

ВИРУСВЫДЕЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ

Н.В. Мороз¹, А.В. Лысанов², В.А. Пыльнов¹

¹ ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ ВНИИЗЖ),
г. Владимир, Россия, e-mail: moroz@arriah.ru

² ФГУП «Федеральный селекционно-генетический центр рыбоводства»,
Ленинградская область, п. Ропша, Россия, e-mail: lysanov73@ya.ru

Инфекционный некроз гемопоэтической ткани (ИН) – острое заболевание лососевых рыб, вызываемое вирусом сем. *Rhabdoviridae*, который является патогенным как в естественных водоемах, так и при искусственном выращивании. Впервые болезнь описана в 50-х гг. прошлого века у нерки (*Oncorhynchus nerka*) на рыбоводных заводах в штатах Вашингтон и Орегон на западном побережье США [7, 9]. В результате деятельности человека (кормление молоди рыб внутренностями лососей, бесконтрольная перевозка оплодотворенной икры и рыбы) ИН широко распространился по Северной Америке, Южной и Центральной Европе [1]. Данное заболевание было зарегистрировано и в России на Дальнем Востоке [3].

ИНV вызывает серьезные эпизоотии у выращиваемой в рыбоводных заводах молоди. При вспышке заболевания в искусственных условиях смертность рыб нередко достигает 100 %, что приводит к большим экономическим потерям [10].

В настоящее время распространение вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани представляет угрозу для водоёмов России. Впервые этот патоген был выделен в 2000 г. у молоди на форелевом хозяйстве в Московской области; вероятно, попал он туда с инфицированной икрой неизвестного происхождения [8]. В естественных условиях ИНV был впервые изолирован в 2001 г. на Камчатке от половозрелой нерки [3]. В последующие годы вирусоносительство было выявлено во всех ее популяциях, обследованных на основных нерестилищах Камчатки.

Заболевание, вызываемое данным вирусом, поражает преимущественно молодь в возрасте от 3 недель до 6 месяцев [6]. Выжившие после эпизоотии особи становятся пожизненными носителями вируса. При этом инфекция переходит в субклиническую (латентную) форму и вновь обостряется при половом созревании лососей и подготовке

к нересту. В этот период у них опять можно обнаружить инфекционный вирус [5].

Болезнь проявляется в форме экссудативно-геморрагического синдрома, развитие которого обусловлено размножением вируса в соединительной ткани органов, гемопоэтической ткани и клетках экскреторной части почек, что ведет к нарушению водно-минерального баланса и выходу плазмы и клеток крови в окружающие ткани и полости тела.

Заболевание развивается при температуре воды от 3 до 15° С и затухает при дальнейшем её повышении. Наиболее остро болезнь протекает при 10-12° [2].

Целью данной работы было вирусвыделение из патологического материала, полученного от молоди радужной форели, экспериментально зараженной вирусом ИHN в лабораторных условиях и содержащейся при разной температуре воды.

Материалы и методы

Для экспериментального заражения использовали личинку радужной форели массой 500 мг, полученную из благополучного по инфекционным болезням хозяйства.

Культуральный вирус ИHN, изолированный от радужной форели в Ленинградской области в 2007 г., с инфекционной активностью 8,1 lg ТЦД₅₀/см³ нарабатывали на культуре клеток ЕРС.

Рыбу заражали в аквариуме с аэрируемой водой (9° С), в которую вносили вирус до конечной концентрации 5,1 lg ТЦД₅₀/см³ в течение 1 часа. Затем радужную форель разделили на две опытные группы приблизительно по 50 штук в каждой и содержали в аквариумах с проточной водой: первую группу при температуре 9-10°, вторую – при 17-18° С. Контрольную рыбу (25 штук) обрабатывали аналогичным образом, используя культуральную жидкость незараженной культуры клеток ЕРС, и содержали при 9-10° С. Наблюдение за рыбой вели в течение 30 дней.

Обработку патматериала проводили общепринятым способом. Образцы тканей гомогенизировали, готовили 10 %-ную суспензию на среде ДМЕМ с добавлением гентамицина в дозе 300 ЕД/см³, инкубировали 1 час при 4° С, центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин. при 4° С и инокулировали на культуры клеток.

