

УДК 619:616-0024: 616-078:639.3

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛЕВОГО ИЗОЛЯТА ВИРУСА ВЕСЕННЕЙ ВИРЕМИИ КАРПА «ОРЕНБУРГ 05/14»

А.А. Пичуева¹, М.И. Доронин², Д.К. Павлов³

¹ старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир; e-mail: pichueva@arriah.ru

² младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир; e-mail: doronin@arriah.ru

³ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир; e-mail: pavlov_dk@arriah.ru

Резюме

В статье представлены результаты исследования культуральных свойств полевого изолята вируса весенней виремии карпа «Оренбург 05/14», выделенного в клеточной линии папулезной эпителиомы карпа в 2014 г. Вирус весенней виремии карпа культивировали в перевиваемой культуре клеток ЕРС в течение 10 пассажей, титры вируса от 1 до 10 пассажа отмечали в пределах от 5,01 до 7,79 lg ТЦД₅₀/см³. Наличие антигена вируса было подтверждено с помощью серологических и молекулярно-биологических методов исследования.

Ключевые слова: вирус весенней виремии карпа, изолят «Оренбург 05/14», клеточная линия папулезной эпителиомы карпа, культуральные свойства вируса.

Введение

Вирус весенней виремии карпа (ВБК, SVC) является возбудителем особо опасного заболевания карповых рыб (сем. *Cyprinidae*). Болезнь протекает по типу эпизоотии, характеризуется развитием острого септического процесса и некротическими изменениями в головном мозге, почках, селезенке, кишечнике, сердце, что вызывает массовую гибель рыбы. Смертность годовиков достигает 70% от всего стада [1, 7, 9].

В соответствии с классификацией Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV), возбудитель ВВК принадлежит к роду *Sprivivirus* в семействе *Rhabdoviridae* порядка *Mononegavirales* [6].

Распространение вируса ВВК в рыбоводных хозяйствах приводит к значительному экономическому ущербу, который складывается из потерь от гибели рыбы, затрат на осуществление ветеринарно-санитарных и карантинных мер, а также ограничений в торговле [2, 4]. Своевременное выявление антигена вируса ВВК позволяет проводить необходимые мероприятия по защите рыбы. Согласно требованиям Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ), лабораторная диагностика ВВК предусматривает выделение возбудителя в чувствительных клеточных линиях, серологическую идентификацию вируса с помощью реакции нейтрализации, иммуноферментного анализа и реакции иммунофлуоресценции, а также выявление генома вируса ВВК с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени и с обратной транскрипцией [7].

Впервые вирус ВВК был выделен в Югославии в 1968 г., а в России – в 1971 г. [2]. В последние десятилетия вспышки данного заболевания регистрируют в Канаде, Великобритании и других странах Западной Европы, а также в Российской Федерации (Кировская, Калужская, Владимирская, Оренбургская области) [4, 8].

В соответствии с международными требованиями репродукцию вируса ВВК рекомендуется проводить при температуре 15-20 °С [7].

Учитывая возможность формирования природных очагов ВВК, актуальным является изучение биологических свойств эпизоотических изолятов вируса ВВК, циркулирующих среди карповых рыб в разных регионах нашей страны.

Целью работы была адаптация вируса ВВК изолята «Оренбург 05/14» к перевиваемой культуре клеток папулезной эпителиомы карпа, изучение его культуральных свойств, а также поиск оптимальной температуры для репродукции вируса.

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали изолят вируса ВВК «Оренбург 05/14», который был выделен из патологического материала от зеркального карпа, обитавшего на территории Приволжского федерального округа РФ. В качестве положительного

контроля использовали референтный штамм вируса ВВК «Яяла» с титром инфекционной активности $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Указанный штамм был предоставлен сотрудниками «Государственного научно-исследовательского института ветеринарии и сельского хозяйства» (г. Хельсинки, Финляндия).

Отбор проб патматериала проводили согласно требованиям, описанным в методических рекомендациях [3].

Культура клеток. Для репродукции вируса ВВК использовали пептизируемую клеточную линию папулезной эпителиомы карпа (ЕРС).

Культивирование клеток. В качестве ростовой среды использовали культуральную среду DMEM (pH 7,2-7,4) с добавлением 10% фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота («Sigma», США), 3% раствора L-глутамин, 0,02М Нерес-буферного раствора и 100 МЕ гентамицина на 1000 см^3 среды. Выращивание монослоя клеток проводили в CO_2 -инкубаторе при температуре 15 и 20 °С.

