

УДК 639.3.091:619:578

На правах рукописи



004602343

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. Igorevich'.

Щелкунов Артем Игоревич

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ГЕРПЕСВИРУСА СИБИРСКОГО ОСЕТРА**

03.02.02 - вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

20 МАЯ 2010

Покров - 2010 г.

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийском научном исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии (ГНУ ВНИИВВиМ) РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ и Федеральном государственном унитарном предприятии “Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства” (ФГУП “ВНИИПРХ”) Федерального агентства по рыболовству

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник

Балышева Вера Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Пономарев Виктор Николаевич

кандидат биологических наук

Пыльнов Владимир Александрович

Ведущее учреждение: Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ (ГНУ ВИЭВ, г. Москва)

Защита состоится 27 мая 2010 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 006.003.01 при Государственном научном учреждении Всероссийском научном исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии (ГНУ ВНИИВВиМ) РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ по адресу: 601120, г. Покр Владимирской области, ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ. Тел./факс (49243) 62125

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГНУ ВНИИВВиМ

Автореферат разослан “22” апреля 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.А. Балашова

1 Общая характеристика работы

1.1 Актуальность темы

Промышленному выращиванию осетровых рыб уделяется возрастающее внимание во всем мире. Это обусловлено, с одной стороны, угрозой исчезновения ценных видов осетровых рыб, а с другой, - значительным увеличением спроса на деликатесную продукцию – икру и мясо осетровых.

Вместе с тем опыт показывает, что интенсификация аквакультуры сопряжена с появлением ряда негативных факторов, одним из главных среди которых являются болезни объектов разведения. Как и в аквакультуре в целом, основной ущерб осетроводству наносят вирусные болезни [Hedrick et al., 2001].

Первые работы по изучению вирусных болезней осетровых рыб были выполнены в США Р. Хедриком в середине 80-х годов прошлого столетия, в лаборатории которого получены первые линии клеток белого осетра и впервые выделены вирусы осетровых рыб. На сегодня у североамериканских видов осетровых обнаружено 10 разных вирусов, наиболее опасными из которых являются: аденовирус, иридовirus и два герпесвируса белого осетра [Hedrick et al., 1985; Watson et al., 1995; Georgiadis et al., 2000]. Эти вирусы вызывают болезни у мальков и сеголетков белого осетра, которые обычно развиваются весной или в начале лета, реже - осенью.

Осетроводство в России в последние годы становится одной из наиболее перспективных отраслей аквакультуры. В результате обследований культивируемых осетровых рыб вирусных агентов до последнего времени обнаружено не было [Щелкунов И.С., 2000; 2006].

Весной 2006 г. на племенном рыболовном предприятии - Конаковском заводе товарного осетроводства (КЗТО, Тверская обл.) наблюдали массовую гибель сеголетков сибирского осетра, *Acipenser baeri*, которая в отдельных партиях доходила до 100%. Аналогичные вспышки болезни регистрировали позднее в других осетровых хозяйствах.

Исключение паразитов и бактерий как возможных возбудителей указывало на необходимость проведения исследований по установлению роли вирусов в этиологии этой болезни.

1.2 Цель и задачи исследований

Целью данной работы явилось установление этиологии выявленной опасной болезни российских осетровых рыб и изучение биологических, физико-химических и

молекулярно-генетических свойств возбудителя.

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие задачи:

- установить роль вирусов в этиологии болезни;
- изучить клиническую, патологоанатомическую картину и эпизоотологические особенности болезни;
- изучить биологические, морфологические, физико-химические и молекулярно-генетические свойства выделенного вируса;
- оптимизировать технологические параметры культивирования вируса;
- разработать высокочувствительный метод выделения вируса;
- провести паспортизацию и депонирование выделенного вируса в музей микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ.

1.3 Научная новизна

Впервые диагностирована вирусная болезнь у осетровых рыб в России и выделен вирус-возбудитель от неамериканских видов осетровых рыб.

Изучены биологические, морфологические, физико-химические и молекулярно-генетические свойства выделенного вируса.

Показано тесное генетическое родство выделенного вируса североамериканскими изолятами герпесвируса осетровых рыб второго типа (AcIHV-2).

1.4 Практическая значимость

Описана опасная вирусная болезнь российских осетровых рыб.

Разработан высокочувствительный метод выделения герпесвируса из клинического материала от рыб и подана заявка на его патентование (№ 2009118870 от 20.05.2009).

Получена гипериммунная антисыворотка сибирского осетра с высокими титрами нейтрализующих антител к возбудителю болезни.

Определены технологические параметры культивирования герпесвируса.

Возбудитель болезни и антисыворотка к нему паспортизированы и депонированы в музее микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ (инв. № 2780 и 2780а, соответственно) и используются при проведении НИР и диагностических исследований.

1.5 Основные положения, выносимые на защиту:

- выявление опасной болезни молоди российских осетровых рыб, имеющей вирусную природу и представляющей серьезную угрозу отечественному осетроводству;

- биологические, морфологические, физико-химические и молекулярно-генетические свойства вируса-возбудителя болезни позволяющие отнести его к герпесвирусу осетровых рыб 2 типа семейства *Alloherpesviridae* порядка *Herpesvirales*;
- оптимизированные технологические параметры культивирования герпесвируса;
- высокочувствительный метод выделения герпесвируса с использованием эксплантатов покровных тканей исследуемых рыб, увеличивающий содержание вируса в клиническом материале в 100 и более раз и повышающий частоту его выделения от рыб по сравнению с традиционным методом.

1.6 Апробация и публикация результатов работы

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях Ученого Совета ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии в 2006-2009 г.г.; Международном симпозиуме “Тепловодная аквакультура и биологическая продуктивность водоемов аридного климата” (16-18 апреля 2007 г., г. Астрахань); Международной научно-практической конференции “Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел” (9-10 октября 2008 г., г. Москва); Третьей двусторонней российско-американской конференции “Здоровье водных животных” (12-20 июля 2009 г., г. Шефердстаун, шт. Западная Вирджиния, США).

Основные результаты диссертации опубликованы в 9 научных работах, в том числе: 2 статьи в журналах по перечню ВАК, 1 статья в центральном зарубежном журнале, 2 статьи в сборниках научных трудов (1 из них в зарубежном), 4 - в материалах научных конференций.

1.7 Личный вклад

Все разделы диссертационной работы выполнены автором самостоятельно.

Исследования проведены в лабораториях ихтиопатологии ФГУП “ВНИИПРХ”, “Здоровье гидробионтов” и “Биология и культивирование вирусов” ГНУ ВНИИВВиМ.

Автор выражает глубокую признательность за оказание консультативной и научно-методической помощи сотрудникам лаборатории морфологии микроорганизмов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, г. Москва при изучении морфологии и морфогенеза герпесвируса, сотрудникам кафедры медицины и эпидемиологии Калифорнийского университета США - при проведении молекулярно-

генетического анализа вирусной ДНК, сотрудникам лаборатории “Конструирование биопрепаратов” ГНУ ВНИИВВиМ - при проведении работы по лиофилизации герпесвируса сибирского осетра и антисыворотки к нему.

1.8 Объем и структура работы

Диссертация изложена на 137 страницах, иллюстрирована 18 таблицами, рисунками и дополнена 4 приложениями. Список используемой литературы включает 206 источников, из которых 195 - иностранные.

2 Собственные исследования

2.1 Материалы и методы

Рыба: сибирский и русский осетры, стерлядь, белуга, бестер, гибрид русск осетр x ленский осетр, гибрид стерлядь x бестер, карп и радужная форель получены рыбоводных хозяйств России и Казахстана.

