучения культуральных свойств, выделенных изолятов, кроме вышеуказанных, были взяты культуры клеток: СНН-1 (сердце кеты), СНСЕ-214 (эмбрион чавычи), АСК (почка атлантического лосося), КПОО (паренхиматозные органы ленского осетра).

Клетки выращивали в среде MEM с двойным набором аминокислот и витаминов с добавлением 10% фетальной сыворотки КРС и в обогащенной среде ПСП. Для выделения вируса использовали 7-10 суточный монослой культур клеток, выращенный в пластиковых матриксах.

Отбор проб и перевозку образцов проводили в соответствии с инструкцией, изложенной в «Методических указаниях по идентификации вирусов и лабораторной диагностики вирусных болезней рыб» [3].

Гомогенаты тканей рыб в концентрации 10%, приготовленные на соответствующей питательной среде, центрифугировали при 2500 g при 4°C. Образцы титровали

на 96-луночных планшетах одновременно с посевом клеток согласно стандартной методике на модифицированной среде Игла МЕМ с двойным набором аминокислот и витаминов с добавлением 10% фетальной сыворотки КРС и антибиотиков в стандартной концентрации. При отсутствии CO_2 -инкубатора в среду добавляли Нерес рН 7,4 в конечной концентрации 0,02М. Готовили десятикратные разведения гомогенатов, с 10^{-1} до 10^{-8} . Затем в четыре лунки пластиковых планшетов вносили по 0,075 см³ суспензии культуры клеток ЕРС с концентрацией клеток 1 млн/см³, обеспечивающей образование монослоя через 24 ч инкубации, и по 0,025 см³ соответствующего разведения исследуемого гомогената. Планшеты инкубировали при 20°C в течение 10 суток, ежедневно просматривая, начиная с 3-х суток, под микроскопом на наличие ЦПД. При отсутствии ЦПД делали два последовательных слепых пассажа.

С целью идентификации выделенных на культуре клеток изолятов вирусов были использованы следующие методы:

- РН на культуре клеток со специфическими гипериммунными сыворотками кролика к вирусу весенней виремии карпа (ВВК);

- РИФ с использованием коммерческих наборов фирмы «Cypress» (Бельгия) для выявления вирусов ВВК, инфекционного некроза гемопоэтической ткани (ИНГТ), вирусной геморрагической септицемии (ВГС), инфекционного некроза поджелудочной железы (ИНПЖ);

- ИФА с использованием коммерческих диагностических наборов фирмы «Test-line» (Чехия) для выявления вируса ВВК;

- иммуноэнзимный метод (PEROX) с использованием коммерческих наборов фирмы «Cypress» (Бельгия) для выявления вирусов ВВК, ИНГТ, ИНПЖ;

- ОТ-ПЦР с праймерами, фланкирующими ген N вируса ВВК.

Результаты исследований. При патологоанатомическом вскрытии у некоторых рыб отмечали серповидное кровоизлияние в глазное яблоко, наличие кровавого экссудата в брюшной полости, признаки воспаления плавательного пузыря. У некоторых рыб наблюдали увеличенный желчный пузырь, кишечник с признаками катарального воспаления (рис.1, 2).



Рис. 1. Серповидное кровоизлияние в глазное яблоко у карпа



Рис. 2. Кровавый экссудат в брюшной полости и признаки воспаления плавательного пузыря

В результате вирусвыделения на культуре клеток были изолированы вирусы из проб, взятых в рыбохозяйствах Муромского и Суздальского районов Владимирской области, Кировской, Калужской областей.

Реакцию нейтрализации изолятов вирусов на культуре клеток ЕРС со специфическими гипериммунными сыворотками кролика к вирусу ВВК ставили по стандартной методике. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты реакции нейтрализации изолятов вирусов с гипериммунными сыворотками к вирусу ВВК

№	Изолят вируса	Вид рыбы	Индекс нейтрализации
1	«Муром 04/08»	Карась	$10^{6,0}$
2	«Киров 05/08»	Карп	$10^{5,75}$
3	«Суздаль 05/08»	Карп	$10^{5,85}$
4	«Калуга 06/08»	Карп	$10^{5,35}$
		Карась	$10^{5,75}$
		Линь	$10^{5,0}$
		Лещ	$10^{4,5}$

Таким образом, все изоляты от карповых были предварительно отнесены к вирусу ВВК. В дальнейшем видовая принадлежность выделенных изолятов к вирусу ВВК была подтверждена в РИФ (рис.3), PEROX (рис.4) и ИФА.

