

На правах рукописи

ДОРОНИН Максим Игоревич

**ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО
НЕКРОЗА ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ**

03.02.02 «Вирусология»

11 НОЯ 2015

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



005564230

Владимир – 2015

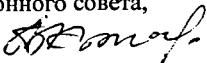
Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

- Научный руководитель:** доктор биологических наук
Мудрак Наталья Станиславовна
- Официальные оппоненты:** Грищенко Леонид Иванович –
доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБУ ВПО «Московская государственная
академия ветеринарной медицины и
биотехнологии им. К.И. Скрябина», доцент
- Ломакина Наталья Федоровна –
кандидат биологических наук, ФГБНУ
«Институт полиомиелита и вирусных
энцефалитов имени М.П. Чумакова»,
ведущий научный сотрудник лаборатории
молекулярной биологии вирусов гриппа
- Ведущая организация:** Государственное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский
институт экспериментальной ветеринарии
имени Я.Р. Коваленко Россельхозакадемии»

Защита состоится **«15» декабря 2015 года в 10 часов** на заседании диссертационного совета Д220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, мкр. Юрьевец.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.ariah.ru ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир).

Автореферат разослан «15» октября 2015 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук  Жбанова Татьяна Валентиновна

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы исследования. Инфекционный некроз гемопозитической ткани (ИНГТ) – высококонтагиозное вирусное заболевание лососевых рыб, которое встречается как в пресноводной, так и в морской аквакультуре [21]. Болезнь протекает по типу эпизоотии, характеризуется развитием септического процесса с тяжелым поражением органов гемопоза и приводит к массовой гибели рыбы (смертность молоди приближается к 100%) [10, 22]. Распространение вируса наносит значительный экономический ущерб, который складывается из затрат на проведение ветеринарно-санитарных и карантинных мероприятий, убоя всей рыбы на территории очага болезни и ограничений в торговле [19, 22]. В связи с большим количеством рыбопосадочного материала, поставляемого из стран, не благополучных по вирусным болезням рыб (США, Канада, страны Скандинавского п-ва и Юго-Восточной Азии), возрастает актуальность проведения экспрессных диагностических исследований в рамках мониторинга по вирусным заболеваниям аквакультуры, в частности по ИНГТ [19].

Возбудитель принадлежит к порядку *Mononegavirales*, семейству *Rhabdoviridae*, роду *Novirhabdovirus*. Геном представлен несегментированной одноцепочечной негативной РНК длиной около 11000 нуклеотидов и кодирует N-, P-, M-, G-, NV- и L-белки [19].

Впервые заболевание было зарегистрировано в 1953 г. на рыбозаводах США, а затем в Канаде и на Аляске. В семидесятые годы болезнь появилась в Западной Европе, Юго-Восточной Азии и Японии. В Российской Федерации вспышки ИНГТ регистрируют с 2000 г. [7, 12, 19, 22]. По данным Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ, OIE), в течение последних 15 лет в различных странах мира было зарегистрировано около 100 вспышек ИНГТ. Данная инфекция включена в список заболеваний, обязательно декларируемых в МЭБ [19]. В настоящее время Приказом Минсельхоза РФ № 476 от 19.12.2011 г. ИНГТ отнесен к перечню заразных и особо опасных болезней, по которым устанавливается карантин, что предусматривает проведение масштабного эпизоотологического мониторинга данного заболевания.

Согласно Руководству МЭБ, лабораторная диагностика ИНГТ предусматривает выделение вируса в чувствительных клеточных линиях, серологическую идентификацию вируса с помощью ИФА и РИФ, а также выявление РНК вируса ИНГТ в ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ [19]. Применение этих методов предполагает высокие требования к лабораторному персоналу, закупку зарубежных коммерческих наборов и оборудования, что существенным образом отражается на стоимости анализов и делает отечественное рыбоводство зависимым от импортных поставок.

В связи с этим разработка экспресс-методов для дополнения существующей схемы диагностики ИНГТ на основе высокочувствительных и специфичных тест-систем, позволяющих упрощать проведение анализа, является актуальной задачей. К одним из таких методов относится реакция агглютинации латекса (РАЛ), используемая для диагностики бешенства, герпеса, сальмонеллеза, листериоза, микоплазмоза и других инфекционных заболеваний. Метод является бесприборным, экспрессным и простым в исполнении, достаточно чувствительным и специфичным. Стоимость исследования значительно ниже по сравнению с другими диагностическими тестами. Учитывая эти преимущества перед другими методами, РАЛ может найти применение в лабораториях рыбохозяйств для проведения скрининговых исследований.

Использование формата реакции ОТ-ПЦР-РВ для одновременного выявления в патологическом материале нескольких возбудителей с применением ПЦР-чипов позволит создать диагностическую тест-систему нового поколения с высокой аналитической и диагностической чувствительностью и специфичностью. За счет снижения количества манипуляций в пределах каждого этапа анализа по сравнению с классическим вариантом ОТ-ПЦР, совмещения в микрореакторе чипа обратной транскрипции и ПЦР и оптимизации режима термоциклирования сократится время проведения анализа.

Таким образом, применение РАЛ и метода ОТ-ПЦР-РВ с использованием диагностических ПЦР-чипов для проведения скрининговых исследований на ИНГТ даст возможность выявлять возбудителя на ранних стадиях заболевания. Следовательно, разработка экспресс-методов выявления вируса ИНГТ лососевых рыб для дополнения существующей схемы диагностики является актуальной.

1.2 Степень разработанности проблемы. Для изучения структуры и свойств возбудителя ИНГТ были исследованы различные изоляты вируса, выделенные на территории Северной Америки, Европы и Азии. На основе анализа отличий генов N и G были определены 5 генетических групп вируса ИНГТ [13]. Применяя моноклональные антитела к гликопротеину и нуклеопротеину вируса ИНГТ, была проведена серологическая дифференциация его штаммов [14, 21]. Изучена цитоморфологическая характеристика культур клеток рыб и изучена их чувствительность к некоторым вирусам лососевых [4, 11]. Изоляты вируса были адаптированы к различным клеточным линиям рыб (ЕРС, RTG-2 и др.) [1, 4, 19].

Были разработаны разные варианты ОТ-ПЦР для выявления вируса ИНГТ. Предложены системы ОТ-ПЦР в режиме реального времени для обнаружения вируса ИНГТ [8, 20, 23]. Разработаны системы мультиплекс-ПЦР и мультиплекс-ПЦР-РВ с целью выявления вирусов ИНГТ, ВГС и ИНПЖ [17, 24]. ОТ-ПЦР-РВ возможно проводить не только в пробирке, но и в микрореакторах чипа, на гидрофильном дне которых адсорбирована смесь компонентов для одновременного проведения обратной

транскрипции и ПЦР, что позволяет при оптимизации режима термоциклирования сокращать время проведения анализа. В нашей стране в таком формате разработаны коммерческие тест-системы, позволяющие выявлять возбудителей некоторых вирусных и бактериальных болезней птиц и КРС [25]. Сведения о разработке метода ОТ-ПЦР-РВ с применением диагностических ПЦР-чипов для выявления вируса ИНГТ отсутствуют.

Экспресс-метод для выявления антигенов вирусов, бактерий и других патогенных микроорганизмов, который основан на агглютинации сферических частиц латекса, сенсibilизированных специфичными антителами, находит применение как в медицинской, так и ветеринарной практике. Широкий спектр тестов латексной агглютинации для нужд ветеринарии производят предприятия «Microgen Bioproducts» (Великобритания), «БиоВитрум» (РФ) и др. В ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) были синтезированы латексные препараты для диагностики различных вирусных болезней животных, в частности бешенства, микоплазмозов птиц и др. [3, 5]. Сведения о разработке РАЛ для выявления вируса ИНГТ отсутствуют.