Вирусовыделение из патологического материала проводили в культуре клеток ЕРС в соответствии с Руководством МЭБ [7].

Культивирование вируса ВВК. Репродукцию изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14» осуществляли в монослое культуры клеток ЕРС при температуре 15 и 20 °С в течение 10 последовательных пассажей. Доза заражения составляла $0,05 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл}$.

Титрование вируса ВВК проводили в монослое клеточной линии ЕРС, выращенном в 96-луночном культуральном планшете. Титр инфекционной активности вируса ВВК вычисляли согласно методу Рида и Менча и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Определение концентрации антигена вируса ВВК проводили методом Лоури и с помощью твердофазного прямого «сэндвич»-варианта иммуноферментного анализа («TEST-LINE», Чехия).

Твердофазный прямой «сэндвич»-вариант иммуноферментного анализа (ТФ ИФА). При постановке реакции использовали коммерческие наборы для выявления антигена вируса ВВК в патматериале и суспензии инфицированных клеток («TEST-LINE», Чехия). Вирусосодержащий материал классифицировали как положительный, если значение величины Р/Н, которое показывает отношение специфического и фонового сигналов, было более 2.

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ). В работе использовали диагностический набор для обнаружения антигена вируса ВВК в

монослой инфицированных клеток («Сурпресс», Бельгия). Результаты анализа представлены по стандартной шкале четырех крестов.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ). Выявление генома вируса ВВК проводили по стандартной методике [7]. По значениям величины порогового цикла амплификации (C_T) оценивали концентрацию генома вируса ВВК в исследуемых образцах культуральной жидкости.

Результаты и обсуждение

В работе проводили выделение изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14» с использованием культуры клеток ЕРС и оценивали стабильность его культуральных свойств в течение 10 последовательных пассажей при температуре 10 и 15 °С.

На первом этапе работы сравнивали динамику формирования цитопатического действия (ЦПД) в культуре клеток ЕРС, вызванного референтным штаммом «Яяла» и полевым изолятом вируса ВВК «Оренбург 05/14», при температуре 15 и 20 °С по результатам 10 последовательных пассажей (рис. 1).

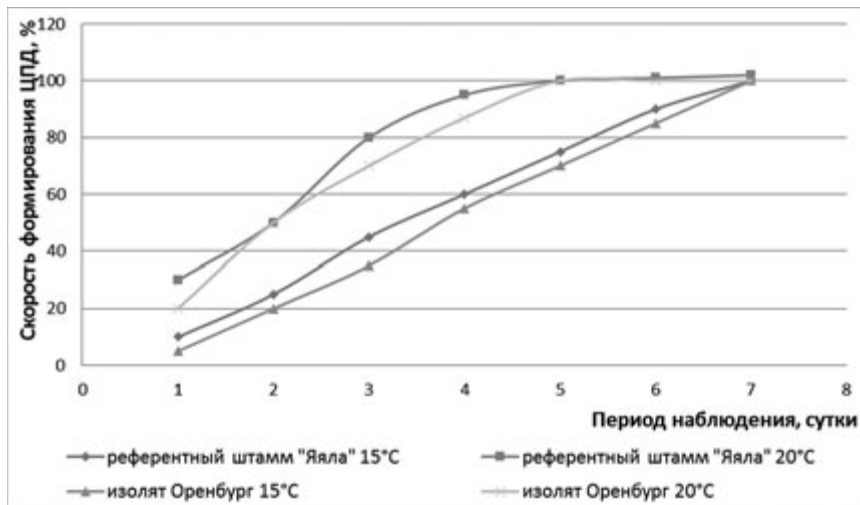


Рис. 1. Динамика формирования ЦПД референтного штамма «Яяла» и полевого изолята «Оренбург 05/14» вируса ВВК на культуру клеток ЕРС при температуре 15 и 20 °С (n=10)

Из рис. 1 следует, что скорость формирования ЦПД под действием полевого изолята была ниже по сравнению с референтным штаммом вируса ВВК. При этом ЦПД, вызванное изолятом «Оренбург 05/14», также как и штаммом «Яяла», было активнее при температуре 20 °С.

По итогам каждого пассажа определяли значения титра инфекционной активности и концентрацию белков вируса ВВК (табл. 1).

