

УДК 639
ББК 47.2
Н72

Н72 Новейшие генетические технологии для аква-культуры: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Москва, МВЦ «Крокус Экспо», 29 – 31 января 2020 г). – М.: Издательство «Перо», 2020. – 350 с. – Мб. [Электронное издание]. – Систем. требования: процессор x86 с тактовой частотой 500 МГц и выше; 512 Мб ОЗУ; Windows XP/7/8; видеокарта SVGA 1280x1024 High Color (32 bit). – Загл. с экрана.

ISBN 978-5-00171-087-5

В сборнике представлены материалы Международной научно-практической конференции с международным участием «Новейшие генетические технологии для аквакультуры» проходившей в г. Москва, МВЦ «Крокус Экспо», 29 – 31 января 2020 г в рамках выставки «Agros 2020».

УДК 639
ББК 47.2

ISBN 978-5-00171-087-5

© Авторы статей, 2020

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРАСНУХИ ПРУДОВЫХ РЫБ С
ПРИМЕНЕНИЕМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

Спиридонов А.В.¹, Капитова И.А.², Гузеева А.А.³

¹ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет -МСХА
им. К.А. Тимирязева, E-mail: spi-a@yandex.ru

²«СЖС Восток Лимитед»

³«СЖС Восток Лимитед»

**METHOD OF DETECTION OF THE POND FISHES REDDING USING
AN IMMUNO-ENZYMAL ANALYSIS**

Spiridonov A.V., Kapitova I. A., Guzeeva A.A.

Резюме. Ввиду отсутствия эффективных средств специфической профилактики краснухи прудовых рыб очевидно, что ранняя диагностика – один из важнейших и результативных способов борьбы с данной болезнью.

Данное исследование посвящено разработке методов, предназначенных для быстрого обнаружения антител к возбудителям краснухи прудовых рыб (*Aeromonas punctata*, *Pseudomonas* sp., *Rhabdovirus cyprini*). Предложенный метод определения краснухи прудовых рыб (далее по тексту КПП) с применением иммуноферментного анализа позволяет в рамках лабораторного мониторинга быстро, качественно и своевременно проводить диагностику болезней прудовых рыб. Небольшая стоимость диагностических наборов, возможность автоматизации всех этапов проведения реакции, возможность ранней диагностики заболевания указывают практическую ценность использования данной методики для быстрого установления диагноза.

Ключевые слова: ИФА, краснуха прудовых рыб, *Aeromonas punctata*, *Pseudomonas* sp., *Rhabdovirus cyprini*, весенняя вирусная болезнь.

Summary. Due to the lack of effective means of specific prevention of rubella of pond fish, it is obvious that early diagnosis is one of the most important and effective ways to combat this disease.

This study focuses on the development of methods for rapid detection of antibodies to the causative agent of rubella pond fish (*Aeromonas punctata*, *Pseudomonas* sp., *Rhabdovirus cyprini*). The proposed method for determining rubella pond fish (hereinafter referred to as CRC) using enzyme immunoassay allows laboratory monitoring quickly, efficiently and in a timely manner to diagnose diseases of pond fish. The low cost of diagnostic kits, the ability to automate all

stages of the reaction, the possibility of early diagnosis of the disease indicate the practical value of using this technique for rapid diagnosis.

Keywords: *IFA, rubella of pond fish, Aeromonas punctata, Pseudomonas sp., Rhabdovirus cyprini, spring viral disease*

Введение

Краснуха — заразная болезнь, которая, по мнению одних исследователей вызывается вирусом, по мнению других - бактериями. Существуют объективные свидетельства в пользу обеих гипотез. По-видимому, под термином "краснуха" скрывается несколько болезней со сходной симптоматикой. На основании исследований, проведенных Всесоюзным институтом экспериментальной ветеринарии, предложено выделять три самостоятельных болезни: аэромоноз, вызываемый бактериями *Aeromonas punctata*, псевдомоноз, вызываемый бактериями рода *Pseudomonas*, и весеннюю вирусную болезнь, вызываемую вирусом *Rhabdovirus cyprini* [1].

Для лечения рыб используют такие препараты, как левомицетин, тетрациклин, биомицин, метиленовая синь и ряд других препаратов. В последние годы в практику вошло применение препаратов - пробиотиков. Лечение назначается только врачом - ихтиопатологом с учетом множества факторов, касающихся конкретного водоема. Неквалифицированное использование антибиотиков может вызвать отрицательный результат.

Единственным надежным методом оздоровления хозяйства от краснухи является летование, во время которого пруды осушаются, подвергаются обработке дезинфектантами, а рыбы всех возрастных групп сдаются в торговую сеть или утилизируются. Если больные рыбы обитают в источнике водоснабжения хозяйства, оздоровить его практически невозможно [2].