1.3 Цели и задачи исследований. Основная цель данных исследований заключалась в разработке экспресс-методов, позволяющих выявлять вирус ИНГТ в патологическом материале рыб. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- а) подобрать оптимальные условия для получения культурального антигена вируса ИНГТ;
- б) получить поликлональные и моноклональные антитела к антигенам вируса ИНГТ и дать им характеристику;
- в) оптимизировать параметры получения латексных диагностикумов и разработать экспресс-метод РАЛ для выявления вируса ИНГТ в патологическом материале лососевых рыб с использованием поликлональных и моноклональных антител;
- г) разработать экспресс-метод ОТ-ПЦР-РВ с применением диагностических ПЦР-чипов для выявления вируса ИНГТ;
- д) провести апробацию разработанных методов при диагностических исследованиях полевого материала в рамках мониторинга в ряде регионов РФ в 2014-2015 гг.

1.4 Научная новизна результатов исследований. Подобраны оптимальные условия для получения культурального антигена вируса ИНГТ. Предложена методика вирусвыделения из патологического материала рыб одновременно в нескольких чувствительных культурах клеток с определением титра накопления вируса. Определены оптимальные параметры получения латексных препаратов, впервые разработан экспресс-метод РАЛ для выявления вируса ИНГТ в патологическом материале лососевых рыб с использованием поликлональных и моноклональных

антител. Впервые разработан экспресс-метод ОТ-ПЦР-РВ в формате диагностических ПЦР-чипов для выявления вирусов ИНГТ, вирусной геморрагической септицемии (ВГС) и весенней виремии карпа (ВВК) в пробах патологического материала рыб. Проведена апробация разработанных методов РАЛ и ОТ-ПЦР-РВ с применением диагностических ПЦР-чипов при диагностических исследованиях полевого материала на вирусные заболевания рыб в рамках мониторинга в ряде регионов РФ в 2014-2015 гг.

1.5 Теоретическая и практическая значимость работы. Изучены культуральные свойства штамма «Аркус 32/87» и изолята «Воронин 14/08» вируса ИНГТ. Определена оптимальная инфицирующая доза вируса ИНГТ и выбрана наиболее подходящая клеточная линия для его культивирования. Оценена эффективность культивирования вируса в клеточной линии гонад радужной форели (RTG-2) в зависимости от его пассажного уровня и концентрации фетальной сыворотки КРС в поддерживающей среде. Культуральный антиген вируса ИНГТ с высоким титром накопления получали на основе штамма «Аркус 32/87», который использовали для получения вирусспецифичных сывороток и моноклональных антител.

Получены 18 гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к антигенам вируса ИНГТ. Проведена оценка чувствительности и специфичности связывания полученных антител с белками вируса ИНГТ в ИФА и вестерн-блот-анализе. Для разработки диагностических тест-систем использовали моноклональные антитела, специфичные к G- и N-белкам вируса ИНГТ, с активностью в двойном сэндвич-варианте ИФА 1:192000 и 1:384000, соответственно.

Определены оптимальные условия синтеза и хранения латексных диагностикумов с разными функциональными группами в процессе физической и химической адсорбции антител, специфичных к вирусу ИНГТ. Разработан экспресс-метод РАЛ (реакция агглютинации латекса) для выявления вируса ИНГТ с использованием полученных моноклональных и поликлональных антител. Оценены диагностические характеристики полученных латексных препаратов.

Разработан экспресс-метод ОТ-ПЦР-РВ с применением диагностических ПЦР-чипов для выявления вирусов рыб. Предложены оригинальные системы праймеров и зонды, а также оптимизированы режимы термоциклирования для каждой тест-системы. Разработаны тест-системы с высокими показателями эффективности амплификации, аналитической и диагностической чувствительности и специфичности.

Разработаны «Методические рекомендации по вирусвыделению из патологического материала рыб на культуре клеток» (утверждены в ФГБУ «ВНИИЗЖ» 20 декабря 2013 г.), «Методические рекомендации по выявлению вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых в реакции агглютинации латекса» (утверждены в ФГБУ «ВНИИЗЖ» 17 июня 2015 г.), «Методические рекомендации по выявлению вирусов рыб в обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) с применением

диагностических ПЦР-чипов) (утверждены в ФГБУ «ВНИИЗЖ» 09 октября 2015 г.).

Проведено депонирование использованных в работе штамма вируса ВГС «Аланд» и штамма вируса ВВК «Яяла» в КШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» (справка о депонировании штамма вируса геморрагической септицемии (ВГС) лососевых рыб «Аланд» (диагностический) № 41/15-3 от 08.04.2015 г.; справка о депонировании штамма вируса весенней виремии карпа (ВВК) «Яяла» (диагностический) № 45/15-9 от 05.08.2015 г.).

Разработанные методы применяются в ФГБУ «ВНИИЗЖ».

1.6 Методология и методы исследования. Методология проведенных исследований включает стандартные процедуры с использованием различных материалов и естественно восприимчивых животных. В работе использовали молекулярно-биологические (ПЦР, секвенирование, анализ нуклеотидных последовательностей), вирусологические (вирусыделение, культивирование вируса) и серологические (ИФА, РИФ, РАЛ) методы исследований.

1.7 Положения, выносимые на защиту:

а) метод вирусыделения из патологического материала рыб одновременно в клеточных линиях RTG-2, EPC, FHM с определением титра накопления вируса; оптимальные условия для получения культурального антигена вируса ИНГТ;

б) получение 18 гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к антигенам вируса ИНГТ, и их характеристика для разработки диагностических тест-систем;

в) тест-системы на основе экспресс-метода РАЛ для выявления вируса ИНГТ лососевых с применением поликлональных и моноклональных антител;

г) экспресс-метод ОТ-ПЦР-РВ с применением диагностических ПЦР-чипов для выявления вирусов рыб;

д) результаты апробации разработанных методов при диагностических исследованиях полевого материала из ряда регионов РФ в 2014-2015 гг.

1.8 Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (г. Москва), ООО «Люмэкс-Маркетинг» (г. С.-Петербург): к.б.н. Ф.А. Бровко, к.б.н. М.М. Никитину и ФГБУ «ВНИИЗЖ»: к.в.н. А.А. Пичуевой и др. сотрудникам реф. лаб. болезней аквакультуры, к.б.н., ст.н.с. ГосНИИОРХ А.В. Лысанову за помощь в проведении отдельных этапов работы; д.б.н., г.н.с. Н.С. Мудрак, к.б.н. Д.Б. Андрейчуку, к.б.н. Н.А. Назарову за консультативную помощь; д.б.н., проф. С.С. Рыбакову за содействие в выполнении работы. Автор выражает признательность в.н.с. реф. лаб. болезней аквакультуры, к.в.н. Д.К. Павлову.

1.9 Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета ФГБУ

«ВНИИЗЖ», на 18-й Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пушкино, 2014 г.), 10-й Молодежной международной научно-практической конференции «Наука XXI века: новый подход» (г. Санкт-Петербург, 2014 г.), Международной научно-практической конференции «Инновационный вектор развития в условиях риска и неопределенности: новые задачи и пути их решения в экономике, экологии, зоологии, химии, биологии и др.» (г. Санкт-Петербург, 2015 г.), III Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы и перспективы развития современной науки: социально-экономические, естественно-научные исследования и технический прогресс» (г. Ростов-на-Дону, 2015 г.), VIII Всероссийской научно-практической конференции "Тенденции развития естественных и гуманитарных наук" (г. Ростов-на-Дону, 2015 г.). Достоверность результатов исследований подтверждена комиссионными испытаниями.

