

На правах рукописи

Калаба

Калабекова Фатима Султанхамидовна

**ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕРПЕСВИРУСА СИБИРСКОГО ОСЕТРА С ПОМОЩЬЮ ППР
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА**

03.02.02 Вирусология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

12 ФЕК 2013



005543373

Покров – 2013

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии).

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,
доцент

(ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии)

Колбасова Ольга Львовна

Официальные оппоненты:

заведующая кафедрой ветеринарной
вирусологии им. В.М. Сюрина
ФГБУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник

Ярыгина Елена Игоревна

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Пыльнов Владимир Александрович

Ведущая организация:


Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии), г. Москва.

Защита диссертации состоится **«26» «декабря» 2013 г. в «10.00» часов** на заседании диссертационного совета Д 006.003.01 при Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии по адресу: 601120, Владимирская область, г. Покров, Тел./факс: (09243) 6 21 25.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Автореферат разослан **«22» ноября 2013 г.** и размещен на официальном сайте ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии www.vniivvim.ru и сайте ВАК России www.vak2.ed.gov.ru

Ученый секретарь
диссертационного совета
ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии,
кандидат биологических наук



**Балашова
Елена Алексеевна**

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность работы

В связи с угрозой исчезновения ценных видов осетровых рыб и возрастающим спросом на товарную осетровую продукцию в последние годы все большее развитие получает индустриальное осетроводство. В то же время интенсификация аквакультуры осложняется возникновением болезней гидробионтов. По данным Международного эпизоотического бюро основной ущерб мировой аквакультуре наносят вирусные болезни рыб [Aquatic Animal Health Code. 12th ed., OIE, Paris, 2009].

В середине восьмидесятых годов двадцатого века от осетровых рыб был выделен первый вирус – иридовирус [Adkison, M.A., 1998]. В результате мониторинга внутренних водоемов страны и регулярных обследований рыбководных хозяйств позднее были выделены и другие вирусы от осетровых рыб. В настоящее время у североамериканских осетровых обнаружено 10 разных вирусов, из которых наиболее опасны – аденовирус, иридовирус и два герпесвируса белого осетра. Эти вирусы вызывают болезни у мальков и сеголетков белого осетра, являющегося главным объектом осетроводства США [R.P. Hedrick, 1985; Adkison, M.A. 1998]. Помимо США вирусы у осетровых были обнаружены в Италии и Бельгии [Ghittino, P., 1985].

Первое сообщение об обнаружении вирусной болезни осетровых рыб, в Российской Федерации, появилось в 2006 г., когда в весенний период в Тверской области на Конаковском заводе товарного осетроводства началась массовая гибель молоди сибирского осетра (*Acipenser baeri*) с признаками некрогеморрагического синдрома, типичными для герпесвирусной инфекции. Выявленный патоген был изучен и идентифицирован как герпесвирус сибирского осетра [Щелкунов, И.С., 2006].

Мировая аквакультура развивается столь высокими темпами, что возможности ветеринарной науки по разработке средств и методов борьбы с болезнями существенно отстают от запросов практики. Исходя из этого, МЭБ

33

определило главным направлением борьбы с болезнями культивируемых гидробионтов профилактику заболеваний, основным принципом которой является предотвращение проникновения патогенов в регионы, где они прежде отсутствовали. Это достигается путем проведения эпизоотологического мониторинга на рыбоводных предприятиях и регулированием межхозяйственных перевозок объектов разведения с учетом полученных при этом результатов.

В настоящее время в Российской Федерации утвержден только один метод идентификации выделяемых изолятов герпесвируса сибирского осетра - реакция нейтрализации с использованием референсной гипериммунной антисыворотки, получаемой во ВНИИВВиМ [Щелкунов И.С., 2007].

Данная реакция обладает известными достоинствами, но требует предварительного выделения вируса в культуре клеток, и поэтому ее использование затруднено при исследовании большого количества полевых материалов. Существенным недостатком реакции является невозможность определения с ее помощью филогенетических взаимоотношений выделенных изолятов, что достигается только с использованием молекулярно-биологических методов, в том числе и ПЦР, которая является главным инструментом активно развивающейся сегодня молекулярной эпизоотологии вирусных инфекций рыб.

1.2 Степень разработанности проблемы

Изучению биологических, физико-химических и в меньшей мере молекулярно-генетических свойств герпесвируса сибирского осетра посвящена работа А.И. Щелкунова. В данной работе представлено описание выявленной болезни и свойств вируса-возбудителя, оптимизированы условия его культивирования, определено таксономическое положение [Щелкунов А.И., 2010].

Работа И.Б. Прокаевой посвящена изучению гуморального иммунного ответа осетровых рыб при герпесвирусной болезни сибирского осетра, предложен способ выявления противогерпетических антител в сыворотках крови осетровых рыб на основе твердофазного иммуноферментного анализа для ретроспективной диагностики данной болезни [Прокаева И.Б., 2013].

Однако недостаточно изучены молекулярно-генетические свойства выделенных изолятов герпесвируса сибирского осетра. Не разработаны методы молекулярно-генетической диагностики герпесвирусной инфекции осетровых рыб, основанных на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР), отличающихся высокой чувствительностью и специфичностью получаемых результатов.