Таблица 1

Значения титров инфекционной активности изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14», репродуцированного в клеточной линии ЕРС в течение 10 последовательных пассажей при температуре 15 и 20 °С (n=4)

№ пассажа	Титр инфекционной активности культурального антигена вируса ВВК, lg ТЦД ₅₀ /см ³		Концентрация белка вируса ВВК, мкг/см ³			
	15 °С	20 °С	15 °С		20 °С	
			по Лоури	ИФА	по Лоури	ИФА
1	4,84±0,03	5,01±0,03	5	5,2	10	13
2	5,23±0,01	5,43±0,02	20	25	30	32
3	5,79±0,04	6,01±0,03	40	40	50	53
4	6,00±0,03	6,24±0,02	50	52	170	175
5	6,31±0,03	6,53±0,03	200	220	300	300
6	6,51±0,02	6,91±0,01	300	290	440	435
7	6,77±0,03	7,08±0,03	400	390	490	495
8	7,07±0,02	7,27±0,03	490	495	1100	1100
9	7,18±0,03	7,46±0,03	800	790	1200	1180
10	7,38±0,03	7,79±0,01	1400	1380	2150	2200

Как следует из табл. 1, при репродукции в течение 10 последовательных пассажей в клеточной линии ЕРС полевой изолят оставался стабильным с титрами инфекционной активности от 4,94 до 7,58 lg ТЦД₅₀/см³ при температуре 15 °С и от 5,01 до 7,64 lg ТЦД₅₀/см³ при температуре 20 °С. При этом отмечали рост концентрации белка вируса ВВК от 5 до 1400 мкг/см³ при температуре 15 °С и от 10 до 2200 мкг/см³ при температуре 20 °С. Данные табл. 1 также подтверждают, что репродукция полевого изолята «Оренбург 05/14» была активнее при температуре 20 °С.

На следующем этапе работы оценивали развитие ЦПД в культуре клеток ЕРС под влиянием полевого изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14». Репродукция вируса в клеточной линии ЕРС вызывала формирование ЦПД, которое проявлялось в образовании темных сферических клеток и их отделении от субстрата, что приводило к разрушению монослоя (рис. 2, 3).

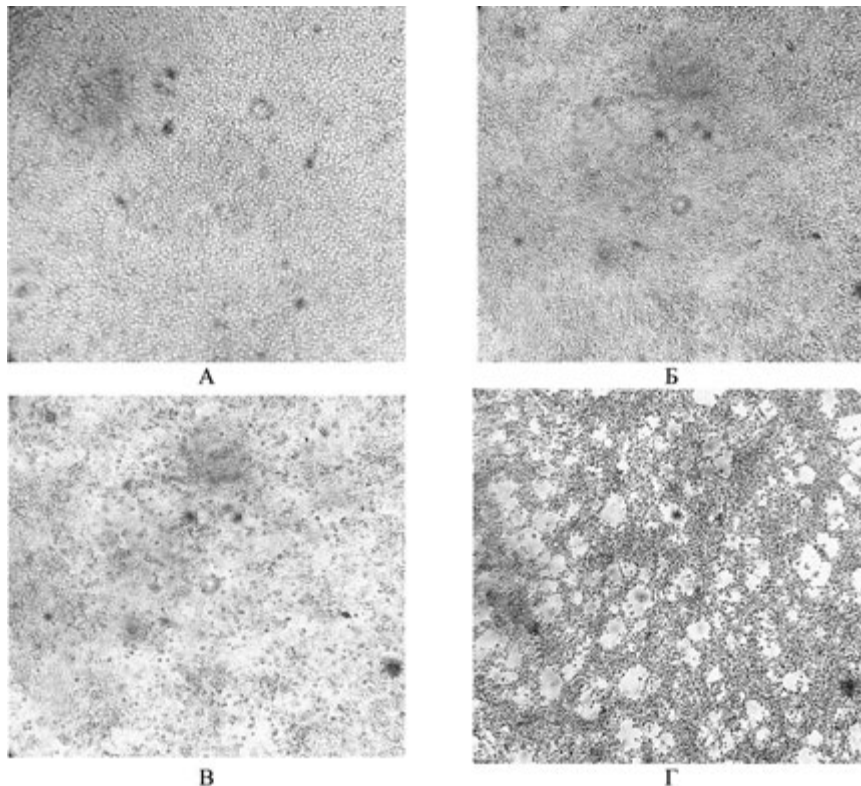


Рис. 2. Развитие ЦПД изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14» в клеточной линии ЕРС при температуре 15 °С:

- А – монослой культуры клеток ЕРС до заражения вирусом ВВК, без ЦПД;
Б – монослой культуры клеток ЕРС, инфицированный вирусом ВВК, на 1 сутки после заражения, с ЦПД;
В – монослой клеточной линии ЕРС, инфицированный вирусом ВВК, на 2 сутки после заражения, с ранними признаками ЦПД;
Г – монослой культуры клеток ЕРС, инфицированный вирусом ВВК, на 3 сутки после заражения, с яркими признаками ЦПД (увеличение $\times 10$) (1 пассаж).