1.10 Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 9 научных работ, в том числе 2 статьи в изданиях, включенных в Перечень ВАК Министерства образования и науки РФ для докторских и кандидатских диссертаций.

1.11 Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 141 страницах компьютерного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, практические предложения, приложения; иллюстрирована 30 таблицами и 13 рисунками. Список использованной литературы включает 164 источника, из них 112 иностранных. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих достоверность результатов работы, ее научную новизну и практическую значимость.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

Вирусы. В работе были использованы штамм «Аркус 32/87» вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани (ИНГТ) лососевых рыб, штамм «Аланд» вируса геморрагической септицемии (ВГС) лососевых рыб, изолят «S-IPNV/FS12-01» вируса инфекционного некроза поджелудочной железы (ИНПЖ), штамм «Яяла» вируса весенней виремии карпа. Указанные штаммы получены из «Государственного научно-исследовательского института ветеринарии и сельского хозяйства» (г. Хельсинки, Финляндия). Также использовали изолят «Воронин 14/08» вируса ИНГТ, выделенный на территории РФ.

Культуры клеток. Использовали перевиваемую культуру клеток гонад радужной форели (RTG-2), папулезной эпителиомы карпа (ЕРС), клетки хвостового стебля черного толстоголова (ФНМ), полученные из отдела культивирования клеток ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Животные. Для получения моноклональных и поликлональных антител к антигену вируса ИНГТ использовали клинически здоровых кроликов массой 1500 г и мышей массой 15-60 г.

Питательные среды, сыворотки, растворы и реактивы: среда ДМЕМ с 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота («Sigma», США); 4% раствор сульфата гентамицина (ЗАО НПП «Агроферм», г. Воронеж); фосфатный, трис-НСl, Нерес-буферные растворы; насыщенный раствор сульфата аммония; диспергирующий раствор трипсина (0,25%) и версена (0,02%); L-глутамин («ПанЭко», г. Москва); 5 мМ раствор MgCl₂ («Promega», США); 10 мМ раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфатов («Fermentas», Литва); 10x буферный раствор для Таq-полимеразы; РНК-зависимая ДНК-полимераза («Promega», США); HS Таq-полимераза (5 ед/мкл) («Promega», США); полный и неполный адъювант Фрейнда («Sigma»); пристан («Biomedicals», Франция); полиакриламид («Amersco», США); (2-оксиэтил)-триметиламмония хлорид («Serva», Германия); лаурилсульфат натрия (ООО «РусХимТрейд»); 25% водный раствор глутарового альдегида («Serva», Германия); белок А («Акохим», Россия).

Наборы реактивов: «Рибо-Сорб вариант 100» ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, набор реагентов для обнаружения вируса ИНГТ в сэндвич-варианте ИФА «TEST-LINE» (Чехия).

Праймеры и зонды: оригинальные праймеры IHN-F, IHN-F; VHS-F, VHS-R; SVC-F, SVC-R («Амплипрайм»). Для выбора систем праймеров использовали программу Oligo 6. Зонды IHN-P; VHS-P; SVC-P, меченные красителем FAM, применяли для выявления специфических фрагментов вирусов ИНГТ, ВГС и ВВК. Дизайн праймеров предложен ООО «Люмэкс-Маркетинг». Олигонуклеотиды, меченные красителем ROX, использовали для внутреннего контрольного образца (ВКО) и положительных контролей.

Диагностические специфические препараты: поликлональные антитела против иммуноглобулинов кролика и мыши, меченные пероксидазой (рабочее разведение 1:3000) (ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалея, г. Москва); моноклональные антитела диагностические против антигенов вируса ИНГТ (получены совместно с ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалея, г. Москва).

Латексные суспензии. В работе применяли полистирольные латексные частицы белого цвета производства ООО «Диафарм» (г. Санкт-Петербург) с -COOH, -NH₂, -SO₄ группами, с концентрацией поверхностных функциональных групп 1,42, 1,70 и 1,98 мкг-экв/м², диаметрами микросфер 950, 740, 650, 340 нм. Использовали также латексы белого цвета с диаметром частиц 250, 110, 90 нм и концентрацией вышеуказанных групп 1,98 мкг-экв/м².

Диагностические ПЦР-чипы. Для проведения ОТ-ПЦР-РВ использовали кремниевые диагностические ПЦР-чипы, (ООО «Люмэкс-Маркетинг») с лиофилизированной на дне микрореакторов смесью реактивов для ОТ-ПЦР-РВ.

Получение очищенного концентрированного антигена вируса ИНГТ штамма «Аркус 32/87» проводили методом, описанным Апасовой Л.Ю. [6].

Получение моноклональных антител. Работу проводили совместно с научными сотрудниками ФГБУН ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (г. Москва). Для иммунизации использовали мышей линии BALB/c, от которых получали лимфоциты. Гибридизацию лимфоцитов проводили с клетками миеломы SP 2/0 по методу Колера и Мильштейна [15]. Полученные гибридомы вводили в брюшную полость мышей, спустя 3 недели отбирали асцитную жидкость, из которой методом высаливания выделяли моноклональные антитела.

Электрофорез и иммуноблоттинг. SDS-ПААГ-электрофорез вируса ИНГТ проводили по методу Лэммли [16]. Белки вируса ИНГТ вместе с полоской геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану BA-85. Эффективность переноса белков из геля на мембрану проверяли окрашиванием мембраны 0,125% раствором красителя Coomassie blue. Неспецифическое связывание на репликах блокировали обработкой их 1% BSA в трис-солевом буферном растворе с добавлением 0,1% Tween-20 (TBST). После блокирования проводили инкубирование моноклональных антител (5 мкг/мл) с мембраной в течение ночи при комнатной температуре. После промывания мембраны для удаления несвязавшихся антител ее выдерживали в меченных пероксидазой хрена антителах к мышинным иммуноглобулинам (рабочее разведение 1:3000). В качестве хроматогена использовали смесь 4-хлорнафтола с 1% перекисью водорода.

Постановка твердофазного непрямого варианта иммуноферментного анализа. Для определения активности сывороток и асцитов, а также концентрации выделенных антител к антигенам вируса ИНГТ проводили ТФ непрямого варианта ИФА согласно методике, описанной Апасовой Л. Ю. [2].

Синтез латексных диагностикумов. Латексные препараты готовили по стандартной схеме, описанной Molina-Bolivar J.A. [18]. В качестве компонента для дополнительного связывания антител с поверхностью латекса применяли 1% стрептококковый белок А. Химическую адсорбцию биологанда проводили с использованием 1% глутаральдегида. Для сохранения высокой коллоидной стабильности полученных латексных диагностикумов использовали (2-оксиэтил)-триметиламмоний хлорид.

