Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко»
ФАНО России

На правах рукописи

Карпова Марианна Алексеевна

Разработка тест-системы для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV) иммуноферментным методом

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология;
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
академик РАН, доктор ветеринарных наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ
М. И. Гулюкин

кандидат биологических наук **Е. А. Завьялова**

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ 2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 5
1. ВВЕДЕНИЕ 7
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 15
2.1. Характеристика инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых 16
2.2. Устойчивость вируса 19
2.3. Пути передачи IPNV 20
2.4. Клинические признаки 23
2.5. Инкубационный период 25
2.6. Сезонная закономерность 26
2.7. Строение генома 26
2.8. Репликация вируса 27
2.9. Профилактика и меры борьбы 29
2.10. Диагностика инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых 30
2.10.1. Культура клеток 30
2.10.2. Реакция нейтрализации 31
2.10.3. Иммуноферментный анализ 31
2.10.4. Полимеразная цепная реакция 31
2.10.5. Иммуногистохимический анализ 32
2.11. Иммунизация 33
2.12. Заключение по литературному обзору 35
3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ 37
3.1. Материалы и методы 37
3.1.1. Культуры клеток 37
3.1.2. Вирус 37
3.1.3. Животные 38

3.1.4. Сыворотка 38
3.1.5. Реактивы 38
3.1.6. Буферные растворы 39
3.1.7 Лабораторное оборудование: 40
3.1.8. Культивирование перевиваемых клеточных линий рыб 41
3.1.9. Титрование вируса 44
3.1.10. Реакция нейтрализации 44
3.1.11. Накопление вируса 45
3.1.12. Очистка и концентрирование вируса 45
3.1.13. Получение иммунной сыворотки к IPNV на кроликах 45
3.1.14. Ацетонирование печени 45
3.1.15. Очистка от липидов 46
3.1.16. Определение концентрации белка 46
3.1.17. Выделение иммуноглобулинов из сыворотки кролика 46
3.1.18. Получение иммунопероксидазного конъюгата к IPNV 47
3.1.19. Статистические методы 47
3.2. Культивирование различных штаммов IPNV и чувствительность разных культур клеток рыб, влияние pH на жизнеспособность вируса 47
3.3. Получение постоянной линии клеток OMG 53
3.4. Очистка и концентрирование вируса 58
3.5. Иммунизация кроликов 60
3.6. Выделение иммуноглобулинов из сыворотки кролика 63
3.7. Получение иммунопероксидазного конъюгата к IPNV 65
3.8. Определение оптимальных условий постановки «сэндвич» ИФА 69
3.9. Определение позитивно-негативного порога (ПНП) 72
3.10. Определение специфичности и чувствительности тест-системы для выявления IPN 73
3.11. Определение стабильности специфических компонентов набора при хранении 76

3.12. Испытание полученной тест-системы в производственных условиях 77
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ 79
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ 87
6. ВЫВОДЫ 88
7. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ 90
8 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 92
9. ПРИЛОЖЕНИЕ 113

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДЭАЭ-целлюлоза – диэтиламиноэтилцеллюлоза;

ИН – индекс нейтрализации;

ИФА – иммуноферментный анализ (ELISA);

КРС – крупнорогатый скот;

мбар – миллибар;

мкл – микролитры;

нм – нанометр;

об/мин – обороты в минуту;

ОП – оптическая плотность образца;

ОФД – ортофенилендиамин;

ПНП – позитивно-негативный порог;

ПХ – пероксидаза хрена;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПЭГ – полиэтиленгликоль;

РН – реакция нейтрализации;

РНК – рибонуклеиновая кислота (RNA);

ТМБ – тетраметилбензидин;

ТЦД – цитопатогенная доза;

ФСБ – фосфатносолевой буфер;

ФСБ-Т – фосфатносолевой буфер с твином;

ЦПД – цитопатическое действие;

CHH-1 – культура клеток из сердца киты;

CHSE-214 – культура клеток из эмбриона чавычи;

Da – дальтон;

EPC – Epithelioma papulosum cyprinid (Cyprinus carpio) – культура клеток из эпителиальной папилломы карпа;

FHM – культура клеток из хвостового стебля черноголового гольян;

Ig – иммуноглобулин;

IHN – инфекционный некроз гемопоэтической ткани;

IPN – инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых;

ISA – инфекционная анемия лососевых;

OIE – World Organisation for Animal Health (Всемирная организация по охране здоровья животных);

OMG – Oncorhynchus mykiss gonade (Oncorhynchus mykiss) – культура клеток из гонад радужной форели;

RTG-2 – Gonadal tissue, Raindow trout (Oncorhynchus mykiss) культура клеток из гонад радужной форели;

SVC – весенняя виремия карпа;

VHS – вирусная геморрагическая септицемия;

WSSK – культура клеток из кожи белого осетра.

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Актуальность темы исследования

Сельское хозяйство — неотъемлемая часть всей экономики страны, которая обеспечивает сырьем предприятия легкой и пищевой промышленности, является главным источником продовольствия. В условиях действующих санкций и обеспечения продовольственной безопасности страны, роль сельского хозяйства в современной экономике постоянно возрастает. От развития агропромышленного комплекса напрямую зависит жизненный уровень и благосостояние населения. В 2016 году доля аграрного сектора в структуре ВВП страны выросла до 3,9 %, что на 0,4% больше, чем годом ранее (Федеральная служба государственной статистики). Этот показатель является самым высоким после кризиса 2008–2009 годов. Одной из важнейших отраслей сельского хозяйства является аквакультура [1]. По данным ФАО, в общемировом объёме пищевой рыбы на долю выращиваемых биообъектов приходится почти половина. Ежегодно растет объем рыбоводной продукции. В связи с этим в процессе культивирования гидробионтов особенно актуальна борьба с инфекционными заболеваниями [159]. Разнообразие заболеваний оборачивается серьезными экономическими и экологическими проблемами для народного хозяйства [120]. В России необходимо независимое производство сельскохозяйственной продукции, включая развитие внутреннего производства аквакультуры. Важнейшими государственными документами, которыми руководствуются рыбоводы страны, являются Продовольственная доктрина РФ, Государственная программа развития сельского хозяйства и Стратегия развития аквакультуры в РФ на период до 2020 года.

Однако интенсификация аквакультуры ставит ряд трудноразрешимых задач перед ветеринарной медициной в плане эффективной системы выявления, лечения и профилактики инфекционных заболеваний, поражающих все возрастные группы рыб из-за высокой концентрации

поголовья на ограниченной площади, нарушения естественного баланса окружающей среды, нарушения режима выращивания, технологических стрессов и других условий [15].

Одно из опаснейших заболеваний — инфекционный некроз поджелудочной железы лососёвых (Infectious pancreatic necrosis, IPN) — высококонтагиозная вирусная болезнь, поражающая молодь культивируемых лососевых и некоторых других семейств, обитающих как в пресной, так и в морской воде [29, 94, 126, 131]. Вызывает до 90% гибели поголовья в условиях индустриального рыбоводства. Против IPNV нет адекватной терапии (кроме уничтожения зараженной рыбы). Клинически IPN расценен как самое серьезное заболевание в производстве лососевых. Вирус нередко циркулирует в популяциях годами, не вызывая эпизоотии [164].

В 2001 году впервые в России от мальков семги, полученных из оплодотворенной икры, завезенной из Норвегии, и в культуре клеток сердца кеты был выделен вирус инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых, представитель семейства Birnaviridae [6]. На сегодняшний день исследования, проводимые на культурах клеток, являются «золотым стандартом» в выделении и идентификации возбудителей вирусных заболеваний, незаменимым в таких областях биологических наук как цитология, вирусология, биотехнология [62]. Применение в вирусологической практике клеточных линий позволило узнать биологию вирусов, понять взаимодействие с клеткой, изучить этиологию вирусных болезней, а так же помогло при создании противовирусных препаратов [8; 151, 175].

Традиционными диагностическими методами на IPN во всем мире являются вирусовыделение в культуре клеток и последующая серологическая идентификация со специфической сывороткой в реакции нейтрализации. Дополнительно в диагностических лабораториях вирус, выявляют иммуногистохимически в гистологических препаратах, в реакции

гемагглютинации или современными молекулярными методами, такими как ПЦР [126]. В будущем, возможно, молекулярные методы приобретут еще большее значение, по крайней мере, для изучения генетического профиля вирусов и определения вирулентности [60].

За рубежом проблема IPN носит комплексный многогранный характер. Пока еще остается много нерешенных вопросов о резервуарах патогена, вертикальной и горизонтальной передаче, патогенности и вирулентности вируса, защите рыб, взаимоотношениях «возбудитель-хозяин» и т.п. [60].

В нашей стране первоочередной задачей является организация мониторинга, который позволит получать объективные данные о распространении данной болезни. Лабораторная диагностика болезни путем вирусовыделения в культурах клеток сама по себе занимает много времени (от 21 до 31 дня), затратна, субъективна, так как зависит от качества применяемых культур клеток, а также опыта и компетенции специалиста проводящего работу. Поэтому выполняется только в двух-трех крупных научно-исследовательских институтах Центрального региона страны, следовательно, официальная статистика недополучает данные о возникновении болезни в других субъектах Федерации [2].

В последние годы в диагностике вирусных болезней человека и животных широко используется иммуноферментный анализ (ИФА). Его главные достоинства — высокая чувствительность и специфичность, коррелирующие с результатами, полученными при использовании других серологических методов, а также широкое распространение специального оборудования, позволяющего почти полностью автоматизировать процесс выявления антигенов без использования культур клеток.

1.2 Цели и задачи

Целью настоящего исследования являлась разработка тест-системы для выявления вируса возбудителя IPN рыб методом иммуноферментного анализа.

Для достижения поставленной цели определены следующие задачи:

1. Выбрать криопротектор для хранения вируса в лиофилизированном виде. Изучить чувствительность разных культур клеток рыб и влияние pH на жизнеспособность вируса.
2. Получить перевиваемую линию клеток и определить ее чувствительность к вирусам различных таксономических групп.
3. Разработать метод получения очищенного и концентрированного вируса IPN, обеспечивающий максимальную чувствительность и специфичность тест-системы.
4. Получить иммуноспецифические компоненты: антиген, гипперимунные сыворотки и специфичные иммуноглобулины к вирусу IPN.
5. Получить иммунопероксидазный конъюгат.
6. Определить оптимальные условия постановки ИФА.
7. Определить чувствительность и специфичность тест-системы в сравнении с другими способами диагностики: выделение в культуре клеток, реакция нейтрализации и ПЦР.
8. Испытать тест-систему в практических условиях в некоторых лососеводческих хозяйствах РФ.

1.3 Степень разработанности темы исследования

Изучению вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых в России посвящены работы А.И. Канаева [11], Т.Д. Пичугиной [6] и Е.А Завьяловой [14, 9, 6], в которых представлены результаты изучения некоторых морфо-биологических свойств вируса и частично раскрыты механизмы развития заболевания. В работах Т.Д. Пичугиной и Е.А. Завьяловой показаны возможности воспроизведения *in vivo* в лабораторных условиях и предложены перевиваемые линии клеток для выделения и культивирования вируса. В Чехии велась разработка тест-системы для

выявления IPNV[83]. Однако на отечественном рынке ветеринарных препаратов в настоящее время отсутствуют качественные диагностикумы, сочетающие невысокую стоимость анализа, простоту в использовании, а главное, высокую чувствительность, такие как иммуноферментный анализ. Не разработаны методы получения очищенного вируса, антител к IPNV и конъюгатов.

1.4 Научная новизна

- 10 октября 2013 года получен Патент РФ на изобретение №2495120 «Постоянная линия клеток OMG из гонад радужной форели (Oncorhynchus mykiss)»;
- впервые в РФ разработана экономичная по времени и перспективная для полевых испытаний тест-система на основе твердофазного «сэндвич» варианта ИФА для определения антигена IPNV в инфицированных культурах клеток и в гомогенатах тканей рыб;
- разработана схема гипериммунизации получения антивидовых сывороток для серологических реакций (на основе штамма N07-1);
- оптимизированы методы накопления и очистки вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых, получения иммунопероксидазного конъюгата.

1.5 Теоретическая и практическая значимость работы

- 16 марта 2010 года штамм постоянной линии клеток OMG из гонад радужной форели паспортизирован и депонирован в Специализированной коллекции перевиваемых соматических культур клеток сельскохозяйственных и промысловых животных Российской коллекции клеточных культур при Всероссийском научноисследовательском институте экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. Линии клеток присвоен коллекционный номер 75.
- Разработана и оптимизирована схема иммунизации кроликов.

- Определена схема накопления, очистки и концентрирования вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых
- По материалам диссертации разработаны и утверждены: «Наставления по применению набора для диагностики инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN)» от 10 октября 2013 года протокол № 4, «Инструкция по применению набора для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPNV) методом иммуноферментного анализа «IPNV-ИФА-ВИЭВ» от 10 октября 2013 года и «Стандарт ГНУ ВИЭВ Набор для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPNV) методом иммуноферментного анализа «IPNV-ИФА-ВИЭВ» (СТО 004961-65-00-2013) от 26 сентября 2013 года.

1.6 Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием современного оборудования и применением широкого спектра методов, включающих методики: очистки и концентрирования вируса, получения гипериммуных сывороток, выделения иммуноглубулинов, получения иммунопероксидазного конъюгата и другие.

1.7 Положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Характеристика вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых.
2. Характеристика и биологические свойства перевиваемой культуры клеток OMG.
3. Характеристика иммунореагентов, разработанных для твердофазного иммуноферментного анализа и обнаружения специфических антигенов возбудителя в патологическом материале.
4. Результаты определения корреляционной зависимости при сравнении данных, полученных с использованием разработанной тест-системы и других методов диагностики.
5. Результаты испытания тест-системы в практических условиях.

1.8 Личный вклад автора

Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно в лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко согласно заданию 08.02.01.13 НИР по РНТП. Отдельные этапы работы проводились совместно с сотрудниками института Е.А. Завьяловой, А.Е. Дрошневым, П.Д. Богдановой, Н.Ю. Кандриной, Н.Ф. Ломакиной. Автор выражает глубокую и искреннюю благодарность руководителям: к.б.н. Е.А.Завьяловой, академику РАН М.И. Гулюкину, всем исполнителям и участникам за помощь в выполнении диссертационной работы.

1.9 Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность результатов подтверждается достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. В работе использовалось сертифицированное откалиброванное оборудование. Научные положения, рекомендации и выводы, сформулированные в диссертации, подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках. Статистический анализ и интерпретация результатов проведены с использованием современных методов статистического анализа и обработки информации.

Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на МНПК «Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчёл» (Москва, 2011), МНПК «Проблемы ветеринарной медицины и зооэкологии Российского и Азиатско-Тихоокеанского регионов (Благовещенск, 2012), МНПК «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК (Щелково, 2012), 2-ая международная конференция молодых ученых «Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности» (Казахстан, п.г.т. Гвардейский, 2014).

1.10 Публикации результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в девяти научных работах, в том числе четыре статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, а так же Патент РФ №2495120.

1.11 Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 118 страницах и включает введение, обзор литературы, собственные исследования (материалы и методы исследования и результаты), заключение, выводы, список литературы. Материалы диссертации иллюстрированы 6 таблицами 6 рисунками. Список литературы включает 180 источников, в том числе 155 иностранных авторов.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В процессе культивирования гидробионтов особенно актуальна борьба с инфекционными болезнями. Несмотря на то, что большинство бактериальных и вирусных инфекций не представляют прямой угрозы здоровью человека, они отрицательно влияют на продуктивность, реализуемость товара и общественное мнение. Разнообразие заболеваний оборачивается серьезными экономическими и экологическими проблемами для народного хозяйства [120]. Аквабионты, выращеваемые в открытых системах, подвержены рискам заражения инфекционными заболеваниями и из окружающей среды, и от дикой популяции [159]. Так как болезни в выращиваемой популяции происходят от диких видов [51]. Взаимодействие между выращиваемой и дикой популяциями имеет фундаментальное значение для возникновения эпизоотий. Основным недостатком искусственного разведения рыб является большая плотность по сравнению с дикой популяцией, что приводит к быстрой передаче заболевания и подъему уровня инфицирования. Патогены, как правило, не вызывающие клинических форм болезней в естественных условиях, приводят к высокому уровню смертности в аквакультуре. В выращиваемой рыбе возбудители развиваются с повышенной вирулентностью, что представляет большую угрозу для сельского хозяйства.

В настоящее время, одной из основных проблем рыбного хозяйства являются вирусные инфекции. На сегодняшний день выделено около 300 вирусов из морских и пресноводных гидробионтов. Многие из них вызывают серьезные заболевания, наносящие серьезный ущерб аквакультуре. Поражение большей части молоди приводит к колоссальному вреду и убыткам, грозящим практически полным разорением владельца рыбного хозяйства. В странах с высоким уровнем аквакультуры (Норвегия, США, Япония, Канада и др.) регулярно проводятся активные вирусологические исследования. К наиболее серьезным вирусным инфекциям относятся:

инфекционный некроз гемопоэтической ткани (IHN), весенняя виремия карпа (SVC), инфекционная анемия лососевых (ISA), вирусная геморрагическая септицемия (VHS), инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых (IPN).

2.1. Характеристика инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых

Одно из самых опасных вирусных заболеваний —инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых (IPN), внесенное в «Перечень карантинных и особо опасных болезней рыб» от 29 сентября 2005 года. Это сильно контагиозная вирусная болезнь молоди лососевых рыб, способная вызвать 90% смертность в условиях индустриального рыбоводства. Против IPNV нет адекватной терапии (кроме уничтожения зараженной рыбы). Клинически IPN расценен как самое серьезное заболевание в производстве лососевых [29].

Инфекционный некроз поджелудочной железы (IPN) сначала был описан в 1941 году в Канаде как острый катаральный энтерит и приписывался к пищевым факторам [102]. Wolf К.открыл, что это заболевание вирусной этиологии [174], вызывающее высокую смертность у молоди лососевых рыб. Вирус был выделен на культурах эксплантатов радужной форели.

Чаще всего поражается молодь радужной форели (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*), американской палии (*Salvelinus fontinalis Walbaum*), кумжи (*Salmo trutta L.*), атлантического лосося (*Salmo salar L.*), и некоторых других видов тихоокеанского лосося (*Oncorhynchus spp.).* С возрастом восприимчивость к заболеванию уменьшается. Резистентность к клиническому проявлению болезни обычно достигается приблизительно в 1500 градусодней [56]. IPNV и вирусы, серологически с ним связанные, вызывают заболевания у некоторых видов морской рыбы, таких как камбала – тюрбо (*Scophthalmus maximus L.*) [40, 114, 125] и других видов [47], палтус (*Hippoglossus hippoglossus L.*) [114, 143, 61], желтохвостая лакедра (*Seriola quinqueradiata*

L.) [122], лиманда (*Limanda Limanda L.*) [129], атлантическая треска (*Gadus morhua L.*).

Болезнь распространена по всему миру (OIE 2006) в основном за счет движения живой рыбы и икры [65; 71]. На территории бывшего СССР впервые это заболевание было зарегистрировано в Прибалтике в 1986 году. Эпизоотии возникали среди молоди кижуча и стальноголового лосося при температуре воды около 14°С. Гибель кижуча достигала 80% и более (Н.И. Рудиков с соавт., неопубл.).

В настоящее время инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых является наиболее изученным из всех вирусных болезней рыб [8].

IPNV относится к роду *Aquabirnavirus* из семейства *Birnaviridae* [164]. Бирнавирусы (*Birnaviridae*) – небольшая группа вирусов, поражающая позвоночных, беспозвоночных и насекомых. Вирус распространён среди рыб и домашних птиц. У домашних птиц симптомы проявляются в виде депрессии, тремора, тяжелой диареи. Семейство состоит из трех родов: *Aquabirnavirus* – поражает рыб, *Entomobirnavirus* – вирус X дрозофилы, заразный для плодовой мушки Дрозофилы меланогастер (*Drosohpila melanogaster*) и *Avibirnavirus* – вирус инфекционной бурсальной болезни птиц (IBDV) [55].

Бирнавирусы гидробионтов разделены на две серогруппы (A и B), которые не реагируют в перекрестной реакции нейтрализации [29].

К серогруппе А относятся десять серотипов [74, 81]: WB (West Buxton, A1 или VR299), Sp (Spjarup, A2), Ab (Abild, A3), He (Hecht, A4), Te (Tellina, A5), C1 (Canada 1, A6), C2 (Canada 2, A7), C3 (Canada 3, A8), Ja (Jasper, A9) и N1 (Norway, A10) [81].

Серогруппу В составляют несколько перекрестно реагирующих между собой изолятов, называемых IPNV-подобными: четыре штамма, выделенных от моллюсков [173]. Обычно случаи болезни связаны с тремя серотипами Ab, Sp (европейские серотипы) и WB (американский серотип). Хотя строение

вирионов и антигенные характеристики выделенных изолятов близки и хорошо изучены, организация и структура геномов по прежнему остаются недостаточно охарактеризованными. Полные структуры сегмента А представлены только для трех вирусных штаммов: Jasper [58], N1 [70] и DRT [45]. Нуклеотидный анализ штаммов Jasper и DRT показал сходство в структурах на 99% , в то время как сходство со штаммом N1 было на уровне 80%. Все три последовательности содержали большую открытую рамку считывания [39].