1.3 Цель и задачи исследований

Целью исследования являлась разработка тест-системы для выявления ДНК герпесвируса сибирского осетра на основе ПЦР в режиме реального времени и проведение молекулярно – генетического анализа изолятов вируса.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. С использованием данных GenBank рассчитать специфичные праймеры и зонд, определить оптимальные условия проведения ПЦР в режиме реального времени;
2. Разработать тест-систему для выявления ДНК герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени и рекомбинантный положительный контроль для тест-системы;
3. Оработать методику пробоподготовки и оценить диагностическую ценность проб различных органов и тканей рыб для выявления ДНК герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени;
4. Определить филогенетические взаимоотношения выделенных изолятов герпесвируса сибирского осетра.

1.4 Научная новизна результатов исследований

Впервые разработана тест-система на основе ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК герпесвируса сибирского осетра в пробах инфицированных культур клеток, органов и тканей рыб.

Впервые в Российской Федерации определены нуклеотидные последовательности фрагментов гена ДНК-полимеразы штамма SK1/0406 и изолятов герпесвируса сибирского осетра, выделенных на территории нашей страны.

1.5 Теоретическая и практическая значимость работы

Разработана методика выявления ДНК герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени.

Проведен молекулярно-генетический анализ участков гена ДНК-полимеразы штамма SK1/0406 и 8 изолятов герпесвируса сибирского осетра, выделенных в период 2006-2013 гг., и изучены их филогенетические взаимоотношения.

Разработаны «Методические положения по выявлению ДНК герпесвируса сибирского осетра методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени», утвержденные академиком-секретарем Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии А.М. Смирновым 28. 05. 2012 г.

1.6 Степень достоверности и апробация работы

Степень достоверности результатов проведённых исследований подтверждена статистическими исследованиями и комиссионными испытаниями. Акт комиссионных испытаний утвержден директором ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии 31.10.2011 г. Статистическая обработка включала расчёты средних арифметических значений, стандартных отклонений результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, вычисления эволюционных дистанций с помощью программы «MEGA 5.0». Научные положения, выводы и практические предложения диссертационной работы аргументировано отражают содержание диссертации.

Результаты исследований, выполненных по теме диссертационной работы, представлены, заслушаны и обсуждены на заседаниях ученого совета ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии (Покров 2010-2013 гг.), Международной научно-практической конференции (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, Покров, 2011 г.), Международной конференции «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов» (Борок - Москва, 2011 г.), Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» (УГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, 2012 г.; ГНУ ВНИТиБП Россельхозакадемии, Щелково, 2012 г.).

1.7 Соответствие содержания диссертации паспорту специальности, по которой она рекомендуется к защите

В соответствии с формулой специальности 03.02.02 Вирусология, охватывающей проблемы исследования вирусов, генетики, биохимических и молекулярно-генетических аспектов, разработки мер диагностики вызываемых вирусами заболеваний, включая области исследований: проблемы генетики вирусов, структурной организации генома вирусов, проблемы генной инженерии, разработки мер диагностики вирусных заболеваний, совершенствование лабораторных диагностических систем, в диссертационной работе описано проведение исследований по созданию тест-системы на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, использование которой позволяет идентифицировать ДНК герпесвируса сибирского осетра. Также представлены результаты разработки рекомбинантной конструкции на основе плазмидного вектора, применяемого в качестве положительного контроля амплификации в данной тест-системе. Определены нуклеотидные последовательности участка гена ДНК-полимеразы штамма SK1/0406 и 8 изолятов герпесвируса сибирского осетра, выделенных на территории Российской Федерации. Проведён филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей, полученных в данной работе. Результаты научного исследования соответствуют пунктам паспорта специальности 4, 5, 10.

1.8 Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 1 статья в журнале «КубГАУ», включённом в перечень изданий, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

1.9 Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 105 страницах машинописного текста и состоит из разделов: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение, выводы, практические предложения, список использованной литературы, включающий 34 отечественных и 108 иностранных источников; дополнена приложениями.

Диссертация содержит 11 таблиц и 22 рисунка. В приложении представлены документы, подтверждающие достоверность результатов работы, ее научную и практическую значимость.

1.10 Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту

- 1) Разработанная тест-система на основе ПЦР в режиме реального времени позволяет выявлять ДНК герпесвируса сибирского осетра методом в инфицированных культурах клеток, проб органов и тканей рыб.
- 2) Метод изоляции герпесвируса сибирского осетра в культуре клеток и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени позволяют выявить ДНК вируса на разных стадиях течения инфекционного процесса
- 3) Результаты сравнительного анализа нуклеотидного состава участка гена ДНК-полимеразы штамма SK1/0406 и 8 изолятов герпесвируса сибирского осетра, выделенных на территории Российской Федерации, и их филогенетические взаимоотношения.

1.11 Личный вклад автора в выполнение работы

Основной объем исследований проведен автором самостоятельно. Отдельные этапы исследований выполнены при консультативной и практической помощи сотрудников лабораторий Здоровья гидробионтов и Биофизики ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

2.1.1 Вирус

В работе использовали штамм SK1/0406 и изоляты SK2/0506, BK/0506, SL/0708, SP1/1108, SA7/0310, SSS/0111, RSS/0111, SIz6/0311 герпесвируса сибирского осетра.

При оценке специфичности тест-системы для выявления генома герпесвируса сибирского осетра на основе ПЦР в режиме реального времени использовали образцы ДНК гетерологичных вирусов, патматериала от экспериментально зараженного сеголетка сибирского осетра, гетерологичных вирусов, ин-

тактных культур клеток и биологического материала от здорового сеголетка сибирского осетра.

2.1.2 Рыба

В работе использованы: сибирский осетр (*Acipenser baeri*) – мальки, сеголетки, двухгодовики; русский осетр (*Acipenser gueldenstaedti*) – годовики; ленский осетр (*Acipenser baeri*) – мальки.

