

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ

**ФГБОУ ВО «КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**ФГБОУ ВО «САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ им. Н.И. ВАВИЛОВА»**

**IV Национальная
научно-практическая конференция**

**СОСТОЯНИЕ И ПУТИ РАЗВИТИЯ АКВАКУЛЬТУРЫ
В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Калининград, 8-10 октября 2019 г.

УДК 639.3:639.5
ББК 47.2
С23

Редакционная коллегия:
Васильев А.А., Кузнецов М.Ю., Сивохина Л.А., Поддубная И.В.

Состояние и пути развития аквакультуры в Российской Федерации: материалы IV национальной научно-практической конференции, Калининград – 8-10 октября 2019 г./ под ред. А.А. Васильева; Саратовский ГАУ. – Саратов: Амирит, 2019. – 267 с.

ISBN 978-5-00140-341-8

В сборнике материалов IV национальной научно-практической конференции приводятся результаты исследования по актуальным проблемам аквакультуры, в рамках решения вопросов продовольственной безопасности, ресурсосберегающих технологий производства рыбной продукции и импортозамещения. Для научных и практических работников, аспирантов и обучающихся по укрупненной группе специальностей и направлений подготовки 35.00.00 сельское, лесное и рыбное хозяйство.

Статьи даны в авторской редакции в соответствии с представленным оригинал-макетом.

**Сборник подготовлен и издан при финансовой поддержке
ООО «Научно-производственное объединение «Собский рыбоводный завод»»
Генеральный директор Д. Ю. Эльтеков**

ISBN 978-5-00140-341-8

© ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ, 2019

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ СЕПТИЦЕМИИ

В.А. ПЫЛЬНОВ, Л.И. БЫЧКОВА, И.В. БУРЛАЧЕНКО, И.В. ЯХОНТОВА

V.A. Pylnov, L.I. Vychkova, I.V. Burlachenko, I.V. Yahontova

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ФГБНУ «ВНИРО»)

Russian Federal Research institute of fisheries and oceanography (FSBSI «VNIRO»)

Аннотация. Предложена разработка метода диагностики вируса геморрагической септицемии лососевых рыб с использованием прямой реакции иммунофлуоресценции. Для разработки метода проведена очистка вируса ВГС, иммунизация животных. Получены гипериммунные сыворотки.

Abstract. A method of diagnostic the virus of hemorrhagic septicaemia of salmon fish using a direct reaction of immunofluorescence has been proposed. To develop the method, the VHS virus was purification and animals were immunized. Hyperimmune serums have been obtained.

Ключевые слова: ВГС –вирус геморрагической септицемии, РИФ – реакция иммунофлуоресценции, гипериммунные сыворотки.

Key words: VHS – virus of haemorrhagic septicaemia, RIF – reaction of immunofluorescens, immune serums.

Болезнь радужной форели и лососевых, сопровождающаяся септическими процессами, была впервые установлена в 1962 году в Дании, в форелеводческих хозяйствах. В 80-х гг. XX века болезнь регистрировали на всей европейской территории. В настоящее время вспышки вирусной геморрагической септицемии (ВГС) фиксируют в Европе, Америке и Азии. За последние 10 лет 2009-2019 гг. в мире по официальным данным Международной Организации Защиты Здоровья Животных (МЭБ) неблагополучными в отношении ВГС являлись 20 стран, среди которых 16 европейских [6].

Jensen в 1965г. впервые выделил вирус ВГС на перевиваемой клеточной линии RTG-2 (гонады радужной форели) и назвал его Egtved-virus в честь города Эгтвед в Дании, вблизи которого была расположена форелевая ферма, неблагополучная по ВГС [4]. Инфекционный агент – РНК-содержащий вирус, который классифицируют как представитель семейства Rhabdoviridae.

Основные методы диагностики вирусной геморрагической септицемии (ВГС) изложены в Сборнике инструкций по борьбе с болезнями рыб [2]. Однако, в настоящее время установлено наличие 3-х генотипов вируса ВГС. Выявлено, что изоляты ВГС морского происхождения, по сравнению с пресноводными

изолятами, обладают низкой патогенностью для форели и не представляют большого риска для лососевых, культивируемых на фермах. Пресноводные изоляты ВГС наиболее патогенны [3]. Рутинные диагностические методы не позволяют различать изоляты морского и пресноводного происхождения. Сыворотки, полученные к вирусу ВГС, нейтрализуют изоляты ВГС независимо от их серотипа, определённого с помощью моноклональных или поликлональных антител млекопитающих. Пока нет достаточных средств для серологической диагностики, которые позволяли бы дифференцировать морские и пресноводные изоляты вируса ВГС. К тому же Lorenzen [5] и Bearzotti [3] в своих работах указывают, что эпитопы нейтрализации на белке G вируса ВГС при температуре 22 °С меняют свою конформационную структуру и поэтому трудно при классических способах иммунизации получить антисыворотки, чтобы избежать перекрестной нейтрализации между серогруппами вируса ВГС. Вот почему для идентификации штаммов вируса ВГС используется ПЦР-секвенирование, с помощью которого установлено 3 генотипа изолятов ВГС, циркулирующих в различных географических регионах.