Кролики – беспородные серые, получены из хозяйства Владимирской обл.

Культуры клеток. Перевиваемые линии клеток рыб: пула печени, почки селезенки (SSO-1, SSO-2, SSO-3) и плавников (SSF-1, SSF-2) сибирского осетра [Щелкунова и др., 1997]; кожи белого осетра (WSSK-1) [Hedrick et al., 1991]; хвостового стебля синезаберного солнечника (BF-2) [Wolf, Quimby, 1967]; плавников (CTF, CTF и яичников (ICO) неполовозрелого карпа [Shchelkunov et al., 1995]; эпидермальных новообразований большого оспой карпа (EPC) [Fijan et al., 1983]; хвостового стебля черного толстоголова (FHM) [Gravell, Malsberger, 1965]; эмбриона чавычи (CHSE-2) [Nims et al., 1970]; гонад радужной форели (RTG-2) [Wolf, Quimby, 1960]; артериальной луковицы мозамбикской тилапии (TmB) [Lewis, Marks, 1985]. SSO-1, SSO-2, SSC SSF-1, SSF-2, CTF, CTF/T и ICO получены в лаборатории ихтиопатологии ФГУ “ВНИИПРХ”. Остальные клеточные линии были любезно предоставлены зарубежными коллегами.

Перевиваемые линии клеток почки теленка (MDBK/EC) и почки зеленых маршанки (VERO), первичная культура клеток фибробластов эмбрионов кур (ФЭ) получены из “Лаборатории культур клеток с музеем штаммов” ГНУ ВНИИВВиМ.

Питательные среды, растворы и сыворотки: среда Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (2MEM), среда 199, сыворотка крови плода коровы (СПК), раствор трипсина (0,25%), раствор версена (0,02%), 1M Непес-буфер (pH 5,5; (

7,0; 7,5; 8,5), трис-НСl буфер с рН 8,0. Питательные среды: МПБ, МПА, Сабуро.

Криопротекторы при лиофилизации: обезжиренное молоко, пептон:лактоза:желатин (20%:20:2%), СПК.

Праймеры: комплементарные последовательностям участка гена ДНК-полимеразы - HV 5'-CGG AAT TCT AGA YTT YGC NWS NYT NTA YCC-3' и Cons 5'-CCC GAA TTC AGA TCT CNG TRT CNC CRT A-3'; комплементарные последовательностям участка гена терминазы - TermF2 5'-GCM MGR GGA CAG AWC CCM G-3' и Tersal-3Rdeg 5'-GGT GCA CAC RCC MAD IGA CG-3' [Kurobe et al., 2008].

Культивирование перевиваемых клеточных линий рыб и теплокровных животных проводили согласно рекомендациям, описанным авторами для каждой линии.

Вирусологические методы. Отбор и обработку патологического материала, выделение вируса из патологического материала, накопление вируса в культурах клеток, экспериментальное воспроизведение заболевания, титрование вируса в культурах клеток проводили согласно принятым методам [Метод. указания по идентификации вирусов и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб, 1998]. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча.

Изучение влияния физических и химических факторов и условий хранения на инфекционную активность вируса проводили по общепринятым в вирусологии методам [Лярски, 1980; Ahne, 1982].

Получение гипериммунных антисывороток. Антисыворотки получали гипериммунизацией кроликов культуральным герпесвирусом, сконцентрированным с помощью ПЭГ 6000 в 500-800 раз и инактивированным 0,4% формалином (одна внутримышечная с полным адьювантом Фрейнда и две внутривенных инъекции), и после однократной внутрибрюшинной инъекции двухгодовикам-реконвалесцентам сибирского осетра культурального вируса ($10^{5,63}$ ПЦД₅₀/рыба) через 152 суток после заражения.

Титр вируснейтрализующих антител в сыворотках крови определяли в реакции нейтрализации в культуре клеток SSO-2 по общепринятой методике [Лярски, 1980; Метод. указ. по идентификации вирусов и лаб. диагностике вирусных болезней рыб, 1998].

Тестирование герпесвируса сибирского осетра на контаминацию посторонними микроорганизмами проводили по ГОСТу 28085 высевом на

питательные среды МПБ, МПА, Сабуро.

Электронно-микроскопические исследования. Образцы ткан экспериментально зараженных сеголетков сибирского осетра и зараженной культу клеток SSF-2 фиксировали по Ито и Карновскому [Ito, Karnovsky, 1968], обезживали спиртах восходящей концентрации и заливали в метакрилатную заливочную среду I White (PLANO W. Plannet GmbH). Ультратонкие срезы контрастировали цитрат свинца по Рейнолдсу [Reynolds, 1963] и исследовали в электронном микроскопе п инструментальном увеличении 20000-40000х.

Молекулярно-генетические исследования. Тотальную ДНК из клеток лин SSO-2, зараженной тремя вирусными изолятами (SK1/0406, SK2/0506 и BK/0506) выделяли с помощью коммерческого набора “РИБО-преп” ЦНИИ эпидемиолог Роспотребнадзора. Выделенную ДНК использовали для ПЦР-амплификации фрагмент двух вирусных генов – ДНК-полимеразы и терминазы. Амплифицированные фрагмент клонировали в бактериальном векторе *E. coli*, штамм DH5 α , секвенировали выравнивали в сравнении с последовательностями североамериканских штамм герпесвирусов осетровых рыб с использованием прикладной программы Clustal [Thompson et al., 1994]. Филогенетический анализ последовательностей проводили помощью программы Phylip [Felsenstein, 1990].

Статистические методы. Статистическую обработку полученных данн проводили общепринятыми методами [Лакин, 1990].

2.2 Результаты исследований

2.2.1 Выделение вируса от естественно больных рыб

Во время вспышки болезни среди сеголетков сибирского осетра на КЗТО образцов пораженных тканей ротового аппарата и жабр в клеточных линиях SSO SSF-2 и WSSK-1 был выделен цитопатогенный агент (изоляты SK1/0406, SK2/0506 BK/0506). Содержание выделенного агента в тканях рыб находилось на высоком уровне (10^6 - 10^7 ТЦД₅₀/г ткани). Было сделано предположение о его вирусной природе.

Электронно-микроскопическое исследование препаратов зараженной культу клеток SSF-2 позволило выявить в ядрах инфицированных клеток скопления пустых заполненных нуклеиновой кислотой капсидов вируса икосаэдрической форм диаметром около 100 нм. В цитоплазме и межклеточном пространстве присутствова

многочисленные зрелые вирионы диаметром 200-250 нм, покрытые внешней оболочкой и содержащие электроноплотный тегумент между нею и нуклеокапсидом (рис. 1). Выявленное строение и особенности морфогенеза вируса характерны для представителей семейства *Alloherpesviridae* порядка *Herpesvirales*.

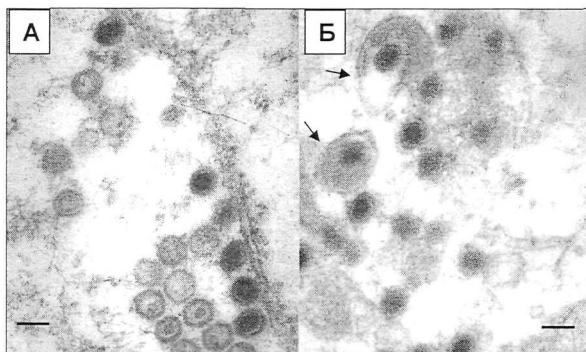


Рис. 1. Электронные микрофотографии частиц герпесвируса сибирского осетра в клетках зараженной культуры SSF-2

Пустые и заполненные нуклеиновой кислотой капсиды герпесвируса в ядре (А) и зрелые вирионы с внешней оболочкой (показаны стрелками) в межклеточном пространстве (Б). Масштабная линейка - 100 нм.