2.1.3 Культуры клеток

Использовали перевиваемые клеточные линии рыб:

- пула печени, почки, селезенки (SSO-1, SSO-2) и плавников сибирского осетра, *Acipenser baeri* (SSF-1, SSF-2);

- кожи белого осетра, *Acipenser transmontanus* (WSSK-1);

- селезенки белого осетра, *Acipenser transmontanus* (WSS-2).

Клеточные линии SSO-1, SSO-2, SSF-1, SSF-2 получены в лаборатории ихтиопатологии ФГУП “ВНИИПРХ”. Остальные клеточные линии были любезно предоставлены нам зарубежными коллегами.

2.1.4 Плазмида и бактериальные штаммы

Конструирование рекомбинантного положительного контроля к разработанной тест-системе проводили на основе плазмидного вектора pTZ57R/T (Fermentas). Клонирование осуществляли в генетически модифицированных клетках *E. coli* линии DH5 α (Promega).

2.2 Методы

2.2.1 Расчет праймеров и зонда

Расчет праймеров и олигонуклеотидного зонда осуществляли с помощью программы «Oligo 4.0» на основе представленной в GenBank нуклеотидной последовательности фрагмента гена ДНК-полимеразы герпесвируса сибирского осетра [GI:288975339].

2.2.2 Выделение ДНК

При выделении вирусной ДНК использовали метод нуклеосорбции [R. Boom., 1990].

2.2.3 Оценка специфичности тест-системы

Для оценки специфичности тест-системы использовали пробы, содержащие ДНК герпесвируса сибирского осетра. В качестве отрицательных образцов - пробы органов от здоровых рыб, интактных культур клеток и гетерологичных вирусов.

2.2.4 Оценка аналитической чувствительности тест-системы

При оценке аналитической чувствительности тест-системы использовали серию последовательных десятикратных разведений образцов культурального материала герпесвируса, штамм SK1/0406 с титром инфекционной активности $7,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

2.2.5 Оценка воспроизводимости тест-системы

Оценку воспроизводимости результатов обнаружения ДНК герпесвируса сибирского осетра с помощью разработанной тест-системы осуществляли путём анализа 8 образцов патматериала от клинически больного сибирского осетра, который выполняли независимо три квалифицированных специалиста лаборатории Биофизики ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

2.2.6 Нуклеотидное секвенирование и филогенетический анализ штамма SK1/0406 и изолятов герпесвируса сибирского осетра

Выделение продуктов амплификации из реакционной смеси осуществляли коммерческим набором («DNA purification kit» (Fermentas, Латвия), с последующей реамплификацией фрагментов при помощи компонентов «BigDye v. 3.1. Terminator» (Applied Biosystems, США). Реакцию с дефектными дезокситрифосфатами проводили в параллелях с прямым и обратным праймерами при следующих температурных режимах: 95 °С-10 секунд, 50 °С – 20 секунд, 60 °С – 4 минуты- всего 25 циклов. По окончании реакции к смеси добавляли 45 мкл 96 % этанола и 2,5 мкл 125 мМ EDTA, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10-15 минут. Затем пробы центрифугировали в течение 10-15 минут при 10000g, супернатант удаляли, а осадок промывали 75 % этанолом по той же схеме с 10-15 минутной экспозицией при комнатной температуре. Осадок после центрифугирования подсушивали, аккуратно рас-

творяли в 10-12 мкл формамида (Applied Biosystems, США). Полученную смесь денатурировали при 94 °С в течение нескольких минут и резко охлаждали во льду. Секвенирование проводили в автоматическом анализаторе Genetic Analyzer 3130XL (Applied Biosystems, США).

Данные, полученные после постановки капиллярного электрофореза, обрабатывали с помощью пакета прикладных программ SeqScape 2.6 (Applied Biosystems) и BioEdit 7.0.

Филогенетические древа строили с использованием метода присоединения соседей; расчёт эволюционных дистанций осуществляли по алгоритму р-дистанций в программе «MEGA 5.0».

2.2.7 Культивирование герпесвируса сибирского осетра в перевиваемых культурах клеток осетровых рыб и определение его инфекционной активности

Герпесвирус сибирского осетра культивировали в перевиваемых культурах клеток в статических условиях с питательной средой 199 или 2MEM, содержащей 2 % фетальной сыворотки КРС, при температуре (15±0,5) °С в течение 6-12 суток до наступления 90-100 % цитопатогенного действия. Вирус вносили в дозе 0,1-0,01 ТЦД₅₀/клетка. Накопление вируса в клетках линии SSO-2 составляло 10^{5,7±0,10} - 10^{6 ±0,10} ТЦД₅₀/см³. Вирусосодержащий материал хранили при температуре плюс (4±0,5) °С не более одного месяца или длительно при минус (70±0,5) °С. Инфекционную активность герпесвируса определяли по общепринятой методике. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/см³.

2.2.8 Экспериментальное заражение рыб

Для экспериментального заражения использовали клинически здоровых сеголетков сибирского осетра. Заражение рыбы проводили штаммом SK1/0406 герпесвируса сибирского осетра методом ванн.

2.2.9 Выделение вируса от зараженных рыб

Отбор и подготовку патологического материала для исследований проводили в соответствии с действующими международными и отечественными нормативными документами по вирусологическому

исследованию рыб [Методические указания по идентификации вирусов и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб; Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 6th ed. – Paris: Office International des Épidémiologies, 2009].