В России вспышки ВГС зафиксированы в 2012 г. на территории Республики Карелия [1]. Выделение вируса сопряжено с определёнными трудностями, так как в лабораторных условиях культивирование ВГС возможно только на клеточных линиях рыб ЕРС (из эпителиомы карпа), RTG-2 (клетки гонад радужной форели), BF-2 и других при соблюдении определённого температурного режима и протокола состава питательной среды для культуры клеток рыб.

В настоящей работе представлены данные по наработке вируса ВГС, очистке и концентрированию, иммунизации кроликов, получению антисывороток и проверки их активности.

Материалы и методы. Вирус ВГС культивировали на клеточных линиях рыб: 1) ЕРС (из эпителиомы карпа); 2) BF-2 (хвостовой стебель синежаберного солнечника *Lepomis macrochirus*); 3) RTG-2 (гонады радужной форели). Клеточные линии рыб выращивали на различных питательных средах и исследовали их рост на среде ПСП (полусинтетическая питательная), среде Игла с двойным набором аминокислот и витаминов (DMEM «SERVA») и на среде Игла с 10 % эмбриональной сывороткой КРС. Культуры клеток выращивали в 75 см³ пластиковых матрасах фирмы «Nunc». Вирус в монослое культивировали следующим методом. Подготавливали клеточный монослой (исходная концентрация 200-300 тыс. клеток/мл). Ростовая среда содержала 10 % эмбриональной сыворотки КРС, глутамин и антибиотик. Сформированный клеточный монослой (2 суток) инфицировали вирусом ВГС с конечной концентрацией вирионов 50-100 тыс./мл. Культивировали в охлаждающем термостате при 14 °С до 7 дней (ЦПД 80-100 %). После этого матрасы с вирусосодержащим материалом замораживали при температуре минус 20 °С, затем оттаивали и использовали для последующих пассажей. Титр вируса определяли на 7-10-й день после заражения культуры клеток с использованием

культуральных микропланшетов; расчёт вели по методу Рида и Менча и выражали в тканевых цитопатогенных дозах в 1 мл (ТЦД_{50/мл}).

Очистку вируса проводили по следующей схеме: вирусную суспензию замораживали и оттаивали, вносили NaCl до 3 %, осветляли центрифугированием при 3000 об/мин 10 мин; вносили ПЭГ-6000 до 6-8 % и после инкубации осаждали вирус центрифугированием при 8000 об/мин. за 30 мин.; осадок ресуспендировали в буфере STE и наносили на сахарозную подушку, после чего центрифугировали при 22000 об/мин. в течение 1,5-2 часов; полученный осадок ресуспендировали в буфере STE и центрифугировали в градиенте CsCl при 23000 об/мин в течении 2-х часов. Полученный элюат вируса подвергали диализу против буфера STE.

Гипериммунные сыворотки против вируса ВГС получали на кроликах массой 2,0-3,0 кг и морских свинок массой 400-500 г. Вирусный антиген для иммунизации готовили с полным (ПАФ) и неполным адъювантом Фрейнда (НАФ) в соотношении 1:1. Для иммунизации использовали вирус с титром 7,85 LgТЦД_{50/мл} по схеме: 1-я инъекция в подушечки лап задних конечностей по 0,1 мл эмульсии с ПАФ в каждый палец; 2-я инъекция через 42 дня внутримышечно в бедро задних конечностей по 0,5 мл эмульсии с НАФ. После проверки уровня специфических антител в сыворотке крови животных по необходимости иммунизировали в 3-й раз спустя 10-14 дней. Морских свинок иммунизировали по той же схеме, но антиген вводили только внутримышечно в дозе 0,5 мл эмульсии.

Контроль наличия вируса в культуральной суспензии осуществляли регулярным микроскопированием и с помощью ПЦР. Постановку непрямого варианта ИФА(Н-ИФА) осуществляли по общепринятой схеме.

Результаты исследований и обсуждение. В данной работе использовали 3 клеточные линии рыб. Результаты исследования по адаптации 3-х клеточных линий рыб к питательным средам Игла, ПСП, ДМЕМ приведены в таблице 1. Использование указанных питательных сред позволяло поддерживать культуры клеток в течение 5 пассажей и более. Установлено, что наиболее приемлемой для культивирования исследованных клеточных линий является среда Игла с двойным набором аминокислот и витаминов (DMEM «SERVA»), которая в отличие от среды Игла и ПСП имеет в составе двойной набор аминокислот и витаминов. Среда ДМЕМ обеспечивала лучший, по сравнению с другими средами, рост клеток.

В результате проведённых исследований показана возможность использования питательной среды ДМЕМ, включающей 10 % эмбриональной сыворотки КРС для культивирования клеточных линий рыб.