Определение степени адсорбции антител на поверхности латекса. Степень сенсibilизации латексов определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм и в ТФ непрямого варианте ИФА. Процент адсорбции антител на поверхности латексных частиц рассчитывали по формуле:

$$1 - \left(\frac{\text{концентрация антигена после адсорбции}}{\text{концентрация антигена до адсорбции}} \right) \times 100\%$$

ОТ-ПЦР-РВ с применением диагностических ПЦР-чипов для выявления вирусов рыб. Для работы применяли амплификатор «Ариа DNA» (ООО «Люмэкс-Маркетинг»), который осуществлял термоциклирование и детектирование продуктов ПЦР в режиме реального времени в микрореакторах чипа с применением двухканального флуоресцентного детектора. Для анализа использовали ПЦР-чипы, на дне микрореакторов которых в лиофилизированном состоянии находилась смесь реагентов для ОТ-ПЦР-РВ. В каждый микрореактор вносили по 1,2 мкл следующей смеси для реакции: 0,150 мкл смеси дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (10 ммоль каждого), 0,144 мкл Random Hexamers (5 пмоль), 0,144 мкл RNase Inhibitor (20 U/мкл), 0,144 мкл обратной транскриптазы (50 U/мкл), 0,144 мкл хлористого магния (25 ммоль), по 0,047 мкл праймеров и зондов, меченных FAM и ROX (5 пмоль), 0,012 мкл Taq-ДНК-полимеразы (5 ед/мкл), 0,20 мкл трегалозы, которая используется в качестве криопротектора. В лунки с положительными контролями также вносили плазмидные векторы pGEM-3Zf (с сайтами рестрикции HindIII/EcoRI), в которые встроены участки гена N вирусов ИНГТ штамма «Аркус 32/87», ВГС штамма «Аланд» и ВВК штамма «Яяла» с размерами 66, 67 и 103 н.п., соответственно. В качестве отрицательного контроля использовали ДНК генома радужной форели и зеркального карпа. В качестве ВКО служила плаزمида pGEM-3Zf со встроенной последовательностью размером 100 н.п., состоящая из нескольких участков гена цитохрома b ягуара (*Panthera onca*) и не вызывающая перекрестной реакции ни с одной из имеющихся тест-систем. Перед проведением анализа реакционную зону ПЦР-чипа покрывали полиметилсалаксаном (ПСМ)) в объеме 620 мкл. Буферный раствор для Taq-полимеразы (x10) в объеме 0,12 мкл вносили в микрореактор вместе с 1,08 мкл РНК пробы.

Статистическая обработка результатов исследований. Статистическая обработка включала расчеты средних арифметических значений, достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера, обработку результатов с использованием пакета прикладных программ StatSoft (версия 6.0) и Microsoft Excel 2010, а также методов, приведенных в руководствах Сошниковой Л.А. и др. [9].

2.2 Результаты собственных исследований

Поиск оптимальных условий для получения культурального антигена вируса ИНГТ. Разработка экспресс-методов выявления вируса ИНГТ предполагала необходимость оптимизации условий и поиска источника для получения культурального антигена вируса ИНГТ. С этой целью проводили поиск клеточной линии рыб, наиболее чувствительной к вирусу ИНГТ. При этом также оценивали стабильность его культуральных свойств. Для этого осуществляли культивирование

штамма «Аркус 32/87» и изолята «Воронин 14/08» вируса ИНГТ в перевиваемых культурах клеток гонад радужной форели (RTG-2), папулезной эпителиомы карпа (ЕРС), хвостового стебля черного толстоголова (FHM), чувствительность которых к вирусу проверяли в течение 15 последовательных пассажей при заражающей дозе 0,01-0,05 ТЦД₅₀/кл. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Исследование стабильности свойств штамма «Аркус 32/87» и изолята «Воронин 14/08» вируса ИНГТ в культурах клеток RTG-2, ЕРС, FHM (n=3)

Штамм/изолят вируса ИНГТ	Культура клеток	Титр инфекционной активности вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³					
		1 пассаж	3 пассаж	5 пассаж	8 пассаж	10 пассаж	15 пассаж
«Аркус 32/87»	RTG-2	5,02±0,15	5,60±0,12	6,01±0,14	6,51±0,16	7,25±0,18	7,35±0,12
	ЕРС	4,85±0,13	5,42±0,15	5,88±0,17	6,34±0,13	7,01±0,16	7,13±0,14
	FHM	4,82±0,13	5,36±0,17	5,79±0,14	6,29±0,13	6,93±0,20	7,05±0,14
«Воронин 14/08»	RTG-2	4,87±0,15	5,44±0,12	5,87±0,14	6,36±0,16	7,11±0,18	7,24±0,12
	ЕРС	4,71±0,13	5,23±0,15	5,70±0,17	6,23±0,13	6,87±0,16	7,01±0,15
	FHM	4,62±0,13	5,11±0,17	5,54±0,14	6,12±0,13	6,75±0,20	6,88±0,11

Как показывает таблица 1, высокая чувствительность к вирусу ИНГТ отмечалась у всех клеточных линий. Для получения культурального антигена решили использовать RTG-2, так как эта клеточная линия получена от типичного представителя семейства лососевых, радужной форели, которая восприимчива к вирусу ИНГТ в естественных условиях. В течение 15 последовательных пассажей вируса в культуре клеток RTG-2 титр накопления штамма «Аркус 32/87» увеличился с 5,02 до 7,35 lg ТЦД₅₀/см³, а полевого изолята «Воронин 14/08» - с 4,87 до 7,24 lg ТЦД₅₀/см³, что свидетельствовало о стабильности их культуральных свойств.

Оценивали влияние дозы заражения вируса ИНГТ и концентрации фетальной сыворотки крови КРС в поддерживающей среде и на репродукцию вируса в культуре клеток RTG-2. Основными маркерными признаками при вирус выделе нии являлись наличие ЦПД, скорость репродукции и уровень накопления вируса в клеточном монослое. Исследование проводили на 10 пассаже.

Результаты представлены в таблице 2, из которой следует, что оптимальная доза заражения штамма «Аркус 32/87» и изолята «Воронин 14/08» вируса ИНГТ составляла 0,01 – 0,05 ТЦД₅₀/кл. при концентрации фетальной сыворотки крови КРС 1%. В этих условиях на 7 сутки накопление штамма «Аркус 32/87» обеспечивалось на уровне 7,25±0,18 lg ТЦД₅₀/см³, а изолята «Воронин 14/08» - на уровне 7,11±0,18 lg ТЦД₅₀/см³ при поражении клеточного монослоя на 90-100%. Увеличение дозы заражения до 0,05-0,10 ТЦД₅₀/кл., а также отсутствие или увеличение концентрации сыворотки в поддерживающей среде до 5 и 10 % вызывало снижение уровня накопления вируса ИНГТ.

Таблица 2 – Уровни накопления вируса ИНГТ в культуре клеток RTG-2 в зависимости от дозы заражения и концентрации фетальной сыворотки крови КРС в составе поддерживающей среды (10 пассаж) (n=5)

Название штамма/ изолята вируса ИНГТ	Доза заражения, ТЦД ₅₀ /кл	Концентрация фетальной сыворотки крови КРС, %	Уровни накопления вируса ИНГТ, lg ТЦД ₅₀ /см ³		
			3 сутки	5 сутки	7 сутки
«Аркус 32/87»	0,01-0,05	0	3,68±0,08	5,02±0,09	6,20±0,09
		1	4,76±0,10	6,04±0,09	7,25±0,18
		5	4,02±0,10	5,50±0,11	6,80±0,10
		10	3,75±0,08	5,09±0,10	6,30±0,09
	0,05-0,10	0	3,08±0,10	4,68±0,10	5,80±0,08
		1	4,12±0,10	5,42±0,07	6,55±0,10
		5	3,62±0,08	5,13±0,11	6,10±0,11
		10	3,20±0,10	4,55±0,07	5,74±0,10
«Воронин 14/08»	0,01-0,05	0	3,50±0,10	4,80±0,12	5,91±0,12
		1	4,57±0,11	5,90±0,10	7,11±0,18
		5	3,75±0,10	5,10±0,10	6,30±0,10
		10	3,60±0,10	4,73±0,10	5,97±0,10
	0,05-0,10	0	3,20±0,07	4,26±0,10	5,49±0,08
		1	4,25±0,11	5,40±0,08	6,75±0,10
		5	3,45±0,12	4,85±0,10	5,84±0,06
		10	3,40±0,11	4,33±0,11	5,58±0,09

По результатам исследования штамм «Аркус 32/87» и изолят «Воронин 14/08» имели примерно одинаково высокие титры накопления вируса (7,11-7,25 lg ТЦД₅₀/см³) в культуре клеток RTG-2. При этом штамм «Аркус 32/87» в большей степени изучен, а также депонирован в КШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ», что позволило использовать его в качестве источника для получения культурального антигена с дальнейшей наработкой поликлональных и моноклональных антител.