2.2.10 Программное обеспечение и интернет-ресурсы

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием алгоритма «Clustal W» программы «Bio Edit 7.0». Дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов осуществляли в программе «Oligo 4.0». Специфичность рассчитанных олигонуклеотидов проверяли при помощи интернет-ресурса BLAST [blast.ncbi.nlm.nih.gov].

2.2.11 Статистическая обработка результатов исследований

Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами [Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.].

2.3 Результаты собственных исследований

2.3.1 Разработка тест-системы для выявления генома герпесвируса сибирского осетра на основе ПЦР в режиме реального времени

В связи с отсутствием в литературе информации о разработке и применении молекулярно-биологических методов для выявления генома герпесвируса сибирского осетра одним из этапов нашей работы было создание тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени для идентификации генома данного вируса.

Основными задачами этого этапа исследований являлись расчет специфичных праймеров и зонда, оптимизация условий постановки реакции, оценка аналитической специфичности и чувствительности тест-системы для идентификации герпесвируса сибирского осетра.

На основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генома герпесвируса сибирского осетра были рассчитаны специфичные праймеры, комплементарные гену ДНК-полимеразы (как наиболее хорошо изученному гену герпесвирусов рыб), фланкирующие фрагмент длиной 89 п.о. и флуоресцентный зонд SbSHV1-Z, комплементарный внутреннему фрагменту выбранного участка и несущий в качестве флуоресцентного красителя молекулу FAM на 5'-конце, а в качестве тушителя флуоресценции – гаситель

ВНQ1 на 3'-конце.

В процессе оптимизации условий постановки ПЦР в режиме реального времени были опробованы различные режимы амплификации, буферные системы, концентрации ионов Mg^{2+} и dNTP. Оптимальными параметрами амплификации ДНК герпесвируса сибирского осетра является реакционная смесь объемом 25 мкл, содержащая 10 мкл деионизированной воды, 5 мкл 5× ПЦР буфера, 2 мкл 25 мМ $MgCl_2$, по 1 мкл прямого и обратного праймера (10 пмоль), 0,5 мкл зонда (5 пмоль), 0,5 мкл dNTPs (10 пмоль), 0,25 ед. Таq-полимеразы, 5 мкл исследуемой ДНК.

Оптимизацию температурного режима амплификации проводили на приборе Rotor Gene 6000. Оптимальный температурный режим и количество циклов составили: 3 минуты предварительной денатурации при 95 °С (1 цикл); денатурация при 95 °С - 16 секунд, отжиг праймеров при 62 °С - 26 секунд, элонгация при 71 °С - 26 секунд (5 циклов); денатурация при 95 °С - 16 секунд, отжиг праймеров 62 °С - 26 секунд – детекция, элонгация 71 °С - 26 секунд (35 циклов).

Результаты амплификации учитывали путем анализа кривых флуоресценции, после завершения реакции. Флуоресценцию измеряли при 62 °С по каналу Green (FAM).

2.3.2 Определение специфичности тест-системы для выявления герпесвируса сибирского осетра

При проверке специфичности тест-системы в качестве матриц была использована ДНК, выделенная из 41 пробы, в том числе 16 заведомо положительных и 25 заведомо отрицательных. Результаты исследования данных проб с помощью ПЦР в режиме реального времени были сравнены с результатами выделения вируса в культуре клеток, что наглядно представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Определение специфичности тест-системы для выявления ДНК герпесвируса сибирского осетра

№ п/п	Образцы вирусного материала	n=3	
		Результаты ПЦР-РВ	Результаты выделения вируса в культуре клеток
Культуральный материал			
1	шт. SK1/0406	+	+
2	изолят SK2/0506	+	+
3	изолят BK/0506	+	+
4	изолят SL/0708	+	+
5	изолят SP1/1108	+	+
6	изолят SA7/0310	+	+
7	изолят RSS/0111	+	+
8	изолят SSS/0111	+	+
Патматериал от зараженного сеголетка сибирского осетра			
9	Слизь с поверхности тела	+	+
10	Ротовой аппарат	+	+
11	Жабры	+	+
12	Грудной плавник	+	+
13	Печень	+	+
14	Почка	+	+
15	Селезенка	+	+
16	Сердце	+	+
Штаммы гетерологичных вирусов			
17	шт. SVCV-3Л4 вируса весенней веримии карпа	-	-
18	шт. IHNV-10 Ж-3 вируса инфекционного некроза гемопозической ткани	-	-
19	шт. IPNV-Ab финский вируса инфекционного некроза поджелудочной железы	-	-
20	шт. CCIV-4БЖ иридовируса карпа	-	-
21	шт. «Бук» вируса болезни Ауески	-	-
22	шт. «ТК-А/К» вируса инфекционного ринотрахеита КРС	-	-
23	шт. «НТ» вируса инфекционного ларинготрахеита кур	-	-
Интактные контрольные культуры клеток			
24	SSO-1 пул печени, почки и селезенки	-	-
25	SSO-2 пул печени, почки и селезенки	-	-
27	SSF-1 плавники	-	-
28	SSF-2 плавники	-	-
29	WSS-2 селезенка	-	-
30	WSSK-1 кожа	-	-
Биологический материал от здорового сеголетка сибирского осетра			
31	Слизь с поверхности тела рыб	-	-
32	Грудной плавник	-	-
33	Селезенка	-	-
34	Сердце	-	-
35	Печень	-	-
36	Почка	-	-
37	Жабры	-	-
38	Мозг	-	-
39	Задний отдел кишечника	-	-
40	Отрицательный контроль	-	-
41	Положительный контроль	+	+

Примечание: «+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат

В результате исследований ДНК герпесвируса сибирского осетра выявлена в пробах культурального вирусосодержащего материала и пробах органов от инфицированных рыб. Показано, что геном герпесвируса сибирского осетра не выявляется при использовании в качестве матриц препаратов ДНК, экстрагированной как из проб органов здоровых осетров, так и гетерологичных вирусов и интактных культур клеток. Таким образом, показано, что тест-система обладает 100 % специфичностью.