Для доказательства этиологической роли выделенного вируса было проведено экспериментальное заражение здоровых сеголетков сибирского осетра методом ванн.

Через 14 суток гибель экспериментально зараженных рыб составила 100%. Погибающая рыба имела типичные признаки болезни, наблюдавшейся в условиях КЗТО. Вирус реизолирован из разных органов и тканей экспериментально зараженных рыб.

Результаты проведенных исследований подтвердили предположение о вирусной природе болезни осетровых рыб на Конаковском заводе товарного осетроводства.

2.2.2 Биологические свойства герпесвируса сибирского осетра

Патогенность герпесвируса для сибирского осетра разного возраста. При экспериментальном заражении методом ванн ($4,70 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, экспозиция 1 ч) первые признаки заболевания у сеголетков отмечались спустя примерно 6 дней. Гибель 2-месячных рыб начиналась через 9 суток после заражения, 3-месячных – 12 суток, а двухгодовиков – 28 суток. Гибель сеголетков составила 100% (2-месячных - на 14 сутки, а 3-месячных - на 20 сутки). Среди зараженных двухгодовиков погибло 36,4% рыб (рис. 2). Погибающая рыба имела типичные признаки болезни.

Сеголетки сибирского осетра, подсаженные к последнему оставшемуся месячному большому осетру, также заболели и погибли через 12 – 17 дней.

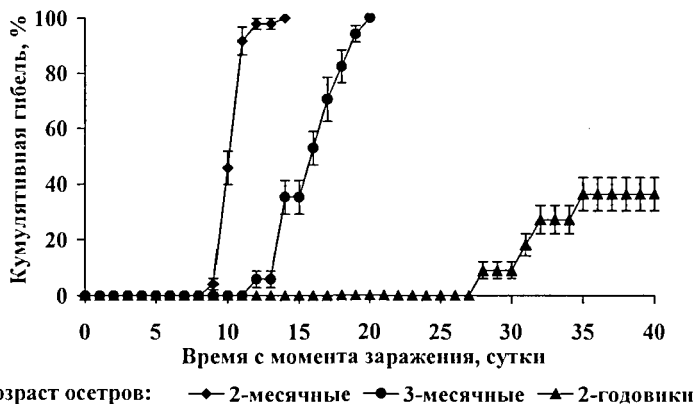


Рис. 2. Динамика гибели сибирского осетра разного возраста при заражении герпесвирусом методом ванн

Установлено, что с возрастом восприимчивость сибирского осетра к инфекции снижается. Так, кумулятивная гибель двухгодовиков достоверно ниже, чем сеголеток ($P < 0,001$). Двух- и трехмесячные осетры хотя и не различались между собой по кумулятивной гибели (100% в обеих группах), но достоверно отличались по среднему времени выживания, которое существенно увеличивалось с $10,63 \pm 0,84$ суток у месячных до $16,18 \pm 2,24$ у 3-месячных осетров и возросло до $31,50 \pm 2,89$ двухгодовиков. Дисперсия среднего времени выживания также увеличивалась с возрастом, что свидетельствовало о снижении остроты течения болезни.

Патогенность герпесвируса для молоди карпа и радужной форели. Вирус вызывал заболевания мальков карпа и сеголетков радужной форели при заражении методом ванн и не был выделен от них, а подсаженные к ним сеголетки сибирского осетра не болели. Это свидетельствует о невосприимчивости карпа и форели к данному вирусу и их неспособности передавать инфекцию.

Клиническая и патологоанатомическая картина герпесвирусной болезни сибирского осетра. У 2-месячных сеголетков сибирского осетра спустя 6 суток после экспериментального заражения отмечали угнетение и отказ от корма. На 10-11 сутки к коже появлялись мелкие (от < 1 до 3-4 мм в диаметре) дымчато-голубоватые полупрозрачные бляшки, выступающие над поверхностью тела и напоминающ

скопления слизи. Бляшки с трудом снимались скальпелем, что позволило предположить, что они являются очагами гиперплазии кожного эпителия. Развивался прогрессирующий некроз плавников, в жабрах отмечали поражение концевых участков лепестков. На 11-12 сутки у больных рыб наблюдали локальные некротические поражения кожного покрова, которые являлись следствием разрушения очагов гиперплазированной ткани. Отмирающие покровные ткани обычно поражались сапролегнией. За 1 – 2 суток до гибели на теле появлялись участки гиперемированной ткани и множественные точечные кровоизлияния. Они встречались на боковых поверхностях, брюшке, хвостовом стебле, у основания плавников, под глазами и нередко в жабрах, но наиболее сильно были поражены ими нижняя сторона рострума и ротовой аппарат рыб.

У двухгодовиков сибирского осетра первые признаки болезни появлялись через 14 суток и проявлялись в угнетении, отказе от корма и изменении поведения. На 20-23 сутки наблюдали кровоизлияния на вершинах жучек. У отдельных особей на 25 сутки появлялись бляшки гиперплазированного эпидермиса. Позднее на коже больных рыб развивались язвы, количество которых со временем увеличивалось и они сливались друг с другом. Язвы имели желтоватый оттенок из-за обсеменения миксобактериями, хорошо различимыми при микроскопическом исследовании соскобов с их поверхности.

При вскрытии погибших сеголетков видна общая бледность внутренних органов. При этом печень имеет почти белый цвет. Пищеварительный тракт обычно свободен от пищевых масс, его задний отдел нередко воспален и заполнен полупрозрачным слизеподобным содержимым, имеющим желтоватый оттенок.

При вскрытии погибших двухгодовиков отмечали геморрагическое воспаление заднего отдела кишечника, в брюшной полости небольшое скопление экссудата. Печень неравномерно окрашена, почки кровенаполнены, селезенка увеличена, передний отдел плавательного пузыря увеличен, стенки его дряблые, сердце бугристое, пятнистой окраски, сердечная мышца также дряблая, легко растирается.

Содержание герпесвируса в органах и тканях экспериментально зараженных сибирских осетров. От сеголетков, погибающих с типичными признаками остро протекающей болезни, вирус выделяли из всех органов и тканей, отобранных на исследование. В то же время от двухгодовиков даже при острой форме болезни вирус из внутренних органов выделяли не всегда (таблица 1).