Также следует помнить про вирулентность бактерий *Aeromonas punctata* и *Pseudomonas sp.* Согласно литературным данным, эти бактерии развили устойчивость к большинству химиотерапевтических агентов. Из этого следует, что потребуются приложить огромные усилия для контроля болезни, а не ее лечения, которое в большинстве случаев является рискованным и дорогостоящим [4].

Диагноз на весеннюю вирусную болезнь (ВВБ), вызываемую вирусом *Rabdovirus cyprini* ставят на основании клинико-анатомической картины, эпизоотологических данных и результатов вирусологических исследований: выделения вируса, его серологической идентификации и подтверждения вирулентности в биопробе, а также использования ИМФ-метода и ПЦР. Исследования проводят в соответствии с Методологическими указаниями по лабораторной диагностике вирусных болезней рыб [3].

На сегодняшний день основным методом идентификации КБР (*Aeromonas punctata*, *Pseudomonas sp.*, *Rabdovirus cyprini*) клинико-анатомического анализа патологических изменений. Клинико-морфологическая картина при аэромонозе прудовых рыб отличается от ВВК и псевдомоноза карпов более разнообразным симптомокомплексом и динамикой развития патологического процесса: постепенной сменой или комбинацией острой септической, подострой асцитно-язвенной и хронической язвенной формы. Указанную стадийность развития и проявления болезни считаем важным дифференциально-диагностическим признаком аэромоноза, отличающим его от псевдомоноза и ВВК [4].

Окончательный диагноз базируется на результатах вирусологических исследований по выделению и серологической идентификации вируса.

При КПР болезнь сопровождается высокой смертностью - 80%-100%. Такое быстрое течение болезни может быть результатом мутаций, приводящих к появлению нового свойства, позволяющего бактериям адаптироваться к новым условиям окружающей среды [5]. Инкубационный период длится от 7 до 30 дней в зависимости от температуры воды [10]. Однако, допускается проведение идентификации видов бактерий с использованием химических методов анализа.

Целью работы является создание методики определения краснухи прудовых рыб с применением иммуноферментного анализа является проведение экспресс-идентификации с использованием комплексного диагностического набора с определением не только вирусного возбудителя болезни, а также бактериальных патогенов в рамках лабораторного контролю за распространением КПР.

Материалы и методы

При анализе системой MALDI-TOF-MS (матричная лазерная десорбция / масс-спектрометрия) использовали изоляты. Их готовили для масс-спектрометрии в соответствии со стандартным протоколом, рекомендованным компанией Bruker [12].

Всегда следует помнить о целесообразности выбранного метода идентификации возбудителя КПР. К примеру:

- Биохимия: медленно, не всегда специфично;
- типирование: быстро, специфично, но дорого;
- Диагностическая ПЦР (культура, необходимая для создания мишени-теста);
- Серологические полевые испытания (на основе ELISA-иностранный производства);
- Белковый метод: MALDI TOF: быстрый, специфичный, дорогой аппарат;

- Антибиограмма (необходима чистая культура) [6].

Исходя из этого, следует в рамках профилактических мероприятиях использовать методику определения краснухи прудовых рыб с применением иммуноферментного анализа. Это позволит значительно сократить время проведения экспертизы (подготовка пробы, проведение реакции, учет результатов реакции). В течение 1-2 часов поставить точный диагноз, определить КПП.

Назначение методики

Методика позволяет выявить специфические антитела к возбудителям краснухи прудовых рыб (*Aeromonas punctata*, *Pseudomonas sp.*, *Rabdovirus cyprini*) с помощью специальных биохимических реакций, которые помогают определить присутствие или отсутствие антител и их количество.

Преимущества ИФА относительно других методов обнаружения антигенов и антител:

- высокая чувствительность, которая, составляющая 90%;
- стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (год и более);
- быстрота и удобство проведения диагностической реакции;
- возможность использовать минимальные объемы исследуемого материала;
- возможность автоматизации всех этапов проведения реакции;
- небольшая стоимость диагностических наборов;
- возможность ранней диагностики инфекции;
- унифицированность и пригодность для массовых обследований;
- легкость в отслеживании динамики развития процесса инфекционного заболевания [9].

Принцип метода

Генетически чужеродные вещества, попадая в организм высших животных и человека, способны вызывать в них ряд специфических процессов, направленных на их удаление из организма. Система организма, выполняющая эту функцию, называется иммунной системой, а сами процессы – иммунологическими. К важнейшим из них следует отнести образование специфических белков крови – антител (иммуноглобулинов).