Результаты выявления вируса методом ПЦР в режиме реального времени полностью совпали с результатами выделения вируса в культуре клеток.

2.3.3 Оценка аналитической чувствительности тест-системы

Аналитическую чувствительность тест-системы определяли амплификацией ДНК герпесвируса сибирского осетра, выделенной из последовательных десятикратных разведений образцов культурального герпесвируса сибирского осетра. В качестве исходного материала использовали штамм SK1/0406 с титром инфекционной активности $7,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Пределом чувствительности считали максимальное разведение, при котором регистрировали положительный результат.

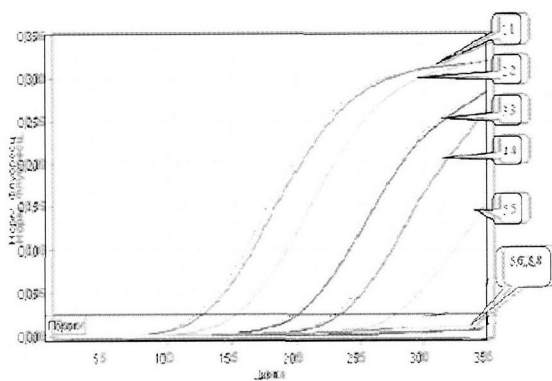


Рисунок 1 – Результаты ПЦР-РВ на матрице последовательных десятикратных разведений герпесвируса сибирского осетра, штамм SK1/0406 1 – исходный материал $7,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; 2 - $6,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; 3 - $5,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; 4 - $4,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; 5 - $3,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; 6 - $2,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; 7 - $1,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; 8 - $0,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$

В результате проведенных исследований установлено, что рассчитанное значение аналитической чувствительности тест-системы для выявления ДНК герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени составляет $3,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

2.3.4 Оценка повторяемости результатов, полученных при использовании тест-системы

Применение испытуемой тест-системы позволило трем независимым исследователям выявить заведомо положительные образцы, содержащие ДНК герпесвируса сибирского осетра. Ложноположительные результаты при исследовании заведомо отрицательных образцов получены не были. Это свидетельствует о воспроизводимости результатов, получаемых разными исследователями с помощью предлагаемой тест-системы (таблица 2).

Таблица 2 – Оценка повторяемости результатов, полученных при использовании тест-системы n=3

№ пробы	Наименование биологического материала (пробы органов от клинически больного сеголетка сибирского осетра)	Результаты, полученные исследователями		
		1	2	3
		Значение порогового цикла (C_t)	Значение порогового цикла (C_t)	Значение порогового цикла (C_t)
1	Ротовой аппарат	17,13±0,15	17,02±0,24	17,17±0,10
2	Селезенка	16,11±0,06	16,05±0,09	16,14±0,01
3	Жабры	13,34±0,10	13,44±0,04	13,46±0,02
4	Грудной плавник	15,60±0,05	15,40±0,22	15,56±0,07
5	Сердце	16,25±0,23	16,45±0,06	16,26±0,21
6	Почка	13,65±0,22	13,49±0,34	13,82±0,08
7	Слизь	13,54±0,17	13,78±0,05	13,75±0,12
8	Печень	16,93±0,25	17,13±0,11	17,11±0,09
9	К-	Нет значений	Нет значений	Нет значений
10	К+	10,09±0,03	10,06±0,09	10,14±0,07

Таким образом, разработанная тест-система позволяет выявлять ДНК герпесвируса сибирского осетра.

В результате проведенных исследований по отработке режимов и условий проведения ПЦР в режиме реального времени разработана «Тест-система для

выявления ДНК герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени». Специфичность, чувствительность тест-системы подтверждены комиссионными испытаниями (Акт от 31.10.2011г.). «Методические положения по выявлению ДНК герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени» утверждены академиком-секретарем отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии, академиком Россельхозакадемии А.М. Смирновым 28.05.2012 г.

2.3.5 Схема подготовки проб различных органов и тканей рыб и оценка их диагностической ценности

Для исследования использовали слизь с поверхности тела и пробы органов от инфицированных или погибших рыб. Пробы органов массой не более 50-150 мг каждая, отбирали в пробирки типа Eppendorf - с 200 мкл бидистиллированной воды. Слизь отбирали ватными тампонами и также помещали в пробирки. Для выделения ДНК использовали 10 % суспензию органов и тканей, экстракт органов и тканей сеголетков сибирского осетра, а также слизь, разведенную в бидистиллированной воде в соотношении 1:1.

Для получения экстракта кусочки органов и тканей помещали в чистую пробирку типа Eppendorf на 1,5 мл и заливали 150-200 см³ бидистиллированной воды или физраствора. Пробирку с пробой инкубировали в течение 5 минут при температуре 64 °С в твердотельном термостате. Затем пробу центрифугировали при максимальных оборотах в течение 1 минуты, супернатант перенесли в чистую пробирку и использовали для выделения ДНК герпесвируса сибирского осетра.