Таблица 1 - Содержание герпесвируса в органах и тканях экспериментально зараженных сибирских осетров \blacktriangledown (n=3)

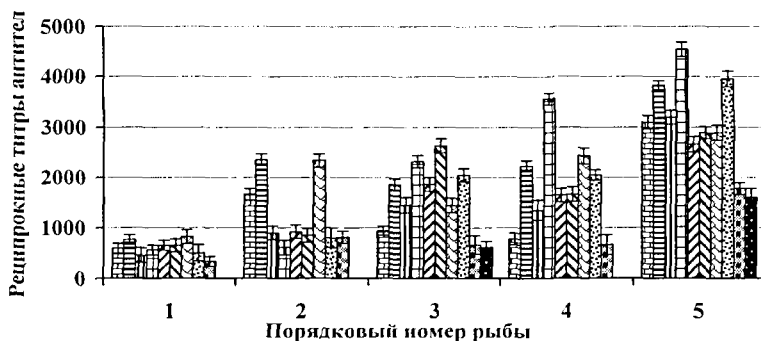
Вид пат-материала	Титр вируса, IgТЦД ₅₀ /г ткани						
	сеголетки			двухгодовики			
	1*	2*	3**	1 ^x	2 ^{xx}	3 ^{xxx}	4 ^{xxx}
слизь	8,85±0,20 [*]	8,85±0,18	8,10±0,11	7,10±0,14	8,35±0,16	6,85±0,12	н.и.
плавники	9,10±0,20	7,35±0,12	8,85±0,20	6,10±0,14	7,10±0,11	4,10±0,17	н.и.
жаб. крышки	8,35±0,11	н.и.	н.и.	5,35±0,20	4,35±0,15	3,85±0,14	н.и.
жабры	8,35±0,18	5,35±0,12	7,35±0,09	6,85±0,18	5,35±0,12	н.о.	н.и.
кожа	9,10±0,12	н.и.	н.и.	5,10±0,21	5,35±0,15	н.о.	н.и.
усы	5,35±0,14	н.и.	н.и.	5,85±0,11	н.о.	н.о.	н.и.
ротовой аппарат	8,85±0,21	7,85±0,21	7,10±0,16	5,35±0,11	4,85±0,11	3,35±0,20	н.и.
мозг	6,35±0,19	н.о.	5,10±0,13	3,85±0,20	4,35±0,16	н.и.	н.и.
печень	8,35±0,14	7,85±0,17	7,35±0,21	4,85±0,21	4,85±0,12	н.о.	н.и.
почка	7,35±0,18	6,35±0,11	5,10±0,19	н.о.	4,85±0,21	н.о.	н.и.
селезенка	6,85±0,11	5,85±0,11	4,35±0,18	н.о.	н.о.	н.о.	н.и.
сердце	н.и.	н.и.	н.и.	5,85±0,09	4,10±0,20	н.о.	н.и.
содержимое кишечника	6,35±0,14	3,35±0,16	н.о.	5,85±0,14	4,10±0,13	н.о.	н.и.

Примечание: \blacktriangledown - определено титрованием в культуре клеток SSO-2; материал отобран через: * - 10, ** - 12, ^x - 29, ^{xx} - 34, ^{xxx} - 56, ^{xxxx} - 73 суток после заражения; • - средн. геометрическая \pm среднее квадратическое отклонение; н.и. - не исследовали; н.о. - ЦТЭ обнаружен в течение 3 "слепых" пассажей.

Содержание вируса в покровных тканях рыб в большинстве случаев было высоким по сравнению с титрами его во внутренних органах этих же рыб. Особенно выделялась в этом отношении слизь с поверхности тела, как у сеголетков, так и двухгодовиков. Из внутренних органов наиболее высокое содержание вируса было печени.

Полученные данные свидетельствуют о покровно-тканевом тропизме вируса. При электронной микроскопии эпидермальных бляшек в межклеточном пространстве обнаружено большое количество зрелых оболочечных вирионов, что является дополнительным доказательством покровно-тканевого тропизма вируса.

Уровень вируснейтрализующих антител в сыворотке крови переболевших сибирских осетров. У выживших двухгодовиков сибирского осетра через 114 суток после заражения методом ванн титр вируснейтрализующих антител в сыворотках крови колебался в пределах 1:600 - 1:3000 (рис. 3). Антитела у рыб накануне заражения выявлены не были (порог детектирования 1:8).



Время после экспериментального заражения методом ванн, сутки:
 114 183 197 215 230 253 274 307 337 393

Рис. 3. Вируснейтрализующая активность сывороток крови двухгодовиков сибирского осетра после экспериментального заражения герпесвирусом методом ванн и однократной внутривентральной инъекции реконвалесцентам вирулентного вируса

Содержание герпесвируса в воде. В бассейне при температуре воды 15°C с 8-кратным водообменом в сутки, в котором находились 11 больных осетров средней массой 400 г, спустя месяц после заражения, концентрация вируса достигала $2,85 \pm 0,24 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Чувствительность к герпесвирусу разных культур клеток рыб. Все 6 линий клеток осетрового происхождения из 15 испытанных оказались чувствительными к вирусу. Из них наибольшей вирусрепродуцирующей способностью обладали клетки линии SSO-2 (таблица 2). В девяти линиях клеток неосетровой природы на протяжении трех проведенных пассажей ЦПЭ не наблюдали.

Таблица 2 - Чувствительность клеточных линий осетрового происхождения к герпесвирусу сибирского осетра (n=3)

Клеточная линия	Первые признаки ЦПЭ, сутки после заражения		Полная деструкция монослоя, сутки после заражения		Титр вируса после 3 пассажей, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$
	1 пассаж	2-3 пассаж	1 пассаж	2-3 пассаж	
SSO-1	3-4	4	14-15	19-20	$5,35 \pm 0,21$
SSO-2	2-4	2	6-7	7-9	$6,50 \pm 0,32$
SSO-3	4	4	15-17	18-20	$5,85 \pm 0,18$
SSF-1	4	5	15-16	14-15	$5,85 \pm 0,20$
SSF-2	3-4	2	7-8	9-12	$5,35 \pm 0,28$
WSSK-1	4	3	11-15	10-11	$5,85 \pm 0,30$

При заражении малыми дозами вируса ($\leq 0,0001 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл.}$) полную деструкцию монослоя наблюдали только в клетках SSO-2 и WSSK-1, тогда как в остальных культурах

ЦПЭ носил очаговый характер. Таким образом, наиболее чувствительной к вирусу оказалась линия клеток SSO-2.

По своему проявлению ЦПЭ в разных клеточных линиях несколько различался, в целом выражался в округлении клеток и отделении их от субстрата. В культурах SSF и SSO-2 помимо этого наблюдали образование симпластов.

Оптимизация условий культивирования герпесвируса. *Температура репродукции.* В результате проведенных исследований установлено, что репродукция вируса в культуре клеток SSO-2 происходит в интервале температур от 10° до 20°С. Однако динамика накопления вируса и скорость развития ЦПЭ при этих температурах различались (рис. 4). При температуре 15°С максимальный титр вируса ($5,85 \pm 0,16$ ТЦД₅₀/см³) получен на 15 сутки инкубации, в это же время наблюдалась полная деструкция клеточного монослоя. При 10°С максимальный титр отмечали на 20 сутки, тотальный ЦПЭ наблюдали только на 25 сутки. Титр вируса был на $0,50 \pm 0,14$ lg ниже чем при 15°С.

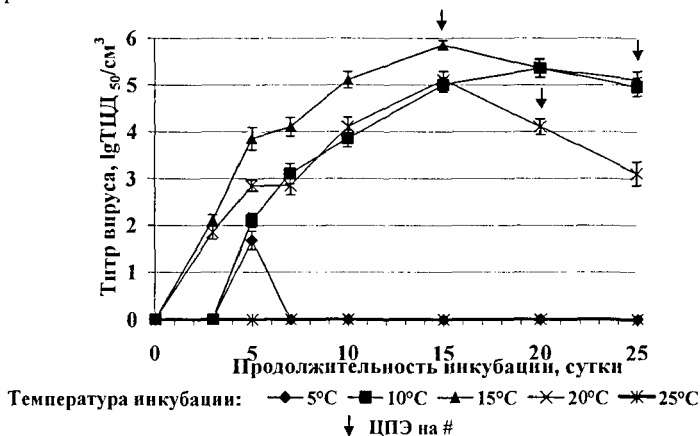


Рис. 4. Динамика инфекционной активности герпесвируса сибирского осетра в культуре клеток SSO-2 при разных температурах

Максимальный титр вируса при 20°С отмечали, как и при 15°С на 15 сутки, одна величина его была на $0,78 \pm 0,16$ lg ниже, и полного разрушения монослоя при этом не наблюдали. Тотальный ЦПЭ развивался только на 20 сутки, а титр вируса к этому времени снижался на $1,00 \pm 0,24$ lg.