Филогенетический анализ региона VP2 (главный капсидный белок) позволил выделить семь геногрупп: шесть геногрупп коррелирует с ранее выделенными серогруппами (A1-A9), седьмая геногруппа была выделена на основании региона VP2/NS [36, 124]. Регион VP2 был также выбран по причине того, что белок VP2 является главной антигенной детерминантой среди различных серотипов [41, 162] и содержит два гипервариабельных участка: 243-335 позиции аминокислот. В этом гипервариабельном домене белка VP2, Santi [149] с коллегами продемонстрировал, что этот регион связан с вирулентностью вируса. Исследования показали, что ослабление вируса связано с заменой аланина в 221 положении на треонин, что было доказано как на культурах клеток, так и при выделении вируса в естественных условиях [150].

Обычно классификации на основе генома для IPNV строятся на сегменте А и разнообразии гена VP2. Это объясняется тем, что белок, кодируемый этим геном, играет важнейшую роль в иммунном ответе и развитии вирусной инфекции [150].

Мексиканские исследователи построили генетическую классификацию, основываясь на сегменте В. Филогенетическое дерево состоит из трех геногрупп: первая геногруппа (изоляты из Испании, Кореи, Японии, Канады, США, Мексики), вторая геногруппа (изоляты из Испании,

Норвегии, Дании, Франции и Канады) и третья группа, включающая в себя морские аквабирнавирусы [104].

Lee et al. [99] использовали ПЦР для амплификации фрагмента 1180 пн внутри гипервариабельного региона VP2 и исследовали схожесть вирусов на геномном уровне с помощью RFLP (restriction fragment length polymorphism) – анализ полиморфизмов с помощью рестриктаз. Этот регион был выбран по нескольким причинам: во-первых, вследствие большого количества сайтов рестрикции, которые могут дать необходимую информацию о генетических вариациях, во-вторых, этот регион содержит гены, кодирующие белки Ns (неструктурный белок, консервативная область) и VP2 (главный структурный белок, отличается большим количеством геномных вариаций) [98].

Серотипы вируса различаются по фенотипическим и по физико-химическим свойствам, но они дают перекрестные иммунологические реакции и являются, таким образом, близкородственными. Выделяются также новые серотипы. Среди полевых изолятов обнаружены авирулентные и вирулентные вирусы [78, 109].

2.2. Устойчивость вируса

IPNV стабилен в диапазоне температур от минус 80°C до плюс 20°C. Выдерживает нагревание при плюс 44°C в течение 15 минут, инактивируется при плюс 60°C в течение 60 минут, а при плюс 80°C – около 10 минут. Стабилен при солености от 0 до 40‰ [113]. Устойчив к высушиванию, на воздухе вирус остается инфекционным до двух недель (при температуре от плюс 15°C до плюс 22°C). В лиофилизированном состоянии при температуре минус 20°C остается активным до пяти лет. Выдерживает закисление среды до pH 1.1 – 1.3 [52, 121]. Устойчив к действию эфира, хлороформа, метиленового синего, сернокислой меди, малахитового зеленого. При воздействии УФ-излучением полностью инактивируется за 60 минут; 3%-ный раствор формалина и 2%-ный раствор NaOH инактивируют вирус за 10 минут. Разрушается йодином, хлорином, озоном [170].

IPNV очень устойчив в воде. Рассеивание вируса в воде приводит к серьезному риску передачи болезни. Аквакультурная рыба является важным источником распространения IPNV [131]. Высокие концентрации вируса обнаруживаются при вспышках инфекционного некроза поджелудочной железы. Ahne W. [27] нашел IPNV в пробах из озера при отсутствии вспышки IPN. IPNV был найден в фекалиях рыбы [35; 178] и в пресноводном речном раке *Astacusastacus* [68]. Вирус также присутствовал в тканях мертвых экземпляров. Вирус и загрязненный вирусом материал определялся вниз по течению от загрязненного места в 19.3 км из IPNV – загрязненных садков рыбы [108]. IPNV накапливается в фильтрующих животных [77]. Переболевшие рыбы остаются носителями на всю жизнь.

2.3. Пути передачи IPNV

Вертикальная передача – передача от одного поколения к следующему [107]. Вирус может содержаться внутри икры – истинная вертикальная передача, или альтернативно – на поверхности гаметы, в яичниках, в овариальной или семенной жидкости. В данном случае поверхностная дезинфекция икры недостаточно эффективна для предотвращения заболевания [37].

Горизонтальная передача происходит через воду. Вирус встречается в пресной, солоноватой и морской воде, распространяясь течениями на большие расстояния от очагов инфекции. Например, незначительное количество жизнеспособных вирусов IPN было обнаружено вниз по течению от лососёвого хозяйства на расстоянии 19.3 км [108]. Перенесшие заболевание рыбы становятся бессимптомными вирусоносителями. Продолжительность вирусоносительства исчисляется годами и может быть пожизненной. Вирусоносители формируют естественный резервуар инфекции в природных условиях в пресной и морской воде. Источником вируса в воде служат больные рыбы, рыбы – вирусоносители, их выделения, погибшие рыбы, икра [135]. Инфицированные особи выделяют вирус с

мочой, экскрементами и слизистыми отделениями из воспаленного кишечника, с половыми продуктами (овариальная и семенная жидкости), через жабры, кожу и ткани плавников. На сегодняшний день IPNV изолирован из воды, отложений на дне водоема или бассейна, птиц, моллюсков, рыб [137, 81]. Вирус перемещается от основного хозяина (например, лосось или форель) по различным водохранилищам и векторам инфекции и наоборот. Во время эпизоотии вирус в огромном количестве рассеивается больными или погибшими особями [146]. У рыб-вирусоносителей количество вируса во внутренних органах, желудочно-кишечном тракте, фекалиях, сперме и овариальной жидкости может достигать 10^{-6} $ТЦД_{50}$/г ткани. В связи с этим в рыбоводческих хозяйствах необходимо проводить систематические исследования на скрытое вирусоносительство во избежание вспышки IPN.

IPNV передается через воду, рабочий инвентарь, донные отложения, при каннибализме. Переносчиками инфекции могут быть рыбоядные млекопитающие и птицы (в пищеварительном тракте которых вирус не разрушается и выходит с экскрементами), планктон, эктопаразиты, моллюски, ракообразные. Многочисленные исследования показали, что двустворчатые моллюски быстро накапливают вирус от зараженной воды, иногда в концентрациях выше, чем в окружающей среде [112]. Все штаммы IPNV, связанные с эпизоотиями рыб, могут быть изолированы от моллюсков. В воде при плюс 10°С вирус сохраняется более 230 дней, при плюс 4°С около 1 года, в донных отложениях при плюс 20°С и плюс 10°С – соответственно более 1 и 2 месяца. Высушивание на открытом воздухе полностью инактивирует вирус не менее чем за 2 недели [80].

Воротами инфекции являются жабры, интактные кожные покровы, плавники и, возможно, начальный отдел пищеварительного тракта. Из этих мест первоначального размножения вирус разносится по всему организму. Переболевшая рыба приобретает стойкий иммунитет, в крови появляются

антитела, уровень и продолжительность циркуляции которых (от нескольких месяцев до 1 года и более) определяются интенсивностью инфекционного процесса. Эксперименты показали, что вирус может сохранять инфекционность, пройдя через пищеварительный тракт млекопитающих и птиц, одновременно оставаясь безопасным для них. Кстати, водоплавающие птицы выступают в качестве разносчика инфекции, поскольку поедают, прежде всего, больную рыбу, более доступную для хищника. Изоляты IPNV, выделенные из моллюсков и ракообразных, включая и тех, что инфицируют рыб и могут вызывать у них болезни, растут на клеточных линиях самых разнообразных рыб. Вирус инфекционного панкреатического некроза распространен по всему свету. Он встречается как в природных условиях, так и в аквахозяйствах, и выделен из морских и пресноводных рыб, относящихся к 31 семейству, из короткопёрого кальмара (*Illex illecebrosus*), из 14 видов моллюсков, в том числе от обыкновенной и средиземноморской мидий, а также из 6 видов ракообразных. Все штаммы IPN, связанные с эпизоотиями рыб, могут быть изолированы от моллюсков, хотя информация об эпизоотиях, болезнях или смертности среди двустворок, связанных с вирусом IPN, отсутствует, за исключением случая с клэмом на Тайване [101]. В моллюсках вирус IPN обычно не реплицирует, но накапливается в их тканях в процессе питания, и сохраняет инфекционность довольно длительное время: в европейской устрице основные штаммы IPNV сохранили свою жизнеспособность даже спустя 40 – 60 дней после её очистки [79]. Что касается упомянутого клэма, то у этого моллюска цвет жабр, поражённых вирусом, изменился и приобрёл оттенки от белого до тёмно-серого, а ядра инфицированных клеток жабр стали пикнотическими. Таким образом, вполне можно предположить, что вирусы, изолированные из рыб, могут быть инфекционными также и для двустворок в случае сильной заражённости последних. Подобное предположение тем более вероятно, что практически каждый вид вируса представлен в природе несколькими серотипами или

штаммами. То обстоятельство, что моллюски, и в частности мидии, в больших количествах обитают в районах размещения рыбоводческих хозяйств, объясняет их высокую обсеменённость вирусом IPN. Например, на северо-западном побережье Испании, в районе Галиции, от выращиваемых на фермах микиши *Oncorhynchus mykiss*, атлантического лосося *Salmo salar L.*, а также тюрбо *Psetta Scophthalmus maximus* было выделено 176 изолятов IPNV [48]. Одновременно с этим, проводилось изучение встречаемости вируса IPN в объектах окружающей среды в непосредственной близости от ферм. В результате было получено 55 изолятов IPNV, в том числе от средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* – 32, от гигантской устрицы *Crassostrea gigas* – 5, литторины *Littorina litorea* – 4, от трёх видов рыб естественных популяций – 8, из донных отложений – 5 и из влажных кормовых шариков. Таким образом, среди объектов окружающей среды наибольшее количество изолятов вируса инфекционного панкреатического некроза было выделено из мидий, что свидетельствует о весомой роли этих моллюсков в качестве естественного резервуара IPNV в морской среде. Этот вывод подтверждается также довольно высокими показателями встречаемости вируса IPN у мидий, исследованных у берегов Испании в Средиземном море. Здесь он был обнаружен у 24% обследованных моллюсков [137]. IPNV распространяется горизонтально непосредственно инфицированными рыбами с мочой и фекалиями, а также с фекалиями и тканями беспозвоночных, с экскрементами водоплавающих птиц.

2.4. Клинические признаки

У лососевых вирус поражает печень, поджелудочную железу, пищеварительный тракт и вызывает катаральный энтерит, панкреатит, некроз печени. Клинически проявляется в виде экссудативно-геморрагического синдрома из-за поражения гемопоэтической ткани заднего отдела почки, что ведет к нарушению водно-минерального баланса и выходу плазмы и клеток крови в окружающие ткани и полости тела. Септический процесс приводит к

поражению практически всех органов и тканей. У лососевых рыб наиболее тяжело поражаются поджелудочная железа (выраженный некроз секреторных клеток концевых отделов экзокринной части железы), почки и пищеварительный тракт.

Болезнь возникает при температуре воды от плюс 6 до 16^{o}С. Смолты атлантического лосося обычно страдают от болезни вскоре после пересадки из пресной воды в морскую [155]. Первый признак заболевания — внезапная прогрессирующая гибель мальков, особенно у быстрорастущих видов. Наиболее остро протекает при температуре воды от плюс 12 до 14^{0}С. Инкубационный период составляет от 6 до10 суток [11]. Первыми признаками заболевания являются анорексия и угнетение рыб. Больные особи приобретают темную окраску тела, отделяются от стаи, поднимаются к поверхности воды, перемещаются к краям пруда или канала, где течение слабее. При быстром развитии заболевания появляются рыбы с нарушением координации движений и повышенной возбудимостью. Удар по воде или стенке бассейна вызывает у них кратковременные спиралеобразные движения, сменяющиеся угнетением рыб и опусканием их на дно. Острая вспышка начинается с внезапного появления массовой гибели рыб. Характеризуется нарушением координации движения, вздутием брюшка, потемнением кожного покрова, слабыми дыхательными движениями, развивается одно- или двусторонняя экзофтальмия, рыба опускается на дно, жабры бледные, из ануса выделяется беловатая слизь [11, 126]; поражением поджелудочной железы, точечными кровоизлияниями на пилорических придатках, изменениями в селезенке, печени и других паренхиматозных органах. Желчный пузырь переполнен желчью. Стенки кишечника дряблые, он растянут и заполнен бесцветной или беловатой слизью. В поджелудочной железе находят некрозы и цитоплазматические включения. В гемопоэтической ткани почек – дегенеративные изменения и увеличение количества клеток-макрофагов [11]. Отмечают катаральное или

геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта. Он свободен от пищи и наполнен слизеподобным содержимым молочно-белого цвета.

Хроническое течение характеризуется менее выраженными признаками и растянутой во времени гибелью рыбы. С возрастом восприимчивость к заболеванию уменьшается, резистентность к клиническому проявлению болезни достигается приблизительно в 1500 граусодней [56]. Вспышки IPN у лососей в возрасте старше 5 месяцев известны как в пресной, так и в морской воде [44, 90, 110, 155]. Они могут быть спровоцированы стрессовыми факторами: обработка, транспортировка, перепады температуры, плотность посадки, перебои в кормлении, дефицит растворенного кислорода [158, 34].

Смертность составляет от 10% до 90% в зависимости от сочетания факторов, таких как штамм вируса [109], его количество [127], хозяин, условия содержания и окружающая среда [54].

Переболевшие особи на всю жизнь остаются вирусоносителями. Титры могут колебаться от необнаруживаемых до высоких [72]. Низкий титр IPNV не оказывает отрицательного воздействия на рост, развитие и здоровье [50]. Однако это все равно несет угрозу популяции.

Вирусоносительство констатировано у 40 видов гидробионтов [9], в том числе у пресноводных рыб: вьюна (*Misgurnus anguillicaudatus L.*) [43], щуки (*Esoxlucius L.*) [27] и среди семейств *Anguillidae, Atherinidae*, *Bothidae*, *Carangidae*, *Cotostomidae*, *Cichlidae*, *Clupeidae*, *Cobitidae*, *Coregonidae*, *Cyprinidae*, *Esocidae*, *Moronidae*, *Paralichthydae*, *Percidae*, *Poecilidae*, *Sciaenidae*, *Soleidae* и *Thymallidae* [135]; а также у 70 видов морских беспозвоночных животных [161, 84] и *Artemia salina L.* [40].

2.5. Инкубационный период

Инкубационный период при IPNV зависит от температуры окружающей среды и возраста рыб. Так, в экспериментальных условиях при температуре воды 12 – 14°C инкубационный период длится 6 – 10 дней.

Гибель рыб в основном наблюдается в течение первых двух недель, затем постепенно ослабевая, продолжается в течение 2 – 6 последующих недель. При заражении рыб путем прямого контакта больных со здоровыми инкубационный период не превышает 5 – 8 дней у мальков, а у сеголетков форели при температуре 12 – 14°С он равен 10 – 12 дням

2.6. Сезонная закономерность

Сезонную закономерность IPNV невозможно определить однозначно, так как в зависимости от температуры водоема болезнь может проявляться в течение осени, зимы и весны, то есть в то время года, когда происходит выклев личинок молоди лососевых рыб и перевод их на искусственное кормление. Наиболее интенсивно IPNV протекает при температуре воды плюс 12-14°С. Экспериментально установлено, что при температуре воды плюс 10°С гибель мальков тем меньше, чем больше их возраст, к 20-недельному возрасту у них болезнь клинически не проявляется. Гибель рыб уменьшается в тех случаях, когда температура воды низкая (до 6°С) или, наоборот, очень высокая – более 16°С. Энзоотии и эпизоотии, как правило, сопровождаются массовой гибелью больных рыб (10 – 90%).

2.7. Строение генома

IPNV – относительно небольшой вирус, 60 нм без внешней оболочки. Имеет икосаэдрическую форму и лишен оболочки. Изометрический капсид без выступов, гексагональный по очертанию, состоит из 132 капсомеров. Обладает геммаглютинирующей способностью [111]. Внешняя окружность определяет капсулу вируса. Геном состоит из линейной двухцепочечной РНК (bi-RNA) с двумя геномными сегментами (А и В) [179], которая имеет молекулярную массу $4{,}8 \times 10^6$ Da, что составляет 8,7% массы вириона. Её плавучая плотность в градиенте сернокислого цезия равна 1,615 г/см^3, а температура плавления 89^0С. При электрофорезе в 5%-ном полиакриламидном геле РНК вируса разделяется на два компонента. Репликация происходит в цитоплазме клеток [49, 147].

Геном двухсегментный, имеет 5876 нуклеотидов. Сегмент А состоит из 3092 нуклеотидов, сегмент В из 2784 [59].

Сегмент А кодирует 2 больших белка. Капсула вируса построена из структурных белков VP2 (54 kDa), который формирует капсид вириона, является видоспецифическим антигеном и влияет на вирулентность [150, 118] и VP3 (31 kDa) ассоциированный с вирусным геномом [57, 148, 30]. А также кодирует два дополнительных неструктурных белка, а именно,VP4 или NS (29 kDa) сериновые и лизиновые протеазы которого участвуют в созревании вирусных частиц [168]. Белок без четко определенной функции VP5 (17 kDa), богатый аргинином. Есть данные, что он предотвращает апоптоз, таким образом участвует в размножении вируса [105, 73].

Сегмент В кодирует зависимую РНК полимеразу, белок VP1 (94 kDa). Этот белок был обнаружен как свободный полипептид, ковалентно присоединенный к пятому концу РНК сегментов [59, 96]. Участвует в синтезе вирусной РНК [115]. Для представителя семейства Birnaviridae IBDV белок VP1 модулирует вирулентность *in vivo* [157, 92].

Важность различных структурных и неструктурных белков в вирусном патогенезе еще не полностью изучена [100].

2.8. Репликация вируса

Репликация вируса проходит в цитоплазме восприимчивых клеток. Линия клеток RTG-2 (постоянная перевиваемая линия клеток фибробластов радужной форели) чаще всего используется для культивирования вируса [176]. На этой клеточной линии ЦПД появляется при достаточном широком диапазоне температур (от плюс 5 до 20 °С). Другие постоянные перевиваемые линии клеток, полученные от костных рыб GF [46], BFz [177] и FHM [67] также оказались восприимчивыми к вирусу [177]. Наиболее часто линия клеток FHM используется для таких задач, как идентификация вируса и постановка диагноза IPN [31], изучение эффектов влияния температуры и

исследования по изучению выработки интерферона под воздействием вируса [151, 67].

Также было установлено, что некоторые штаммы вируса имеют ограниченный круг восприимчивых культур клеток. Так, например, штамм Ab, изолированный в Дании и серологически отличающийся от ранее выделенных, не размножался на культуре клеток FHM cells [166, 167].

Цикл репликации вируса в культуре клеток CHSE-214 занимает 24 часа при плюс 15ºС [93]. Спустя 16-20 часов после заражения наблюдается выраженный цитопатический эффект [106]. Вирусная одноцепочечная мРНК обнаруживается в клетках спустя 2-4 часа после заражения, двуцепочечная РНК появляется еще спустя 2 часа [156]. Синтез вирусной специфической РНК достигает своего максимума спустя 8-10 часов после заражения и затем снижается [156]. Недавно было показано, что во время репликации вируса формируется два типа вирусных частиц: незрелые и неинфекционные частицы – предшественники и зрелые вирионы [168].

Вирус инфекционного некроза проникает в клетку путем рецепторного эндоцитоза, который быстро переносит вирус через плазматическую и эндосомальные мембраны [59].

Для распространения инфекции *in vivo* вирусу необходимо не только проникнуть внутрь клетки хозяина, реплицировать геном, синтезировать вирусные белки и частицы, но и обойти иммунную систему организма хозяина [99]. Интерферон I типа играет важнейшую роль в защите организма рыбы от вирусной инфекции. Именно поэтому синтез интерферонов типов a и b начинается в ответ на проникновение вируса в клетку для защиты еще неинфицированных клеток [138, 180, 139]. После секреции IFN, происходит активация Янус киназ 1 (JAK1) и тирозинкиназ 2 (TYK2), которые запускают каскады фосфорилирования сигнальных трансдуктов и активацию транскрипции белков STAT1 и STAT2. Комплекс этих белков активируют транскрипцию большого числа генов, ассоциированных с продукцией

интерферона [64]. Показано, что в вирусном геноме кодируется множество генов для ингибирования различных компонентов системы интерферона, среди них есть такие, которые блокируют синтез интерферона, экспрессию генов, сигнальные пути [133]. IPNV чувствителен к антивирусному действию интерферонов, это показано в экспериментах на культурах клеток, где экзогенное добавление интерферона 1a ингибирует репликацию вируса [140].

Исследования показали, что активность интерферона1 типа связана с угнетением синтеза вирусных белков и репликации вируса [95]. Так при добавлении интерферона в культуру клеток, инфицированных IPNV, подавляет продукцию белка VP2 даже спустя 96 часов. Недостаток этого белка критичен для сборки вирусных частиц, так как этот белок формирует капсид вириона [86].

Villanueva и соавторы [165] показали вовлеченность сериновых и лизиновых протеаз вирусного белка VP4 в созревание вирусных частиц.

Таким образом вирусная протеаза VP4 может быть мишенью для системы интерферона.

2.9. Профилактика и меры борьбы

Благополучие хозяйства зависит от выполнения санитарных норм. Для предотвращения вертикальной передачи: использование производителей, проверенных на IPNV и имеющих отрицательные результаты; проверка оплодотворенной икры при завозе в хозяйство.