Получение и характеристика моноклональных антител к антигенам вируса ИНГТ. За счет гибридизации лимфоцитов иммунных мышей линии BALB/c с клетками миеломы Sp2/0 было отобрано 18 стабильных клонов. Из асцитных жидкостей мышей, которым вводили клетки клонов-продуцентов, выделяли моноклональные антитела (МА) к антигенам вируса ИНГТ. По результатам непрямого варианта ТФ ИФА наибольшую активность проявили асциты №7, 8, 9 и 15 (активность 1:51200), более низкая активность была характерна для асцитов № 4, 12 и 18 с титрами 1:25600, 1:12800 и 1:25600, соответственно. Минимальная активность антител наблюдалась при исследовании асцитов № 3, 6, 11 и 17 (титр 1:400).

Полученные образцы очищенных МА характеризовались высокой степенью чистоты, о чем свидетельствовали результаты SDS-ПААГ-электрофореза в восстанавливающих условиях. Для оценки специфичности связывания полученных МА с белками вируса ИНГТ после электрофореза проводили вестерн-блот-анализ, результаты которого представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Оценка взаимодействия моноклональных антител с белками вируса ИНГТ (по результатам вестерн-блот-анализа)

№ МА	Взаимодействие МА с белками вируса ИНГТ (+/-)				
	L-белок, 170 кДа	G-белок, 70 кДа	N-белок, 40 кДа	P-белок, 32 кДа	M-белок, 26 кДа
1	–	–	–	(+)	(+)
2	–	–	–	+	–
3	–	–	–	(+)	(+)
4	–	–	++	–	–
5	–	(+)	–	+	–
6	–	(+)	–	–	–
7	+	+	–	(+)	–
8	+	+	–	+	–
9	+	+	–	+	–
10	–	–	–	+	–
11	–	–	–	(+)	(+)
12	–	–	–	+	–
13	–	–	–	+	–
14	–	–	–	+	–
15	–	++	–	–	–
16	+	–	–	–	–
17	–	–	+	–	–
18	+	+	–	–	–

Примечание: «++» - наиболее яркая полоса, «+» - четко проявившаяся полоса, «(+)-» - слабо проявившаяся полоса, «-» - полоса не проявилась

Согласно этим данным МА № 4 и 17 взаимодействовали исключительно с нуклеопротеином вируса ИНГТ. Антитела № 6 и 15 были активными к G-белку, № 2, 10, 12, 13, 14 – к P-белку. Антитела № 16 проявляли специфичность по отношению к L-белку вируса ИНГТ. Специфичность к матричному белку была выявлена у антител № 1, 3, 11, которые при этом проявляли активность и к фосфопротеину вируса ИНГТ. Также были выделены антитела № 7, 8, 9, которые одновременно проявляли свою активность по отношению к L-, G- и P-белкам, № 5 и 18 – к G- и P-белкам. Связывание МА преимущественно G- и P-белка и, в меньшей степени, нуклеопротеина и матричного белка, вероятнее всего, связано с особенностями локализации вирусных белков в вирионе препарата, использованного для иммунизации. Для дальнейших исследований были отобраны МА № 4, наиболее активные по отношению к N-белку, и МА № 15, проявляющие высокую активность к G-белку вируса ИНГТ.

Для оценки специфичности детектирующих МА № 4 и 15 в двойном сэндвич-варианте ИФА в качестве сенсibiliзирующих использовали поликлональные антитела против вирусов ИНГТ, ВГС и ВВК. В качестве антигенов использовали вирусы ИНГТ, ВГС и ВВК. Конъюгатом служили антимишьянные антитела, меченные

пероксидазой хрена. По результатам анализа, детектирующие МА № 4 и 15 проявляли специфичность к вирусу ИНГТ.

С помощью двойного сэндвич-варианта ИФА определяли активность препаратов МА № 4 и 15, проводя титрование полученных антител с шагом 2, начиная с разведения 1:1000. Для получения более точных значений проводили дополнительное титрование. В качестве антигена применяли суспензию вируса ИНГТ с концентрацией 1 мкг/мл. По результатам исследования установили, что активность МА № 4 и 15 составляла 1:192000 и 1:384000, соответственно.

Таким образом, полученные препараты МА № 4 и 15 против N- и G-белков вируса ИНГТ с активностью 1:192000 и 1:384000 и концентрациями 28,1 и 54,6 мг/мл, соответственно, характеризовались специфичностью к вирусу ИНГТ, что позволило их использовать при разработке диагностических тест-систем.

Разработка реакции агглютинации латекса для выявления вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани. К одному из экспресс-методов диагностики инфекционных болезней относится реакция агглютинации латекса (РАЛ), которая является простым бесприборным методом с достаточно высокой диагностической чувствительностью и специфичностью. Однако получение латексных диагностикумов осложняется влиянием различных физико-химических факторов на процесс адсорбции специфичных антител. По этой причине проводили поиск оптимальных условий, позволяющих повысить степень физической и химической адсорбции антител на поверхности латексных частиц и получить тест-системы с высокими диагностическими показателями (таблица 4).

Таблица 4 – Оптимальные условия для синтеза и хранения латексных препаратов, выявляющих вирус ИНГТ (n=3)

Характеристика латексных частиц		Характеристика буферного раствора		Характеристика латексного препарата	
Диаметр частиц, нм	340	рН	7,0	Сенсибилизирующие антитела к вирусу ИНГТ	ПА/МА
		Ионная сила, мМ	5		
Активная группа	-NH ₂	Базовый раствор	глицин-солевой буферный раствор (ГСБР)	Концентрация сенсибилизирующих антител, мг/мл	1
Конц. активных групп, мкг-экв/м ²	1,98	Блокирующий компонент	1% BSA	Концентрация сенсиблированных частиц в готовом препарате, %	1,5
		Компонент для ковалентного связывания антител к вирусу ИНГТ	1% глутаральдегид		
		Раствор для хранения латексных препаратов	(2-окситил)-триметиламмония хлорид (50 ммоль/л) в ГСБР	Степень адсорбции антител, %	82,8-83,8
				Аналитическая чувствительность, Ig TCC ₅₀ /см ²	3,11-3,20

Примечание: ПА – поликлональные антитела, МА – моноклональные антитела

Данные условия позволяли получать препараты с лучшими диагностическими показателями и сохранять их в течение 9 месяцев. Для их синтеза применяли ПА и

МА против вируса ИНГТ. Диагностикумы, полученные на основе моноклональных антител, характеризовались высокой специфичностью (отсутствие положительной реакции с гетерологичными антигенами с титром накопления $7,0 \text{ IgTЦД}_{50}/\text{см}^3$). Специфичность препаратов на основе поликлональных антител была ниже (отсутствие положительной реакции с неспецифичными антигенами с титром $6,0 \text{ IgTЦД}_{50}/\text{см}^3$). Аналитическая чувствительность полученных препаратов составляла $3,11-3,20 \text{ IgTЦД}_{50}/\text{см}^3$.