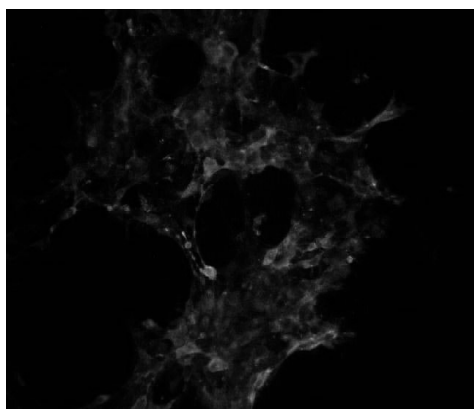


Рис. 3. Характерное специфическое свечение зеленым цветом пораженной изолятом «Суздаль 05/08» культуры клеток ЕРС под люминисцентным микроскопом при постановке РИФ с использованием коммерческого набора для выявления вируса ВВК



Рис. 4. Характерное специфическое окрашивание красным цветом пораженной изолятом «Муром 04/08» культуры клеток ЕРС под инвертированным микроскопом при постановке PEROX с использованием коммерческого набора для выявления вируса ВВК

Специфичность выделенных изолятов вируса ВВК была также подтверждена в ОТ-ПЦР с праймерами, фланкирующими N ген (рис.5).

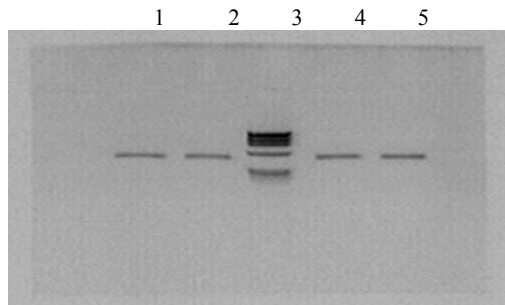


Рис.5. Электрофореграмма продуктов ПЦР

Примечание: изоляты вируса ВВК, выделенные на культуре клеток FHM; 1 – «Калуга 06/08»; 2 – «Муром 04/08»; 3 - маркер фХ174 DNA/НаеIII; 4 – «Киров 05/08»; 5 – «Суздаль 05/08».

Итоги проведенных комплексных исследований по идентификации изолятов вирусов рыб представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Идентификация выделенных изолятов вирусов рыб

№	Месторасположение хозяйства	Изолят	Проба, вид рыбы	Метод исследования					Результат исследования
				ИФА	РН	РИФ	Рогох	ПЦР	
1	Муромский р-н Владимирская обл.	«Муром 04/08»	Карась № 4	+	+	+	+	+	ВВК
2			Карась № 5	+	н/и	н/и	н/и	н/и	
3	Кировская обл.	«Киров 05/08»	Карп № 1	+	н/и	н/и	н/и	н/и	ВВК
4			Карп № 2	+	+	+	+	+	
5	Суздальский р-н, Владимирская область	«Суз- даль 05/08»	Карп № 1	–	н/и	+	н/и	н/и	ВВК
6			Карп № 2	+	+	+	+	+	
7	Калужская обл.	«Калуга 06/08»	Карп	+	+	+	+	+	ВВК
8			Карась	–	+	+	+	н/и	
9			Линь	+	+	+	+	н/и	
10			Лещ	–	+	+	+	н/и	

Примечание: н/и – не исследовали.

В результате проведенных комплексных исследований изоляты вирусов, выделенные от рыб из хозяйств Муромского и Суздальского районов Владимирской области, Кировской и Калужской областей идентифицировали как вирус ВВК.

Для изучения культуральных свойств изолятов вируса ВВК патологический материал высевали одновременно на несколько культур клеток: ЕРС, RTG-2, BF-2, FHM. Характерное ЦПД при первом пассаже почти у всех изолятов отмечалось только на культуре клеток ЕРС. Только во втором пассаже на культуре RTG-2 изолятов вируса «Муром 04/08» и «Суздаль05/08» наблюдали ЦПД. Но и в этом случае, их титр был гораздо ниже, чем на культуре клеток ЕРС.

В дальнейшем при пассировании на культуре клеток ЕРС и получении изолятов вирусов со стабильными свойствами удалось адаптировать их и к другим культурам клеток.