Использование водоемов, изолированных от дикой популяции рыб и от других гидробионтов – возможных вирусоносителей [126]. Движение живой рыбы между хозяйствами несет высокий риск передачи IPNV, поэтому необходима проверка поступающей рыбы. Повышенное внимание в периоды, когда рыба наиболее подвержена заболеванию: во время пересадки смолтов из пресной в морскую воду и в течение нескольких месяцев после, до и во время нерестового сезона, при переходе из стадии зародыша в личинку.

Вакцинация рыбы регулярно используется в Норвегии, Шотландии, Чили [42].

2.10. Диагностика инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых

2.10.1. Культура клеток

Традиционным методом обнаружения IPNV, является вирусная изоляция в клеточной культуре [85], которая рекомендована в руководстве OIE. С последующим подтверждением иммунологической идентификацией в реакции нейтрализации [81] или иммуноферментным анализом (ELISA), изолированного вируса. Для выявления вируса проводят гистологические исследования и электронную микроскопию. Чувствительными культурами клеток к IPNV являются EPC, RTG-2, CHSE – 214, FHM и BF-2, в которых цитопатогенное действие вируса характеризуется веретеновидной дегенерацией клеток перед их отделением от стекла. При температуре инкубации 20^0C и pH среды 7,3-7,6 однократный цикл репликации составляет 16-20 часов. Главным недостатком этого метода является длительность выделения вируса, которая может достигать 1- 14 дней.

По руководству OIE для идентификации вируса необходимо отобрать печень, почку, селезенку и/или овариальную жидкость у рыб, мечущей в это время икру [126]. Причина выбора этих органов основана на результатах исследований, которые показали, что в них находится наибольшее количество вируса, но главным образом он сосредоточен в поджелудочной железе и печени. Поджелудочная железа не упомянута в выбранных органах вероятно из-за того, что ее сложно изолировать.

Alonso et al [28] изолировали IPNV от сенегальской солеи *Solea senegalensis*, затем инфицировали культуры клеток BF-2, EPC, CHSE-214 для определения чувствительности метода гибридизации *in situ*. В ходе этого эксперимента было установлено, что линии клеток обладают разной чувствительностью, что требует установления стандартов в выделении

вируса на культуре клеток или для разработки метода, детектирующего низкие титры вируса, полученные из гомогенатов тканей, минуя стадию культивации в культурах клеток.

2.10.2. Реакция нейтрализации

Серологическая реакция основана на способности специфических вируснейтрализующих антител блокировать инфекционные свойства вируса. Служит для идентификации и определения титра.

2.10.3. Иммуноферментный анализ

В последнее время учеными предложены экспресс-методы диагностики IPNV к ним относится прямой и непрямой методы флуоресцирующих антител, а также «сэндвич» ИФА, чувствительность которого составляет $10^{5,5}$ $ТЦД_{50}$/мл. Иммуноферментный анализ дает хорошие результаты при диагностике на ранних стадиях развития болезни, скрытой форме, а также при вирусоносительстве и не требует специального оборудования и высокой квалификации оператора [128, 53].

2.10.4. Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция была разработана как быстрый метод выявления вируса IPN [89]. Метод быстрый и очень чувствительный. Мультиплексный анализ, дающий возможность выявлять вирусы IPN, IHN, VHS, был разработан [171]. В работе Saint-Jean [145] была проведена работа по сравнению чувствительности ПЦР и вышеупомянутых иммунологических методов. Метод проточной цитометрии и метод ПЦР оказались наиболее чувствительными методами и выявляли вирус уже спустя 4 часа после заражения культуры клеток CHSE-214. Позволяет определить вирус $10^{-1.5}$ $ТЦД_{50}$/мл. ПЦР в режиме реального времени была разработана в 1992 году [75, 76].

Достижения в области диагностики человеческих инфекционных болезней были успешно применены для диагностики болезней водных

организмов. Одним из примеров является применение ПЦР в режиме реального времени. ПЦР в режиме реального времени была разработана в 1992 году [75, 76] и быстро стала главным инструментом для изучения экспрессии генов и диагностики инфекционных болезней [103, 123]. С тех пор было разработано огромное количество методов, основанных на детекции в режиме реального времени: неспецифическое связывание ДНК красителем SYBR® Green I, технология Taqman и тд. [103]. Среди этих технологий, технология SYBR® Green I наиболее простая и дешевая в исполнении, так как не требует дизайна и подбора олигонуклеотидного зонда. Специфичность продукта амплификации подтверждается исследованием кривой плавления [136, 165]. Внутренний контроль используется для нормирования разных начальных концентраций РНК, различий в эффективности синтеза кДНК, амплификации и разной экспрессии генов в тканях разных типов [165, 38].

Jorgensen S.M. с соавторами (2006) обнаружили, что экспрессия некоторых референсных генов, таких как b-actin, EF-1b, 18S rRNA, b2-микроглобулин, РНК полимераза I и II, и глицерол- 6- фосфат дегидрогеназа в разных тканях (печень, селезенка, головная почка, сердце) существенно отличается у больных и здоровых рыб. Наиболее стабильными оказались гены 18S рРНК и EF-1b [132].

ПЦР с предварительным проведением реакции обратной транскрипции для обнаружения IPNV была представлена Dannevig B. с соавторами [51] с минимальными модификациями.

2.10.5. Иммуногистохимический анализ

Метод с использованием антител с флуоресцентной меткой используется для идентификации вируса IPN. Однако этот метод имеет некоторые ограничения, так как образцы для рутинной диагностики часто зафиксированы в формальдегиде с последующей заливкой в парафин [26].

2.11. Иммунизация

Использование химиотерапевтических веществ в рыбном хозяйстве для лечения и профилактики инфекционных заболеваний менее предпочтительно, чем применение вакцин. Так как препараты, которые применялись для лечения рыб, могут попасть в организм человека с пищей и зачастую неэффективны. Из-за этого в современном рыбоводстве все чаще используют вакцинацию рыб.

Одна из основных проблем, связанных с созданием противовирусных вакцин, это понимание того, какие иммунные механизмы защиты организма рыбы задействованы в защите против вируса [154]. Большинство вакцин против вируса инфекционного некроза поджелудочной железы связаны с использованием ослабленных вирусных штаммов или рекомбинантных вирусных белков [116]. При использовании данных вакцин в полевых условиях уровень их защиты значительно ниже, нежели чем в лабораторных условиях [66]. Идеальная вакцина против IPNV должна индуцировать длительную защиту в раннем возрасте, предотвращать дальнейшее заражение и быть эффективной против большого количества серотипов вируса, а также быть эффективной при оральном и иммерсионном способе введения [32, 33, 117]. Гуморальная форма неспецифического иммунитета обеспечивается различными органами и клетками, производящими лизоцим, интерферон, пропердин, комплемент, фибронектин и некоторые другие биологически активные вещества. Часто общую оценку неспецифического иммунитета проводят по активности лизоцима сыворотки крови. Этот фермент с ярко выраженными бактерицидными свойствами вырабатывается в организме всех позвоночных. Сообщения о его отсутствии у того или иного вида рыб, скорее всего, связаны с некорректными оценками его активности. У рыб сезон года, физиологическое состояние сильно меняют титр лизоцима. Так, у карпа активность лизоцима максимальна осенью, в конце сезона выращивания, и минимальна в конце зимовки. Есть сообщения, что хищные

рыбы имеют более высокие титры лизоцима по сравнению с мирными рыбами.

Система интерферона первого типа является системой первой линии защиты от вирусов, так как продуцирует белок Мх, который является ключевым в ингибировании вирусной репликации [130, 142]. Роль интерферона была показана для большого количества видов рыб [141]. Экспрессия матричной РНК гена Мх и белка Мх является индикатором ответа интерферона, так как продукты этих двух генов имеют большее время жизни *in vivo* и в больших концентрациях, чем интерферон [63, 88] У атлантического лосося выявлено три субтипа интерферона 1: IFN-a, b и c [160]. Интерферон 1 типа экспрессируется в головной почке и его экспрессия индуцируется poly I:C.

Интерферон 1 типа обнаружен у всех позвоночных, начиная от костных рыб до млекопитающих, однако его структура значительно отличается. Если функции и свойства интерферонов млекопитающих известны, то роль интерферона в организме рыб по-прежнему изучена недостаточно.

Интерферон-гамма это интерферон второго типа продуцируется Т-лимфоцитами и NK. Стимулирует активность Т- и В-лимфоцитов, моноцитов/макрофагов и нейтрофилов. Индуцирует апоптоз активированных макрофагов, кератиноцитов, гепатоцитов, клеток костного мозга, эндотелиоцитов и подавляет апоптоз периферических моноцитов в антивирусном ответе, его функции сходны с интерфероном 1 типа. Более того, интерферон-гамма играет важную роль в адаптивном клеточно-ассоциированном ответе. Синтезируется только некоторыми клетками иммунной системы, включая естественные киллерные (NK) клетки, CD4 Т-клетки и CDS цитотоксические супрессорные клетки. [153, 118, 91]. Гены, кодирующие интерфероны первого и второго типов секвенированы и для

них показано, что по своей структуре и функциям они сходны к таковым у млекопитающих [141, 138, 142].

В настоящее время во всем мире при разработке долгосрочных стратегий искоренения вирусных заболеваний все большее внимание уделяется применению методов молекулярно-эпизоотологического надзора.

Молекулярная эпизоотология изучает такие проблемы, как сохранение возбудителей в природе, распространение инфекций, эволюция инфекционных болезней, возникновение «новых» патогенов.

Генетическую и антигенную вариабельность вирусов изучают методом филогенетического анализа, т.е. частичного секвенирования определенных фрагментов геномов и аминокислотных последовательностей различных вирусных изолятов и сравнения их с рядом наиболее известных референтных штаммов [144].

2.12. Заключение по литературному обзору

Инфекционный некроз поджелудочной железы – высококонтагиозная болезнь, поражающая пресноводных и морских рыб, приносящая серьезный экономический ущерб промышленному рыбоводству. Разработка надежных современных средств диагностики и профилактики – важнейшая задача на пути борьбы с распространением возбудителей данного заболевания и понимания механизмов эволюционного развития патогена.

Диагностика вируса инфекционного некроза поджелудочной железы традиционно была основана на выделении вируса в чувствительной культуре клеток с последующей идентификацией его в реакции нейтрализации со специфическими антителами. Помимо этого для экспресс-диагностики заболевания МЭБ рекомендованы непрямой иммунофлуоресцентный и ELISA-методы, а для идентификации генома вируса – метод обратной транскрипции – гнездовой полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) [126].

В связи с угрозой распространения IPNV в России и отсутствием в стране экспресс-методов диагностики данной инфекции нами были

проведены исследования по созданию такого метода на основе твердофазного «сэндвич» варианта ИФА для определения антигена IPNV в инфицированных культурах клеток и в гомогенатах тканей рыб.

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Материалы и методы

3.1.1. Культуры клеток

Для выделения и культивирования вируса использовали перевиваемые культуры клеток рыб, предоставленные лабораторией ихтиопатологии ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко.

EPC – Epithelioma papulosum cyprinid (*Cyprinus carpio*) – культура клеток из эпителиальной папилломы карпа.

FHM – культура клеток из хвостового стебля черноголового гольяна

RTG-2 – Gonadal tissue, Raindow trout (*Oncorhynchus mykiss*) культура клеток из гонад радужной форели.

CHSE-214 – культура клеток из эмбриона чавычи.

WSSK – культура клеток из кожи белого осетра.

OMG – Oncorhynchus mykiss gonade (*Oncorhynchus mykiss*) – культура клеток из гонад радужной форели, полученная в лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ.

3.1.2. Вирус

В работе использовали десять штаммов вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV), выделенных сотрудниками лаборатории ихтиопатологии от лососёвых рыб разных видов в период 2001–2011 гг. А также европейский референтный штамм, любезно предоставленный доктором Erke Neuvonen, (Финляндия, НИИ ветеринарии и продовольствия Хельсинки). Штаммы, прошедшие после изоляции 6-10 пассажей в культуре клеток, хранились в коллекции лаборатории ихтиопатологии в условиях низких температур (минус 75^{o}C) и в лиофилизированном виде.

Вирус нарабатывали в перевиваемых культурах клеток: эпителиальной папилломы карпа (EPC), гонад радужной форели (RTG-2 и OMG), хвостового стебля гольяна (FHM) и эмбриона чавычи (CHSE-214).

3.1.3. Животные

Было использовано 15 кроликов в возрасте 8-10 месяцев, массой 3-3,5 кг. Клинически здоровые животные были предоставлены Вышневолоцким филиалом ФГНБУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко с опытной базой о. Лисий. Кормление и содержание проводили в соответствии с принятыми санитарно-зоотехническими нормами для этого вида животного.

В работе использовали радужную форель (*Oncorhynchus mykiss*) средней массой 800 гр, которые были проинкубированы в условиях аквариальной лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ из оплодотворенной икры

3.1.4. Сыворотка

Для получения специфических иммуноглобулинов использовали сыворотку кроликов, гипериммунизированных вирусом IPN штаммом N07-1, выращенный на культуре клеток EPC и OMG.

3.1.5. Реактивы

Питательные среды, растворы и сыворотки: среда Игла МЕМ с солями Эрла, Игла МЕМ с двойным набором аминокислот и витаминов с солями Хенкса, среда Игла МЕМ с солями Эрла с 25 мМ HEPES (пр-во «ПанЭко»), 2 % и 10 % фетальная сыворотка КРС (пр-во «PAA»), 0,02 % раствор Версена, 0,025% раствор трипсина, антибиотики (канамицин, пенициллин, гентамицин).

Белки и ферменты: бычий сывороточный альбумин, пероксидаза хрена (пр-во ЮАР).

Реактивы: сульфат декстрана (Sigma, США), хлорид кальция (ГОСТ 4460-66), риванол (Sigma, США), хлорид натрия (ГОСТ4233-77), аммония сульфат (ТУ 6-09-1038-76), периодат натрия (Sigma, США), борогидрид

натрия (Sigma, США), серная кислота (ГОСТ 14262-78), ледяная уксусная кислота (ГОСТ 61-75), перекись водорода 30 % (ТУ 6-02-570-75), раствор ABTS, ортофенилендиамин (ОФД), тетраметилбензидин (ТМБ), молселект G10, G25,G75, ДЭАЭ-целлюлоза, полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ), мертиолят натрия.

3.1.6. Буферные растворы

Для приготовления компонентов иммуноферментного анализа и его проведения использовались следующие буферные растворы:

1. Натрий-фосфатный буфер (Phosphate buffered saline, PBS) pH-7,3. 8,0 г NaCl, 0,2 г KCl, 2,8 г Na_2HPO_4, 0,2 г K_2HPO_4 растворяли в дистиллированной воде и доводили объем до 1 л;
2. 0,001М натрий-ацетатный буфер pH-4,4. На 1 л дистиллированной воды 50,4 мг ацетата натрия, 20 мкл ледяной уксусной кислоты. Затем доводили pH раствора этой же кислотой до 4,4;
3. 1М калий-фосфатный буфер pH–7,2-7,4. 8 мл 1М K_2HPO_4, 2 мл 1М KH_2PO_4, 5,8 г NaCl растворяли в дистиллированной воде и доводили объем до 1 л;
4. 0,2М карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ) pH-9,5. 21,3 г Na_2CO_3, 16,8 г $NaHCO_3$ растворяли в дистиллированной воде и доводили объем до 1 л;
5. 0,01М фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH-7,5, содержащий 0,15М NaCl. 1,02 г Na_2HPO_4, 0,38 г KH_2PO_4, 8,8 г NaCl растворяли в дистиллированной воде и доводили объем до 1 л;
6. 0,01М фосфатно-солевой буфер с Tween-20 (ФСБ-Т) pH-7,5, содержащий 0,5М NaCl и 0,05 % Tween-20. 1,02 г Na_2HPO_4, 0,38 г KH_2PO_4, 29,22 г NaCl и 0,5 мл Tween-20 растворяли в дистиллированной воде и доводили объем до 1 л;
7. Фосфатно-цитратный (субстратный) буфер pH-5.0.

Раствор А (0,2М): 7,16 г $Na_2HPO_4 \times 12H2O$ на 100 мл H_2O

Раствор В (0,1М): 1,92 г лимонной кислоты на 100 мл H_2O

Раствор С (фосфатно-цитратный буфер): 6,4 мл раствора А+6,1 мл раствора В+12,5 мл H2O;

8. Субстрат-индикаторный раствор: 25 мл фосфатно-цитратного буфера + 10 мг ОФД + 10 мкл 33 % H_2O_2. Приготовленный раствор необходимо использовать немедленно.

Дезинфицирующие средства: 70 % этиловый спирт, 0,025 % раствор «Экодез».

Для гипериммунизации кролика использовали полный и не полный адъювант Фрейнда.

Для сорбции антител использовали печень КРС, карпа и форели.

Для отбора крови от радужной форели использовали анестетик бензокаин путем добавления в воду до конечной концентрации 40 мг/л.

3.1.7 Лабораторное оборудование:

1. Аналитические весы GR-200 (AND);
2. Бокс биологической безопасности с вертикальным ламинарным потоком II класса (ESCO);
3. Гомогенизатор;
4. Дозаторы с переменным объемом Nichiryo;
5. Культуральные матрасы SPL;
6. Культуральные микропланшеты 96-луночные SPL;
7. Культуральные стеклянные матрасы;
8. Лабораторная посуда общего назначения;
9. Лиофильная сушка Epsilon 1-4 LSC (Christ);
10. Магнитная мешалка MSH-300 (Biosan);
11. Микропланшетный промыватель Wellwash (Thermo Scientific);
12. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф»;
13. Морозильная лабораторная центрифуга MPW-380R (MPW);
14. Низкотемпературный морозильник на минус 80^{o}C (Sanyo);

15. Планшетный фотометр Multiskan FC с программным обеспечением SkanIt (Thermo Scientific);
16. Полистироловые микропланшеты (низкой, средней и высокой степени сорбции)и для проведения ИФА 96-луночные SPL;
17. Препаративная ультрацентрифуга Optima L-90K (Backman Coulter);
18. Прямой световой микроскоп Olympus BX53F;
19. Ротатор PSU-10i (Biosan);
20. Световой инвертированный микроскоп Биомед-3 (ув. ×70, ×280);
21. Сканирующий спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu);
22. Термостатированный шейкер СТ-3М (ELMI);
23. Технические весы Ohaus Scout;
24. Фильтровальные насадки на шприц с диаметром пор 0,22 мм (Миллипор);
25. Хладотермостат на плюс 15 и плюс 20^{o}C;
26. Холодильник фармацевтический плюс 4^{o}C (Panasonic);
27. Хромотографическая система Biologic LP (Bio Rad);
28. Центрифуга Avanti J-26 XP (Backman Coulter);
29. Шейкер Multi Bio RS-24 (Biosan);
30. Шприцы пластиковые.

3.1.8. Культивирование перевиваемых клеточных линий рыб

В работе были использованы перевиваемые клеточные линии рыбного происхождения с учетом особенностей условий культивирования для каждой из них. Культуры клеток поддерживали путем периодического пассирования. Пересев осуществляли по мере формирования монослоя бесцентрифужным методом.

Жизнеспособность определяли с помощью камеры Горяева. Для этого брали 1 мл суспензии и добавляли 1 мл 0,5 % водного раствора трипановой сини, которая окрашивает мертвые клетки в синий цвет. Полученную смесь вносили в камеру и подсчитывали живые клетки под микроскопом (ув. 7×10).

Далее объем среды доводили до необходимой концентрации. Посевная концентрация составляла 300 тыс. клеток в 1 мл среды. Коэффициент пересева составлял 1:3. Пересевали в культуральные матрасы 25 $см^3$.

Биологические и культурально-морфологические свойства культур клеток приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Биологические и культурально-морфологические свойства культур клеток

	EPC	OMG	RTG-2	CHSE-214	FHM	WSSK
Вид рыбы	карп	форель	форель	чавыча	черноголовый гольян	осетр
Морфология	эпителиоподобные клетки	эпителиоподобные клетки	фибробластные клетки	эпителиоподобные клетки	эпителиоподобные клетки	фибробластные клетки
Среды	Игла МЕМ с двойным набором аминокислот и витаминов с солями Хенкса	Игла МЕМ с солями Эрла с 25мМ HEPES	Игла МЕМ на солях Эрла	Игла МЕМ с двойным набором аминокислот и витаминов с солями Хенкса	Игла МЕМ на солях Эрла	Игла МЕМ с солями Эрла с 25 мМ HEPES
Соотношения трипсина и версена	1:2	4:1	1:1	1:2	1:2	1:3
Время диспергиро-вания (мин)	10	20+10мин после сливания диспергата	5	10	10	15 +10мин после сливания диспергента
Возраст при пересеве (дни)	10-30	2-3 недели	7-10	10-30	10-30	10-40
t^o выращивания культуры	18^{o}C	12 ^{o}C для формирования монослоя, через 2 дня перенести на 15^{o}C	15^{o}C	15^{o}C	15^{o}C	20^{o}C

3.1.9. Титрование вируса

Инфекционный титр вируса определяли по цитопатическому действию в культуре клеток, в полистироловых панелях. В лунки 96-луночной панели вносили по 270 мкл клеточной суспензии на поддерживающей среде, в концентрации $3x10^2$/мкл. Далее в 4 лунки первого ряда вносили 30 мкл вируса, который титровали, перенося по 30 мкл в лунки каждого следующего ряда. На одной панели проводилась работа с вирусом одновременно в двух культурах клеток. Учёт цитопатического действия проводили микроскопированием зараженных культур клеток через 1, 3, 5 дней инкубации при оптимальной температуре. Окончательный учёт ЦПД проводили на 7 сутки. Титр вируса определяли по методу Рида и Менча [134] и выражали в тканевых цитопатогенных дозах в 1 мл ($ТЦД_{50}$/мл).