С помощью разработанного экспресс-метода РАЛ в 2014-2015 гг. было исследовано 50 образцов биоматериала, положительных по ИНГТ (5 положительных проб от лососевых рыб с титром накопления $4,0-5,0 \text{ IgTЦД}_{50}/\text{см}^3$, 45 образцов культурального вируса ИНГТ с титром накопления $3,2-5,0 \text{ IgTЦД}_{50}/\text{см}^3$) и 500 проб патматериала, отрицательных по данному заболеванию, по результатам вирусвыделения в культуре клеток, сэндвич-варианта ИФА, РИФ и ОТ-ПЦР.

В данном исследовании диагностическая чувствительность и специфичность латексных препаратов на основе поликлональных антител составляли 96,0 и 98,2 %, соответственно, диагностикумов на основе моноклональных антител – 92,0 и 99,2 %, соответственно. Таким образом, для проведения диагностических исследований на ИНГТ надежнее применять высокоспецифичные аминированные латексные препараты, полученные с применением моноклональных антител.

Разработка метода ОТ-ПЦР-РВ с применением диагностических ПЦР-чипов для выявления вирусов ИНГТ, ВГС и ВВК. Актуальной в настоящее время является разработка молекулярно-биологических экспресс-методов диагностики вирусных болезней рыб, позволяющих упростить проведение и сократить время анализа. В сотрудничестве с ООО «Люмэкс-Маркетинг» (г. С.-Петербург) нами были проведены исследования по разработке метода ОТ-ПЦР-РВ с применением диагностических ПЦР-чипов для выявления вирусов ИНГТ, ВГС и ВВК. С целью повышения экспрессности и для одновременного проведения скрининговых исследований патологического материала рыб на несколько вирусных заболеваний ОТ-ПЦР-РВ был переведен в формат ПЦР-чипов, который предусматривает проведение всех этапов реакции в одном микрореакторе. Совместно с ООО «Люмэкс-Маркетинг» проведена оптимизация реакции по температурному и временному профилю реакции и по концентрации ионов магния.

Температуру отжига праймеров подбирали экспериментально постановкой реакции с градиентом температур от 48 до 64°C с шагом 1°C на амплификаторе «АриаDNA» («Люмэкс-Маркетинг», Россия). Подобранные температурные и временные профили ОТ-ПЦР-РВ в формате чипов представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Режим термочиклирования при проведении ОТ-ПЦР-РВ с применением диагностических ПЦР-чипов

Параметры	Кол-во циклов	Режимы термочиклирования при выявлении вирусов		
		ИНГТ	ВГС	ВВК
Обратная транскрипция		37°C – 20 мин	37°C – 20 мин	37°C – 20 мин
Предварительная денатурация	1	94°C – 2 мин	94°C – 2 мин	94°C – 2 мин
Денатурация Отжиг праймеров Элонгация	45	94°C – 3 сек 60°C – 10 сек 60°C – 10 сек	94°C – 3 сек 60°C – 10 сек 60°C – 10 сек	95°C – 3 сек 60°C – 12 сек 60°C – 12 сек

Данные по оптимальной концентрации ионов магния были предоставлены ООО «Люмэкс-Маркетинг» [25]. Проводили поиск оптимальной концентрации хлорида магния, используя смеси для реакции с содержанием $MgCl_2$ 1-4 мМ. Оптимальная концентрация хлорида магния составляла 3 мМ, что позволило повысить эффективность связывания праймеров с матрицей ДНК вирусов без потери специфичности.

Проводили оценку специфичности полученных тест-систем. Отмечали отсутствие положительной реакции с гетерологичными вирусами рыб в ОТ-ПЦР-РВ, что свидетельствовало о специфичности разработанных тест-систем по отношению к выявляемым вирусам (ИНГТ, ВГС, ВВК).

Проводили оценку аналитической чувствительности разработанных тест-систем. Результаты исследования представлены в таблице 6.

По результатам исследования минимальная детектируемая концентрация РНК вирусов ИНГТ, ВГС и ВВК составляла 1,25 нг/мл с титром накопления вируса 1,5 $lg TЦД_{50}/cm^3$. Полученные данные указывали на возможность применения метода для выявления данных вирусов в пробах патологического материала рыб с низкими значениями титра инфекционной активности.

Таблица 6 – Оценка аналитической чувствительности разработанных тест-систем на основе метода ОТ-ПЦР-РВ для выявления вирусов ИНГТ, ВГС и ВВК

Титр накопления вируса, $lg TЦД_{50}/cm^3$	Концентрация РНК вируса, нг/мл	Исследование разработанных тест-систем методом ОТ-ПЦР-РВ с применением чипов для выявления вируса		
		ИНГТ	ВГС	ВВК
4,0	400	+	+	+
3,0	40	+	+	+
2,0	4	+	+	+
1,6	1,50	+	+	+
1,5	1,25	+	+	+
1,4	1	-	-	-

Для оценки эффективности амплификации тестировали десятикратные разведения РНК вирусов ИНГТ, ВГС и ВВК в трех повторах, получали средние

значения порогового цикла амплификации (C_t) и определяли эффективность реакции амплификации. Результаты исследования отражены в таблице 7.

Таблица 7 - Эффективность амплификации фрагментов гена N вирусов ИНГТ, ВГС и ВВК в ОТ-ПЦР-РВ с применением ПЦР-чипов (n=3)

Тест-система для выявления вируса	b	k	E	E, %
ИНГТ	40,01±0,47	-3,37±0,10	1,980	98,0
ВГС	44,52±0,34	-3,33±0,09	1,995	99,5
ВВК	39,96±0,44	-3,36±0,08	1,984	98,4

Примечание: k, b - коэффициенты, E – эффективность амплификации

Из таблицы 7 следует, что разработанные тест-системы имели высокие значения эффективности амплификации – 98,0 – 99,5%. С помощью разработанной тест-системы методом ОТ-ПЦР-РВ с применением диагностических ПЦР-чипов в 2014-2015 гг. было исследовано по 500 проб патологического материала от рыб, отрицательных по ИНГТ, ВГС, ВВК на основе данных вирусвыделения (ВВ), ИФА, РИФ и ОТ-ПЦР. Также тестировали по 50 образцов биоматериала, инфицированных вирусами ИНГТ, ВГС, ВВК, соответственно. Из них по 5 положительных проб, отобранных на территории РФ в 2004-2014 гг., с титрами накопления 4,0-5,0 lg ТЦД₅₀/см³ и по 45 образцов культурального вируса ИНГТ, ВГС и ВВК с титрами накопления 1,5-4,0 lg ТЦД₅₀/см³. Пробы патматериала были отобраны из рыбоводческих хозяйств на территории Республики Карелия, Краснодарского края, Мурманской, Ленинградской, Псковской, Ростовской, Астраханской и др. областей РФ. Результаты исследования отражены в таблице 8.