Результаты изучения культуральных свойств изолятов вируса ВВК, выделенных в 2008 г., представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Чувствительность клеточных культур рыб к изолятам вируса ВВК

№	Изолят вируса ВВК	Культура клеток	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³				
			1 пас	2 пас	3 пас	4 пас	5 пас
1	2	3	4	5	6	7	8
1	«Муром 04/08»	ЕРС	≥4,6	≥6,1	8,35	8,10	8,10
		FHM*	7,35	8,60	7,60	8,10	7,84
		RTG-2*	6,40	5,55	6,10	5,60	5,10
		BF-2*	8,05	6,55	6,85	5,35	6,35
		СНН-1*	7,27	5,35	5,10	н/и	н/и
		СНСЕ-214*	9,90	7,10	7,35	н/и	н/и
		АSК*	-	-	-	н/и	н/и
КПОО*	-	-	-	н/и	н/и		

1	2	3	4	5	6	7	8
2	«Киров 05/08»	ЕРС	-	≥6,1	9,35	7,35	8,35
		ФНМ*	7,35	8,84	7,85	7,10	9,10
		RTG-2*	6,30	3,30	5,85	4,60	4,85
		BF-2*	7,05	6,55	6,1	5,10	5,85
		СНН-1*	7,85	5,10	5,35	н/и	н/и
		СНСЕ-214*	9,10	7,35	7,10	н/и	н/и
		АСК*	-	-	-	н/и	н/и
3	«Суздаль 05/08»	КПОО*	3,35	-	-	н/и	н/и
		ЕРС	4,35	7,10	8,28	8,35	8,60
		ЕРС**	8,10	8,10	8,35	9,35	8,30
		ФНМ*	7,35	8,84	7,60	9,10	8,10
		RTG-2	6,1	7,10	7,10	7,10	8,85
		RTG-2*	5,55	5,05	5,10	4,10	5,10
		BF-2*	6,05	6,55	6,85	5,35	7,35
		СНН-1*	8,10	5,10	5,10	н/и	н/и
		СНСЕ-214*	8,10	7,35	7,10	н/и	н/и
4	«Калуга 06/08»	АСК*	-	-	-	н/и	н/и
		КПОО*	4,1	-	-	н/и	н/и
		ЕРС	+	8,35	8,85	8,35	8,35
		ФНМ*	7,85	8,30	7,10	7,10	7,85
		RTG-2*	5,80	5,80	5,85	4,60	5,10
		BF-2*	6,05	6,80	6,85	5,85	7,10
		СНН-1*	7,85	5,10	5,10	н/и	н/и
		СНСЕ-214*	8,10	7,35	7,10	н/и	н/и
		АСК*	-	-	-	н/и	н/и
КПОО*	-	-	-	н/и	н/и		

Примечания: * – культуральный вирус после адаптации его на ЕРС; ** – культуральный вирус после адаптации его на RTG-2.

Наиболее чувствительными к изолятам вируса ВВК в наших опытах были культуры клеток ЕРС и ФНМ. ЦПД, характерное для вируса ВВК, отмечалось на 2–4 сутки культивирования и инфекционная активность находилась на уровне 7–9 lg ТЦД₅₀/см³. Пассирование на культурах клеток RTG-2, BF-2, СНН1, СНСЕ-214 изолятов вируса, адаптированных к ЕРС, приводило к снижению уровня их накопления. Культуры клеток АСК и КПОО оказались непригодными для культивирования выделенных изолятов.

Заключение. Было проведено вирусвыделение из патологического материала от карповых видов рыб из рыбохозяйств центрального региона России. При исследовании проб патматериала из рыбных хозяйств Владимирской, Кировской и Калужской областей на культурах клеток ЕРС и ФНМ было выявлено цитопатическое действие вируса.

Выделенные изоляты были идентифицированы как вирус ВВК с помощью нескольких методов.

Наиболее чувствительными к выделенным изолятам вируса были культуры клеток ЕРС и ФНМ.

Список литературы

1. Абтахи, Б. Вирусные болезни рыб / Паразиты и болезни рыб: Сборник научных трудов // Редкол.: Безгачина Т.В., Недоговорова Т.В., Соколовская С.А., Юхименко Л.Н. – М.:Изд-во ВНИРО, 2000. – 183 с.
2. Здоровая рыба. Профилактика, диагностика и лечение болезней / Ракхонен Р., Веннерстрем П., Ринтамяки-Киннунен П. и др. // НИИ охотничьего и рыбного хозяйства – Хельсинки, 2003. – 164 с.
3. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб / М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. – 310 с.
4. Шелкунов, И.С. Эпизоотическая ситуация по вирусным болезням культивируемых рыб // Ветеринария, № 4, 2006. – С. 22–25.
5. Эпизоотологический мониторинг заболеваний рыб в Российской Федерации

ции / Гулюкин М.И., Борисова МН., Пичугина Т.Д. и др. //90-й выпуск тематического научного сборника «Ветеринарная медицина» посвященного междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы охраны здоровья рыб и других гидробионтов». – Харьков, 2008. – С. 142-146. 6. Aquatic Animal Health Code OIE / Eleventh Edition, 2008. – P. 308. 7. Wolf, K. Fish viruses and fish viral diseases // U.S. Fish and wildlife service. Ithaca, London. 1988. – 478 p. 8. http://www.oie.int/eng/normes/fcode/A_summry.htm 9. http://www.oie.int/eng/publicat/en_aqua.htm

ISOLATION OF CARP SPRING VIREMIA VIRUS IN THE CENTRAL REGION OF RUSSIA

Moroz N.V., Rybakov S.S., Yeremeyeva T.B., Apasova L.Yu., Pylnov V.A., Kalinkina T.Yu.
FGI “Federal Centre for Animal Health” (FGI “ARRIAH”), Vladimir, Russia

Pathological material from cyprinoids from fish farms in the central region of Russia was tested for spring viremia of carp virus during the epidemic monitoring aimed at the detection of presence of viral fish disease agents in 2008. Cytopathic effect of the virus was detected in cell cultures from samples from the Vladimirskaia, Kirovskaya and Kaluzhskaya Oblasts.

The recovered isolates were identified as spring viremia of carp virus by ELISA using commercial diagnostic kits produced by “Test-line” (Czech Republic), immunofluorescence test, neutralization test, immunoenzyme method using PEROX commercial kits produced by “Cypress” company (Belgium) and by PCR.

EPC and FHM cell cultures were the most sensitive to the recovered isolates of spring viremia of carp virus.

УДК 616:619-006.446:636.2

АНТИЭПИЗООТИЧЕСКАЯ ЦЕПЬ МЕРОПРИЯТИЙ, ГАРАНТИРУЮЩИХ ИСКОРЕНЕНИЕ И НАДЕЖНУЮ ПРОФИЛАКТИКУ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Москалик Р.С.

Научно-практический институт биотехнологий в животноводстве
и ветеринарной медицине, Молдова, г. Кишинев

Впервые в ветеринарной науке и практике разработан и внедрен новый принцип и тактика «антиэпизоотической цепи» эффективного оздоровления от лейкоза. Установлено, что главным звеном этой цепи является первое – соблюдение профессиональной этики при обслуживании животных. Процесс искоренения лейкоза можно ускорить при своевременном выполнении всех трех звеньев антиэпизоотической цепи: второе – серологическая диагностика, а третье – выбраковка на убой зараженных животных.

Лейкоз крупного рогатого скота в послевоенные годы получил распространение в большинстве стран мира с высокоразвитым молочным скотоводством [2]. В Молдове эта болезнь впервые зарегистрирована в 1965 г., а к началу 80-х годов XX-го столетия страна стала самой неблагополучной в мире [15,18].

Такая ситуация – следствие отсутствия в течение длительного времени сведений об истинной причине, вызывающей лейкоз, а поэтому профессиональное обслуживание животных проводилось без учета механизма передачи возбудителя болезни, что привело к массовому ее распространению.

Решающее значение в расшифровке этиологии лейкоза КРС внесли американские ученые Miller J. и Olson O. [11], которые впервые обнаружили РНК-содержащий вирус, отнесенный к семейству Retroviridae [22] и названный вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) [23].

Первые разработки стратегии и тактики борьбы с лейкозом уже были к 30-м годам прошлого столетия в Дании, Голландии, Швеции и др. государствах, где к тому времени лейкоз был широко распространен [12, 21]. Однако во многих странах мира лейкоз КРС до настоящего времени остается одной из наиболее распространенных инфекций при ежегодной выбраковке на убой значительного (десятки и сотни тысяч) количества инфицированных высокопродуктивных коров [1,9,10,14,16,25].