Для выделения вируса использовали перевиваемые клеточные линии рыб - ЕРС (эпителиальные новообразования большого оспой карпа), ВF-2 (хвостовой стебель синежаберного солнечника) и RTG-2 (гонады радужной форели), которые культивировали при 20° С на питательной среде ДМЕМ с добавлением 10 %-ной сыворотки эмбрионов коров.

Инокуляцию 10 %-ной суспензией патологического материала проводили в 96-луночных пластиковых микропанелях одновременно с посадкой культур клеток. Для инокуляции клеточных культур готовили 10-кратные разведения исследуемого деконтаминированного патологического

материала (от 1 до 8 lg) на питательной среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки КРС, 1 % глутамина; гентамицин вносили до конечной концентрации 100 ЕД/мл.

Патматериал в различных разведениях вносили на культуры клеток и культивировали первые сутки при 20° С, затем температуру инкубации снижали до 15°. В течение 10 дней вели регулярное микроскопирование.

Появление признаков цитопатического действия (ЦПД) в инокулированной культуре клеток свидетельствовало о выделении вирусного цитопатогенного агента.

Титр определяли общепринятым методом конечного разведения с расчетом по Риду и Менчу.

При отсутствии в культуре клеток изменений монослоя проводили два «слепых» пассажа исследуемых материалов. Результат считали отрицательным при отсутствии изменений монослоя во втором «слепом» пассаже.

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

- реакция нейтрализации (РН) на культуре клеток со специфическими гипериммунными сыворотками кролика к вирусу ИHN;
- реакция иммунофлуоресценции (РИФ) с использованием коммерческого набора фирмы «Cupress» (Бельгия) для выявления вирусов инфекционного некроза гемопоэтической ткани;
- иммуноэнзимный метод (PEROX) с использованием коммерческого набора фирмы «Cupress» (Бельгия) для выявления вируса ИHN.

РН реизолата вируса на культуре клеток ЕРС со специфической гипериммунной сывороткой кролика к вирусу ИHN ставили по стандартной методике. Рассчитывали индекс нейтрализации, который представляет собой разницу титров вируса, определяемого по методу Рида и Менча, в присутствии гипериммунной и нормальной сывороток.

Результаты исследования

При наблюдении в ходе опыта у рыб первой опытной группы, содержащихся при 9-10° С, отмечали нарушение координации плавательных движений, слабую реакцию на раздражители, потемнение кожных покровов, увеличение брюшка и экзофтальмию. У рыб второй группы и контрольной изменений не отмечалось.

Отбор проб патологического материала проводили на 14-й день после заражения при наличии ярко выраженных клинических признаков заболевания у рыб первой опытной группы.

При патологоанатомическом вскрытии рыб из первой группы в брюшной полости выявляли асцитную жидкость прозрачного цвета, на внутренних органах – кровянистые тяжи, селезенка увеличена, с диффузными краями, печень – бледно-песочного цвета, сердце бледное, желудочно-кишечный тракт – свободен от пищи и заполнен прозрачной светло-желтой слизью. У отдельных особей наблюдали увеличение

желчного пузыря (ярко-зеленого цвета) и кровоизлияния в мышечной ткани. У личинок из второй группы и контрольной отмечали небольшую анемию жабр и бледную печень.

Результаты вирусвыделения из патологического материала от радужной форели представлены в таблице.

**Результаты вирусвыделения из патматериала личинки радужной форели,
экспериментально зараженной вирусом IHN**

№	Группа	Температура воды, °С	Культура клеток	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³				
				1 пас.	2 пас.	3 пас.	4 пас.	5 пас.
1	Первая опытная	9-10	ЕРС	9,10	8,35	8,10	8,30	8,35
			RTG-2	-	-	н/и	н/и	н/и
			BF-2	-	-	н/и	н/и	н/и
			RTG-2*	6,10	5,85	5,10	5,35	5,85
			BF-2*	7,85	7,85	8,10	7,85	8,10
2	Вторая опытная	17-18	ЕРС	-	-	н/и	н/и	н/и
			RTG-2	-	-	н/и	н/и	н/и
			BF-2	-	-	н/и	н/и	н/и
3	Контроль	9-10	ЕРС	-	-	н/и	н/и	н/и
			RTG-2	-	-	н/и	н/и	н/и
			BF-2	-	-	н/и	н/и	н/и

Примечания. * - культуральный вирус после адаптации его на ЕРС; н/и – не исследовали.