Таблица 8 - Диагностическая чувствительность и специфичность разработанных тест-систем для выявления вирусов ИНГТ, ВГС и ВВК методом ОТ-ПЦР-РВ с применением ПЦР-чипов (n=3)

Диагностическая тест-система для выявления вируса	Положительные пробы					Se, %	Отрицательные пробы					Sp, %
	ВВ	ИФА	РИФ	ОТ-ПЦР	ОТ-ПЦР-РВ		ВВ	ИФА	РИФ	ОТ-ПЦР	ОТ-ПЦР-РВ	
ИНГТ	50	50	50	50	50	100	500	500	500	500	499	99,8
ВГС	50	50	50	50	50	100	500	500	500	500	498	99,8
ВВК	50	50	50	50	50	100	500	500	500	500	498	99,6

Как следует из таблицы 8, в результате исследования 50 инфицированных образцов вирусы ИНГТ, ВГС и ВВК были обнаружены во всех пробах. Таким образом, в данном исследовании диагностическая чувствительность разработанных тест-систем составила 100 %.

Из 500 проб, отрицательных по результатам вирусвыделения, ИФА, РИФ и ОТ-ПЦР на ВВК, ВГС, в ОТ-ПЦР-РВ по 498 проб были определены в качестве отрицательных, на ИНГТ – 499. Остальные пробы были определены в качестве

сомнительных. Следовательно, в данном исследовании диагностическая специфичность разработанных тест-систем составила 99,6-99,8 %.

Разработанные ПЦР-чипы удобны в эксплуатации. Для работы достаточно внести пробы в микрореакторы и начать реакцию, что упрощает процедуру анализа. За счет оптимизации режима термоциклирования и совмещения в одном микрореакторе обратной транскрипции и ПЦР время проведения анализа сокращается до 1 часа. Кроме того, данные тест-системы и амплификатор «АриаDNA» (ООО «Люмэкс-Маркетинг») для проведения ОТ-ПЦР-РВ отечественного производства, поэтому их стоимость дешевле по сравнению с зарубежными аналогами.

Разработанные тест-системы применяются в ФГБУ «ВНИИЗЖ», а также могут найти применение в лабораториях рыбоводческих хозяйств нашей страны для скрининговых исследований патологического материала на вирусные болезни рыб (ИНГТ, ВГС, ВВК). Их применение даст возможность с высокой степенью достоверности выявлять возбудителей на ранних стадиях болезни. Такой подход позволит своевременно принять меры по защите здоровой рыбы и, как следствие, снизить экономический ущерб рыбоводческих хозяйств.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

3.1 Выводы

1. Оптимизированы условия получения культурального антигена вируса ИНГТ с концентрацией после очистки 0,7-2,0 мг/мл и титром накопления 7,0-8,5 lg ТЦД₅₀/см³ для дальнейшего получения вирусспецифичных сывороток и моноклональных антител.

2. Получены и охарактеризованы 18 гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к белкам вируса ИНГТ. Для разработки диагностических тест-систем выбраны 2 препарата: против N- и G-белка вируса ИНГТ, с концентрациями 28,1 и 54,6 мг/мл и активностью в ИФА 1:192000 и 1:384000, соответственно.

3. Определены оптимальные параметры получения латексных препаратов для выявления вируса ИНГТ – глицин-солевой буферный раствор с ионной силой 5,0 мМ и рН 7,0, латексы с диаметром микросфер 340 нм и концентрацией -NH₂ групп 1,98 мкг-экв/м²; концентрация сенсibiliзирующих антител – 1 мг/мл, стабилизатор – (2-оксизтил)-триметиламмония хлорид 50 мМ, позволяющий хранить латексные препараты сроком не менее 9 месяцев.

4. Разработан экспресс-метод РАЛ для выявления вируса ИНГТ с применением поликлональных и моноклональных антител. Чувствительность и специфичность тест-системы на основе поликлональных антител составила 99,0 и 98,2%, соответственно, с аналитической чувствительностью 3,11 lgТЦД₅₀/см³. Чувствительность и специфичность тест-системы на основе моноклональных антител составила 92,0 и 99,2%, соответственно, с аналитической чувствительностью 3,20 lgТЦД₅₀/см³.

5. Разработан метод ОТ-ПЦР-РВ с применением диагностических ПЦР-чипов для выявления вирусов ИНГТ, ВГС и ВВК. Диагностическая чувствительность

разработанных тест-систем составила 100%, диагностическая специфичность – 99,6-99,8%. Аналитическая чувствительность – 1,25 нг/мл и 1,5 IgТЦД₅₀/см³.

6. Разработанные методы апробированы при диагностических исследованиях 550 проб патматериала рыб, отобранных в 80 рыбохозяйствах Северо-Западного, Центрального и Южного округов РФ в 2014-2015 гг. Результаты исследования, полученные с помощью разработанных методов РАЛ и ОТ-ПЦР-РВ, подтверждены с помощью классических методов диагностики вирусных болезней рыб.

Таким образом, в результате проделанной работы поставленные задачи были выполнены. Разработанные в ходе проведенных исследований методы применяются в ФГБУ «ВНИИЗЖ».

3.2 Практические предложения. Депонированные в КШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» штамм «Аланд» вируса ВГС (диагностический) и штамм «Яяла» вируса ВВК (диагностический) 08 апреля 2015 года и 05 августа 2015 года, соответственно, используются в референтной лаборатории болезней аквакультуры для научно-исследовательских и диагностических целей.

Разработаны «Методические рекомендации по вирусвыделению из патологического материала рыб на культуре клеток» (утверждены в ФГБУ «ВНИИЗЖ» 20 декабря 2013 г.), «Методические рекомендации по выявлению вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани лососевых в реакции агглютинации латекса» (утверждены в ФГБУ «ВНИИЗЖ» 17 июня 2015 г.), «Методические рекомендации по выявлению вирусов рыб в обратно транскриптазной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) с применением диагностических ПЦР-чипов» (утверждены в ФГБУ «ВНИИЗЖ» 09 октября 2015 г.).

3.3 Перспективы дальнейшей разработки темы. Одним из основных направлений разработки данной темы является расширение диагностических возможностей разработанных ПЦР-чипов, которое заключается во включении в имеющийся чип новых тест-систем, позволяющих выявлять другие вирусные заболевания (инфекционный некроз поджелудочной железы, инфекционную анемию лососевых, герпесвирусные болезни и др.), а также бактериальные болезни рыб (аэромоназ и др.) на территории РФ в связи с опасностью их распространения.

Вторым аспектом является разработка экспресс-метода РАЛ для выявления антител против вируса ИНГТ в сыворотках крови рыб при проведении ретроспективной диагностики, что позволит контролировать иммунный статус аквакультуры и обеспечит биозащиту рыбоводных хозяйств.

Третье важное направление – применение полученных моноклональных антител против антигенов вируса ИНГТ в качестве основы при разработке высокочувствительного и специфичного ТФ сэндвич-варианта ИФА и РПИФ.