3.1.10. Реакция нейтрализации

Реакцию нейтрализации ставили микрометодом в 96-луночных панелях по стандартной методике с серийными десятикратными разведениями вируссодержащей суспензии от 10^{-1} до 10^{-9} и постоянной концентрацией сыворотки 1:100. Титр вируса определяли по Риду и Менчу в присутствии гипериммунной и нормальной сывороток. За титр вируснейтрализующих антител принимали конечное разведение сыворотки, которое полностью ингибировало ЦПД вируса. Значение индекса нейтрализации (ИН) находили по таблице антилогарифмов. При исследовании патологического материала в реакцию нейтрализации брали деконтаминированную 10 % суспензию, при этом идентификация вируса достигалась одновременно с его выделением на культуре клеток.

В качестве испытуемого материала использовали культуральные вирусы IPN из коллекции лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ и пробы от лососевых рыб полученные в ходе мониторинга в некоторых регионах России.

3.1.11. Накопление вируса

Заражали культуру клеток вирусом, таким образом, чтобы рабочий титр был равен 10^3. Для этого брали предварительно вытитрованный вирус и разводили его до рабочего титра (10^3).

Вирус вносили из расчета на 100 мл среды 0,1 мл вируса (100 мкл). Матрасы оставляли в термостате при температуре необходимой для репликации данного вируса. Через 5–7 дней вирус разрушал клетки, образовывалась вируссодержащая суспензия, которую собирали, промораживали в течение суток при температуре минус 18°С для окончательного разрушения клеток и более полного выхода вируса. Далее суспензию осветляли центрифугированием при 2000 об/мин в течение 20 минут, снимали надосадок и использовали для вирусологических работ.

3.1.12. Очистка и концентрирование вируса

Получение вирусного антигена начинали с разрушения клеточного детрита замораживанием и оттаиванием. Концентрирование IPNV проводили методом осаждения ПЭГ-6000 [4, 5, 22, 97, 163, 169] и с использованием сульфата аммония. Накопленный вирус (хранили при температуре минус 70°С). Далее концентрированный вирус подвергали очистке методом ультроцентрифугирования на ступенчатым градиенте плотности хлористого цезия и сахарозе [5, 10, 19, 20, 21].

3.1.13. Получение иммунной сыворотки к IPNV на кроликах

Для получения гипериммуных сывороток и выделения Ig придерживались стандартных методов и условий, описанные разными авторами [3, 5, 20, 21, 25].

3.1.14. Ацетонирование печени

Для удаления балластных белков. Использовали печень крупного рогатого скота, карпа и форели. Ее подготавливали следующим образом. Первый этап. К гомогенизированной печени добавляли ледяной ацетон (минус 18°С) в

соотношении 1:4 соответственно. Шуттелировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Далее инкубировали при минус 12°С в течение 10 минут. Центрифугировали с ускорением 7500 g 30 минут при температуре плюс 4°С. Второй этап. Осадок ресуспензировали в охлажденном PBS. Шуттелировали 15 минут и центрифугировали с ускорением 7500 g 30 минут при плюс 4°С (три цикла). Далее повторяли первый этап. Потом снова осадок ресуспензировали в охлажденном PBS. Для удаления лишних белков отмывали 20 раз. Шуттелировали 15 минут и центрифугировали с ускорением 7500 g 30 минут при плюс 4°С. Надосадок измеряли при 280 нм на спектрофотометре. Он должен быть близок к нулю. Осадок лиофилизировали [5, 10, 19, 20, 21].

3.1.15. Очистка от липидов

Очистку от липидов проводили с применением декстран сульфата в качестве преципитирующего агента [69]. К инактивированной при 56°С гипериммунной сыворотке кролика добавляли из расчета 0,04 мл 10 % раствора декстран сульфата и 1 мл 1М раствора хлористого кальция на каждый миллилитр образца. Тщательно шуттелировали 15 минут и центрифугировали с ускорением 10000 g 10 минут при плюс 4°С. Супернатант собирали для дальнейшей работы [3, 7, 12, 13, 14].

3.1.16. Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [19].

3.1.17. Выделение иммуноглобулинов из сыворотки кролика

Иммуноглобулины получали риванольным методом. К сыворотке добавляли равный объем 0,75 % раствора риванола при перемешивании. Через 15 минут легкого шуттелирования центрифугировали при ускорении 3000 g 30 минут. К супернатанту, который содержит иммуноглобулины, добавляли хлорид натрия до концентрации 5 % для удаления риванола. Затем центрифугировали при ускорении 3000 g 15 минут. Остатки риванола удаляли гельфильтрацией через

колонку с сефадексом G10-15 [17]. Далее осаждали иммуноглобулины добавлением насыщенного раствора сульфата аммония (37 % и 40 % насыщения). Инкубировали 2 часа при плюс 4°С и центрифугировали с ускорением 15000 g 40 минут. Супернатант сливали, а осадок доводили до первоначального объема ФСБ. Диализировали против ФСБ в течение 2 суток с 4-х кратной заменой. Количество белка определяли по Лоури [5, 10, 19, 20, 21].

3.1.18. Получение иммунопероксидазного конъюгата к IPNV

Конъюгирование фермента с иммуноглобулинами проводили ковалентным способом, для введения фермента в молекулы антител использовали периодат натрия по модифицированной методике M.B. Wilson и P.K. Nakane [172]. В качестве ферментативной метки использовалась пероксидаза хрена (ПХ).

3.1.19. Статистические методы

Статистический анализ проводили общепринятыми методами [12].

3.2. Культивирование различных штаммов IPNV и чувствительность разных культур клеток рыб, влияние pH на жизнеспособность вируса

Данные о штаммах и результаты исследования представлены в таблице 2.

Большинство штаммов IPNV было выделено от радужной форели, кроме трёх: GP01/BC-1, GP07/BC-3, GP09/Синяя, которые были выделены от семги.

Биологическую активность (инфекционность) вирусов проверяли непосредственно после высушивания и через 0,5 – 2 года хранения. В результате установлено: снижение вирусной активности в процессе лиофилизации и хранения различных серий одного и того же препарата неодинаково. При этом длительность сохранения вирусов в сухом виде зависит от режима сушки и вида криопротектора. Лиофилизацию всех серий вирусов, проводили по одной схеме: в течение 26–30 часов при давлении в камере 0,05–0,02 мбар и температуре от минус 45°С до 20°С. При этом были апробированы несколько вариантов стабилизаторов: эмбриональная телячья сыворотка в соотношении с

биоматериалом 1:1, сахарозо-желатозная среда – 4% и 2,5% от объема биоматериала и среда ВГНКИ №3, как 1:1.

Первые морфологические изменения в клетках, вызываемые IPNV, наблюдали через 20 часов после инокуляции. В первые-вторые сутки характерным цитопатогенным действием вируса являлось появление в клетках множественных вакуолей, монослой клеток становился зернистым, клетки округлялись или приобретали вытянутую форму, ядра и ядрышки в пораженных клетках увеличивались в размере, появлялись внутриядерные включения.

Через 72 часа клетки еще больше вытягивались, появлялись цитоплазматические выступы в виде шипов, эпителиоподобные клетки напоминали по форме фибробластоподобные. Вирус вызывал симпластообразование пораженных клеток, которое вело к слиянию мембран и объединению ядер, что характерно для гемагглютинующих вирусов (рисунок 1). Образование симпластов становилось более заметным через 90 часов после заражения, в дальнейшем прогрессировало. Наблюдали околоядерные вакуоли. Появлялись пикнотические изменения в ядрах и их деструкция, в цитоплазме розоватые включения свойственные для РНК-геномных вирусов.

На пятые сутки культура представляла собой отдельно лежащие клетки, с сильно уплотненными ядрами. В контрольных культурах клеток подобных изменений не наблюдали.

На рисунке 1 видно дегенерацию монослоя, симпластообразование (1), частичная смерть клеток (2), разрушение цитоплазмы (3), ядра переместились на периферию клетки (4).

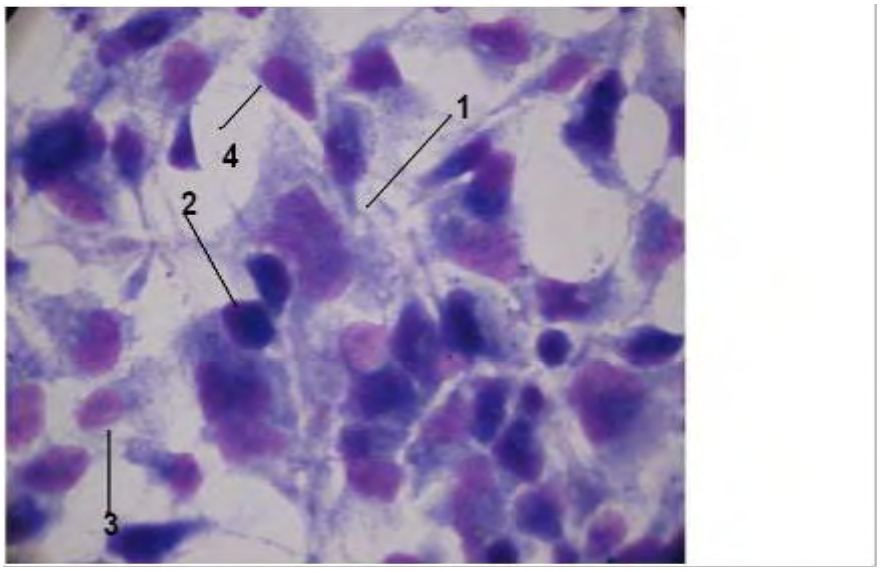

Рисунок 1 – Действие вируса IPN на культуру клеток RTG-2 через 72 часа (Микрофото, ×200, окраска по Романовскому-Гимзе)

Таблица 2 – Сравнительная характеристика штаммов IPN

№ п/п	Штаммы IPN	Источник и год выделения	Культура клеток, исходный титр	Дата лиоф-ции	Среда	Состояние таблетки	EPC	RTG-2	FHM	CHSE-214	OMG
1	LSK09	радужная форель, 2009г	EPC	май 2011г	желтоза+сах	норма	7*	8	7	8	
					сыв.КРС 1:1	норма	6*	1	---	---	
					среда №3	розоватая	8*	5	5.5	5	8
2	VT06	рад.форель, 2006г	RTG-2, $7{,}0^{.0}$	25.02.2010	желтоза+сах	норма	6	8*	8	5.5	7.5
					среда №3	ярко розовая	штамм не восстановлен				
3	N09-3	радужная форель, 2009г	EPC, CHSE-214	Май 2011	желтоза+сах	норма	7*	7	6.5	5.5	
					сыв.КРС 1:1	норма	1*	2.5	1	2	
					среда №3	розоватая	8*	6.5	5	6	7
4	G211	радужная форель, 2011г	FHM, RTG-2 EPC титр $10^{-7.5}$	2011г	желтоза+сах	норма	5*	6.5*	3.5*	2.5	7
					сыв.КРС 1:1	норма	5*	3*	1.5*	1.5	
					среда №3	розоватая	4.5*	6*	3*	5	
5	RKTV09	радужная форель, 2009г	CHSE-214 титр $10^{-7.0}$	25.02.2010	желтоза+сах	норма	5.5	7	7	7*	8
					среда №3	розоватая	6.5	---	7	---*	
6	LRK07	радужная форель, 2007г	FHM титр $10^{-7.0}$	25.02.2010	желтоза+сах	норма	7.5	6.5	7*	6.5	
					среда №3	розоватая	5	---	4*	2	
7	GP07	семга, 2007г	CHSE-214 титр $10^{-7.0}$	25.02.2010	желтоза+сах	норма	4.5	7	7	---*	
					среда №3	норма	3	8	4	---*	
8	GP09	семга, 2009г	RTG-2 титр $10^{-6.0}$	18.12.2009	среда №3	норма	5	7*	2	2	

№ п/п	Штаммы IPN	Источник и год выделения	Культура клеток, исходный титр	Дата лиоф-ции	Среда	Состояние таблетки	EPC	RTG-2	FHM	CHSE-214	OMG
9	N07-1	радужная форель, 2007г	EPC титр $10^{-7.0}$	22.01.2010	желтоза+сах	розоватая	8*	6	7	6.5	7
					сыв.КРС 1:1	желтая, усохшая	8*	---	---	1	
					среда №3	ярко розовая, сильно усохла	8*	---	3	---	
10	B09	радужная форель, 2009г	FHM титр $10^{-8.0}$	5.02.2010	желтоза+сах	норма	4	4	5*	4.5	
					среда №3	норма	5	---	4*	4	
11	SK07	радужная форель, 2007г	CHSE-214 титр $10^{-6.0}$	28.12.2009	сыв.КРС 1:1	норма	7	---	8	6*	
					среда №3	ярко розовая, усохшая	---	---	---	---*	
12	«Ab»	рефентный	CHSE-214(среда №3) титр $10^{-7.0}$–$10^{-8.0}$ RTG-2	май 2001г	желтоза+сах	норма	6	7*	6	6*	7
					NB-1	зеленоватая	5	8*	3.5	7.5*	
					среда №3	оранжевая, усохшая	6.5	7.5*	6.5	6.5*	

* - исходная культура клеток; «-» - отсутствие ЦПД; н.д. – не исследовали.

Для изучения влияния pH на жизнеспособность вируса использовали штаммы с титром 8,0 lg. Вируссодержащую суспензию делили на одиннадцать частей. В десять из них устанавливали pH (добавлением 0,1M NaOH и 0,1M HCl, под контролем pH-метра ЭКОТЕСТ-2000) от 1 до 10, с шагом 1, последняя часть была контролем – pH 7,4. Вирус хранили в течение полутора месяцев при температуре плюс 4 ^{o}C, еженедельно отбирали аликвоты для заражения культуры клеток. Было сделано 5 заражений с одновременным титрованием. Также было проведено два последовательных пассажа с интервалом 7 суток.

Полноту инактивации вируса под воздействием экстремальных значений pH, определял сотрудник лаборатории Богданова П.Д., методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией. В работе использовали четыре праймера к сегменту B (B1, B2, B3r, B4r) для штамма «Jasper» IPNV для гнездовой и полугнездовой ПЦР.

В результате экспериментов по изучению влияния pH было установлено, что IPNV сохраняет жизнеспособность через 7 дней хранения при всех испытанных pH, только при pH 1,0 – титр вируса составил 1,0 lg, однако, при последовательном заражении увеличился до 4,0 lg и 7,0 lg во втором пассаже и третьем пассаже соответственно. Полностью вирус инактивируется через 14 дней хранения при pH 1,0, что подтверждено результатами исследования в ПЦР. Во всех остальных образцах, включая контроль, за 45 дней хранения, титр вируса снизился не более чем на 0,5 – 1,2 lg.

Наши данные коррелируют с результатами исследований английских авторов [52], которые изучали влияние температуры и pH на жизнеспособность возбудителей вирусных и бактериальных болезней рыб, в частности IPNV. Однако, ими были испытаны только два значения pH 4,0 и 12,0, при этом было показано, что в течение 28 суток наблюдения титр вируса

уменьшился незначительно, на 0,22 lg. Следовательно, возбудитель IPN очень устойчив к изменению редокс-потенциала среды.

3.3. Получение постоянной линии клеток OMG

При первичной изоляции возбудителя вирусного заболевания необходимы чувствительные к максимальному количеству штаммов клеточные линии. Создание эталонного запаса клеточных линий, изучение жизнеспособности при длительном хранении в жидком азоте, а главное, чувствительности к вирусам дает большие преимущества в научно-исследовательской работе, так как клетки являются ценным биологическим материалом, необходимым для создания диагностических тест-систем. В задание лаборатории ихтиопатологии получение перевиваемой линии клеток из гонад половозрелой радужной форели, обладающей высокой чувствительностью к ихтиовирусам различных таксономических групп. Культура клеток была получена из первично-трипсинизированной ткани гонад половозрелой (третья стадия по шкале Киселевича) радужной форели путем длительного пассирования на среде Игла МЕМ на солях Эрла с 25мМ HEPES с 10 % эмбриональной сыворотки. Была названа авторами OMG (Oncorhynchus mykiss gonade (Oncorhynchus mykiss).

Цитоморфологические исследования, проведенные на уровне 50 пассажа, показали, что культуру OMG представляют прозрачные клетки эпителиоподобного типа. Границы клеток четко различимы. Встречались адгезированные, но не распластавшиеся, так называемые, покоящиеся клетки.

К настоящему времени она прошла более 300 пассажей без изменения морфологии клеток на протяжении всего периода наблюдения клетки сохраняли стабильные ростовые и цитоморфологические свойства.

Морфологические признаки – постоянная линия радужной форели представляет собой ровный, плотный монослой из клеток эпителиоподобной, полигональной формы, с крупными ядрами округлой или овальной формы с

1–3 ядрышками (рисунки 2 и 3). Клетки делятся обычным двуполюсным митозом.

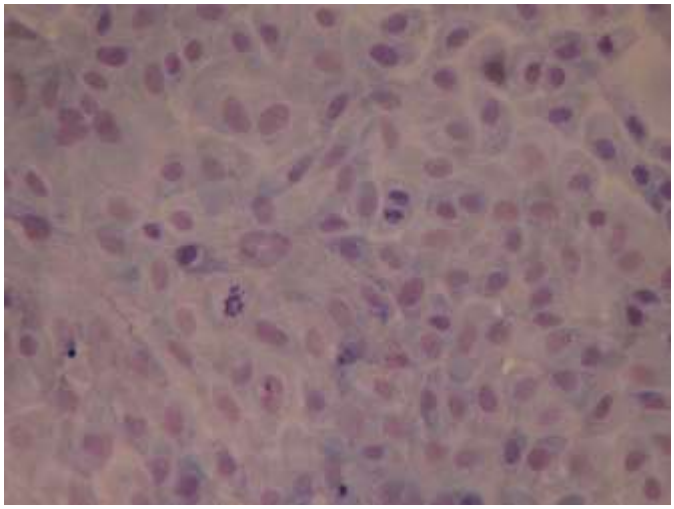

Рисунок 2 – Культура клеток OMG
(Микрофото, ×100, окраска по Романовскому-Гимзе)

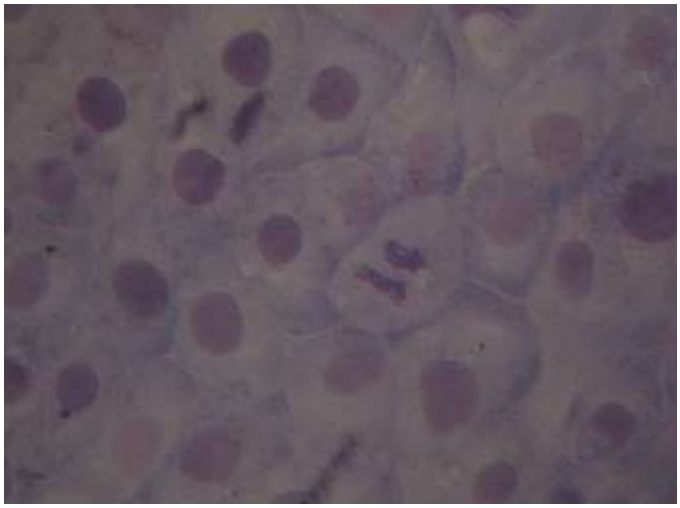

Рисунок 3 – Культура клеток OMG
(Микрофото, ×200, окраска по Романовскому-Гимзе)

Кариологический анализ проводили с колхицином. Для этого в культуральный флакон добавляли 1 мл колхицина и инкубировали четыри часа. Далее монослой снимали раствором трипсин-версена в соотношении 4:1 и заливали изотоническим раствором 0,56 % KCl на 30 минут. Центрифугировали при ускорении 2000 g пять минут. Отбрасывали

супернатант и аккуратно по стенке добавляли фиксатор (раствор абсолютного спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1), инкубировали 15 минут. После икубации осадок разбивали и центрифугировали при ускорении 2000 g пять минут (три цикла). По окончанию последнего центрифугирования сливали фиксатор и добавляли 1 мл свежего. Далее окрашивали по Романовскому-Гимзе. Кариотип соответствует видовому признаку форели, модальный класс содержит 60 хромосом (2n=60) и составляет 77 %.

Полученную линию клеток выращивали при температуре от плюс 15 до 22^{o}C в пристеночных условиях в сосудах различной емкости. Ростовая среда Игла МЕМ на солях Эрла с 25мМ HEPES с 10 % эмбриональной сыворотки без антибиотиков, pH среды 7,4–7,6. Дезагрегацию монослоя при субкультивировании осуществляли смесью трипсина 0,25 % и раствора Версена 0,02 % (4:1), кратность рассева 1:3–6. Посевная концентрация 250–300x10^{3} клеток/мл. Первые сутки после субкультивирования содержали при плюс 20–22^{o}C, для формирования монослоя, через двое суток монослой переносили на хранение при плюс 15^{o}C. Частота пересева составляла один раз 2–3 недели.