Таким образом, оптимальной температурой репродукции герпесвируса является 15°С, при которой наблюдали наиболее быстрое развитие ЦПЭ и наивысший титр вирус

Множественность заражения. Множественность заражения (МЗ) в диапазоне от 1 до 0,01 ТЦД₅₀/кл. обеспечивала развитие тотального ЦПЭ на 7-12 сутки и получение вируса с инфекционной активностью $6,10 \pm 0,20 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. МЗ 1 ТЦД₅₀/кл. является избыточной, т.к. требует использования неоправданно большого количества вируса (0,1 от объема поддерживающей среды). Уменьшение МЗ до 0,00001 ТЦД₅₀/кл. достоверно не влияло на накопление вируса в культуре клеток, но приводило к замедлению (до 37 суток) развития тотального ЦПЭ. При инокуляции клеток с МЗ 0,000001 ТЦД₅₀/кл. ЦПЭ не проявлялся в течение всего срока наблюдения (40 суток). Исходя из полученных данных, оптимальной является МЗ 0,1 - 0,01 ТЦД₅₀/кл.

“Возраст” культуры клеток и процентное содержание СПК в среде. Использование культуры клеток SSO-2 в “возрасте” (время с момента посева клеток до их заражения) от 1 до 33 суток приводило к накоплению вируса до $5,85-6,35 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Однако с увеличением “возраста” культуры срок развития тотального ЦПЭ удлинялся с 10 суток для 1-2-суточной культуры до 12 суток для 14-33-суточной.

Полный ЦПЭ быстрее всего развивался при заражении клеток одновременно с посевом (за 7 суток), хотя титр вируса при этом был наименьшим ($5,10 \pm 0,12 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$).

Исследования показали, что герпесвирус накапливался практически до одинаковых титров ($5,85-6,10 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) в бессывороточной среде и среде, содержащей 2% СПК. С увеличением содержания СПК в среде до 5 - 10% титр вируса снижался с $6,10 \pm 0,20$ до $5,35 \pm 0,14 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и увеличивался срок наступления тотального ЦПЭ с 8 до 11 суток.

Таким образом, установлено, что максимальное накопление вируса обеспечивает использование 1-2-суточной культуры клеток и поддерживающей среды с 0-2% СПК.

pH среды. Репродукцию вируса отмечали во всем диапазоне испытанных значений pH среды (5,5 – 8,5). Наибольший титр ($6,36 \pm 0,18 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) был получен при pH 6,5, а наименьший - при pH 8,5 ($5,77 \pm 0,20 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$).

Влияние разных способов культивирования клеток на титр вируса. Титр вируса в культуре клеток SSO-2 повышался с $5,85 \pm 0,30 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в стационарных условиях до $6,10 \pm 0,28 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ на шейкере и $6,85 \pm 0,20 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ на роллере. При этом инкубация в условиях роллера (объем заполнения 0,1; скорость вращения 25-30 об/ч) ускоряла развитие тотального ЦПЭ до 6-7 суток вместо 8 суток в стационарных условиях.

Сохраняемость герпесвируса в патологическом материале при разных условиях хранения. При 0°C вирус сохранялся в патматериале без изменения инфекционной активности в течение первых 5 суток (рис. 5). В дальнейшем титр вируса постепенно снижался и через 26 суток уменьшился на $3,50 \pm 0,20$ lg. Еще хуже вирус сохранялся при минус 18°C (за 26 суток он снизился на $4,50 \pm 0,20$ lg). При минус 80°C не наблюдалось снижения титра вируса в течение первых 10 суток, однако через 26 суток титр вируса уменьшился на $1,25 \pm 0,20$ lg. Вирус хорошо сохранялся при 4°C в патматериале помещенном в среду 199: в течение всего срока наблюдения (26 суток) титр его практически не изменялся, а добавление в среду 10% СПК способствовало увеличению содержания вируса на $1,50 \pm 0,15$ lg спустя 10 суток хранения.

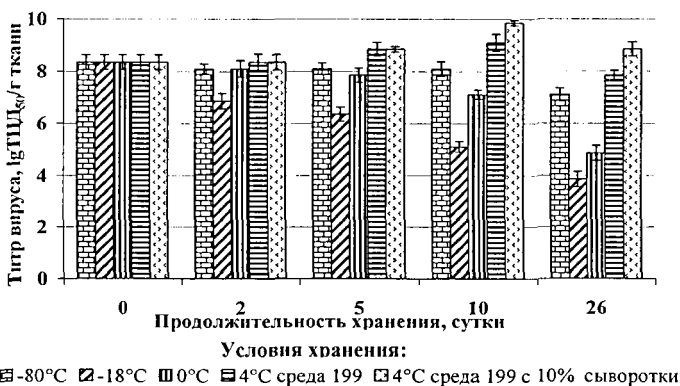


Рис. 5. Сохраняемость герпесвируса сибирского осетра в патологическом материале при разных условиях хранения

Сохраняемость культурального герпесвируса с разным содержанием СПК при 4°C
В течение 2 месяцев хранения инфекционная активность культурального вируса снижалась с $6,85 \pm 0,20$ до $6,14 \pm 0,21$ lg ТЦД₅₀/см³ независимо от содержания СПК (2, 10, 20%). Однако при дальнейшем хранении вирус быстрее инактивировался с 2% СПК, чем с 10% и 20% и полностью утрачивал инфекционность спустя еще 6 месяцев с 2% СПК тогда как с 10% СПК - спустя 7 месяцев, а с 20% СПК - 8 месяцев.

Таким образом, если предполагаемый срок хранения вируса при 4°C не превысит месяцев, его можно с успехом сохранять непосредственно в поддерживающей среде.

Срок сохранения вируса, осветленного центрифугированием (2000g, 20 мин) значительно короче, чем неосветленного. За 4 месяца хранения его инфекционность снизилась на $5,76 \pm 0,15$ lg, тогда как неосветленного - на $1,50 \pm 0,18$ lg.

Сохраняемость культурального герпесвируса с 20% СПК при разных температурах. За месяц хранения при 4°C инфекционность вируса снижалась на $0,50 \pm 0,16$ lg, тогда как при минус 18°C на $2,50 \pm 0,14$ lg. За полгода она снизилась, соответственно, на $2,00 \pm 0,21$ lg и $3,50 \pm 0,16$ lg. Через год хранения при 4°C и при минус 18°C инфекционная активность вируса не выявлена. При минус 80°C титр вируса в течение года практически не изменялся.

Следовательно, для продолжительного сохранения культуральный вирус следует хранить при минус 80°C и ниже.

Результаты тестирования герпесвируса сибирского осетра на контаминацию посторонними микроорганизмами. Вирус не контаминирован бактериальной и грибной микрофлорой, а также вирусами теплокровных (на протяжении трех пассажей в культурах клеток ФЭК, MDBK и VERO признаков ЦПЭ не наблюдали, реакция гемагглютинации эритроцитов петуха, барана и человека с культуральной жидкостью инокулированных культур клеток была отрицательной).