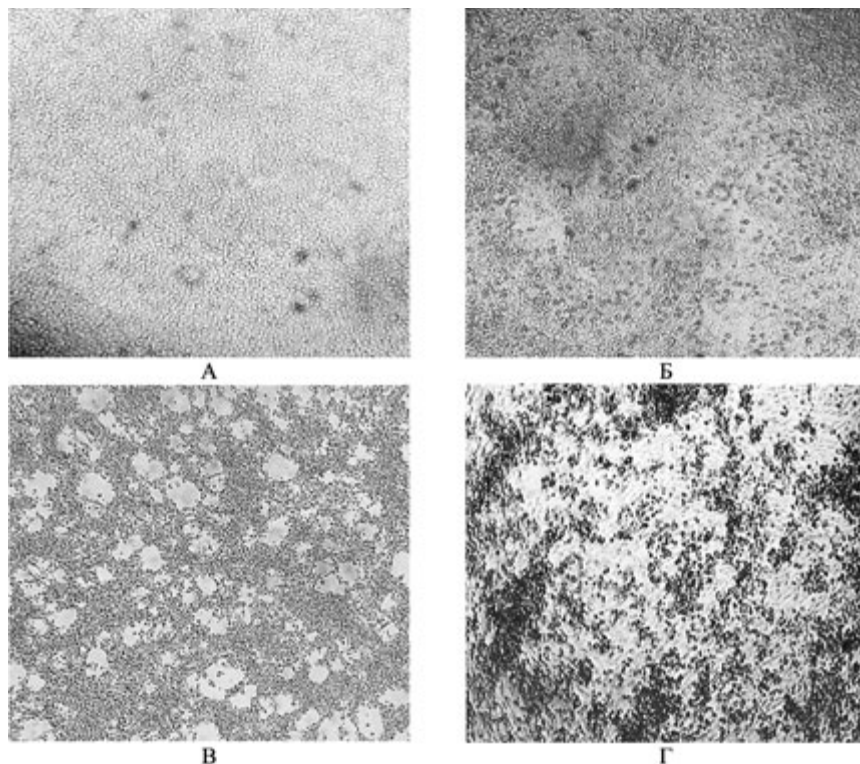


Рис. 3. Развитие ЦПД изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14» в клеточной линии ЕРС при температуре 20 °С:

- А – монослой культуры клеток ЕРС до заражения вирусом ВВК, без ЦПД;
Б – монослой культуры клеток ЕРС, инфицированный вирусом ВВК, на 1 сутки после заражения, с ЦПД;
В – монослой клеточной линии ЕРС, инфицированный вирусом ВВК, на 2 сутки после заражения, с ранними признаками ЦПД;
Г – монослой культуры клеток ЕРС, инфицированный вирусом ВВК, на 3 сутки после заражения, с яркими признаками ЦПД (увеличение $\times 10$) (1 пассаж).

Как видно из рис. 2 и 3, репродукция изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14» в клеточной линии ЕРС при температуре 15 °С приводила к возникновению ранних признаков ЦПД, начиная со 2-3 суток, а при температуре 20 °С подобная картина наблюдалась уже на 1 сутки. Наиболее полное проявление деструкции монослоя под влиянием вируса достигалось на 3-7 сутки. Аналогичные данные были полу-

чены при анализе 10 последовательных пассажей данного изолята вируса ВВК.

Таким образом, более раннее и яркое проявление ЦПД наблюдалось при культивировании изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14» в клеточной линии ЕРС при температуре 20 °С. Полученные данные подтверждаются ранее проведенными исследованиями других авторов в отношении изолятов вируса ВВК [5, 10].