Характерное ЦПД на первом пассаже отмечалось только на культуре клеток ЕРС при вирусвыделении из патматериала от радужной форели из первой опытной группы. В дальнейшем при пассировании его на культуре клеток ЕРС и получении вируса со стабильными свойствами удалось адаптировать его и к другим культурам клеток. Результаты чувствительности реизолированного вируса к культурам клеток RTG-2 и BF-2 также представлены в таблице.

ЦПД характеризовалось округлением, увеличением клеток в размере, которые становились прозрачными, с тонкой оболочкой и уплотнённым ядром, образованием скоплений в виде гроздьев винограда и отделением клеток от стекла.

При постановке реизолированного вируса в РН со специфической сывороткой кролика к вирусу IHN индекс нейтрализации составил 10^{5,1}. В дальнейшем видовая принадлежность выделенного изолята к вирусу IHN была подтверждена в РИФ и PEROX.

Было проведено экспериментальное заражение личинки радужной форели методом ванн вирусом инфекционного некроза гемопоэтической ткани, изолированным в Ленинградской области в 2007 г. Клиническое течение болезни удалось воспроизвести при содержании рыбы при температуре воды 9-10° С. У рыб данной опытной группы был реизолирован вирус в титре 9,1 lg ТЦД₅₀/см³.

У зараженной рыбы, содержащейся при температуре 17-18° С, выделить вирус не удалось, а при ее патологоанатомическом вскрытии выраженных признаков патологии внутренних органов обнаружено не было. По нашему мнению, проведение исследований в этом направлении представляет несомненный интерес как для практического рыбоводства, так и при изучении проблемы развития и распространения вирусных инфекций у рыб в целом.

Литература

1. *Ракхонен Р., Веннерстрем П., Ринтамяки-Киннунен П. и др.* Здоровая рыба. Профилактика, диагностика и лечение болезней. Хельсинки, НИИ охотничьего и рыбного хозяйства, 2003: 164 с.
2. *Головина Н.А., Стрелков Ю.А., Воронин В.Н., Головин П.П., Евдокимова Е.Б., Юхименко Л.Н.* Ихтиопатология. М., Мир, 2003: 95-97.
3. *Рудакова С.Л.* Некроз гемопоэтической ткани у производителей нерки и предполагаемые источники инфекции. – *Вопр. рыболовства*, 2003, т. 4, № 1 (13): 93-102.
4. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. М., отдел маркетинга АМБ-агро, 1998: 62-67.
5. *Mulcahy D., Pascho R.J.* Vertical transmission of infectious haematopoietic necrosis virus in sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* Walbaum: isolation of virus from dead eggs and fry. - *J. Fish Diseases*, 1985, № 8: 393-396.
6. *Pilcher K.S., Fryer J.L.* The viral diseases of fish: a review through 1978. Part I: Diseases of proven viral etiology. - *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 1980, № 7: 287-364.
7. *Rucker R.R., Whipple W.J., Parvin J.R., Evans C.A.* A contagious disease of salmon, possibly of viral origin. - *Fish Bull.*, 1953, № 54, U.S. Fish wild. Serv.: 35-46.
8. *Shchelkunov I.S., Shchelkunova T.I., Kupinskaya O.A. et al.* Infectious haematopoietic necrosis (IHN): the first confirmed finding in Russia. - 10th Intern.Conference of the EAFFP «Diseases of fish and shellfish», Book of abstracts. Dublin, 2001: 44.
9. *Watson S.W., Guenther R.W., Rucker R.R.* A virus disease of sockeye salmon: interim report. *Spec. Sci. Rep. Fish*, 1954, U.S. Fish Wildl. Serv.: 138 p.
10. *Wolf K.* Fish viruses and fish viral diseases. U.S. Fish and wildlife service. Ithaca, London, 1988: 478 p.