На поверхности молекулы сложного антигена можно выявить функциональные группы или остатки, обуславливающие антигенную специфичность, называемые антигенными детерминантами или эпитопами. Число эпитопов на поверхности сложной молекулы определяет валентность антигена. Понятие антигенная детерминанта включает в себя последовательность образующих ее химических функциональных групп и их пространственное расположение.

Антигенные детерминанты белков бывают двух типов – секвенциальные, т.е. представляющие собой последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи, и конформационные, образованные аминокислотными остатками из различных частей белковой глобулы.

Биологическая функция антител заключается в защите организма от проникновения чужеродных веществ путем образования прочных специфических иммунных комплексов с соответствующими антигенами и последующего удаления их из организма. Способность антител образовывать высокоспецифичные прочные иммунокомплексы с различными веществами и возможность получения антител в необходимых количествах являются основой иммунохимических методов анализа.

Принципиально важным является то, что поликлональные антитела даже против одной-единственной антигенной детерминанты гетерогенны как по структуре активного центра, так и по физико-химическим свойствам. В том случае, если антиген поливалентен, например, белок, то в сыворотке крови образуются антитела, направленные против каждой индивидуальной антигенной детерминанты, что еще более усложняет состав антител [7].

Подготовка исследуемого материала

Для обнаружения антигенов к *Aeromonas punctata*, *Pseudomonas sp.*, *Rhabdovirus cyprini* в качестве испытуемого используют биопсийный материал внутренних органов (почка, печень, селезенка), соскобы с язв (взятые поверхности тела больных рыб), экссудат и/или вируссодержащую надосадочную жидкость культур клеток. Для получения 10%-ной суспензии биоматериал гомогенизируют до получения однородной массы на ФСБ (рН 7,2-7,4). Полученную суспензию сливают в стерильную посуду и используют для исследования [8].

Подготовка компонентов для постановки реакции

Для промывания планшетов, при постановке реакции, готовят содержащий твин-80 фосфатно-солевой буфер: размешивают содержимое флакона с ФСБ-Т*25, при выпадении в концентрате осадка прогревают его до полного растворения солей, и разводят дистиллированной водой до 700 мл. Хранят при 4°C до 5 суток.

Растворы конъюгатов №1, 2, 3 в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием, к 0,05 мл концентрированного раствора добавляют 15 мл раствора для разведения конъюгата (РК), тщательно перемешивают.

Раствор ТМБ готов к применению, непосредственно перед использованием отбирают в пластиковую ванночку 12 мл. Остатки раствора

ТМБ из ванночки нельзя сливать во флакон с исходным раствором ТМБ. Хранят при 4°C в течение всего срока годности набора [11].

Постановка реакции

Перед началом анализа лунки планшета промывают один раз промывочным раствором. В каждую лунку вносят по 300 мкл раствора, через пять минут после заполнения лунок раствор аккуратно удаляют. Остатки влаги из лунок тщательно удаляют, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

В первые лунки рядов планшета сенсibilизированных иммуноглобулинами к IPN, ИHN и VHS вносят по 100 мкл специфических положительных антигенов (IPN K+, ИHN K+, VHS K+). Во вторые лунки каждого ряда вносят 100 мкл отрицательного антигена. Во все остальные лунки по 100 мкл исследуемых образцов (желательно делать 2-3 повторности). Лунки на планшете сенсibilизированы следующим образом: иммуноглобулинами к IPN (1, 4, 7, 10 ряды), ИHN (2, 5, 8, 11 ряды), VHS (3, 6, 9, 12 ряды). Внесение материала в плашку сопровождают тщательным перемешиванием пипетированием в течение 5-7 секунд. Планшет инкубируют при комнатной температуре (21-25°C) 60 минут.

Растворы конъюгатов № 1, 2, 3 в рабочем разведении готовят за пятьдесят минут до окончания инкубации.

По окончании инкубации планшет отмывают четыре раза ФСБ-Т от не связавшихся антигенов, после чего удаляют влагу постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

В лунки рядов 1, 4, 7, 10 планшета вносят по 100 мкл раствора конъюгата 1 (IPN) в рабочем разведении. В лунки рядов 2, 5, 8, 11 планшета вносят по 100 мкл раствора конъюгата 2 (ИHN) в рабочем разведении. В лунки рядов 3,6,9,12 планшета вносят по 100 мкл раствора конъюгата 3 (VHS) в рабочем разведении. Планшет инкубируют при комнатной температуре (21-25°C) 60 минут. По окончании инкубации планшет отмывают четыре раза ФСБ-Т после чего удаляют влагу постукиванием.