Для оценки специфичности полученного культурального антигена полевого изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14» по итогам каждого пассажа проводили ТФ ИФА и РИФ в культуре клеток ЕРС (табл. 2, 3). Как следует из табл. 2 и 3, значения величины Р/Н для всех исследуемых в ТФ ИФА образцов были больше 2 и после каждого пассажа увеличивались, что подтверждает наличие антигена вируса ВВК и рост его концентрации. При проведении РИФ по мере адаптации вируса ВВК к культуре клеток ЕРС и повышения титров накопления антигена наблюдали увеличение количества интенсивно светящихся клеток в инфицированном монослое. Таким образом, по результатам проведенных исследований подтверждена специфичность полученного культурального материала изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14».

Таблица 2

**Результаты исследования изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14»
(культивирование при 15 °С) (n=4)**

№ пассажа	Титр накопления культурального антигена вируса, Ig ТЦД ₅₀ /см ³	Концентрация вирусного белка, мкг/мл		ТФ ИФА (величина Р/Н)	РИФ (количество крестов)	ОТ-ПЦР-РВ (значение порогового цикла амплификации)
		по Лоури	ТФ ИФА			
1	4,84±0,03	5	5,2	2,25	3+	27,7
2	5,23±0,01	20	25	2,51	3+	27,2
3	5,79±0,04	40	40	2,93	4+	25,6
4	6,00±0,03	50	52	3,98	4+	24,5
5	6,31±0,03	200	220	4,72	4+	22,3
6	6,51±0,02	300	290	5,46	4+	20,4
7	6,77±0,03	400	390	6,15	4+	18,9
8	7,07±0,02	490	495	6,81	4+	17,6
9	7,18±0,03	800	790	7,43	4+	16,4
10	7,38±0,03	1400	1380	8,04	4+	15,3
К-	-	-	-	1,04	-	-

Таблица 3

**Результаты исследования изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14»
(культивирование при 20 °С) (n=4)**

№ пассажа	Титр накопления культурального антигена вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³	Концентрация вирусного белка, мкг/мл		ТФ ИФА (величина Р/Н)	РИФ (количество крестов)	ОТ-ПЦР-РВ (значение порогового цикла амплификации)
		по Лоури	ТФ ИФА			
1	5,01±0,03	10	13	2,34	3+	27,3
2	5,43±0,02	30	32	2,67	3+	26,9
3	6,01±0,03	50	53	3,24	4+	25,3
4	6,24±0,02	170	175	4,02	4+	23,7
5	6,53±0,03	300	300	4,86	4+	21,5
6	6,91±0,01	440	435	5,67	4+	19,7
7	7,08±0,03	490	495	6,59	4+	17,6
8	7,27±0,03	1100	1100	7,10	4+	16,1
9	7,46±0,03	1200	1150	7,64	4+	14,5
10	7,79±0,01	2150	2200	8,26	4+	12,7
К-	-	-	-	1,05	-	-

Для молекулярно-биологической идентификации генома полевого изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14» проводили ОТ-ПЦР-РВ. По результатам проведенных исследований доказано наличие генома вируса ВВК и его накопление в полученных образцах по итогам 10 пассажей (рис. 4, табл. 2, 3).

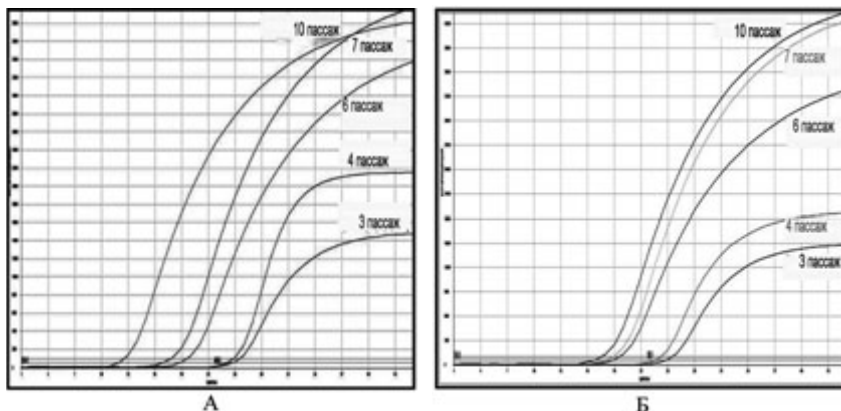


Рис. 4. Результаты исследования методом ОТ-ПЦР-РВ культурального антигена изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14», репродуцированного при температуре 15 (А) и 20 °С (Б)

Таким образом, использование ТФ ИФА, РИФ и ОТ-ПЦР-РВ позволяет контролировать степень накопления изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14» в монослое культуры клеток ЕРС.