Органы и ткани измельчали, растирали со стерильным кварцевым песком и готовили на физрастворе 10% суспензию, которую осветляли центрифугированием. Надосадок использовали для выделения ДНК вируса.

Выделение ДНК из проб патологического материала проводили по модифицированной методике Boom et al. (1990). Для этого, к 100 мкл исследуемых образцов добавляли 500 мкл лизирующего раствора, содержащего 6М ГТЦ, инкубировали при температуре 64 °С в течение 5 минут. Далее добавляли

30 мкл силикатного сорбента, тщательно перемешивали на смесителе типа «Vortex» и инкубировали в течение 5 минут при температуре 64 °С. После этого осаждали сорбент центрифугированием в течение 30 секунд при 13000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость и добавляли к осадку 500 мкл отмывочного раствора, суспендировали и инкубировали пробы при той же температуре 5 минут. Сорбент осаждали центрифугированием в течение 30 секунд, надосадочную жидкость декантировали. К осадку добавляли 600 мкл 75 % этанола, перемешивали, центрифугировали 15 секунд, надосадочную жидкость удаляли. Осадок подсушивали в течение 10 минут при 64 °С в пробирках с открытой крышкой. К осадку добавляли 50 мкл бидистиллированной воды для элюирования ДНК с сорбента, перемешивали смесителе типа «Vortex» и инкубировали 2 минуты при 64 °С в закрытых пробирках. Перемешивали и инкубировали при тех же условиях 5 минут, вновь перемешивали и центрифугировали в течение 30 секунд при 13000 об/мин. Отобранную надосадочную жидкость использовали для проведения ПЦР в режиме реального времени.

В результате проведения ПЦР в режиме реального времени геном вируса выявлялся в пробах слизи, 10 % суспензии органов и тканей, экстрактов органов и тканей рыб.

Для определения наиболее ценного диагностического материала проводили экспериментальное заражение сеголетков сибирского осетра, с последующим вирусовыделением на культуре клеток SSO-2. В результате эксперимента было установлено, что вирус в больших титрах накапливается в слизи ($8,65 \pm 0,18$ ТЦД₅₀/см³), плавниках ($9,10 \pm 14$ lg ТЦД₅₀/см³), жабрах ($8,53 \pm 0,15$ lg ТЦД₅₀/см³), ротовом аппарате ($7,81 \pm 0,20$ lg ТЦД₅₀/см³), из внутренних органов наиболее высокое содержание вируса отмечалось в печени ($8,15 \pm 0,12$ lg ТЦД₅₀/см³).

В результате проведенных исследований установлено, что вирус выявляется во всех исследованных пробах, но при этом исследование слизи и плавников позволяет проводить прижизненную диагностику.

2.3.6 Сравнительная эффективность выявления герпесвируса сибирского осетра на основе ПЦР в режиме реального времени и вирусовыделения в культуре клеток

Для сравнения эффективности выделения вируса нами были проведены исследования 50 сеголетков сибирского осетра 3-месячного возраста завезенных из ООО СМП «Энергетик – Э» Московской области. Молодь выглядела клинически здоровой, активно питалась и росла. Перед началом работ было проведено лабораторное диагностическое исследование завезенной молодежи на наличие возможных вирусных инфекций. В результате исследования патогенных агентов обнаружено не было, геном герпесвируса сибирского осетра обнаружен не был. Экспериментальное заражение рыб герпесвирусом сибирского осетра проводили методом ванн (штамм SK1/0406; доза заражения - $10^{4,1}$ ТЦД₅₀/см³) Для этого рыбу помещали в бак с 30 л аэрируемой воды, в которую вносили вирус до конечной концентрации $10^{4,1}$ ТЦД₅₀/см³. Экспозиция 1 час при температуре воды 15-17 °С. После заражения рыбу содержали в 120-литровых аквариумах с проточной аэрируемой водой при температуре 14 – 16 °С и кормили форелевым комбикормом АК-2ФП + 3 % растительного масла. Контрольную группу рыб содержали в отдельном аквариуме при тех же условиях.

Через две недели после заражения появились первые признаки болезни - угнетение рыбы и отказ от корма. Большинство больных осетров лежало неподвижно на дне емкости. У больных особей наблюдали развитие заболевания со следующими клиническими признаками: кровоизлияния на вентральной стороне рострума, вокруг сифона (ротового отверстия), в межлучевой ткани грудных плавников, также отмечали экзофтальмию и анемию жабр. На 16-ые сутки началась гибель осетров с характерными признаками некрогеморрагического синдрома. Клинический материал, для изучения сравнительной эффективности выявления герпесвируса сибирского осетра в материалах от рыб методом ПЦР в режиме реального времени и выделения вируса в культуре клеток, отбирали на разных стадиях течения болезни.

В инкубационном периоде для выделения вируса в культуре клеток и для ПЦР-анализа отобрали пробы слизи с поверхности тела рыб и кусочки плавников. В период развития болезни, когда клинические признаки были ярко выражены, пробы слизи с поверхности тела рыб, кусочки плавников и внутренних органов погибших рыб. В период реконвалесценции материалом для исследования являлись кусочки плавников, внутренних органов и слизь убитых рыб. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты сравнительной эффективности выявления герпесвируса сибирского осетра в материалах от рыб с помощью ПЦР в режиме реального времени и в культуре клеток