2.2.3 Влияние физических и химических факторов на инфекционную активность герпесвируса сибирского осетра

Чувствительность герпесвируса к воздействию химических агентов. Вирус полностью теряет инфекционную активность при воздействии на него хлороформа (10% от объема смеси) за 1 ч, кислой среды (pH 3,0) за 30 мин, щелочной среды (pH 12,8) за 10 мин и 70° этанола за 5 мин (таблица 3). В то же время часовая экспозиция в растворе хлорамина с концентрацией по активному хлору 50 мг/дм^3 снижала титр вируса на $2,70 \pm 0,20$ lg. Увеличение концентрации хлорамина в 5 раз приводило к полной инактивации вируса в течение 5 мин.

Таблица 3 - Влияние химических агентов на инфекционную активность герпесвируса сибирского осетра (n=3)

Экспозиция, мин	Титр вируса до и после обработки разными агентами, lgТЦД ₅₀ /см ³						
	Этанол, 70°	Хлорамин, мг Cl/дм ³ , *			0,013М ФЦБ, pH 3,0	0,5 М NaOH, pH 12,8	Хлороформ, 10%
		50	250	500			
0	$5,53 \pm 0,12$	$5,80 \pm 0,21$	$5,80 \pm 0,11$	$5,80 \pm 0,11$	$3,70 \pm 0,14$	$4,70 \pm 0,16$	$5,10 \pm 0,20$
5	н.о.	$5,35 \pm 0,14$	н.о.	н.о.	н.и.	н.и.	н.и.
10	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.о.	н.и.
15	н.о.	$5,10 \pm 0,18$	н.о.	н.о.	н.и.	н.и.	н.и.
30	н.о.	$4,10 \pm 0,11$	н.о.	н.о.	н.о.	н.и.	н.и.
60	н.о.	$3,10 \pm 0,13$	н.о.	н.о.	н.о.	н.и.	н.о.

Примечание: * - концентрация по активному хлору; ФЦБ – фосфат-цитратный буфер, н.о. - вирус не обнаружен в течение 3 “слепых” пассажей в культуре клеток SSO-2; н.и. – не исследовали.

Таким образом, дозировки активного хлора (2-4 мг/дм³), рекомендуемые для лечебного купания рыб при паразитарных и бактериальных заболеваниях [Рахконен др., 2003], неэффективны против герпесвируса.

Выживаемость герпесвируса в воде. При температуре 15°C инфекционная активность вируса (исходный титр $6,35 \pm 0,20 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) после суточной экспозиции дистиллированной и водопроводной воде снижалась на $3,25 \pm 0,20 \text{ lg}$, а в воде из бассейна со здоровыми осетрами на $2,50 \pm 0,21 \text{ lg}$. Дальнейшая экспозиция приводила к постепенному снижению титра вируса, и через 10 суток вирус не был обнаружен ни в одном из вариантов эксперимента.

Изучение термоллабильности герпесвируса сибирского осетра. Прогревание культурального вируса при температуре 45°C и выше приводило к полной инактивации вируса (исходный титр $6,10 \pm 0,18 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) через 15 мин, тогда как при 30°C вирус инактивировался за двое суток.

Вирус хорошо переносит кратковременное замораживание (минус 30°C) и оттаивание, но при этом остается связанным с клеточным дебрисом. Пять циклов замораживания-оттаивания исходного культурального вируса или осветленного центрифугированием в течение 20 мин при 2000g приводили к снижению его инфекционной активности всего на $0,08-0,20 \text{ lg}$.

Сохраняемость инфекционной активности герпесвируса в процессе лиофилизации Криопротекторы смешивали с культуральным вирусом в равных объемах. Лиофилизацию проводили в течение 17 ч при давлении в камере $0,07-0,054 \text{ мбар}$ и температуре от минус 50° до 24°C. При использовании в качестве криопротектора обезжиренного молока титр вируса в процессе лиофилизации снижался на $0,70 \pm 0,14 \text{ lg}$ СПК - на $1,79 \pm 0,16 \text{ lg}$, а комбинированного криопротектора пептон:лактоза:желатин (20%:20%:2%) - на $2,45 \pm 0,11 \text{ lg}$. Инфекционность вируса, лиофилизированного обезжиренным молоком, не снижалась в течение 4 месяцев хранения при 4°C (среднее наблюдение).

Фильтруемость герпесвируса через мембранные фильтры. Фильтрация внеклеточного вируса через фильтр с диаметром пор $0,45 \text{ мкм}$ почти не влияло на титр вируса, тогда как фильтр с порами $0,22 \text{ мкм}$ снижал его на $2,00 \pm 0,14 \text{ lg}$. Фильтрация супернатанта 0,1% суспензии патологического материала через фильтр с порами $0,45 \text{ мкм}$ снижало титр на $0,79 \pm 0,35 \text{ lg}$.

2.2.4 Молекулярно-генетические свойства герпесвируса сибирского осетра

При сравнении фрагментов последовательностей генов ДНК-полимеразы (421 нуклеотид) и терминазы (492 нуклеотида) герпесвируса сибирского осетра и североамериканских герпесвирусов осетровых рыб получены следующие результаты: 1) все три изолята герпесвируса сибирского осетра (SK1/0406, SK2/0506, BK/0506) на исследованных участках генома идентичны между собой; 2) вирус относится к герпесвирусу осетровых рыб 2 типа (типовой штамм AciHV-2); 3) герпесвирус сибирского осетра генетически наиболее близок к канадскому изоляту SSHV герпесвируса тупорылого осетра, *Acipenser brevirostrum* (гомология 98%).

Филогенетический анализ фрагментов гена ДНК-полимеразы 12 герпесвирусов низших позвоночных, подтвердил наиболее тесное родство выделенного герпесвируса сибирского осетра с герпесвирусом тупорылого осетра (рис. 6).

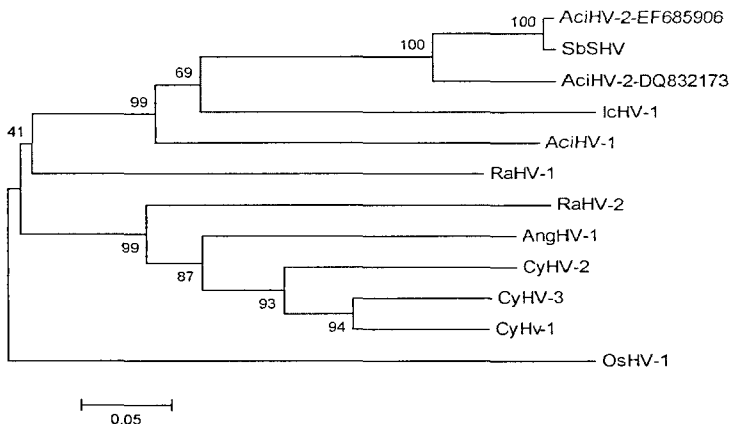


Рис. 6. Филогенетическое древо, построенное по результатам анализа фрагмента гена ДНК-полимеразы для 12 герпесвирусов низших позвоночных

Герпесвирусы: AciHV-1 и AciHV-2 – осетровых 1 и 2 типов; AngHV-1 - угревых 1 типа; CyHV-1, CyHV-2 и CyHV-3 - карповых 1, 2 и 3 типов; IchiHV-1 – икталуровых 1 типа; OsHV-1 – устрицы 1 типа; RaHV-1 и RaHV-2 – лягушек 1 и 2 типов; SbSHV – сибирского осетра.