Заключение

Изолят вируса ВВК «Оренбург 05/14» был адаптирован к клеточной линии ЕРС в течение 10 последовательных пассажей при температуре 15 и 20 °С с получением стабильных титров накопления антигена в пределах от $4,84 \pm 0,03$ до $7,38 \pm 0,03 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$ и от $5,01 \pm 0,03$ до $7,79 \pm 0,01 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$, соответственно. Оптимальная температура репродукции изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14» в культуре клеток ЕРС составляет 20 °С. Наличие антигена вируса ВВК в серийных последовательных пассажах изолята «Оренбург 05/14» можно выявить с использованием твердофазного прямого «сэндвич»-варианта ИФА, РИФ в культуре клеток ЕРС, ОТ-ПЦР-РВ. Дальнейшая работа будет направлена на исследование серологических свойств и проведение филогенетического анализа изолята «Оренбург 05/14» вируса ВВК. На основе полученных результатов планируется проведение депонирования изолята вируса ВВК «Оренбург 05/14» в Коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Список литературы

1. Весенняя виремия карпов / Т.Д. Пичугина, М.Н. Борисова, Е.А. Завьялова [и др.] // Ветеринария. – 2004. – № 5. – С. 28-30.
2. Грищенко Л.И., Акбаев М.Ш. Болезни рыб и основы рыбоводства: учебник для студентов вузов. – М.: Колос, 2013. – 456 с.
3. Методические рекомендации по отбору проб для вирусологического исследования на обнаружение вирусов геморрагической септицемии, инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых, инфекционного панкреатического некроза, весенней виiremии карпа / В.А. Пыльнов, С.С. Рыбаков, Н.В. Мороз; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2013. – 17 с.
4. Эпизоотологический мониторинг заболеваний рыб в РФ / М.И. Гулюкин, М.Н. Борисова, Т.Д. Пичугина [и др.] // Ветеринарная медицина: матер. Междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные

проблемы охраны здоровья рыб и других гидробионтов». – Харьков, 2008. – Вып. 90. – С. 142-146.

5. Gotesman M., Soliman H., Besch R. Inhibition of spring viraemia of carp virus replication in an EPC cell line by RNAi // *J. Fish Dis.* – 2015. – Vol. 38, № 2. – P. 197-207.

6. International Committee on Taxonomy of Viruses. – URL: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (дата обращения: 15.01.16).

7. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals / OIE. – 5th ed. – Paris, 2006. – P. 128-141.

8. Recombinant lactobacillus expressing G protein of spring viraemia of carp virus (SVCV) combined with ORF81 protein of koi herpesvirus (KHV): A promising way to induce protective immunity against SVCV and KHV infection in cyprinid fish via oral vaccination / L.C. Cui, X.T. Guan, Z.M. Liu [et al.] // *Vaccine.* – 2015 – Vol. 33, № 27. – P. 3092-3099.

9. Spring viraemia of carp / W. Ahne, H.V. Bjorklund, S. Essbauer [et al.] // *Dis. Aquat. Org.* – 2002. – Vol. 52. – P. 261-272.

10. Zamani H., Ghasemi M., Hosseini S.M. Experimental susceptibility of Caspian white fish, *Rutilus frisii kutum* to spring viraemia of carp virus // *Virus Dis.* – 2014. – Vol. 25, № 1. – P. 57-62.

**STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES
OF THE FIELD ISOLATE OF SPRING VIRAEMIA
OF CARP VIRUS «ORENBURG 05/14»**

A.A. Pichuyeva¹, M.I. Doronin², D.K. Pavlov³

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine),
FGBI «ARRIAH», Vladimir; e-mail: pichueva@arriah.ru

² Junior Researcher, Candidate of Science (Biology),
FGBI «ARRIAH», Vladimir; e-mail: doronin@arriah.ru

³ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine),
FGBI «ARRIAH», Vladimir; e-mail: pavlov_dk@arriah.ru

Summary

The paper describes the results of examination of cultural properties of field isolate of spring viraemia of carp virus «Orenburg 05/14», isolated in epithelioma papillosum of carp cell line in 2014. Spring viraemia of carp virus was cultivated in continuous EPC cell line at 10 passages, from passages 1 to 10 the titres were between 5.01 and 7.79 lg TCD₅₀/cm³. The presence of viral antigen was confirmed by using serological and molecular biological examinations.

Key words: spring viraemia of carp virus, «Orenburg 05/14» isolate, epithelioma papillosum of carp cell line, cultural properties of the virus.