Согласно литературным данным наиболее чувствительной линией клеток для выделения и культивирования вируса ВГС является линия клеток BF-2 [7], хотя также пригодны и линии клеток CHSE-214, EPC, FHM, RTG-2 [8]. Однако накопление вируса, несмотря на хорошую чувствительность, может отличаться в зависимости от использования конкретной клеточной линии рыб. В настоящем исследовании было выявлено, что линия клеток BF-2 показала наибольшую

чувствительность к вирусу ВГС и самый высокий титр инфекционности по сравнению с другими клеточными линиями. Температура репродукции вируса в клетках BF-2 поддерживалась в пределах 14 °С. Определено, что на клеточной линии BF-2 идёт наибольшее вируснакопление в количествах, необходимых для получения очищенных и концентрированных препаратов вируса.

Таблица 1. - Оценка пригодности культуральных сред для поддержания роста клеточных линий рыб

№	Клеточная линия	Культуральные среды		
		Среда Игла с 10% эмб.сыворотк.	Среда ПСП с 10% эмб.сыворотк.	Среда ДМЕМ с 10% эмб.сыворотк.
1.	ЕРС	+++	++++	++++
3.	RTG-2	-	-	++++
4.	BF-2	-	+++	++++

Примечания:
 (++++) - среда обеспечивает оптимальные условия для роста культур клеток
 (+++) - среда обеспечивает хорошие условия роста культур клеток
 (+/-) - среда обеспечивает условия для роста культуры клеток со скоростью в несколько раз ниже, чем на оптимальной
 (-) - культура клеток не растёт или только 1 пассаж.

Для получения осажденных препаратов вируса провели наработку вирусного материала на культуре клеток BF-2, последующую очистку и концентрирование. В ходе проведенных исследований была проведена очистка и концентрирование трёх объемов культуральной вирусной суспензии ВГС. Проведено титрование полученных элюатов на культуре клеток ЕРС, RTG-2 и BF-2. Полученные результаты после очистки и концентрирования вируса ВГС показали, что чем больше объём суспензии вируса и чем выше титр, тем выше титр вируса после концентрирования, а значит, вероятно, и выше накопление вирусного белка в полученных элюатах. В результате проведенных исследований отработан один из способов очистки вируса ВГС с использованием сахарозной подушки. Получены элюаты с определёнными титрами вирусной активности от 4,5 до 7,85 lgТЦД50/см³.

В результате предложенной схемы иммунизации были получены антисыворотки, специфическая активность которых была проверена в непрямом варианте иммуноферментного анализа н (ИФА). Активность гипериммунных сывороток крови как кроликов, так и морских свинок, в непрямом варианте н (ИФА) после второй иммунизации была на уровне 1:40000 – 1:62500, после третьей – 1:312500. Таким образом, гипериммунные сыворотки кроликов и морских свинок, проверенные в н(ИФА), имели максимальные и стабильные титры 1:312500. Показатели полученных титров – достаточные для изучения возможности использования антисывороток при разработке метода детекции вируса геморрагической септицемии (ВГС) с помощью различных серологических реакций.

Выводы. В результате проведенных исследований показана возможность использования среды ДМЕМ для культивирования клеточных линий рыб.

Определено, что на клеточной линии ВФ-2 идёт наибольшее вирусонакопление в количествах, необходимых для получения очищенных и концентрированных препаратов с целью иммунизации кроликов. Отработаны способы иммунизации кроликов и морских свинок для получения гипериммунных сывороток крови, которые можно использовать для разработки непрямого варианта ИФА при выявлении ВГС-специфических антител с использованием нативного культурального вируса ВГС, а также при дальнейшей очистке и мечении антисывороток в реакции иммунофлуоресценции и в реакции нейтрализации.

Список литературы:

1. Пыльнов В.А Вирусвыделение возбудителя вирусной геморрагической септицемии лососевых / В.А. Пыльнов, Н.В. Мороз, С.С. Рыбаков, Д.К. Павлов, А.Е. Метлин, А.А. Егоров // XXIX международная конференция «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоёмов Европейского Севера» г. Мурманск, 27-30 марта 2013г. Сборник статей.
2. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. – 310 с.
3. Bearzotti M. The glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV): antigenicity and role in virulence. / M. Bearzotti, A.F. Monnier, P. Vende [et al] // Vet. Res. -1995. Vol. 26. P. 413 – 422.
4. Jensen M.H. Research on the virus Egtved disease./ M.H. Jensen// Ann. N.Y. Acad.Sci. 1965. Vol.126. P. 422 – 426.
5. Lorenzen N., Olesen N.J., Jorgensen P.E.V. Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein./ N.Lorenzen, N.J.Olesen, P.E.V. Jorgensen // J.Gen. Virol.71. 1990. P. 561 – 567.
6. OIE.net
- 7 Olesen N.J., Jorgensen P.E.V. Detection of neutralizing antibody to Egtved virus in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by plaque neutralization test with complement addition./ N.J.Olesen, P.E.V. Jorgensen // J.Appl. Ichth. 1992. Vol.1. P. 33 – 41.
8. Wolf K. Viral haemorrhagic septicaemia in fish viruses and fish viral diseases./ Wolf K. // Cornell Univ.Press.Ithaca.NY. 1988. P. 217 – 249.