Номера доступа в GenBank: EF685906 – последовательность гена изолята SSHV тупорылого осетра; DQ832173 – последовательность гена изолята WSHV-99-ID-2 белого осетра.

2.2.5 Получение гипериммунных антисывороток к герпесвирусу сибирского осетра

Антисыворотки, полученные в результате гипериммунизации кроликов герпесвирусом сибирского осетра, имели низкую вируснейтрализующую активность (1:60 – 1:80).

Антисыворотки, полученные после экспериментального заражения двухгодовалых сибирского осетра герпесвирусом методом ванн и однократной внутривенной инъекции реконвалесцентам вирулентного вируса, имели высокие титры вируснейтрализующих антител. Антитела выявляли на протяжении 8 месяцев после инъекции вируса (рис. 3). К концу этого срока их титры снизились до значений ниже таковых перед инъекцией. Максимальный титр антител (1:3560 и 1:4540) приходился на 215 сутки опыта. Антисыворотки с такой активностью были использованы в качестве референсных для идентификации новых изолятов герпесвируса сибирского осетра.

2.2.6 Паспортизация и депонирование герпесвируса сибирского осетра и гипериммунной антисыворотки к нему

По результатам комиссионных испытаний свойств герпесвируса сибирского осетра и гипериммунной осетровой антисыворотки к нему они паспортизированы и депонированы в музее микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ.

2.2.7 Разработка высокочувствительного метода выделения герпесвируса из патологического материала с использованием тканевых эксплантатов

Разработанный метод основан на предварительной инкубации эксплантатов покровных тканей инфицированных рыб в условиях, приближенных к оптимальным для репродукции вируса. При этом измельченные пробы плавников или кожи после десятикратной отмывки питательной средой, содержащей 500 ЕД/см³ пенициллина, 50 мкг/см³ стрептомицина и 500 мкг/см³ нистатина инкубировали при 15°С в среде 199 с 2% СПК и антибиотиками (200 ЕД/см³ пенициллина, 200 мкг/см³ стрептомицина и 25 мкг/см³ нистатина) на шейкере (50 качаний в минуту). Через определенные интервалы времени эксплантаты использовали для выделения вируса традиционным методом (таблица 4).

Таблица 4 - Содержание герпесвируса сибирского осетра в тканевых эксплантатах инфицированных осетров (lgТЦД₅₀/г ткани) спустя разные сроки инкубации (n=3)

Вид ткани	Время инкубации, сутки						
	0*	2	5	10	15	20	27
пл+кожа	6,35±0,21	7,35±0,20	9,35±0,11	9,85±0,14	н.и.	8,10±0,31	6,85±0,22
кожа	5,35±0,13	7,10±0,21	8,85±0,22	7,35±0,18	н.и.	н.и.	н.и.
пл	7,10±0,21	7,10±0,22	9,35±0,21	9,05±0,21	н.и.	н.и.	н.и.
кожа	н.о.	н.и.	4,10±0,21	н.о.	н.о.	н.и.	н.и.
пл	4,10±0,22	н.и.	6,85±0,22	4,10±0,15	6,35±0,23	н.и.	н.и.

Примечание: пл – плавники; * - традиционный метод выделения вируса; н.и. – не исследовали; н.о. - ЦТЭ не обнаружен в течение 3 “слепых” пассажей в культуре клеток SSO-2.

Инкубация тканевых эксплантатов от экспериментально зараженных двухгодовиков сибирского осетра увеличивала содержание в них вируса в 100 и более раз и частоту выделения вируса. Максимальная концентрация вируса наблюдалась на 5 сутки инкубации эксплантатов. Дальнейшее увеличение экспозиции приводило к снижению титра вируса.

При сравнении двух методов выделения герпесвируса сибирского осетра от зараженных двухгодовиков на разных стадиях течения инфекции установлено, что выделение герпесвируса с использованием метода тканевых эксплантатов более эффективно как при острой, так и при хронической форме болезни. Применение разработанного метода позволило выделить вирус из кожи рыбы с хронической формой болезни, тогда как традиционным методом это не удавалось даже после трех “слепых” пассажей в клетках линии SSO-2.

2.2.8 Результаты вирусологического обследования осетровых хозяйств на наличие герпесвирусной инфекции

Вирусологическому исследованию было подвергнуто 364 экземпляра 7 разных видов и гибридов трех возрастных групп осетровых рыб (таблица 5). Рыбоводные хозяйства находились в шести регионах России и в Казахстане. Материал отбирали в разное время года при температуре воды 15-22°C от рыб как с типичными признаками герпесвирусной болезни, так и без признаков (с целью исключения вирусоносительства).

В ходе проведенных исследований герпесвирус сибирского осетра выделен помимо КЗТО еще в двух рыбоводных хозяйствах. Частота выделения вируса была выше весной при температуре воды 15-17°C. Из материалов, отобранных летом или осенью при температуре воды 20-22°C, вирус выделяли не во всех случаях даже в неблагополучных хозяйствах. Его удалось обнаружить только в одном из трех материалов из Ленинградской обл., отобранных в июле при 20°C. Содержание вируса было на уровне порога детектирования ($10^{3.3}$ ТЦД₅₀/г ткани). В двух из четырех материалов из Казахстана, отобранных в ноябре при 20-22°C, вирус удалось обнаружить только с помощью метода тканевых эксплантатов.

Следует отметить, что в Ленинградскую обл. и Казахстан рыба была завезена из КЗТО в виде оплодотворенной икры или подращенной молоди.

Таблица 5 - Результаты вирусологического обследования осетровых хозяйств

Регион	Вид осетра	Возраст рыб	Признаки герпес-вирусной болезни	Температура воды, °С, месяц	Количество исследованных рыб	Выделение вируса
Тверская обл.	сибирский	сеголетки	тп	15-17°, май	35	+
	бестер	сеголетки	тп	-«-	2	+
	-«-	сеголетки	тп	19°, дек.	14	-
Астраханская обл.	сибирский	мальки	нт	18°, май	10	-
	русский		нт	-«-	10	-
	белуга		нт	-«-	9	-
	стерлядь		нт	-«-	3	-
Тульская обл.	сибирский	сеголетки	бп	17°, июнь	156	-
Ставропольский край	сибирский	двухлетки	тп	20°, сент.	13	-
	бестер	сеголетки	тп	20-21°, окт.	21	-
Московская обл.	русский х ленский	сеголетки	тп	-«-	21	-
	стерлядь х бестер		мальки	нт	17-18°, февраль	8
Ленинградская обл.	сибирский	сеголетки	тп	20°, июль	45	+
Казахстан	русский х ленский	сеголетки	тп	20-22°, ноябрь	17	-/+*

Примечание: + - вирус выделен; -- ЦТЭ не обнаружен в течение 3 “слепых” пассажей; нт - признаки нетипичные для герпесвирусной болезни; тп - типичные признаки болезни; бп - признаки заболевания отсутствовали; * - результат выделения вируса традиционным методом/методом тканевых эксплантатов.

2.2.9 Эпизоотологические особенности герпесвирусной болезни сибирского осетра

Анализ наблюдений в неблагополучных рыбоводных хозяйствах и результатов экспериментальных исследований показал, что наиболее остро болезнь протекает весной, реже осенью, при температуре воды 13-17°С и с повышением температуры постепенно затухает. Переболевшие рыбы не менее 2 месяцев остаются вирусоносителями. В крови выявляют вируснейтрализующие антитела, нередко в титрах 1:2000 и выше.

С возрастом восприимчивость рыб к болезни снижается. Гибель сеголетков даже в возрасте полугода достигает 100%, двухгодовиков - до 40-50%.