В опытах по изучению чувствительности использовали культуру клеток OMG на уровне 55–65 пассажей. Вирусы накапливали в референтных клеточных линиях, после полной деструкции монослоя вируссодержащую культуральную жидкость использовали для титрования в культуре клеток OMG. Инфекционный титр вируса определяли по цитопатическому действию (ЦПД) в культуре клеток, в полистироловых микропанелях (Nunc). В лунки 96-луночной панели вносили по 270 мкл клеточной суспензии на поддерживающей среде, в концентрации 3x10^{2} клеток/мл. Далее в 4 лунки первого столбца вносили 30 мкл вируса, который титровали, перенося по 30 мкл в лунки каждого следующего столбца. Учёт цитопатического действия проводили микроскопированием зараженных культур клеток через 1, 3, 5, 7 дней инкубации при оптимальной температуре – плюс 15^{o}C для IPNV, VHSV,

IHNV, SbSHV; плюс 20°С – для SVCV. Окончательный учёт ЦПД проводили на 10 сутки. Титр вируса определяли по методу Рида и Менча [134].

Исследования показали, что данная линия клеток чувствительна к вирусам: инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN), инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых (IHN), весенней виремии карпов (SVC), герпесвирусу карпа кои (KH), герпесвирусу осетровых (SbSH), вирусной геморрагической септицемии лососевых (VHS). Данные приведены в таблице 3.

Таблица 3 –Чувствительность клеточной линии OMG к патогенным вирусам рыб

Вирус	Культуры клеток. n=6			
	OMG		Референтная для данного вируса	
	Проявление ЦПД вируса, суток.	Титр вируса после 3-х пассажей lg $ТЦД_{50}$/мл	Проявление ЦПД вируса, суток	Титр вируса lg $ТЦД_{50}$/мл
Birnaviridae				
Инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV),	2	9,5+0,24	3	RTG-2/ 8,0+0,14
Rhabdoviridae				
Геморрагической септицемии лососевых (VHSV)	3	8,0±0,14	2	EPC/ 7,5±0,25
Инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых (IHNV)	3	8,75±0,14	3	EPC/ 7,5±0,25
Весенней виремии карпов (SVCV)	5	6,6±0,29	5	EPC/ 8,0±0,14
Herpesviridae				
Герпес-карпа кои (KHV)	2	9.0+0,25	2	FHM/7,5
Герпес-осетровых (SbSHV)	5	6,0±0,25	6	WSSK-1/ 6,0±0,29

Из данных таблицы видно, что клеточная линия OMG чувствительна к шести вирусам трёх таксономических групп: Birnaviridae, Rhabdoviridae, Herpesviridae.

Вирус IPN репродуцировался в культуре OMG с первого пассажа, при этом признаки ЦПД наблюдали на день раньше, чем в референтной культуре, через 24 часа после инфицирования, а через 3–4 сутки – полную деструкцию монослоя. Первые признаки дегенерации выражались в скоплении темных, с нарушенным светопреломлением, клеток, с последующим отделением их от субстрата. Инфекционный титр при этом превышал таковой в референтной культуре на 1,5 порядка.

По чувствительности выявления и по вирусрепродуцирующей способности рабдовирусов VHSV и IHNV клеточная линия OMG с первого пассажа превосходит на 0,5–1,25 порядка референтную линию EPC и только эффективность выявления SVCV, вируса того же семейства, даже после проведения трех пассажей, заметно ниже, на 1,5 порядка. Первые признаки ЦПД рабдовирусов на клеточной линии OMG появлялись через 72 часа, а затем нарастали. Полная деструкция монослоя происходила на 4–5 сутки после заражения. Характер ЦПД вирусов IHN, VHS, SVC был примерно одинаковым и выражался в округлении клеток, пикнозе, разрежении монослоя.

При инокуляции культуры клеток OMG герпесвирусом сибирского осетра обнаружено, что вирус репродуцировался с развитием типичного ЦПД: образованием симпластов, клеточного дебриса и полным отслоением клеток от субстрата. Однако, первые признаки ЦПД и полная деструкция монослоя выявлялись позднее (на третьи сутки), чем в культуре WSSK-1, при этом инфекционный титр был одинаковым. В результате опытов установлено, что клеточная линия OMG особенно чувствительна к бирнавирусу лососевых.В результате опытов установлено, что клеточная линия OMG особенно чувствительна к бирнавирусу лососевых.

3.4. Очистка и концентрирование вируса

Получение вирусного антигена начинали с разрушения клеточного детрита замораживанием и оттаиванием. Культуральную вируссодержащую жидкость после двукратного замораживания и оттаивания осветляли центрифугированием с ускорением 7000 g в течение 10 минут. В осветленную вируссодержащую жидкость добавляли до 2,3 % хлористого натрия и вносили стерильный ПЭГ-6000 до концентрации 7%. Смесь шуттелировали до полного растворения и оставляли на 24 часа при плюс 4^{o}C, отбирая аликвоты для титрования через 2, 4, 8, 18 и 24 часа соответственно (таблица 4). Далее центрифугировали при 1000 g с постепенным увеличением до 13000 g, температура плюс 4^{o}C в течение 45 минут. Ресуспензировали полученный осадок в 1/50 первоначального объема.

Таблица 4 – Изменение титра вируса в зависимости от времени

Исходный титр	2ч	4ч	8ч	18ч	24ч
9,0 lg	9,2 lg	9,3 lg	9,3 lg	10,5 lg	10,4 lg

Как видно из данных таблицы 4 оптимальное время инкубации составило 18 часов. При 24 часах титр сильно не изменился, но инкубировать в течение 18 часов целесообразней.

Для дальнейшей очистки вирусосодержащей суспензии использовали два метода ультроцентрифугирования: первый на градиенте раствора сахарозы, второй на растворе хлористого цезия.

Первый метод. В центрифужных пробирках на дно наслаивали 60 % раствор сахарозы (подложка) на который наносили 20 % и 30 % раствор сахарозы. На созданный градиент наносили вирусосодержащую суспензию. Центрифугирование вели при ускорении 84000 g, температура плюс 4^{o}C в течение двух часов – бакет-ротор SW32T. В данном режиме вирус осаждался

на подложку 60% сахарозы. Собранный материал подвергали диализу против ФСБ в течение 48 часов с трехкратной заменой при плюс 4°С. Далее проводили второй этап очистки, который заключался в наслаивании вируса на линейный градиент плотности сахарозы от 60 % до 5 % с шагом пять. Центрифугирование поводили при ускорении 25000g, при плюс 4°С в течение трех часов – бакет-ротер SW41T. Визуальное формирование вирусной полосы оценивали на градиенте 50 %. Собранный материал подвергали диализу против ФСБ в течение 48 часов с трехкратной заменой при плюс 4°С. Очищенный антиген стерилизовали фильтрацией через мембранный фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,22 мм. Определение стерильности приготовленного антигена проводил сотрудник лаборатории ихтиопатологии к.б.н. А.Е. Дрошнев, согласно «Методическим указаниям по бактериологическому контролю стерильности ветеринарных биологических препаратов».

При втором методе очистки антиген наслаивали на ступенчатый градиент плотности хлористого цезия (15–60 %) и центрифугировали с ускорением 100000 g в течение двух часов при плюс 4°С – бакет-ротор SW32T. Собранный материал подвергали диализу против ФСБ в течение 48 часов с трехкратной заменой при плюс 4°С. Далее аналогично первому методу.

Оптимальным оказался первый метод.

После очистки проверяли титр вируса, который составил 12 lg.

3.5. Иммунизация кроликов

Иммунизацию проводили по трём схемам, представленным в таблице 5.

Таблица 5 – Схема иммунизации кроликов

Схема	№ Инъекции	Интервал между инъекциями (сутки)	Антиген (объем – титр – кол-во белка)	Область введения	Способ введения	Присутствие Адъюванта (ад : аг)
№1	1	-	1 мл - $10^{9,0}$ТЦД$_{50}$/мл- 1540 мкг/см^3	бедро	в/м	ПАФ 1:1
	2	7	1,5 мл- $10^{9,0}$ТЦД$_{50}$/мл- 1540 мкг/см^3	ухо	в/в	-
	3	7	1,5 мл- $10^{9,0}$ТЦД$_{50}$/мл- 1540 мкг/см^3	ухо	в/в	-
	4	7	1,5 мл- $10^{9,0}$ТЦД$_{50}$/мл- 1540 мкг/см^3	ухо	в/в	-
	5	21	1,5 мл - $10^{9,0}$ТЦД$_{50}$/мл- 1540 мкг/см^3	ухо	в/в	-
	6	7	1,5 мл - $10^{9,0}$ТЦД$_{50}$/мл- 1540 мкг/см^3	ухо	в/в	-
	7	7	1,5 мл- $10^{9,0}$ТЦД$_{50}$/мл- 1540 мкг/см^3	ухо	в/в	-
№2	1	-	2,0 мл -500мкг/ см^3	спина	п/к	ПАФ 1:1
	2	5	0,5 мл-500мкг/ см^3	ухо	в/в	-
	3	5	1,0 мл-500мкг/ см^3	ухо	в/в	-
	4	5	2,0 мл-500мкг/ см^3	спина	п/к	ПАФ 1:2
	5	5	1,5 мл-500мкг/ см^3	ухо	в/в	-
	6	5	2,0 мл-500мкг/ см^3	ухо	в/в	-
			3,0 мл-500мкг/ см^3	спина	п/к	-
№3	1	-	1,0 мл-500мкг/ см^3	спина	п/к	ПАФ 1:1
	2	7	1,5 мл-500мкг/ см^3	спина	п/к	НАФ 1:1
	3	7	2,0 мл-500мкг/ см^3	спина	п/к	-
	4	7	1,0 мл-500мкг/ см^3	ухо	в/в	-
	5	7	1,5 мл-500мкг/ см^3	ухо	в/в	-

Схемы опытов по получению антисыворотки против вируса IPN.

На седьмые сутки после пятой инъекции (для варианта №1), после четвёртой (для варианта №2) и после третьей (для варианта №3) делали пробный забор крови, определяли титр антител в реакции нейтрализации. Обескровливание кроликов проводили через семь суток после последней инъекции.

На начальном этапе иммунизация проводилась по схеме (№1) по методу Апасовой [3], ранее использованной в лаборатории ихтиопатологии для получения вируснейтрализующей сыворотки против возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб (VHSV). Использовали концентрированный вирусный антиген с инфекционной активностью $10^{9,0}$ и общим содержанием белка 15400 мкг/см^3. Вводили семикратно. При первичной иммунизации антиген, смешанный с масляным адъювантом в равных объемах, в количестве 1 мл вводили внутримышечно в область бедра. Последующие инъекции антигена без адъюванта проводили в ушную вену. Общее количество антигена на одного кролика составило 10 см^3. Опыт продолжался в течение 56 дней, в результате после пяти инъекций титр антисывороток составил 1:256 (n=5), после семи инъекций – 1:512 в РН. Полученная таким образом сыворотка может использоваться в лаборатории для диагностических работ, однако за счёт небольшого титра, непригодна в качестве технологического сырья для конструирования иммунобиологических препаратов.

При анализе литературы было установлено, что уровень продукции вируснейтрализующих антител можно повысить постепенным увеличением содержания в прививочной дозе вирусного белка и многократным введением адъювантов [25]. При этом излишне большое количество вирусного белка в препарате может привести к снижению уровня антител. Более того, при использовании доз, более чем на порядок превышающих оптимальную, возможно развитие толерантности, то есть специфической неотвечаемости на введённый антиген [20]. Динамика накопления вируснейтрализующих антител

после определённого предела имеет обратно пропорциональную зависимость от дозы.

Поэтому схема иммунизации в последующих опытах была оптимизирована следующим образом: дозу антигена рассчитывали не по инфекционному титру, а по содержанию белка, которая была снижена до 500 мкг/см^3, с постепенным нарастанием дозы от 0,5 см^3 до 2,0 см^3. Поскольку известно, что на специфичность антисывороток влияет число инъекций и продолжительность иммунизации [10], во второй схеме уменьшили интервалы между инъекциями до пяти дней, а в схеме №3 количество инъекций до пяти.

Для стимуляции иммуногенеза, в результате замедления резорбции антигена в организме, применяли полный и неполный адьюванты Фрейнда, а также использовали комбинированное – внутривенное и подкожное введение антигена для активации разных звеньев иммунитета.

В результате, проведение иммунизации по схеме №2 продолжалось в течение 25 дней. Использовали концентрированный вирусный антиген с инфекционной активностью $10^{9,0}$ и общим содержанием белка 6000 мкг/см^3. Вводили шестикратно. Общее количество антигена на одного кролика составило 12 см^3. Титр вируснейтрализующих антител в сыворотке оказался значительно выше, чем по схеме №1: после пятого введений 1:1400, после седьмого – 1:1600.

Иммунизация по схеме №3 проводилась 28 дней, использовали 7 см^3 антигена, животным ввели 3500 мкг/см^3 белка на животное. Полученные данные показали, что титр антител после трёх инъекций составил 1:1400, такой же, как после пяти введений по схеме №2; после пяти инъекций в данном случае был получен самый высокий титр антител в данной серии опытов – 1:2048 (n=5) в РН.

То есть большое значение для развития иммунного ответа имеют способы введения антигена. Внутривенное, внутрибрюшинное, внутриселезёночное введения стимулируют в первую очередь гуморальный

иммунный ответ – созревание специфических антигену клонов В-лимфоцитов, которые трансформируются в плазматические клетки, производящие антитела и нейтрализующие антиген. Кроме того, образуются В-клетки памяти. Подкожное и внутрикожное введения приводят к развитию клеточного имунного ответа: антиген доставляется в лимфатические узлы, где зрелые Т-лимфоциты преобразуются в эффекторные Т-клетки, которые участвуют в уничтожении или нейтрализации антигена, а также образуются Т-клетки памяти. Клетки памяти, которые способствуют более быстрому и эффективному иммунному ответу при повторных введениях антигена [20].

Таким образом, была разработана схема иммунизации кроликов, позволившая получить специфичные антисыворотки к вирусу инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV), с высоким титром антител – 1:2048, которые в настоящее время используются в лаборатории для получения иммунологических реагентов тест-систем, таких как конъюгаты.

Кроме того, предложенная биотехнологическая схема (короткий цикл иммунизации плюс оптимальное количество белка) существенно снижает материальные затраты в ходе приготовления антигена и содержания лабораторных животных.

3.6. Выделение иммуноглобулинов из сыворотки кролика

Цельную сыворотку anti-IPNV с тиром в реакции нейтрализации 1:2048 очищали от липидов. Далее сорбировали гомогенатом печени КРС, карпа и форели. Для этого брали на 10 мл сыворотки по 0,3 г лиофилизированной печени каждого вида животного и подвергали легкому шуттелированию в течение двух часов. Смесь центрифугировали при 3000 g, температура плюс 4^{o}C 30 минут. Процедуру повторяли дважды.

К надосадку добавляли равный объем 0,75 % раствора риванола в дистиллированной воде при постоянном перемешивании. Через 15 минут легкого шуттелирования центрифугировали при 3000 g 30 минут. К

супернатанту, который содержит иммуноглобулины, добавляли хлорид натрия до концентрации 5 % для удаления риванола. Затем центрифугировали при ускорении 3000 g 15 минут. Остатки риванола удаляли гель-фильтрацией через колонку с сефадексом G10–15. Далее осаждали иммуноглобулины добавлением насыщенного раствора сульфата аммония (37 % насыщения). Инкубировали два часа при плюс 4^{o}C и центрифугировали при 15000 g 40 минут. Супернатант сливали, а осадок доводили до первоначального объема дистиллированной водой. Проводили второе высаливание насыщенным раствором сульфата аммония (40% насыщения). Инкубировали два часа при плюс 4^{o}C и центрифугировали при 15000 g 40 минут. Супернатант сорбировали печенью один раз и высаливали до 40 % насыщения. Диализировали против ФСБ в течение двух суток с четырехкратной заменой. Полученный белок концентрировали сульфатом аммония, (рисунок 4).

Количество белка определяли по методу Лоури и составило 8,75 мг/мл.

Рисунок 4 –Схема выделения иммуноглобулинов из сыворотки кролика

3.7. Получение иммунопероксидазного конъюгата к IPNV

Подготовка антител к конъюгированию заключалась в диализе иммуноглобулинов против 0,2М Na-карбонатного буфера pH 9,5 30 минут при температуре плюс 56^0С. Конъюгирование фермента с иммуноглобулинами проводили ковалентным способом, для введения фермента в молекулы антител использовали периодат натрия по модифицированной методике М.В.

Wilson и P.K. Nakane [172]. В качестве ферментативной метки использовалась пероксидаза хрена (ПХ) RZ>3,1.

Предварительно пероксидазу хрена очищали через молселект G25. Очищенную пероксидазу хрена 2 мг растворяли в 0,4 мл бидистиллированной воды. Далее к раствору ПХ добавляли 0,1 мл 0,1М периодат натрия. Окисление происходило при мягком шуттелировании при комнатной температуре в течение 30 минут в темноте. Признаком образования активной формы пероксидазы служило изменение окраски раствора фермента с желто-коричневой на зеленоватую. При длительном хранении на свету активированная форма быстро переходит в неактивную, при этом зеленая окраска снова переходит в коричневую. Потом активированный фермент диализировали против 0,001М ацетатного буфера pH 4,4 с трехкратной заменой в течение 24 часов при температуре плюс 4^0C.

Для поиска оптимального соотношения иммуноглобулинов к пероксидазе хрена конъюгирование проводилось в трех вариантах иммуноглобулины к ПХ 1:1, 1:2 и 2:1 в щелочной среде. Инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при слабом шуттелировании в темноте. Оптимальным соотношением ПХ к иммуноглобулинам составило 1:2.

В одну часть растворов после охлаждения до плюс 4^0C добавляли боргидрит натрия для восстановления непрореагировавших альдегидных групп. Введение боргидрида натрия резко снижало чувствительность реакции, тем самым выявлена нецелесообразность его применения. Отсутствие боргидрида натрия не повлияло стабильность конъюгата. Срок хранения составил один год при температуре 4–8^{o}C.

Следующим этапом было высаливание из растворов конъюгата путем добавления насыщенного раствора сульфата аммония до 40 % насыщения. Далее центрифугировали. Полученный осадок ресуспензировали в 1 мл 0,02М фосфатно-солевом буфере и диализировали против этого же буфера с

трехкратной заменой в течение 24 часов при температуре плюс 4^0С. Потом проводилась гель-фильтрация с последующим высаливанием насыщенным раствором сульфата аммония до 50 % насыщения. Заключающим этапом был диализ против фосфатно-солевого буфера pH 7,2-7,4 (рисунок 5).

К полученному конъюгату добавляли равный объем глицерина и хранили при минус 20±0,5^0С. Активность приготовленного конъюгата определяли шахматным титрованием.

Рабочее разведение конъюгата составило 1:16000.

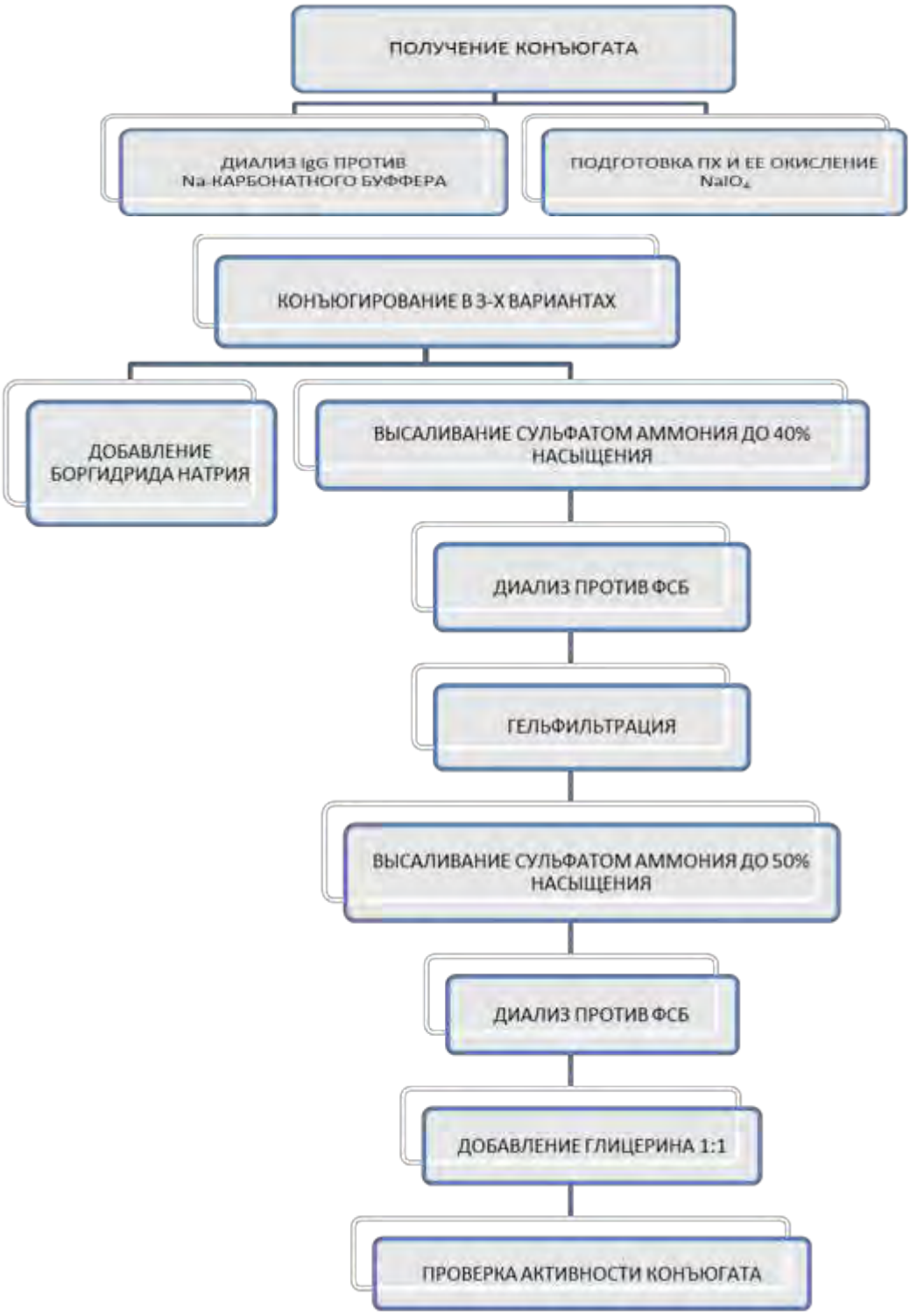

Рисунок 5 – Схема получение иммунопероксидазного конъюгата к IPNV

3.8. Определение оптимальных условий постановки «сэндвич» ИФА

Для создания тест-системы методом «шахматного» титрования подбирали концентрацию специфических Ig и рабочее разведение конъюгата. Для оптимизации реакции, увеличения точности и чувствительности метода определяли оптимальный диапазон оптической плотности, оптимальное рабочее разведение вирусоспецифических антител, при которых наблюдалась максимальная разница между средними значениями оптической плотности положительных и отрицательных контролей, а также диагностические характеристики. Сначала определяли оптимальную концентрацию иммуноглобулинов на лунку в полистироловых планшетах и условия сорбции. Известно, что малая концентрация белка снижает чувствительность анализа, а большая приведет к многослойной сорбции, следовательно к возрастанию артефактов.