№ п / п	Стадии инфекционного процесса	Сутки после заражения	Вид материала, взятый на исследования	Количество проб	Выявление генома герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР-РВ		Выделение вируса в культуре клеток SSO-2	
					«+»	«-»	«+»	«-»
1	Инкубационный период	7	слизь	40	24	16	12	28
			плавники	40	24	16	12	28
		10	слизь	40	28	12	14	26
			плавники	40	28	12	14	26
2	Период развития болезни	13	слизь	40	40	0	40	0
			плавники	40	40	0	40	0
		16	слизь	40	40	0	40	0
			плавники	40	40	0	40	0
			Пробы внутренних органов *	8	8	0	8	0
		19	слизь	32	32	0	32	0
			плавники	32	32	0	32	0
			Пробы внутренних органов *	14	14	0	14	0
		23	слизь	18	18	0	18	0
			плавники	18	18	0	18	0
			Пробы внутренних органов *	10	10	0	10	0
		3	Период реконвалесценции	32	слизь	8	8	0
плавники	8				8	0	2	6
56	слизь			8	8	0	1	7
	плавники			8	8	0	1	7
	Пробы внутренних органов *			8	8	0	1	7

Примечание: * печень, почки, селезенка, сердце

Таким образом, результаты исследований показали, что по эффективности выявления герпесвируса сибирского осетра в инкубационном периоде и в период реконвалесценции метод ПЦР в режиме реального времени значительно превосходит традиционный метод вирусыведения в культуре клеток.

2.3.7 Конструирование рекомбинантного положительного контроля

С целью получения положительного контроля амплификации к тест-системе для выявления ДНК герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени на основе плазмидного вектора pTZ57R (Fermentos) создали рекомбинантную конструкцию, несущую участок гена ДНК-полимеразы герпесвируса сибирского осетра штамм SK1/0406.

На матрице последовательных десятикратных разведений полученной рекомбинантной плазмиды провели количественную ПЦР в режиме реального времени, позволяющую определить число молекул ДНК в исследуемых вирусосодержащих образцах. На основании полученных данных подобрана оптимальная концентрация плазмиды в качестве матрицы для постановки ПЦР в режиме реального времени, которая составляла 7500 копий на реакцию ($1:10^7$) (рисунок 2).

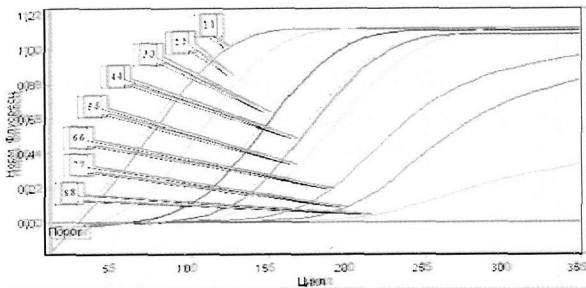


Рисунок 2 – Серия десятикратных разведений рекомбинантной плазмиды, несущей вставку участка гена ДНК-полимеразы

Рисунок 2 – Серия десятикратных разведений рекомбинантной плазмиды, несущей вставку участка гена ДНК-полимеразы

Таким образом, сконструированный рекомбинантный вектор может быть использован в разработанной тест-системе для выявления генома герпесвируса

сибирского осетра с помощью ПЦР в режиме реального времени в качестве положительного контроля амплификации фрагмента генома данного вируса.

2.3.8 Молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса

Нами была проведена работа по идентификации цитопатогенного агента выделенного при вирусологическом обследовании рыбоводного хозяйства г. Ижевск, который по характеру ЦПД отличался от штамма SK1/0406 и изолятов, выделенных в европейской части страны. Данный изолят (SIz6/0311) был идентифицирован в реакции нейтрализации с референсной гипериммунной антисывороткой как герпесвирус сибирского осетра (индекс нейтрализации $10^{3,2}$ при разведении антисыворотки в реакционной смеси 1:100).

Для сравнительной характеристики штамма SK1/0406 и выделенных изолятов был определен нуклеотидный состав фрагментов, полученные последовательности выравнены и сопоставлены. В результате определения нуклеотидных последовательностей у изолята SIz6/0311 было выявлено 49 нуклеотидных замен по сравнению со штаммом SK1/0406.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательности участка гена ДНК-полимеразы показал, что все изоляты герпесвируса сибирского осетра, выявленные на территории Российской Федерации, на 98 % гомологичны со штаммом SK1/0406 герпесвируса сибирского осетра, изолят SIz6/0311 герпесвируса сибирского осетра образует отдельный кластер и на данный момент является единственным его представителем (рисунок 3).

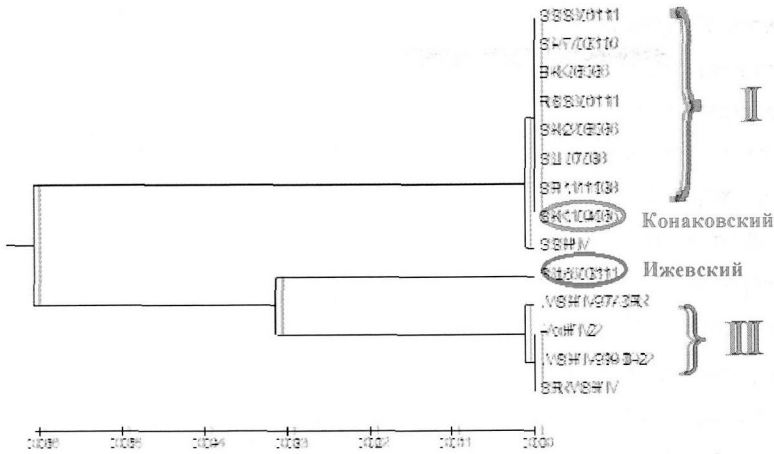


Рисунок 3– Дендрограмма, отражающая филогенетические взаимоотношения герпесвирусов осетровых рыб: I – Российские штамм и изоляты; II - Американские штаммы

2.3.9 Мониторинговые исследования осетроводных хозяйств на наличие герпесвируса сибирского осетра

Разработанную тест-систему применяли при обследовании осетроводных хозяйств различных регионов Российской Федерации.