Вызывая генерализованную инфекцию, возбудитель, вместе с тем, обладает выраженным покровно-тканевым тропизмом и в наибольших количествах накапливается в тканях кожи, плавников, ротового аппарата и особенно в слизи с поверхности тела рыбы. От инфицированных рыб вирус выделяется в окружающую водную среду со слизью с поверхности тела, выделениями кишечника и, возможно, с мочой и через жабры.

Кроме сибирского осетра вирус выделен также от бестера (гибрид белуги

стерляди) и гибрида русского и сибирского (ленского) осетров. Карп и радужная форель нечувствительны к возбудителю болезни и не передают его восприимчивым рыбам. Стерлядь и ее гибрид с бестером менее чувствительны к болезни, чем сибирский осетр. Восприимчивость рыб других видов не исследована.

При вспышке болезни содержание вируса в воде достигает $10^3 - 10^4$ ТЦД₅₀/см³.

3 Выводы

1. Впервые выделен вирус от неамериканских видов осетровых рыб и установлена первая вирусная болезнь у осетровых рыб в России.

2. Болезнь высококонтагиозна и клинически проявляется в виде ярко выраженного некрогеморрагического синдрома, осложненного вторичными инфекциями. Из внутренних органов наиболее сильно поражаются печень, задний отдел кишечника, плавательный пузырь и сердце. Вспышки болезни обычно возникают весной. Сибирский осетр, *Acipenser baeri*, наиболее чувствителен к возбудителю, карп и радужная форель нечувствительны к нему и не передают его восприимчивым видам рыб.

3. Вирус имеет капсид икосаэдрической формы и внешнюю оболочку с заключенным под нею тегументом. Диаметр капсида около 100 нм, вириона с оболочкой 200-250 нм. Строение вириона, особенности морфогенеза и молекулярно-генетические свойства вируса позволяют отнести его к семейству *Alloherpesviridae* порядка *Herpesvirales*.

4. Герпесвирус высокопатогенен для молоди сибирского осетра, обладает покровно-тканевым тропизмом и у переболевших рыб индуцирует выработку нейтрализующих антител в высоких титрах (1:600-1:3000).

5. К герпесвирусу чувствительны только линии клеток осетрового происхождения. Оптимизированы технологические параметры культивирования вируса, обеспечивающие накопление его в титре $6,85 \pm 0,20 \lg$ ТЦД₅₀/см³ и включающие заражение 1-2-суточной культуры клеток SSO-2 с множественностью 0,1 - 0,01 ТЦД₅₀/кл., поддерживающую среду 199 с 2% СПК, pH 6,5, температуру инкубации 15°C, роллерное культивирование со скоростью вращения сосудов 25-30 об./ч.

6. Культуральный герпесвирус высоколабилен и инактивируется при значениях pH среды 3,0 и 12,8, под воздействием хлороформа, 70° этанола и хлорамина с концентрацией активного хлора не ниже 250 мг/дм³. Его инфекционность утрачивается

при температуре 45°C в течение 15 мин и сохраняется на протяжении 7 мес при 4°C.

7. Молекулярно-генетический анализ участков генов ДНК-полимеразы терминазы герпесвируса сибирского осетра показал, что вирус относится к герпесвиру осетровых рыб 2 типа (типовой штамм AcHV-2) и генетически наиболее близок канадскому изоляту SSHV герпесвируса тупорылового осетра, *Acipenser brevirostrum*.

8. Разработан и испытан на экспериментальном и полевом материала высокочувствительный метод выделения герпесвируса с использованием эксплантат покровных тканей исследуемых рыб. Метод обеспечивает повышение содержания вируса в исследуемом материале в 100 и более раз и частоты выделения его на поздних стадиях эпизоотии по сравнению с традиционным методом вирусовыделения.

9. Болезнь выявлена в трех из восьми обследованных осетровых хозяйств – одном племенном и двух товарных, получивших из первого посадочный материал и оплодотворенную икру. Осенняя вспышка болезни в одном из товарных хозяйств показывает, что носительство вируса может продолжаться не менее полугода.

4 Практические предложения

Разработаны и предложены «Методические рекомендации по диагностике герпесвирусной болезни сибирского осетра», утвержденные Россельхозакадемией 21.09.2009.

Выделенный и охарактеризованный герпесвирус сибирского осетра гипериммунная антисыворотка к нему используются для идентификации вирусных изолятов от осетровых рыб и при проведении НИР.

Предложен высокочувствительный метод выделения герпесвируса сибирского осетра, основанный на предварительной инкубации эксплантатов покровных тканей исследуемых рыб в условиях, приближенных к оптимальным для репродукции вируса, который позволяет повысить чувствительность выявления вируса и частоту его выделения от рыб в период эпизоотии и после ее завершения.

Список опубликованных работ по материалам диссертации

1. Герпесвирусная болезнь у осетровых рыб в России/ И.С. Щелкунов, Т. Щелкунова, **А.И. Щелкунов**, Ю.П. Колбасова, Л.В. Диденко, А.Ф. Быковский // Российский вет. журнал. Сельскохозяйственные животные. - 2007. - № 1. - С. 10-12.
2. Герпесвирусное заболевание молоди сибирского осетра/ И.С. Щелкунов, Т.

Щелкунова, А.И. Щелкунов, Ю.П. Колбасова, Л.В. Диденко, А.Ф. Быковский// Тепловодная аквакультура и биологическая продуктивность водоемов аридного климата: материалы и докл. междунар. сим. - Астрахань: АГТУ, 2007. – С. 522-525.

3. Щелкунов, А.И. Биологические свойства герпесвируса сибирского осетра *in vitro*/ Щелкунов А.И., Щелкунова Т.И. // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси: сб. науч. трудов. – Минск: РУП Институт рыбного хозяйства, 2008. – Вып. 24. – С. 501-503.

4. Щелкунов, А.И. Покровно-тканевой тропизм герпесвируса сибирского осетра/ Щелкунов А.И.// Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел: материалы междунар. науч.- практ. конф. – М., 9-10 октября 2008. - С. 437-440.

5. Щелкунов, А.И. Сохранность герпесвируса сибирского осетра при разных условиях хранения /Щелкунов А.И.// Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных: тр. междунар. науч.- практ. конф., посвященной 50-летию ВНИИВВиМ. – Покров, 13-14 ноября 2008. - С. 205-209.

6. Щелкунов, А.И. Оптимизация условий культивирования герпесвируса сибирского осетра/ Щелкунов А.И.// Труды ВИЭВ. - М., 2009. - Т. 75. - С. 670-675.

7. First detection of a viral agent causing disease in farmed sturgeon in Russia/ I.S. Shchelkunov, T.I. Shchelkunova, A.I. Shchelkunov, Y.P. Shchelkunova, L.V. Didenko, A.Ph. Bykovsky// Dis. Aquat. Org. – 2009. – Vol. 86. – P. 193-203.

8. Щелкунов, А.И. Получение гипериммунных антисывороток к герпесвирусу сибирского осетра/ А.И. Щелкунов, И.Б. Прокаева// Актуальные проблемы инфекционной патологии ветеринарной медицины: материалы конф. молодых ученых. – Покров, 3-4 декабря 2009. – С. 127-130.

9. Щелкунов, А.И. Герпесвирусная болезнь сибирского осетра/ А.И. Щелкунов, И.С. Щелкунов// Ветеринария. – 2010. - № 1. – С. 18-21.

Отпечатано в типографии ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ,
г. Покров Владимирской области.
Тираж 80 экз.