Для сорбции использовались полистироловые микропланшеты (низкой, средней и высокой сорбции) для проведения иммунологических работ 96-луночные SPL. Для разведения антител использовался 0,02М карбонатно-бикарбонатный буфер pH-9,5, так как известно, что такой буферный раствор является оптимальным для абсорбции. Применяли два метода сорбции классическая физическая сорбция и метод высушивания раствора иммуноглобулинов на лунках плашек.

Адсорбцию иммуноглобулинов проводили в двух режимах:

Первый – 2 часа при 37^0С, потом 18 часов при 4^0С,

Второй – 18 часов при 4^0С. После планшеты промывали пять раз промывочным раствором - 0,01М фосфатно-солевым буфером с Tween-20 (ФСБ-Т) pH-7,5.

Сенсибилизацию планшетов антителами проводили в следующих рабочих разведениях: 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл далее до 60 мкг/мл с шагом 10 внося по 100 мкл в лунку. Иммунопероксидазный конъюгат в

концентрации 1:250 титровали методом двукратных разведений до концентрации 1:64000. Для разведения конъюгата использовали 0,01М фосфатно-солевой буфер (ФСБ) рН-7,5. В качестве субстрата использовался ТМБ (тетраметилбензидин) и ОФД (ортофенилендиамин).

В пятикратно отмытые ФСБ-Т и высушенные планшеты добавляли по 100 мкл заведомо положительных образцов, планшеты инкубировали 1 час при комнатной температуре (20–22^{o}С), после чего пятикратно промывали. Добавляли конъюгат, в объеме 100 мкл на лунку, инкубировали один час при комнатной температуре, промывали. Реакцию проявляли субстратным раствором ТМБ и ОФД (свежеприготовленным) 25 минут, и после остановки 2М серной кислотой, измеряли значения оптической плотности при длине волны 450 нм для ТМБ или 492 нм для ОФД. Учет реакции проводили на планшетном фотометре Multiskan FC с программным обеспечением SkanIt (Thermo Scientific).

За титр конъюгата принимали его максимальное разведение, которое выявляет минимальное количество антигена. Рабочее разведение конъюгата составило 1:16000. Применение в качестве субстрата ОФД снижает чувствительность реакции. Для определения концентрации антител, сенсибилизированных на планшеты, их титровали с положительными и отрицательными контролями. Концентрация разведенных антител была такая же. Оптимальное разведение антител, обеспечивающее достоверное различие результатов с положительными и контрольными образцами составило 20 мкг/мл.

Параллельно проводился опыт с блокированием неспецифических связываний. В ходе опыта были испытаны несколько блокировочных растворов: 1% БСА на ФСБ, обезжиренное молоко, 5% эмбриональная телячья сыворотка, 5% сыворотка крови лошади. Блокирование проводили в течение одного часа при 37^{0}С. Планшеты трехкратно отмывали ФСБ-Т и подсушивали.

Использование сывороток повышало фон реакции. Применение БСА давало умеренный фон, а использование раствора молока не влияло на результаты.

Опыт показал, что от блокировки неспецифических связываний целесообразно отказаться.

Было установлено, что оптимальными условиями постановки «сэндвич»-метода ИФА являются:

- адсорбцию антител проводить в режиме 2 часа при 37^0C, потом 18 часов при 4^0C;
- блокировка планшетов необязательна;
- разведения антител для сенсибилизации 20 мкг/мл;
- рабочее разведение конъюгата составило 1:20000;
- использование в качестве субстрата ТМБ.

Схема постановки IPNV-ИФА-ВИЭВ:

1. Перед началом анализа промыть планшет
2. Внести по 100 мкл контролей и образцов
3. Инкубация один час при комнатной температуре (21–23°C)
4. Промыть пять раз планшет внести 100 мкл конъгата в рабочем разведении
5. Инкубация один час при комнатной температуре (21–23°C)
6. Промыть пять раз планшет внести 100 мкл субстрата (ТМБ)
7. Инкубация 20мин при комнатной температуре (21–23°C)
8. Добавить 100 мкл стоп-реагента → измерить длину волны при 450 нм.

Разработанная нами тест-система обладает рядом преимуществ перед чешским диагностическим набором TestLine.

Во-первых, время постановки реакции сокращено, так как в качестве антигендетектирующие антитела используются те же, что и для сорбции планшета. В наборе сравнения используются дополнительные антивидовые антитела (свиные). По данной схеме время анализа увеличено на 15 часов.

Во-вторых, в наборе IPNV-ИФА-ВИЭВ в качестве антигендетектирующих антител используются антитела кролика к вирусу IPN, что приводит к повышению точности реакции в то время в наборе TestLine IPNV Ag ELISA используются свиные антитела к иммуноглобулинам кролика.
Предложенная нами схема постановки реакции позволяет проводить анализ при комнатной температуре. При этом в коммерческом наборе необходимо задействовать термостатирование.
Оптимизированы объемы вносимых компонентов, что снижает ошибку метода.
Использование малого количества компонентов при производстве диагностикума позволяет снизить себестоимость тем самым масштабировать изготовление.

3.9. Определение позитивно-негативного порога (ПНП)

Для разграничения неспецифической, сомнительной и специфической реакций, определяли пороговые значения S/P – отношения. Для определения ПНП реакции в ИФА тестировали 120 заведомо отрицательных образцов. Значение стандартного отклонения не превышало 0,012 о.е., что свидетельствует о хорошей воспроизводимости результатов. Рассчитывали среднее значение оптической плотности образцов, которое составило – 0,230 о.е. и прибавляли удвоенное значение стандартного отклонения – 0,012 о.е.

ПНП, представленный в виде прямой, отражал верхнюю границу отрицательных величин – 0,254 о.е., а оптическая плотность, соответствующая наименьшему положительному значению равнялась 0,545 о.е. Промежуточные величины соответствовали зоне «сомнительных результатов».

Для данных значений показателей вычисляли по формуле (1), S/P – отношения, которые были критериями разграничения результатов реакции. В дальнейшем значение S/P выражали в виде процента реактивности

процент реактивности (%) = (ОП – NC)/(PC – NC)X100, (1)

где, ОП – оптическая плотность образца;

РС – оптическая плотность положительного контроля;

NC – оптическая плотность отрицательного контроля.

Были вычислены границы пороговых значений: при величине % больше 22% реакция считается положительной, значение % меньше 10% – реакция отрицательная, а диапазон % от 10% до 22% – сомнительные результаты реакции.

3.10. Определение специфичности и чувствительности тест-системы для выявления вируса IPN

Главными характеристиками иммуноферментного анализа являются специфичность и чувствительность. Оценку чувствительности и специфичности тест-системы проводили путем сравнительного анализа результатов тестирования сывороток в ИФА и в реакции нейтрализации (РН), которая является классическим тестом диагностики вирусных заболеваний.

Для определения чувствительности тест-системы проводили титрование трех штаммов вируса IPN (рисунок 6) с инфекционной активностью $10^{8,20\text{-}8,50}$ $ТЦД_{50}/см^3$. Минимальная концентрация антигена, соответствующая наименьшему положительному результату определения, статистически достоверно отличающаяся от показателей заведомо отрицательных образцов составила 0,545 о.е, что соответствует титру вируса $10^{2,5}ТЦД_{50}/см^3$ (lg 2,5).

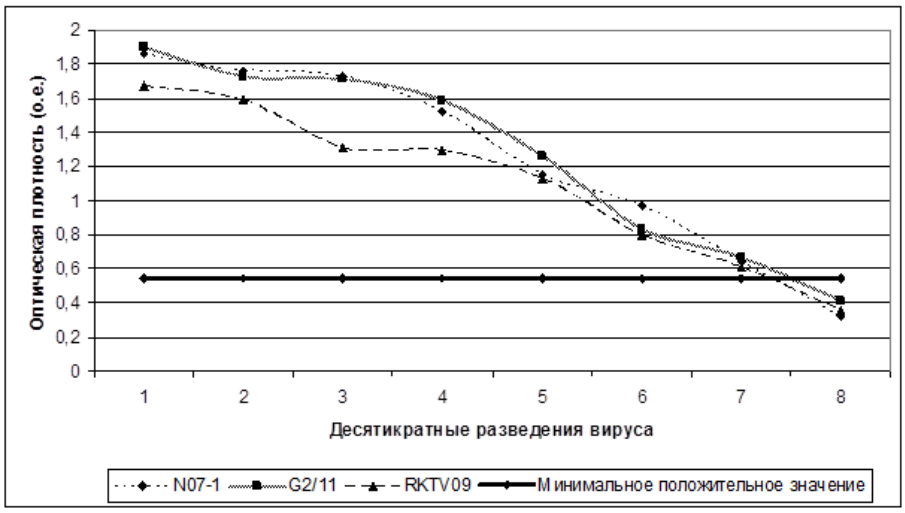

Рисунок 6 – Определение чувствительности ИФА

Специфичность определяли, используя другие вирусы лососевых рыб (IHNV шт. KRK10 и VHSV шт. S7/10).

В тесте на воспроизводимость определяли статистические характеристики для положительных и отрицательных контрольных препаратов при исследовании их в пяти повторах. Взаимодействие тест-системы с препаратами VHSV, IHNV, неинфицированными клетками и тканями и бактериями было на уровне фона. При этом, среди лунок на планшете коэффициент вариации составил 2–4 %, между отдельными планшетами не превышал 4 %, что свидетельствует о высокой чувствительности и специфичности данного метода.

На следующем этапе работы оценивали возможность разработанной тест-системы выявлять искомый антиген в биологическом материале.

Сравнительная оценка обнаружения IPNV антигена методами ИФА, РН и ПЦР представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Сравнительный анализ эффективности выявление антигена IPNV методами ИФА, РН и ПЦР

Испытуемый материал		ИФА		Результат РН	Результат ПЦР
		ОП (о.е.)	Результат		
1	IPNV шт. Ab (ATCC 13-19, референтный)	1,376	+	+	+
2	IPNV шт. GP01	1,079	+	+	+
3	IPNV шт.VT06	1,214	+	+	+
4	IPNV шт. SK07	1,406	+	+	+
5	IPNV шт. RKTV09	1,622	+	+	+
6	IPNV шт. G2/11	1,962	+	+	+
7	IHNV шт.KRK10	0,253	-	-	-
8	VHSV шт.S7/10	0,229	-	-	-
9	Гомогенат внутренних органов семги	0,205	-	-	-
10	Гомогенат внутренних органов карпа	0,207	-	-	-
11	Гомогенат внутренних органов форели, зараженной IPNV (естественная инфекция)	1,333	+	+	+
12	Гомогенат внутренних органов форели, зараженной IPNV (экспериментальное заражение)	1,412	+	+	+
13	*Yersinia ruckeri* шт.RMS10-7/3	0,230	-	-	-
14	Культура клеток EPC	0,209	-	-	-
15	Культура клеток OMG	0,205	-	-	-

Где, №1-4 – гомологичные вирусы, разные штаммы, хранившиеся в лиофилизированном виде; №5-6 – гомологичные вирусы после пассажа в

культуре клеток, нативные, №7-8 – гетерологичные вирусы, после пассажа в культуре клеток, нативные; №9-12 – пробы внутренних органов разных видов рыб; №13 – суспензия бактериальных клеток, №14-15 неинфицированные культуры клеток.

Полученные данные позволяют утверждать, что разработанная тест-система специфично выявляет IPNV в нативной и лиофилизированной культуральной жидкости зараженных клеток, а также в биологическом материале от естественно и искусственно инфицированных рыб.

При сравнительном исследовании материала тремя методами на наличие вируса IPN отмечена корреляция показателей. Однако, при исследовании в реакции РН биологического материала (гомогенизированных органов форели) результат был получен через 10 дней, одновременно с выделением вируса в культуре клеток, что, несомненно, увеличивает время диагностики. При исследовании положительных образцов методом ПЦР во всех случаях был обнаружен IPNV, в пробах отрицательных по результатам ИФА и РН вирус не обнаружен. Полученные данные подтверждают специфичность испытанных реакций.

При исследовании положительных образцов методом ПЦР во всех случаях был обнаружен IPNV, в пробах отрицательных по результатам ИФА и РН вирус не обнаружен. Полученные данные подтверждают специфичность тест-системы ИФА, разработанной для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых, которая составляет не менее 99,9%.

3.11. Определение стабильности специфических компонентов набора при хранении

Главным показателем качества тест-системы ИФА, определяющим эффективность использования в практических условиях является стабильность специфических компонентов при длительном хранении. Стабильность

проверяли в процессе хранения в рекомендуемых условиях, в сухом защищенном от света месте при температуре 4–8°С. Специфическими компонентами набора являются: отрицательный и положительный контроли, вирусоспецифические кроличьи антитела против IPNV (штамм N07-1) сенсибилизированные в лунках полистироловых планшетов, конъюгат. Высушенные сенсибилизированные планшеты с осушителем закрывались в полиэтиленовые пакеты с замком. Конъюгат, положительные и отрицательные контроли с консервантом (0,05 % мертиолят натрия), а также другие компоненты набора разливали в пластиковые флаконы. Для определения срока хранения специфических компонентов набора их хранили в сухом защищенном от света месте при температуре 4–8°С. Активность проверяли с интервалом один месяц. Для опыта использовали одни и те же заведомо отрицательные и положительные пробы, аликвоты которых хранились при температуре минус 18–20°С

Постановку ИФА и учет результатов вели по разработанной методике. Среднеарифметическая оптическая плотность положительной пробы до опыта составила 1,564, а отрицательная 0,072.

Результаты показали, что исходная активность специфических компонентов, сохранялась в течение одного года хранения при рекомендованных условиях. Изменения оптических плотностей были незначительны и не носили статистически достоверного характера.

3.12. Испытание полученной тест-системы в производственных условиях

Мониторинг эпизоотической ситуации в 2011–2016 годах по IPNV было подвергнуто 6246 экземпляров лососевых из рыбоводческих хозяйств некоторых регионов России: Московской, Ленинградской, Калужской, Мурманской, Владимирской, Смоленской, Новгородской, Тверской областей, Республик Алания и Карелия.

В ходе мониторинга по вирусу IPN рыбоводческих хозяйств некоторых регионов нашей страны сотрудники лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ зарегистрировали всего пять случаев в 2011 – 1, 2012 – 2, 2013 – 2, (у форели, кумжи, семги) в товарных хозяйствах Республики Карелия и Мурманской области. Результаты исследований были подтверждены нескольким лабораторными методами, в частности вирусовыделение в культуре клеток, реакция нейтрализации, полимеразная цепная реакция, электронная микроскопия.

Оказана помощь в разработке планов и проведении лечебно-профилактических мероприятий и обеспечении специалистов этих хозяйств нормативными документами, инструкциями и другими материалами о современных методах и способах борьбы с болезнями рыб.

В 2016 году при исследовании радужной форели доставленной в лабораторию представителем компании ООО «Русское море-аквакультура» из Финляндии (Taimen Oy, рыбохозяйство Joutsan, Lohitie 3, 19650 Joutsa), для проверки перед планируемым завозом в Республику Карелия, был выделен вирус-возбудитель инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN), аналогичные результаты были получены в лаборатории Агентства продовольственной безопасности Финляндской республики (EVIRA) в Хельсинки (Elintarviketurvallisuusvirasto Evira Mustialankatu 3 00790 Helsinki).

Министерством сельского хозяйства Республики Карелия ввоз посадочного материала с проверенного предприятия был запрещен.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для лабораторной диагностики и идентификации вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых к настоящему времени в мире применяются такие методы как вирусовыделение в культуре клеток и последующая серологическая идентификация со специфической сывороткой в реакции нейтрализации. Дополнительно, в диагностических лабораториях вирус выявляют иммуногистохимически в гистологических препаратах, в реакции гемагглютинации или современными молекулярными методами, такими как ПЦР [27, 28, 53, 75, 76, 81, 85, 103, 123, 170]. Каждый из этих методов имеет различную диагностическую ценность – одни из них требуют значительных затрат времени, у других низкая чувствительность. Поэтому разработка более чувствительных и специфичных, а также экспрессных методов лабораторной диагностики и идентификации вируса IPN остается актуальной задачей современного рыбоводства и до настоящего времени. В последние годы в диагностике вирусных болезней человека и животных широко используется иммуноферментный анализ. Его главными достоинствами являются высокая чувствительность и специфичность, коррелирующие с результатами, полученными при использовании других серологических методов, а также широкое распространение специального оборудования, позволяющего почти полностью автоматизировать процесс выявления антигенов без использования культур клеток.

В связи с этим, нами были проведены исследования по разработке диагностической тест-системы на основе «сэндвич»-ИФА для выявления вируса возбудителя IPN, позволяющей в течение трех часов определить наличие антигена в вируссодержащих препаратах и биологическом материале, а также дифференцировать от вирусов других видов.

В начале данного исследования не существовало отечественных тест-систем для определения вируса инфекционного некроза поджелудочной

железы лососевых. Выбор оптимального варианта ИФА проводили на основании анализа литературных данных, учитывая следующие критерии: время, необходимое для постановки реакции, ее воспроизводимость и простоту в исполнении. Основываясь на данных литературы, из большого числа известных вариантов ИФА мы выбрали твердофазный «сэндвич» метод.

На первом этапе работы были проведены исследования по подбору оптимальной клеточной линии для культивирования вируса IPN и подходящего штамма, дающего наибольший титр. В ходе работы была получена перевиваемая линия клеток из гонад половозрелой радужной форели, обладающая высокой чувствительностью к ихтиовирусам различных таксономических групп, которая была названа OMG. Исследования показали, что данная линия клеток чувствительна к вирусам инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV), инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых (IHNV), весенней виремии карпов (SVCV), герпесвирусу карпа кои (KHV), герпесвирусу осетровых (SbSHV), вирусной геморрагической септицемии лососевых (VHSV). Наибольший титр вируса был получен в культуре клеток OMG – 9,5 lg $ТЦД_{50}$/мл. На культуру клеток был получен патент РФ № 2495120, 10.03.2013 «Постоянная линия клеток OMG из гонад радужной форели (Oncorhynchus mykiss)».

Было необходимо выяснить в каком криопротекторе лучше всего сохраняется вирус IPN. Для этого была поставлена задача изучить биологические свойства вируса, которая включала: восстановление лиофилизированных штаммов вируса путем пассирования до титра 10, изучение цитопатогенных свойств в культурах клеток, а также изучение влияния pH среды на инфекционность вируса и определение условий инактивации. В работе использовали 11 штаммов вируса IPN из коллекции лаборатории ихтиопатологии. Исследования показали, что при лиофилизации IPNV необходимо использовать в качестве криопротектора фетальную сыворотку КРС в соотношении с биоматериалом 1:1 или сахарозо-желатозную

среду – 4% и 2,5% от объема биоматериала. Dixon et all [52] были проведены исследования по изучению жизнеспособности вируса при pH=4 и 12. Мы же исследовали влияние pH от 1,0 до 12,0 включительно и доказали, что возбудитель IPN очень устойчив к изменению редокс-потенциала среды.

Одним из необходимых условий для разработки и внедрения в практику новых и усовершенствования существующих иммунологических методов обнаружения вирусов является наличие технологии изготовления диагностических препаратов, основанием для которой, кроме антигенов, является наличие хорошо воспроизводимого способа и схемы получения специфических антител [10, 20, 53, 169, 163]. Многие исследователи используют в качестве доноров антител кроликов [3, 5, 20, 53]. Эти животные являются хорошими продуцентами антител и удобны в лабораторной практике. Мы так же решили в качестве источника иммуноглобулинов при отработке ИФА использовать кроличьи антитела к вирусу IPN. При получении вирусспецифических сывороток было испытано несколько схем гипериммунизации кроликов. Однако, как и для получения поликлональных антител (гиперимунных сывороток), первая проблема заключалась в получении очищенного антигена для гипериммунизации кроликов.