4 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОТ-ПЦР-РВ – обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РПИФ – реакция прямой иммунофлуоресценции

ТФ ИФА – твердофазный иммуноферментный анализ

ТЦД₅₀ – тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток

ЦПД – цитопатическое действие

BSA – бычий сывороточный альбумин

FAM - карбоксифлуоресцеин

5 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Апасова, Л.Ю. Вирусовыделение возбудителя инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых / Л.Ю. Апасова, С.С. Рыбаков // Ветеринарна медицина. – Харьков, 2008. - Вып. 90. - С. 38-46.
2. Апасова, Л.Ю. Применение непрямого варианта иммуноферментного анализа для выявления вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых / Л.Ю. Апасова, С.С. Рыбаков // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2010. – Т. 8. – С. 204-214.
3. Волков, М.С. Применение латексных антигенов в диагностике микоплазмозов птиц / М.С. Волков, В.Н. Ирза, Т.Ю. Черняева // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2011. – Т. 9. – С. 228-236.
4. Завьялова, Е.А. Цитоморфологическая характеристика культур клеток рыб и их чувствительность к некоторым вирусам: автореф. дис. канд. биол. наук / Завьялова Елена Александровна. - М., 2006. – 25 с.
5. Назаров, Н.А. Латекс агглютинационный тест для диагностики бешенства животных / Н.А. Назаров, С.С. Рыбаков, А.Е. Метлин // Ветеринария. - 2013. - №6. - С. 56-61.
6. Очистка и концентрирование вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб / Л.Ю. Апасова, Н.В. Мороз, С.С. Рыбаков, Т.Б. Ефремева // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2009. – Т.7. – С. 234-239.
7. Пичугина, Т.Д. Влияние вирусных инфекций на развитие аквакультуры в России / Т.Д. Пичугина, Е.А. Завьялова // Ветеринарна медицина. – Харьков, 2005. - Вып. 85. – С. 906-912.
8. Полимеразная цепная реакция в диагностике вирусных болезней рыб / Е.А. Завьялова, Н.Ю. Кандрина, Н.Ф. Ломакина, М.И. Гулюкин // Ветеринарна медицина. – Харьков, 2011. – Вып. 95. – С. 59-60.
9. Сошникова, Л.А. Многомерный статистический анализ / Л.А. Сошникова, В.Н. Тамашевич. - М.: Юнита-Дана, 1999. – 350 с.
10. Щелкунов И.С. Эпизоотическая ситуация по вирусным болезням культивируемых рыб / И.С. Щелкунов // Ветеринария. – 2006. - №4. – С. 22-25.
11. Щелкунов, И.С. Получение постоянных клеточных линий рыб: практические советы / И.С. Щелкунов, Т.И. Щелкунова // Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры. - М.: ВНИИПРХ, 2002. – Вып. 78. – С. 179 – 187.
12. Эпизоотологический мониторинг заболеваний рыб в РФ / М.И. Гулюкин, М.Н. Борисова, Т.Д. Пичугина [и др.] // Ветеринарна медицина: материалы междунар. научно-

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

13. An isolate and sequence database of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) / S.P. Jonstrup, H. Schuetze, G. Kurath [et al.] // *J. Fish Dis.* – 2010. – Vol. 33, № 6. – P. 469-471.

14. Genetic and serological typing of European infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates / T. Johansson, K. Einer-Jensen, W. Batts [et al.] // *Dis. Aquat. Org.* – 2009. – № 86. – P. 213–221.

15. Kohler, G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Kohler, C. Milstein // *J. Nature.* – 1975. – Vol. 256. – P. 495–499.

16. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680-685.

17. Liu, Z. Simultaneous detection of three fish rhabdoviruses using multiplex real-time quantitative RT-PCR assay / Z. Liu, Y. Teng, H. Liu [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2008. – Vol. 149. – P. 103–109.

18. Molina-Bolivar, J.A. Latex immunoagglutination assays / J.A. Molina-Bolivar, F. Galisteo-Gonzalez // *J. Macromolecular Sci. Part C-Polymer Reviews.* – 2005. – Vol. 45. – P. 59-98.

19. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Aquatic Animals. - 16th ed. - Paris, 2012. - P. 300-313.

20. Overturf, K. Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids / K. Overturf, S. LaPatra, M. Powell // *J. Fish Dis.* – 2001. – №24. – P. 325–333.

21. Ristow, S.S. Monoclonal antibodies to the glycoprotein and nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) reveal differences among isolates of the virus by fluorescence, neutralization and electrophoresis / S.S. Ristow, J.M.A. Avila // *Dis. Aquat. Org.* – 1991. – № 11. – P. 105–115.

22. Rudakova, S.L. Occurrence and genetic typing of infectious hematopoietic necrosis virus in Kamchatka, Russia / S.L. Rudakova, G. Kurath, E.V. Bochkova // *Dis. Aquat. Org.* – 2007. – № 75. – P. 1–11.

23. Universal reverse-transcriptase real-time PCR for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) / M.K. Purcell, R.L. Thompson, K.A. Garver [et al.] // *Dis. Aquat. Organ.* – 2013. – Vol. 106, № 2. – P. 103-115.

24. Williams, K. Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses / K. Williams, S. Blake, A. Sweeney [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – №37. – P. 4139-4141.

25. www.lumex.ru. – Методики.

6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Метод латекс-агглютинации для выявления антигенов вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых / М.И. Доронин, В.А. Пыльнов, С.С. Рыбаков, Н.А. Назаров // *Ветеринария.* - 2014. - №9. - С. 56-61.

2. Доронин, М.И. Метод латекс-агглютинации для выявления антител к вирусу инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб / М.И. Доронин, В.А. Пыльнов, С.С. Рыбаков // Вестник Удмуртского государственного университета. – 2015. – №2. – С. 135-144.

3. Доронин, М.И. Поиск оптимальных условий для выявления вируса ИНГТ лососевых рыб в реакции агглютинации латекса / М.И. Доронин, В.А. Пыльнов // Проблемы и перспективы развития современной науки: социально-экономические, естественно-научные исследования и технический прогресс: 3 Всерос. научно-практ. конф. – Секция «Научные исследования и разработки в области естественных наук». – Ростов-на-Дону, 2015. – С. 48-55.

4. Доронин, М.И. Влияние физико-химических факторов на стабильность латексных препаратов для выявления антигенов вируса ИНГТ лососевых / М.И. Доронин, В.А. Пыльнов, Д.К. Павлов // Инновационный вектор развития в условиях риска и неопределенности: новые задачи и пути их решения в экономике, проектном менеджменте, химии, биологии, медицине, психологии и др.: Междунар. научно-практ. конф., 30-31 марта 2015 г. - Санкт-Петербург, 2015. – С. 28-33.

5. Доронин, М.И. Реакция агглютинации латекса для быстрого выявления антител к вирусу ИНГТ лососевых рыб / М.И. Доронин, В.А. Пыльнов, С.С. Рыбаков // Ветеринария сегодня. – 2015. – №2 (13). – С. 48-53.

6. Доронин, М.И. Изучение культуральных свойств штамма «Аркус 32/87» и изолята «Воронин 14/08» вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых / М.И. Доронин, В.А. Пыльнов // Тенденции развития естественных и гуманитарных наук: сб. материалов 8 Всерос. научно-практ. конф. - Санкт-Петербург, 2015. - №1. – С. 95-102.

7. Иммунохимическое исследование вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб с помощью моноклональных антител / М.С. Попонова, Ф.А. Бровко, А.О. Шепеляковская, Х.М. Бозиев, В.А. Пыльнов, М.И. Доронин // Биология – наука XXI века: 18 Междунар. школа-конф. молодых ученых, 21-25 апреля 2014г. – Пушкино, 2014. – С. 36-37.

8. Доронин, М.И. Разработка метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб М.И. Доронин, В.А. Пыльнов, Н.С. Мудрак // Научный альманах. – 2015. – №8 (10). - С. 1052-1057.

9. Пыльнов, В.А. Разработка метода ПЦР-РВ для диагностики вирусных болезней рыб / В.А. Пыльнов, М.М. Никитин, М.И. Доронин, Е.В. Котова // Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: сб. материалов 4 Междунар. научно-практ. конф. – Борок, 2015. – С. 214-215.

Подписано в печать 14.10.2015 г.

Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л.1.

Тираж 80 экз

Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ
«Федеральный центр охраны здоровья животных».