Во все использованные лунки планшета вносят по 100 мкл раствора ТМБ. Для внесения раствора ТМБ используют пластиковую ванночку, входящую в состав набора. Планшет инкубируют при комнатной температуре, в защищенном от света месте, 25-30 минут. Реакцию заканчивают добавлением во все лунки 100 мкл стоп-реагента.

Учет результатов

Результаты реакции учитывают через 2-3 минуты после добавления стоп-реагента, проводя измерение оптической плотности (ОП) в каждой лунке на спектрофотометре с вертикальным лучом света при длине волны 450 нм

или визуально. Результаты исследований учитывают только при соблюдении следующих условий:

- значение ОП в лунке с отрицательным контролем не более 0,30 о.е.
- значение ОП в лунке с положительным контролем не менее 0,62 о.е.

Реакцию оценивают по формуле и выражают в виде процента реактивности:

$$\text{процент реактивности (\%)} = (\text{ОП}-\text{ОПК-})/(\text{ОПК}+-\text{ОПК-}) \times 100\%,$$

где ОП - оптическая плотность образца, ОПК+ - оптическая плотность положительного контроля, ОПК - оптическая плотность отрицательного контроля.

Границы пороговых значений: при величине % >22% реакция считается положительной, значение % <10% - реакция отрицательная, а диапазон % от 10% до 22% - сомнительные результаты реакции [13].

Заключение

Ввиду отсутствия эффективных средств специфической профилактики краснухи прудовых рыб очевидно, что ранняя диагностика – один из важнейших и результативных способов борьбы с данной болезнью.

Данное исследование посвящено разработке методов, предназначенных для быстрого обнаружения антител к возбудителям краснухи прудовых рыб (*Aeromonas punctata*, *Pseudomonas sp.*, *Rhabdovirus cyprini*). Предложенный метод определения краснухи прудовых рыб (далее по тексту КПП) с применением иммуноферментного анализа позволяет в рамках лабораторного мониторинга быстро, качественно и своевременно проводить диагностику болезней прудовых рыб. Небольшая стоимость диагностических наборов, возможность автоматизации всех этапов проведения реакции, возможность ранней диагностики заболевания указывают практическую ценность использования данной методики для быстрого установления диагноза.

Список использованных источников

1. Васильков Г.В., Грищенко Л.И., Енгашев В.Г. и др. Болезни рыб. Справочник. Под ред. В.С. Осетрова - 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1989. – 288 с. ил.
2. Вербицкая И.Н. и др. Основные болезни прудовых рыб. М., "Колос", 1972.- 72с.
3. Скогорева А.М., Манжурина О.А., Ромашов Б.В. Диагностика заразных болезней рыб / учебное пособие. – Воронеж: ФГБОУ ВО ВГАУ, 2016. – 108 с.

4. Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: расширенные материалы IV Международной конференции 24 – 27 сентября 2015 года // Борок: Изд-во ФГБУН Ин-т биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН, 2015. – 588 с.
5. Справочник по болезням рыб. Под ред. В.С. Осетрова. М., «Колос», 1978. - 351с.
6. А.М. Егоров, А.П. Осипов и др. Теория и практика иммуноферментного анализа - М.: Высшая школа, 1991.
7. Лиманский В.В., Бекина Е.Н. К методу определения общего белка в сыворотке крови рыб // Физиология основных объектов рыбоводства: Сб. науч. тр. М.: ВНИИПРХ, 1984. Вып. 42. - С. 125-129.
8. Shayo S.D., Mwita C.J., Hosea K. M. Virulence of *Pseudomonas* and *Aeromonas* bacteria recovered from *Oreochromis niloticus* (Perege) from Mtera hydropower. – Dam, Tanzania, Scholars Research Library, *Annals of Biological Research*, 2012, 3 (11): 5157-5161.
9. Pękala-Safińska A. Contemporary Threats of Bacterial Infections in Freshwater Fish // *J. Vet. Res.* 2018; 62(3): 261–267.
10. Walczak N., Puk K., and Guz L. Bacterial Flora Associated with Diseased Freshwater Ornamental Fish. // *J. Vet. Res.* 2017. 61(4): 445–449.
11. Haenen O. Major bacterial diseases affecting aquaculture // *Aquatic AMR Workshop Mangalore, India*, 2017: 10-11.
12. Marwa F., Abd El-Kader T., Mousa-Balabe M. Isolation and Molecular Characterization of Some Bacteria Implicated in the Seasonal Summer Mortalities of Farm-raised *Oreochromis niloticus* at Kafr El-Sheikh and Dakahlia Governorates // *Journal of Veterinary Sciences*, 2017. Vol. 53 (2): 107-113.