Полевые материалы от осетров отбирали в рыбоводных хозяйствах Псковской, Вологодской, Смоленской областей и республики Бурятия в связи с подозрением на герпесвирусную болезнь сибирского осетра или в ходе мониторинга хозяйств на данную инфекцию. Материал отбирали прижизненно для исследования параллельно тремя разными методами: а) вирусыведение в культуре клеток; б) выявление вирусной ДНК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени; в) обнаружение антител к вирусу в сыворотках крови обследуемых рыб. Данные по мониторинговым исследованиям представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Данные по обследованным осетроводным хозяйствам

Регион	Вид рыбы	Месяц отбора	Вид материала	Количество проб	ПЦР-РВ	Культуры клеток	Выявление антител (РН)
Псковская обл.	сибирский осетр	декабрь	слизь	60	-	-	+
Вологодская обл.	сибирский осетр	декабрь	слизь	60	+	-	+
Смоленская обл.	сибирский осетр	январь	слизь	60	+	+	н.и.
	русский осетр			20			
Республика Бурятия	байкальский осетр	май	грудные плавники	25	+	+	н.и.

Исследования показали, что инфекция, вызываемая герпесом сибирского осетра, в хозяйствах, имела место, о чем свидетельствует обнаружение ДНК вируса в исследованных пробах грудных плавников и слизи рыб, и противовирусных антител в сыворотках крови обследованных особей.

3 ВЫВОДЫ

1. Рассчитаны специфичные праймеры и зонд, оптимизированы условия постановки ПЦР для амплификации гена ДНК-полимеразы герпесвируса сибирского осетра.
2. Разработана тест-система для выявления ДНК герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени с аналитической чувствительностью $3,1 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, позволяющая выявлять геном вируса в пробах слизи, органов и тканей инфицированных рыб.
3. Отработана методика пробоподготовки и определена диагностическая ценность проб различных органов и тканей рыб для выявления ДНК герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени. на основании которой выбрана слизь живых рыб, в качестве материала для проведения прижизненной диагностики данной болезни.

4. Установлено, что по эффективности выявления герпесвируса сибирского осетра в инкубационный период и период реконвалесценции ПЦР в режиме реального времени значительно превосходит метод выделения вируса в культуре клеток.

5. Установлено, что изоляты SK2/0506, BK/0506, SL/0708, SP1/1108, SA7/0310, SSS/0111, RSS/0111, выделенные на территории Российской Федерации, идентичны, и имеют сходство 98 % со штаммом SK1/0406 герпесвируса сибирского осетра, а изолят Slz6/0311 образует отдельный кластер и на данный момент является единственным его представителем.

4 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Специфичные оригинальные олигонуклеотидные праймеры и зонд предлагаются для использования в целях идентификации ДНК герпесвируса сибирского осетра.

Разработанная методика по выявлению ДНК герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени для обнаружения генома данного вируса с аналитической чувствительностью $3,1 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$

В качестве руководства по применению разработанной тест-системы рекомендуются «Методические положения по выявлению ДНК герпесвируса сибирского осетра методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени», утвержденные академиком-секретарем Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии А.М. Смирновым 28.05.2012 г.

5 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Разработка технологии ПЦР в реальном времени для выявления герпесвируса сибирского осетра в клиническом материале / И.М. Калабеков, Ф.С. Калабекова, Т.И. Щелкунова, И.С. Щелкунов, Д.В. Колбасов // Расширенные материалы III международной конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб» / Москва-Борок, 2011. - С. 303-305.

2. Выявление генома герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени и ее применение при обследовании рыбоводных хозяйств / **Ф.С. Калабекова**, И.М. Калабеков, И.С. Щелкунов // Научный журнал КубГАУ, №82(08), 2012.

3. Разработка положительного контроля к тест-системе для выявления ДНК герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени / **Ф.С. Калабекова**, Щелкунов И.С. // Материалы международной научно-практической конференции «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК» / Щелково, 2012. - С. 129-132.

4. Разработка ПЦР для идентификации герпесвируса сибирского осетра / **Ф.С. Калабекова**, Щелкунов И.С. // Материалы II-ой конференции молодых ученых «Актуальные проблемы инфекционной патологии в ветеринарной медицине» / Покров, 2012. - С. 84-86.

5. Further virus characterization, diagnostics and prevention of Siberian sturgeon herpesvirus disease / Igor Shchelkunov, Andor Dospoly, Tatiana Shchelkunova, **Fatima Kalabekova**, Ismail Kalabekov, Dmitry Kurenkov // USA-Russia Bilateral Workshop On Aquaculture and FishHealth USGS Western Fisheries Research Center, Seattle, WA, USA October , 2012.

6. Detection of Siberian sturgeon herpesvirus genome by Real Time PCR and its application for fish farm survey / **F. Kalabekova**, I. Kalabekov, O. Kolbasova // 16th Intern. Simposium of the WAVLD, Berlin, Germany, 2013. P. 239.

6 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

п.о. – пар оснований

ПЦР- полимеразная цепная реакция

Отпечатано в типографии ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии,
г. Покров Владимирской области.
Тираж 100 экз.