Для гипериммунизации кроликов и отработки твердофазного «сэндвич» варианта ИФА в культурах клеток были испытаны препараты антигенов вируса IPN, двенадцати штаммов: LSK09, VT06, N09-3, G211, RKTV09, LRK07, GP07, GP09, N07-1, B09, SK07, «Ab». В ходе испытаний из них был выбран штамм N07-1, показавший высокий титр в реакции нейтрализации. Для гипериммунизации кроликов использовали очищенный вирус. Очищали и концентрировали вирус путем разрушения клеточного детрита замораживанием и оттаиванием, центрифугирования и концентрации вируса из надосадочной жидкости добавлением хлористого натрия и ПЭГ-6000. Это наиболее простой и широко применяемый в вирусологической практике метод [4, 5, 22, 97, 163, 169]. Следующему этапу уделили особое внимание. Для

дальнейшей очистки вирусосодержащей суспензии нами были опробованы два метода ультроцентрифугирования: первый на градиенте раствора сахарозы, второй на растворе хлористого цезия. Нами было отмечено, что при очистке на градиенте хлористого цезия происходит разрушение вириона до 50 %. Конечный титр вируса составил lg 12. Этим способом, при достаточной степени очистки, удается сохранить структуру вируса и воспроизводимо получать очищенный вирус IPN.

Разработка ИФА вызвала необходимость получения антивидового конъюгата. Как написано выше в качестве доноров антивидовых антител в наших экспериментах служили кролики. Испытанные схемы гипериммунизации кроликов вирусом IPN позволили получить активные сыворотки, титры их в РН составили от 1:512 до 1:2048. Из испытанных трех схем гипериммунизации кроликов лучшей схемой оказалась схема, предусматривающая пятикратное введение вируса в комплексе с полным и неполным адъювантом Фрейнда, а также использования комбинированного внутривенного и подкожного введения антигена для активации разных звеньев иммунитета [3, 18].

Немаловажным этапом при отработке метода ИФА является выделение из сывороток очищенной иммуноглобулиновой фракции. Сначала мы очищали от липидов с помощью декстрана сульфата. Далее удаляли балластные белки сорбцией печенью КРС, но так как мы культивировали вирус на культуре клеток эпителиальной папилломы карпа и гонад радужной форели, было принято решение добавить печень карпа и форели. Из расчета на 10 мл сыворотки по 0,3 г лиофилизированной печени каждого вида животного.

Иммуноглобулины выделяли из сыворотки риванольным методом в сочетании с высаливанием сульфатом аммония, описанным разными авторами [10, 5, 17, 19, 20, 21]. Мы получили 8,75 мг/мл белка.

Конъюгирование специфических иммуноглобулинов с пероксидазой хрена проводили методом периодатного окисления[22, 16, 172]. Оптимальное

соотношение пероксидазы хрена к иммуноглобулинам составило 1:2. Нами было выявлено отличие от общепринятой методики. Нецелесообразность добавления боргидрида натрия для восстановления непрореагировавших альдегидных групп. Его применение резко снижало чувствительность реакции. Активность конъюгата сохранялась более 12 месяцев при температуре минус 20°С. Рабочее разведение составило 1:20000.

Для разработки высокочувствительного и специфического иммуноферментного анализа огромное значение имеет оптимизация условий его проведения. Следовательно, следующим этапом нашей работы стала отработка основных параметров ИФА [10, 16, 163, 169, 172].

Главным фактором, определяющим успешное проведение иммуноферментного анализа, является адсорбция антител на носитель. Известно, что слишком большая концентрация белка приводит к многослойной сорбции, что ведет к появлению артефактов, малая снижает чувствительность реакции. Полученные результаты показали, что процесс адсорбции иммуноглобулинов зависит от способа сорбции и концентрации антител. Применение метода сорбции в буферном растворе, предлагаемого многими авторами [22, 10, 16, 20, 53, 169, 163], по нашим данным повышает адсорбцию иммуноглобулинов по сравнению с адсорбцией методом высушивания раствора иммуноглобулинов. Также высушивание, по сравнению с сорбцией в буферном растворе понижало воспроизводимость результатов, что недопустимо при диагностике заболевания. При сорбции методом высушивания наблюдалось сильное расхождение в ОП положительных контролей при многократном повторении анализа, что выражалось в ломаном характере кривой титрования иммуноглобулинов.

Анализ полученных данных позволил выбрать оптимальную рабочую концентрацию антител - 20 мкг/мл — при проведении сорбции 2 часа при 37^0С, потом 18 часов при 4^0С. При использовании более высоких концентраций, эффективность адсорбции снижалась из-за белок-белковых

взаимодействия, потому что оно менее крепкое, чем связь белок-полистирол. Использование более низкой концентрации антител уменьшало чувствительность реакции. Эти данные подтверждаются другими авторами [10, 22, 10, 16, 20, 53, 169, 163], которыми было доказано, что степень связывания с белка с полистиролом зависит от содержания белка в растворе.

Некоторые исследователи [10, 16, 20, 53, 169, 163] отмечают, что при использовании гомологичных антител для сорбции планшетов и в конъюгате, возникновение фона в отрицательных контролях за счет взаимодействий между конъюгатом и иммобилизированными антителами. При проведении ИФА нами был отмечен повышенный фон реакции, но после более детальной очистки антител и оптимизации условий анализа мы избавились от фона в отрицательных образцах без потери чувствительности. Это подтверждается рядом авторов [10, 20, 22, 10, 16, 20, 53, 169, 163].

В литературе [173,174, 177, 178, 179] предлагаются различные растворы для предотвращения неспецифических связываний. Нами были испытаны несколько блокировочных растворов: 1% БСА на ФСБ, обезжиренное молоко, сыворотка КРС, 5% фетальная сыворотка, 5% лошадиная сыворотка. Растворы либо повышали фон реакции, либо не влияли на результат. Опыт показал, что от блокировки неспецифических связываний целесообразно отказаться.

Выбор оптимального разведения конъюгата проводили методом шахматного тирования при котором наблюдалась максимальная разница между средними значениями оптической плотности положительных и отрицательных контролей. При этом должно было выявляться минимальное количество антигена. Рабочий титр коъюгата составил 1:20000, а время инкубации один час при комнатной температуре.

Применение в качестве субстрата ОФД снижало чувствительность реакции, что расходится с выводами некоторых авторов, которые рекомендовали такой способ для ускорения реакции. Использование ТМБ в

течение двадцати минут дает цветную реакцию и не снижает чувствительность.

Важнейшим качеством диагностического набора является его чувствительность и специфичность. Порог чувствительности составил 2,5 lg $ТЦД_{50}/см^3$. Специфичность тест-системы подтверждена в реакциях с вирусом IPN и другими вирусами рыб. Тест на воспроизводимость показал, что взаимодействие диагностикума с неинфицированными клетками, тканями и с препаратами других вирусов и бактерий рыб было на уровне фона.

При сравнительном исследовании материала методами ПЦР, ИФА и выделении в культуре клеток на наличие вируса IPN отмечена корреляция показателей. Однако, при исследовании в реакции РН биологического материала (гомогенизированных органов форели) результат был получен через 10 дней, одновременно с выделением вируса в культуре клеток, что, несомненно, увеличивает время диагностики. При исследовании положительных образцов методом ПЦР во всех случаях был обнаружен IPNV, а в пробах отрицательных по результатам ИФА и РН вирус не обнаружен. Полученные данные подтверждают специфичность испытанных реакций.

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанная нами тест-система для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых иммуноферментным методом является достаточно специфичной и чувствительной.

Исходная активность компонентов системы сохранялась до одного года при температуре 4–8^{o}C.

Разработанная нами тест-система обладает рядом преимуществ перед чешским диагностическим набором TestLine [83].

Во-первых, время постановки реакции сокращено, так как в качестве антигендетектирующие антитела используются те же, что и для сорбции планшета. В наборе сравнения используются дополнительные антивидовые антитела (свиные). По данной схеме время анализа увеличено на 15 часов.

Во-вторых, в наборе IPNV-ИФА-ВИЭВ в качестве антигендетектирующих антител используются антитела кролика к вирусу IPN, что приводит к повышению точности реакции в то время в наборе TestLine IPNV Ag ELISA используются свиные антитела к иммуноглобулинам кролика.

Предложенная нами схема постановки реакции позволяет проводить анализ при комнатной температуре. При этом в коммерческом наборе необходимо задействовать термостатирование.

Оптимизированы объемы вносимых компонентов, что снижает ошибку метода.

Использование малого количества компонентов при производстве диагностикума позволяет снизить себестоимость тем самым масштабировать изготовление.

Апробацию разработанной тест-системы провели на шести тысячах двести сорока шести экземплярах лососевых рыб из тридцати семи хозяйств, пять из которых оказались неблагополучными. Результаты исследования параллельно подтверждались несколькими лабораторными методами.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работы был определен наилучший криопротектор для лиофилизации штаммов IPNV. Было изучено влияния pH на жизнеспособность вируса.

Получена новая линия клеток обладающая высокой чувствительностью к ихтиовирусам различных таксономических групп.

Таким образом, анализ собственных результатов исследований показал, что они не только согласуются с данными литературы, но и решают некоторые проблематичные вопросы получения очищенного и концентрированного вируса IPN, антител, их характеристики и использование для совершенствования способов обнаружения вируса IPN методом ИФА.

Перспективы разработки темы связаны с дальнейшим изучением распространения вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых в рыбоводческих хозяйствах России и у ввозимого посадочного материала с целью предотвращения вспышек заболевания, а так же для корректировки профилактических мероприятий.

6. ВЫВОДЫ

1. Использование при лиофилизации вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN) в качестве стабилизатора эмбриональной телячей сыворотки в соотношении с биоматериалом 1:1 или сахарозо-желатозной среды – 4% и 2,5% от объема биоматериала обеспечивает сохранность вируса. Установлено, что полная инактивация вируса IPN происходит через 14 суток хранения при pH 1,0; при pH от 2 до 10 за 45 дней хранения титр вируса снижается не более чем на 0,5–1,2 lg.
2. Полученная в ходе работы постоянная линия клеток из гонад радужной форели чувствительна к шести вирусам трех таксономических групп: Birnaviridae, Rhabdoviridae, Herpesviridae, в том числе к вирусу IPN.
3. Наиболее эффективная схема накопления, очистки и концентрирования вируса включает культивирование в перевиваемой культуре клеток OMG, двукратное замораживание и оттаивание, инкубацию с ПЭГ-6000 18 часов, ультрацентрифугирование в два этапа на градиенте плотности раствора сахарозы, что позволяет получить после очистки титр вируса 12 lg.
4. Схема иммунизации кроликов в течение 28 дней с постепенным нарастанием дозы антигена по белку от 1 $см^3$ до 2 $см^3$ и снижением количества инъекций до 5 позволила получить специфичные антисыворотки к вирусу IPN с высоким титром антител (1:2048) в реакции нейтрализации в отличие от других испытанных схем. В результате сорбции гомогенатами печени карпа и форели при выделении иммуноглобулинов из сыворотки кролика, их концентрация увеличилась до 8,75 мг/мл.
5. Оптимизация процедуры получения иммунопероксидазного конъюгата за счет исключения боргидрида натрия увеличивает чувствительность реакции и не влияет на его стабильность в сравнении с оригинальной методикой M.B. Wilson и P.K. Nakane. При этом оптимальное соотношение иммуноглобулинов к пероксидазе хрена составило 1:2.
6. Оптимальными условиями адсорбции антител против вируса IPN на полистироловых планшетах является их концентрация 20 мкг/мл в

карбонатно-бикарбонатном буфере, инкубация 2 часа при 37 ^{0}С и далее 18 часов при 4 ^{0}С. При этом рабочее разведение конъюгата составило 1:16000, а использование в качестве субстрата тетраметилбензидина повысило чувствительность реакции в отличие от ортофенилендиамина.

7. Показана высокая чувствительность и специфичность реагентов иммуноферментной тест-системы при исследовании нативной и лиофилизированной культуральной жидкости зараженных клеток, а также в биологическом материале от естественно и искусственно инфицированных рыб. Минимальное значение оптической плотности, при котором результат был положительным, составило 0,545, что соответствует титру вируса $10^{2,5}$ТЦД$_{50}$/см^3. Специфичность тест-системы составляет не менее 99,9 % в сравнении с ПЦР и реакцией нейтрализации.
8. Использование разработанной тест-системы для анализа эпизоотической ситуации в отношении возбудителя инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых, позволило из 37 исследованных хозяйств выявить 5 неблагополучных.

7. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Впервые разработана отечественная тест-система на основе твердофазного «сэндвич» варианта ИФА для определения антигена IPNV в инфицированных культурах клеток и в гомогенатах тканей рыб.

Штамм постоянной линии клеток OMG из гонад радужной форели паспортизирован и депонирован в Специализированной коллекции перевиваемых соматических культур клеток сельскохозяйственных и промысловых животных Российской коллекции клеточных культур при Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. В ходе работы был полученн Патент «Постоянная линия клеток OMG из гонад радужной форели (Oncorhynchus mykiss)»

На основании результатов проведенных экспериментов, апробации при проверке полевых материалов и результатов комиссионных испытаний разработанная «Тест-система для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPN) иммуноферментным методом» рекомендована для диагностики и серологического мониторинга IPN в рыбоводческих хозяйствах. Тест-система успешно используется в лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. КОВАЛЕНКО.

По результатам исследований разработана, составлена и утверждена нормативно-техническая документация:

- Наставления по применению набора для диагностики инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN);
- Инструкция по применению набора для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPNV) методом иммуноферментного анализа «IPNV-ИФА-ВИЭВ»;

- Стандарт ГНУ ВИЭВ Набор для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPNV) методом иммуноферментного анализа «IPNV-ИФА-ВИЭВ».

Обеспечение такими наборами ветеринарных лабораторий позволит проводить массовые обследования рыб для установления диагноза, а для мониторинга IPNV в рыбоводческих хозяйствах.

8 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, А.П. Современное состояние рыболовства и аквакультуры в мире и в России/ А.П. Алексеев// Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2009. – №1-2. – С.5–13.
2. Анализ эпизоотической ситуации по болезням рыб в России (2001-2011гг)/ М.И. Гулюкин, Е.А. Завьялова, А.Е. Дрошнев, С.А. Коломыцев// Ветеринария. – 2011. – №8. – С.3–7.
3. Апасова, Л.Ю. Получение вируснейтрализующей антисыворотки против возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб/ Л.Ю.Апасова, Н.В.Колбасов, О.Л. Колбасова// Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: сб. тр. междунар. науч.-практич. конф. – М: Изографъ, 2006. – С.154–156.
4. Баррет, Т. Вирусология: Методы / Т. Баррет, П.Берд, Дж. Клегг – М.: Мир, 1988. – 344с.
5. Биотехнология / под ред. Е.С. Воронина. – СПб: ЗАО ГИОРД, 2005. – 792с.
6. Выделение вируса инфекционного некроза поджелудочной железы/ Т.Д. Пичугина, Е.А. Завьялова, М.Н. Борисова, Л.П. Дьяконов, Г.А. Надточей, А.Ф. Шуляк// Ветеринария. – 2005(а) . – №1. – С.31–32.
7. Жданов, В.М. Вирусология / В.М. Жданов, С.Я Гайдамович – М.: Медицина, 1966. – 480с.
8. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии)/ под общ. ред. Л.П. Дьяконова. – М.: Спутник+, 2009. – 656с.
9. Завьялова, Е.А. Цитоморфологическая характеристика культур клеток рыб и их чувствительность к некоторым вирусам: дисс. канд. биол. наук:03.00.23/ Е.А.Завьялова. – Москва, 2006. – 131с.
10. Иммунологические методы / под ред. Х. Фримеля. – М.: Мир, 1979. – 518с.

11. Канаев, А. И. Инфекционные заболевания лососевых/ А. И. Канаев. – М., 1973. – 293с.
12. Лакин, Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин – М.: Высшая. школа, 1990. – 352 с.
13. Лурия, С. Общая вирусология / С.Лурия, Дж. Дарнелл – М.: Мир, 1970. – 423с.
14. Львов, Д.К. Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных/ Д.К. Львов // Вирусные инфекции рыб/ Е.А. Завьялова, А.Е. Дрошнев, М.И. Гулюкин, Д.К. Львов. – М.: Медицинское информационное агенство, 2013. – 1200с.
15. Мухина, Л.Б. Государственная политика продовольственной безопасности и техническое регулирование в рыбной отрасли/ Л.Б. Мухина// Рыбное хозяйство. – 2004. – №4. – С.8–11.
16. Нго, Т. Иммуноферментный анализ / Т. Нго, Г.Ленхоффа – М.: Мир, 1988. – 446с.
17. Остерман, Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1985. – 536с.
18. Пол, У. Иммунология / У. Пол, А. Сильверстайн, М. Купер. – Т. 1-3. – М.: Мир, 1987 – 472с.
19. Практикум по биохимии / под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. – М.: МГУ, 1989. – 508с.
20. Практикум по иммунологии / под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова. – М.: МГУ, 2001. – 224с.
21. Справочник биохимика/ Р. Досон [и др.] – М.: «Мир», 1991.– 545с.
22. Теория и практика иммуноферментного анализа./ А. М. Егоров [и д.р] – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.
23. Филдс, Б.Н. Вирусология / Б.Н. Филдс, Д.М. Найп, Ф.А. Мэрфи. – Т.1-3. – М.: Мир, 1989. – 492с.

24. Холпер, Дж. Методы вирусологии и молекулярной биологии / Дж. Холпер, Я. Макферсон, Дж. Мюллер. – М.: Мир, 1972. – 444с.
25. Шажко, Ж.А. Реакция нейтрализации на культуре перевиваемых клеток и её использование для изучения иммунитета при ящуре: дисс. на соиск. уч. ст. канд. вет. наук. – М.: 1967.
26. Ahmadi, N. Tissue distribution of infectious pancreatic necrosis virus serotype Sp in naturally infected cultured rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum): an immunohistochemical and nested-PCR study/ N. Ahmadi, A. Oryan, M. Akhlaghi, A. Hosseini// J Fish Dis. – 2013. – Vol.36, №7. – P.629–637.
27. Ahne, W. Studies on the use of fish tissue cultures for toxicity tests in order to reduce and replace the fish tests/ W. Ahne// Zbl. Bakt. Hyg., Abt. Orig. B. 1985.-Vol.180.-P.480-504.
28. Alonso, M.C. Development of an in situ hybridization procedure for the detection of sole Aquabirnavirus in infected fish cell cultures/ M.C. Alonso, I. Cano, D. Castro, Perez-Prieto, et al.// J. Virol. Meth. – 2004. – Vol.116. – P.133–138.
29. Ariel, E. Finfish in aquaculture and their diseases-A retrospective view on the European Community/ E. Ariel, N.J. Olesen// Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. – 2002. – Vol.22, №2. – P.72-83.
30. Bahar, M.W. Structure of a VP1-VP3 complex suggests how birnaviruses package the VP1 polymerase/ M.W. Bahar, L.P. Sarin, S.C. Graham, J. Pang, D.H. Bamford, D.I. Stuart, J.M. Grimes// J Virol. – 2013. – Vol.87, №6. – P.3229–3236.
31. Ball, H.I. Infectious pancreatic necrosis in Rainbow Trout in Scotland/ H.I. Ball, A.L. Munro, A. Ellisat et al.// Nature, London. – 1971. – P.334–417.
32. Ballesteros N.A. Immune responses to oral pcDNA-VP2 vaccine in relation to infectious pancreatic necrosisvirus carrier state in rainbow trout

Oncorhynchus mykiss/ N.A. Ballesteros, Saint-Jean S. Rodriguez, S.I. Perez-Prieto// Vet Immunol Immunopathol. – 2015. – Vol.165, №3-4. – P.127–137.

33. Ballesteros, N.A. Oral immunization of rainbow trout to infectious pancreatic necrosis virus (Ipnv) induces different immune gene expression profiles in head kidney and pyloric ceca/ N.A. Ballesteros, S.S. Saint-Jean, P.A. Encinas, S.I. Perez-Prieto, J.M. Coll// Fish Shellfish Immunol. – 2012. – Vol.33, №2. – P.174–185.
34. Bang Jensen, B. Risk factors for outbreaks of infectious pancreatic necrosis (IPN) and associated mortality in Norwegian salmonid farming/ B. Bang Jensen, A.B. Kristoffersen// Dis Aquat Organ. – 2015. – Vol.114, №3. – P.177–187.
35. Billi, J.L. Quantitative comparison of peritoneal washes and faeces for detecting infectious pancreatic necrosis (IPN) in carrier brook trout/ J.L. Billi, K. Wolf// Journal of the Fisheries Research Board of Canada. – 1969. – Vol.26. – P.1459-1465.
36. Blake, S. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA/ S. Blake, J. Ma, D. Caporale// Dis Aquat Org. – 2001. – Vol.45. – P.89–102.
37. Bullock, G.L. Infectious pancreatic necrosis: transmission with iodine-treated and nontreated eggs of brook trout (Salvelinus fontinalis)/ G.L. Bullock, R.R. Rucker, D. Amend, K. Wolf, et al.// Journal of the Fisheries Research Board of Canada. – 1976. – Vol.33. – P.1197-1198.
38. Calleja, F. Use of reverse transcription-real time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) assays with Universal Probe Library (UPL) probes for the detection and genotyping of infectiouspancreatic necrosis virus strains isolated in Chile/ F. Calleja, M.G. Godoy, J.G. Carcamo, I. Bandín, A.J Yanez, C.P. Dopazo, F.S. Kibenge, R. Avendano-Herrera// J Virol Methods. – 2012. – Vol.183, №1. – P.80–85.

39. Calvert, J.G. Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus/ J. G.Calvert, E. Nagy, M. Soler, P.Dobos// Journal of General Virology. – 1991. – Vol.72. – P.2563–2567.
40. Castric, J. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus, Ab serotype, from an epizootic in farmed turbot, Scophtbalmus maximus/ J. Castric, F. Baudin-Laurencin, M.F. Coustans, et al.// Aquaculture. – 1987. – Vol.67. – P.117-126.
41. Caswell-Reno, P. Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus: analysis of viral epitopes and comparison of different isolates/ P. Caswell-Reno, P.W. Reno, B.L. Nicholson// J. Gen. Virol. – 1986. – Vol.67. – P.2193–2205.
42. Chen, L. IPNV Antigen Uptake and Distribution in Atlantic Salmon Following Oral Administration/ L. Chen, O. Evensen, S. Mutoloki// Viruses. – 2015. – Vol.7, №5. – P.2507–2517.
43. Chiou, H.Y. The general characteristics of a birnavirus isolated from cultured loach (Missurnus anguiilicaudatus) in Taiwan/ H.Y. Chiou, C.F. Lo, M.C. Tung, C.H. Wang, H. Fukuda, T. Sano// Fish Pathol. – 1993. – Vol.28. – P.1–7.
44. Christie, K.E. Characterization of a new serotype of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Atlantic salmon/ K.E. Christie, L.S. Havarstein, H.O. Djupvik, S.Ness// Archives of Virology. – 1988. – Vol.103. – P.167-177.
45. Chung, H.-K. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious pancreatic necrosis virus DRT strain/ H.-K. Chung, S.-H. Lee, H.-H. Lee, et al.// Mol. Cells. – 1994. – №4. – P.349–354.
46. Clem, L.W. An orphan virus isolated in marine fish cell tissue culture/ L.W. Clem, M.M. Sihel// Annals of the New York Academy of Sciences. – 1965. – Vol.126. – P.343-361.

47. Crane, M.St.J. First isolation of an aquatic birnavirus from farmed and wild fish species in Australia/ M.St.J. Crane, P. Hardy-Smith, L.M. Williams A.D. Hyatt., et al.// Diseases of Aquatic Organisms. – 2000. – Vol.43. – P.1–14.
48. Cutrin, J.M. Diversity of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish, and other reservoirs in Northwestern Spain/ J.M. Cutrin, J.G. Olveira, J.L. Barja, C.P. Dopazo// Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol.66, №.2. – P.839–843.
49. Cutrin, J.M. Restriction fragment length polymorphisms and sequence analysis: an approach for genotyping infectious pancreatic necrosis virus reference strains and other aquabirnaviruses isolated from northwestern Spain/ J.M. Cutrin, J.L. Barja, B.L. Nicholson, I. Bandin, et al// Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol.70. – P.1059–1067.
50. Damsgard, B. Effects of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) on appetite and growth in Atlantic salmon, Salmo salar L./ B. Damsgard, A. Mortensen, A.-I. Sommer// Aquaculture. – 1998. – Vol.163. – P.185-193.
51. Dannevig, B. Genetic characterization of IPN-virus in a hatchery without IPN and in a sea farm with IPN and with fish originating from the hatchery - preliminary results/ B. Dannevig, C. Thomassen, C.M. Jonassen, N. Santi, I. Modahl, M.J. Hjortaas, T. Taksdal, O. Evensen// Lecture given by C.M. Jonassen at the National Veterinary Institute. – 2003.
52. Dixon, P. F. Studies on the inactivation of selected viral and bacterial fish pathogens at high pH for waste disposal purposes/ P. F. Dixon, M. Algo, A. Bayley, et al. // Journal of Fish Diseases. – 2012. – Vol.35. – P.65–72.
53. Dixon, P.F. Detection of rainbow trout antibodies to infectious pancreatic necrosis virus by an immunoassay/ P.F. Dixon, J. de Groot// Dis Aquat Org. – 1996. – Vol.26. – P125-132.
54. Dobos, P. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review/ P. Dobos, T.E. Roberts// Can. J. Gen. Microbiol. – 1983. – Vol.29. – P.377-384.

55. Dobos, P. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)/ P. Dobos// Annual Review of Fish Diseases. – 1995. – Vol.5. – P.25-54.
56. Dorson, M. The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout, gairdneri Richardson, caused by a European strain of infectious pancreatic necrosis virus/ M. Dorson, C. Torchy// Journal of Fish Diseases. – 1981. – №4. – P.213-221.
57. Duncan, R. Synthesis of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions/ R. Duncan, E. Nagy, P. J. Krell, P. Dobos// J. Virol. – 1987. – Vol.61. – P.3655–3664.
58. Duncan, R. The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA A segment reveals one large ORF encoding a precursor protein/ R. Duncan, P. Dobos// Nucleic Acids Res. – 1986. – Vol.14. – P.5934–5935.
59. Espinoza J.C. Temporal and subcellular localization of infectious pancreatic necrosis virus structural proteins/ J.C. Espinoza, A. Hjalmarsson, J. Kuznar// Arch. Virol. – 2000. – Vol.145. – P.739 – 748.
60. Evensen, O. IPN in salmonids. A review/ O. Evensen, B. Skjelstad, E. Rimstad, E. Brun, L.-H. Johansen, R. Stagg, P. Midtlyng, I. Jensen// The Fisheriers and Aquaculture Industries Research Fund (FHF). – 2003. – P.118.
61. Gahlawat, S.K. A non-destruktive test for detection of IPNV- carriers n Atlantic halibut, Hippoglossus hippoglossus (L.)/ S.K. Gahlawat, E.S. Munro, A.E. Ellis// J offish diseases. – 2004. – Vol.27. – P.233–239.
62. Gamil, A.A. A piscine birnavirus induces inhibition of protein synthesis in CHSE-214 cells primarily through the induction of eIF2α phosphorylation// A.A. Gamil, S. Mutoloki, O.Evensen// Viruses. – 2015. – Vol.7, №4. – P.1987–2005.

63. Gamil, A.A. PKR Activation Favors Infectious Pancreatic Necrosis Virus Replication in Infected Cells/ A.A. Gamil, C. Xu, S. Mutoloki, O. Evensen// Viruses. – 2016. – Vol.8, №6. – P.10–14.

64. Garcia-Sastre, A. Type 1 interferons and the virus–host relationship: a lesson in detente/ A. Garcia-Sastre, C.A. Biron// Science. – 2006. – Vol.312 (5775). – P.879–882.

65. Ghittino, P. Bull.Office int. epizooty./ P. Ghittino, N. Fijan, P. Kinkelin. – 1980. – Vol.92, №9-10. – P.955-966.

66. Gomez-Casado, E. A comparative review on European farmed finfish RNA viruses and their vaccines/ E. Gomez-Casado, A. Estepa, J.M. Coll// Vaccine. – 2011. – Vol.29. – P.2657–2671.

67. Gravell, M. A permanent cell line from the fathead minnow (Pimephales promelas)/ M. Gravell, R.H. Malsberher// Annals of the New York Academy of Sciences. – 1965. – Vol.126. – P.555–565.

68. Halder, M. Freshwater crayfish *Astacus astacus*-a vector for infectious pancreatic necrosis/ M. Halder, W. Ahne// Diseases of Aquatic Organisms. – 1988. – №4. – P.205-209.

69. Hammar L. The use of aqueous two-phase systems to concentrate and purify bovine leukemia virus outer envelope protein gp51. / L. Hammar, M. Merza, K. Malm, S. Eriksson, B. Morein// Biotechnology and biochemistry. – 1989. – №11. – P.296–306.

70. Havarstein, L.S. Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other Birnaviridae/ L.S. Havarstein, K.H. Kalland, K.E. Christie, C. Endessen// J. Gen. Virol. – 1990. – Vol.71. – P.299–308.

71. Hedrick, R.P. Induction of protection from infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by pre-exposure to the avirulent cutthroat trout virus (CTV)/ R.P. Hedrick, S.E. LaPatra, S.K.A. Yun, et al.// Dis. Aquat. Org. – 1994. – Vol.20. – P.118-124.

72. Hedrick, R.P. Persistent infections of salmonid cell lines with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV): a model for the carrier state in trout/ R.P. Hedrick, J.L Fryer// Fish Pathol. – 1982. – Vol.16. – P.163-172.
73. Heppell, J. Characterization of the small open reading frame on genome segment A of infectious pancreatic necrosis virus. J. Heppell, E. Tarrab, L. Berthiaume, J. Lecomte. – J. Gen. Virol. – 1995. – Vol.76. – P.2091-2096.
74. Heppell, J. Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains by restriction fragment profiles/ J. Heppell, L. Berthiaume, E. Tarrab, J. Lecomte, M. Arella// J. Gen. Virology. – 1992. – Vol.73. – P.2863-2870.
75. Higuchi, R. Kinetic PCR: real-time monitoring of DNA amplification reactions/ R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson// Nat. Biotechnol. – 1993. – Vol.11. – P.1026–1030.
76. Higuchi, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences/ R. Higuchi, G. Dollinger, P.S. Walsh, R. Griffith// Nat. Biotechnol. – 1992. – Vol.10. – P.413–417.
77. Hill, B. J. Further investigations into the pathogenicity of IPN-like viruses for oysters/ B. J. Hill, K. Way, D. J. Alderman// Proc. III Int. Colloq. Invertebr. Pathol. – 1982. – P.273–274.
78. Hill, B.J. Impact of viral diseases of salmonid fish in the European Community. In: Salmonid Diseases/ B.J. Hill Kimura T.// ed. Hokkaido University Press, Sapporo, Japan. – 1992. – P.48—59.
79. Hill, B.J. Infectious pancreatic necrosis and its virulence. *In:* Microbial Diseases of Fish (Special Publication of the Society for General Microbiology)/ B.J. Hill, R.J. Roberts// ed. Academic Press, London, UK. – 1982. – P.91-114.
80. Hill, B.J. Infectious Pancreatic Necrosis/ B.J. Hill// Office International des Epizooties (OIE). – Paris, France, 2000.
81. Hill, B.J. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN)

virus and other aquatic birnaviruses/ B.J. Hill, K. Way// Ann. Rev. Fish Dis. – 1995. – №5. – P.55—77.

82. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Office International des Epizooties (OIE): Infectious pancreatic necrosis. – Paris, France, 2003. – P.142–155.

83. IPNV Ag ELISA [Электронный ресурс]/ TestLine Clinical Diagnostics. – Режим доступа: http://www.testlinecd.com/ipnv-ag-elisa (Дата обращения: 15.02.2012).

84. Isshiki, T. Distribution of marine birnaviruses in cultured marine fish species from Kagawa Prefecture, Japan/ T. Isshiki, T. Nagano, K. Kanehira, S. Suzuki// J of fish diseases. – 2004. – Vol.27. – P.89-98.

85. Jensen, I. Establishing a cell line from Atlantic cod as a novel tool for in vitro studies/ I. Jensen, K. Steiro, A.I. Sommer, S. Mennen, A. Johansen, E.K. Sandaker, M. Seppola// Fish Shellfish Immunol. – 2013. – Vol.34, №1. – P.199–208.

86. Jorgensen, J. B. CpG DNA Induces Protective Antiviral Immune Responses in Atlantic Salmon (Salmo salar L.)/ J. B. Jorgensen, L. Johansen, K. Steiro, A. Johansen// J of virology. – 2003. – Vol.77, № 21. – P.11471–11479.

87. Jorgensen, S.M. Validation of reference genes for real-time polymerase chain reaction studies in Atlantic salmon/ S.M. Jorgensen, E.J. Kleveland, U. Grimholt, T. Gjoen// Marine Biotechnol. – 2006. – Vol.8. – P.1436–2228.

88. Julin, K. Persistent infections with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) of different virulence in Atlantic salmon, Salmo salar L/ K. Julin, L.H. Johansen, A.I. Sommer, J.B. Jorgensen// J Fish Dis. – 2015. – Vol.38, №11. – P.1005–1019.

89. Kerr, C.R.C. Moving molecular diagnostics from laboratory to clinical application: a case study using infectious pancreatic necrosis virus serotype A/ C.R.C. Kerr, C.O. Cunningham// Lett. Appl. Microbiol. – 2006. – Vol.43. – P.98–104.

90. Krogsrud, J. Infectious pancreatic necrosis virus in Norwegian fish farms/ J. Krogsrud, T. Hastein, K. Ranningen// In: Ahne W, Kurstak E (eds) Viruses of lower vertebrates. Springer Verlag, Berlin. – 1989. – P.284-291.
91. Kumari, J. Eomesodermin of atlantic salmon: an important regulator of cytolytic gene and interferon gamma expression in spleen lymphocytes/ J. Kumari, J. Bogwald, R.A. Dalmo// PLoS One. – 2013. – Vol.8, №2
92. Lago, M. Aquabirnavirus polyploidy: A new strategy to modulate virulence?/ M. Lago, J.F. Rodríguez, I. Bandín, C.P. Dopazo// J Gen Virol. – 2016. – Vol.97, №5. – P.1168–1177.
93. Lannan, C.N. Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids/ C.N. Lannan, J.R. Winton, J.L. Fryer// In Vitro. – 1984. – Vol.20, № 9. – P.671–676.
94. LaPatra, S.E. Assessment of the risk of White Sturgeon to become infected and potential carriers of infectious pancreatic necrosis virus/ S.E. LaPatra, S. Mead// J Aquat Anim Health. – 2013. – Vol.25, №4. – P.260–264.
95. Larsen, R. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein/ R. Larsen, T.P. Rokenes, B. Robertsen// J. Virol. – 2004. – Vol.78, №15. – P.7938–7944.
96. Lauksund, S. Infectious pancreatic necrosis virus proteins VP2, VP3, VP4 and VP5 antagonize IFNa1 promoter activation while VP1 induces IFNa1/ S. Lauksund, L. Greiner-Tollersrud, C.J. Chang, B. Robertsen// Virus Res. – 2015. – Vol.196. – P.113–121.
97. Leberman, R. The isolation of plant viruses by means of "simple" coacervates/ R. Leberman// Virology. – 1966. – Vol. 30, № 3. – P.341–347.
98. Lee, K.K. Dual challenges of infectious pancreatic necrosis virus and *Vibrio carhariae* in the grouper, Epinephelus sp./ K.K. Lee, T.I. Yang, P.C. Liu, J.L. Wu,// Virus Res. – 1999. – Vol.63. – P.131-134.
99. Lee, M.-K. Genomic Variation of Aquatic Birnaviruses Analyzed with Restriction Fragment Length Polymorphisms/ M.-K. Lee, S. L. Blake, J. T.

Singer, B. L. Nicholson// Applied and environmental microbiology. – July 1996. – Vol. 62, №.7. – P.2513–2520.

100. Liu, M. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo/ M. Liu, V. N. Vakharia// Virology. – 2004. – Vol.330. – P.62–73.
101. Lo, C.-F. The characteristics of the virus isolated from the gill of clam, Meretrix lusoria/ C.-F. Lo, Y.-W. Hong, S.-Y. Huang, C.-H. Wang// Fish Pathol. – 1988. – Vol.23. – P.147–154.
102. M'Gonigle, R.H. Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings/ R.H. M'Gonigle// Transactions of the American Fisheries Society. – 1940. – Vol.70. – P.297-302.
103. Mackay, I.M. Real-time PCR in virology/ I.M. Mackay, K.E. Arden, A. Nitsch// Nucleic Acids Res. – 2002. – Vol.30. – P.1292–1305.
104. Magda Barrera-Mejna. Molecular characterization of the VP1 gene of a Mexican isolate of infectious pancreatic necrosis virus/ Magda Barrera-Mejna, Josq Simyn-Martnnez, Raul Ulloa-Arvizu, Celene Salgado-Miranda, Edgardo Soriano-Vargas// The Canadian Journal of Veterinary Research. – 2010. – Vol.74. – P.218–222.
105. Magyar, G. Evidence for the detection of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17-kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus/ G. Magyar, P. Dobos// Virology. – 1994. – Vol.204. – P.580-589.
106. Malsberger, R.G. Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus/ R.G. Malsberger, C.P. Cerini// Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1965. – Vol.126, № 1. – P.320–327.
107. Martin Marcelo Cortez-San. Molecular characterization of IPNV RNA replication intermediates during the viral infective cycle/ Martin Marcelo Cortez-San, Villanueva Rodrigo A., Matilde Jashes, Sandino Ana Maria// Virus Research. – 2009. – Vol.144. – P.344–349.

108. McAllister, P. E. Infectious pancreatic necrosis virus in the environment: relationship to effluent from aquaculture facilities/ P. E. McAllister, J. Bebak// J. Fish Dis. – 1997. – № 20. – P.201–207.
109. McAllister, P.E. Assessment of the virulence of fish and molluscan isolates of infectious pancreatic necrosis virus for salmonid fish by challenge of brook trout, Salvelinus fontinalis (Mitchill)/ P.E.McAllister, W.J. Owens// J. Fish. Dis. – 1995. – Vol.18. – P.97-103.
110. Melby, H.P. All commercial Atlantic salmon seawater farms in Norway harbour carriers of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). In: Fryer JL (ed) Proceedings from the 2nd International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates/ H.P. Melby, J. Krogsrud, T. Hastein, H. Stenwig// Oregon State University, Corvallis. – 1991. – P.211-217.
111. Mjaaland, S. Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anaemia in Atlantic salmon *(Salmo salar* L.): an ortho-myxo-like virus in a teleost/ S. Mjaaland, E. Rimstad, K. Falk, B.H. Dannevig// J. Virol. – 1997. – Vol.71. – P.7681-7686.
112. Molloy, S.D. Experimental transmission of infectious pancreatic necrosis virus from the blue mussel, Mytilus edulis, to cohabitating Atlantic Salmon (Salmo salar) smolts/ S.D. Molloy, M.R. Pietrak, I. Bricknell, D.A. Bouchard// Appl Environ Microbiol. – 2013. – Vol.79, №19. – P.5882–5890.
113. Mortensen, S. H. Stability of an infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolate stored under different laboratory conditions/ S. H. Mortensen, R. K. Nilsen, B. Hjeltnes// Dis. aquat. Org. – 1998. – Vol.33. – P.67–71.
114. Mortensen, S.H. Infectious pancreatic necrosis virus, serotype N l, isolated from Norwegian halibut *(Hippoglossus hippoglossus),* turbot *(Scophthalmus maximus)* and *scallops (Pecten maximus)/* S.H. Mortensen, B. Hjeltnes, O. Rodseth, J. Krogsrud// Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. – 1990. – Vol.10. – P.42–43.

115. Muller, H. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90000-Da protein/ H. Muller, R. Nitschke// Virology. – 1987. – Vol.159. – P.174–177.
116. Munang'andu, H.M. A Systematic Approach towards Optimizing a Cohabitation Challenge Model for Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Atlantic Salmon (Salmo salar L.)/ H.M. Munang'andu, N. Santi, B.N. Fredriksen, K.E. Lokling, O. Evensen// PLoS One. –2016. – Vol.1, №2. – P.15–20.
117. Munang'andu, H.M. Comparison of vaccine efficacy for different antigen delivery systems for infectiouspancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (Salmo salar L.) in a cohabitation challenge model/ H.M. Munang'andu, B.N. Fredriksen, S. Mutoloki, B. Brudeseth, T.Y. Kuo, I.S. Marjara, R.A. Dalmo, O. Evensen// Vaccine. – 2012. – Vol.30, №27. – P.4007–4016.
118. Munang'andu, H.M. Immunogenicity and cross protective ability of the central VP2 amino acids of infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon (Salmo salar L.)/ H.M. Munang'andu, A. Sandtro, S. Mutoloki, B.E. Brudeseth, N. Santi, O. Evensen// PLoS One. – 2013. – Vol.8, №1.
119. Munang'andu, H.M. The kinetics of CD4+ and CD8+ T-cell gene expression correlate with protection in Atlantic salmon (Salmo salar L) vaccinated against infectious ancreatic necrosis/ H.M. Munang'andu, B.N. Fredriksen, S. Mutoloki, R.A. Dalmo, O. Evensen// Vaccine. – 2013. – Vol.31, №15. – P.1956–1963.
120. Murray, A.G. A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture/ A.G. Murray, E.J. Peeler// Prev. Med. Vet. – 2005. – Vol.67. – P.223–235.
121. Myrmel, M. Infectious pancreatic necrosis virus in fish by-products is inactivated with inorganic acid (pH 1) and base (pH 12)/ M. Myrmel, I.

Modahl, H. Nygaard, K.M. Lie// J Fish Dis. – 2014. – Vol.37, №4. – P.349–355.

122. Nakajima, K. Viral deformity of yellowtail fingerlings/ K. Nakajima, Y. Maeno, M. Arimoto, K. Inouye// Fish Pathol. – 1993. – Vol.28. – P.125-129.
123. Niesters, H.G.M. Clinical virology in real-time/ H.G.M Niesters, J. Clin// Virol. – 2002. – 25 (Suppl.3). – P.3–12.
124. Nishizawa, T. An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region/ T. Nishizawa, S. Kinoshita, M. Yoshimizu// J. Gen. Virol. – 2005. – Vol.86. – P.1973–1978.
125. Novoa, A. Characterization of a birnavirus isolated from diseased turbot cultured in Spain/ A. Novoa, A. Figueras, C.F. Puentes, A. Ledo// Dis. Aquat. Org. – 1993. – