

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ

Завьялова Е.А., Кандрина Н.Ю., Ломакина Н.Ф., Гулюкин М.И.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.П. Коваленко (ВИЭВ), г. Москва

Россия располагает крупнейшим в мире водным фондом внутренних водоемов и прибрежных акваторий морей, использование которого носит комплексный многоотраслевой характер. На протяжении длительного периода времени, рыбохозяйственной эксплуатации внутренних водоемов не придавалось большого значения, так как производство рыбной продукции осуществлялось за счет промышленного изъятия природных популяций рыб и других гидробионтов в Мировом океане. В последние десятилетия мировой вылов стабилизировался на уровне 90-93 млн тонн, а прирост рыбопродукции идет исключительно за счет бурно развивающейся аквакультуры. В России в последние годы вылов составляет 3-3,2 млн тонн, а доля аквакультуры не превышает 5 %, что не соответствует потенциальным возможностям страны и неспособно удовлетворить возрастающие потребности населения страны в высококачественных рыбных продуктах.

Основными факторами, сдерживающими развитие производства, являются: высокая степень износа основных фондов, дефицит инвестиционных ресурсов, недостаточный профессиональный уровень подготовленности специалистов, особенно в части организации производства, а также использования научно-технических достижений и передового отечественного и зарубежного опыта в борьбе с причинами технологического характера, которые могут лимитировать рост сектора.

К технологическим ограничениям относятся в первую очередь болезни культивируемых объектов. Несмотря на то, что большинство инфекций не представляют прямой угрозы здоровью человека, они отрицательно влияют на темп роста, товарный вид и качество рыбопродукции. Распространению болезней способствует перенос патогенного начала из-за расширяющейся торговли живыми гидробионтами.

Ещё одна из существенных проблем отечественной акваиндустрии – отсутствие рыбопосадочного материала, который рыбводам приходится закупать в Финляндии, Норвегии и других Европейских странах. Завоз рыбопосадочного материала в Российскую Федерацию из стран с различной эпизоотологической ситуацией требует мониторинга, чтобы ветеринарная служба могла своевременно принять меры в случае возникновения особо опасных болезней на территории стран-экспортеров. На Европейском континенте у рыб в естественных водоемах и в аквакультуре циркулируют возбудители таких особо опасных вирусных болезней – инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых, инфекционная анемия лососевых, вирусная геморрагическая септицемия и другие.

В современных экономических условиях, при разнообразии форм собственности и методов ведения хозяйства главным направлением является прогнозирование возможных заболеваний, так как только на основе достоверной ветеринарной информации возможна разработка профилактических мер.

Однако в настоящее время, в России отсутствуют адекватные качественные тест-системы, сочетающие невысокую стоимость анализа, простоту в использовании, а главное, высокую чувствительность. Таким образом, целью настоящего исследования являлась разработка тест-систем для индикации и идентификации вирусов-возбудителей особо опасных и карантинизируемых заболеваний карповых и лососевых рыб методом ПЦР.

Материалы и методы. Праймеры, используемые в работе, были взяты из литературных источников [1,2,3,4], а также в международной базе данных «GeneBank». Материалом для отработки методики являлись штаммы вирусов-возбудителей весенней виремии карпов (SVC), инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN), инфекционного некроза гемопозитической ткани (IHN), геморрагической септицемии лососевых (VHS) из коллекции лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ им. Я.П.Коваленко и любезно предоставленные сотрудниками других институтов, занимающихся сходной тематикой (ВНИИВВиМ, КамчатНИРО).

Для пассирования вирусов использовали перевиваемые линии клеток – RTG-2 (гонады радужной форели), EPC (эпителиальная папиллома карпа), CHSE-214 (эмбрион чавычи), FHM (хвостовой стебель голяна) и OMG (гонады радужной форели, ВИЭВ), которые культивировали при температуре 15-22°C (в зависимости от вида вируса) в среде с использованием Игла MEM с добавлением 10 % фетальной сыворотки КРС.

Реагенты для выделения РНК, постановки обратной транскрипции (ОТ) и проведения ПЦР и агарозного гель-электрофореза: набор для выделения РНК «Рибо-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва), фермент для обратной транскрипции – обратная транскриптаза в комплекте с 5x буфером для обратной транскриптазы, GenePak™ DNA Markers M 100, маркер размера фрагментов ДНК (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000), либо 100 bp DNA Ladder, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) с концентрацией 10 mM каждого, 10x реакционный буфер без MgCl₂ и поставляемый в комплекте р-р 25 mM MgCl₂, фермент Taq-полимераза с ПЦР буфером (10x): 670mM трис, pH 8.8; 160mM (NH₄)₂SO₄; 50mM MgCl₂; 0,1% Twin 20; краска (10-кратный краситель) (на 1 мл общего объема 800мкл глицерина, минеральное масло, бромистый этидий, 10 мкг/мл для электрофореза, агароза LE2, буфер для электрофореза TAE 50x (EDTA В · NA2 В · 2H2O (0.05 M), Acetic acid glacial (1 M), Tris (2 M)), вода для молекулярно-биологических целей, деионизированная, свободная от ДНКаз и РНКаз.

Результаты исследований. Для идентификации SVCV были подобраны три праймера N3, N4r, N5r согласно референтной последовательности N-гена штамма *Fijan*, были изменены и оптимизированы условия выделения РНК, проведения обратной транскрипции и ПЦР. В итоге общее время анализа было сокращено до 4 часов.

Реакцию обратной транскрипции проводили при 42°C-45 минут, затем полученную кДНК прогревали при t 95°C в течении 5 минут и использовали для постановки полимеразной цепной реакции. В ПЦР использовали внешние и внутренние праймеры, комплементарные участкам гена нуклеопротеина. Внешние праймеры направляют синтез ПЦР-продукта размером 418 п.н. С целью повышения чувствительности метода применяли методику полугнездовой ПЦР, которая заключалась в использовании в первом цикле реакции внешних праймеров N3 и N5, а во втором – внутреннего праймера N4 в паре с праймером N3 (ПЦР-продукт 388 п.н.). Для идентификации специфического фрагмента использовали стандартные маркеры – наборы фрагментов ДНК известной длины. При просмотре геля на УФ-транслюминаторе присутствие фрагмента определенного размера в виде специфической светящейся полосы большей или меньшей интенсивности свидетельствовало о наличии в пробе кДНК полученной с вирусной РНК.

Данная методика была успешно применена для идентификации изолятов вируса SVC. Штаммы были выделены в разные годы сотрудниками лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ из проб, полученных в рыбхозах. Всего в ходе работы было исследо-

вано 22 пробы культурального вируса, ранее охарактеризованные методом иммуноферментного анализа (ELISA Ag SVCV от «Test-line», Чехия) и содержащих SVC.

Для идентификации IPNV были подобраны четыре праймера к сегменту В (В1, В2, В3r, В4r) для штамма *Jasper* таким образом, это позволило использовать технику гнездовой и полугнездовой ПЦР. Выбор праймеров был обусловлен тем, что сегмент В содержит гены, кодирующие РНК-зависимую РНК-полимеразу и являющиеся высококонсервативными участками генома вируса. Реакцию обратной транскрипции проводили по такой же схеме, как и для SVCV: При $t\ 42^{\circ}\text{C}$ – 45 мин., при $t\ 95^{\circ}\text{C}$ – 5 мин., кДНК использовали для проведения ПЦР, в результате которой получали продукты амплификации длиной 839 п.н. в первом раунде ПЦР и 217 п.н. во втором раунде ПЦР, что подтверждалось во всех экспериментах. Программа амплификации:

1. При $t\ 95^{\circ}\text{C}$ – 2 мин.
2. 1) При $t\ 95^{\circ}\text{C}$ – 20 сек.; 2) при $t\ 50^{\circ}\text{C}$ – 20 сек.; 3) при $t\ 72^{\circ}\text{C}$ – 50 сек. (3 цикла).
3. 1) При $t\ 95^{\circ}\text{C}$ – 20 сек.; 2) при $t\ 58^{\circ}\text{C}$ – 20 сек.; 3) при $t\ 72^{\circ}\text{C}$ – 50 сек. (30 циклов).
4. При $t\ 74^{\circ}\text{C}$ – 2 мин.

Всего было исследовано более 80 образцов различного происхождения, а сконструированные праймеры и отработанные условия ПЦР для выявления IPNV позволили обнаружить присутствие этой инфекции в рыбоводческих хозяйствах РФ. Было установлено, что при исследовании материала с невысоким содержанием вируса, а также для выявления скрытого вирусносительства целесообразно применять гнездовую ПЦР, т.е. последовательно проводимые два этапа ПЦР с наружной и внутренней парами праймеров. В то время как для скрининга при явно выраженной эпизоотии достаточно использовать одноэтапную ПЦР с одной внутренней парой праймеров. Встречались также некультивируемые формы вируса, выявляемые только в ПЦР. Результаты, полученные в ПЦР, коррелировали с результатами исследования вирусосодержащей суспензии методом электронной микроскопии и с помощью коммерческих наборов ELISA Ag IPNV от «Test-line» (Чехия).

Для идентификации VHSV в ПЦР использовали праймеры, комплементарные определенным участкам гена нуклеопротеина: VF (прямой) и VR (обратный). В результате проведенных исследований с этими праймерами на матрице РНК вируса VHS получали четкий ПЦР-продукт ожидаемых размеров 811 п.н. Разработанная методика позволяет выявлять как вирус, полученный из культур клеток, так и вирус, полученный из полевого клинического материала. Эффективность метода подтверждена в случае выявления вируса у дикой молодежи кумжи и озерного лосося в Северо-Западном регионе России, когда в культурах клеток был выделен вирусный цитопатогенный агент, идентифицированный в реакции нейтрализации, как вирус VHS лососевых. При этом продолжительность анализа традиционным методом составила 20 дней, а в ПЦР – 5 часов с учетом подготовки проб.

Для идентификации IHNV применяли специфические праймеры, подобранные к гену нуклеопротеида и технику гнездовой ПЦР nested-PCR. Реакцию обратной транскрипции проводили при $t\ 42^{\circ}\text{C}$ в течении 45 минут, затем полученную кДНК прогревали при $t\ 95^{\circ}\text{C}$ в течении 5 минут и использовали для постановки полимеразной цепной реакции. Программа амплификации аналогична программе для вируса IPNV. В первом раунде получали продукт длиной 786 п.н., во втором – 323 п.н.

Специфичность праймеров была проверена с помощью программы BLAST, а также экспериментально. Исследование культур, после инокуляции вирусами весенней виремии карпов, инфекционного некроза поджелудочной железы, вирусной геморрагической септицемии и инфекционного некроза гемопоэтической ткани, в ПЦР показало, что выбранные праймеры гибридизируются только с фрагментами, комплементарными искомому вирусу и не взаимодействуют с РНК других вирусов.

Выводы и перспективы дальнейших исследований. В результате проведения исследований для идентификации SVCV, IPNV, IHNV, VHSV были подобраны праймеры, согласно референтным последовательностям консервативных участков генома, были изменены и оптимизированы условия выделения РНК, проведения обратной транскрипции и ПЦР, таким образом, что общее время анализа не превышало четырех часов. С помощью отработанных методик была проведена идентификация штаммов, референтных и полевых, имеющих в лаборатории ихтиопатологии и выделенных в разные годы в рыбоводческих хозяйствах. Данные, полученные в ходе исследований с применением ПЦР, коррелировали с результатами, полученными другими методами: в ИФА, в реакции нейтрализации, методом электронной микроскопии, были получены в более короткие сроки. ПЦР предоставляет также возможность выявления скрытого вирусносительства в популяции внешне здоровых рыб, что особенно важно при трансграничных перевозках гидробионтов.

Применение ПЦР в диагностике вирусных болезней рыб стимулирует развитие аквакультуры за счет увеличения разнообразия методических подходов для практической ветеринарии и представляет большой интерес для изучения молекулярно-генетических исследований свойств вирусов, циркулирующих в водоемах России.

Список литературы

1. Manual, of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. – OIE. – 2009.
2. Hirayama, T., Nagano, I., Shinmoto, H. Isolation and characterization of virulent yellowtail ascites virus// Microbiol. Immunol., – 2007. – Vol. 51 – N.4, – P. 397-406.
3. Pedersen, T., Skjesol, A., Jorgensen, J. B. VP3, a structural protein of infectious pancreatic necrosis virus, interacts with RNA-dependent RNA polymerase VP1 and with double-stranded RNA// J. of virology., – 2007. – Vol. 81 – N.17 – P.6652-6663.
4. Faisal, M., Schulz, C.A. Detection of Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSV) from the leech *Myzobdella lugubris* Leidy, 1851// Parasites & Vectors — 2009. – Vol.2. – N.45

POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DIAGNOSTICS OF VIRAL FISH DISEASES

Zavyalova E., Kandrina N., Lomakina N., Gulyukin M.

The All Russian Institute of Experimental Veterinary and Medicine n.Kovalenko (VIEV), Moscow

The purpose of the present work was development of the test systems for indication and identification of viruses-agents dangerous and quarantine diseases of cyprinid and salmon fish by PCR. As a result for identification of SVCV, IPNV, IHNV, VHSV there have been picked up primers, which were complementary to highly conservative sites of the genome, conditions of RNA isolation, carrying out of a reverse transcription and PCR have been changed and optimized in such a manner that the general time of the analysis didn't exceed more than four hours. Identification of strains, referential and field, available in the laboratory ichthyopathology and isolated in different years in fish farms has been carried out by means of the fulfilled techniques. The data received during research was correlated with the data received by other methods such as ELISA, the reaction of the neutralization and method of the electronic microscopy.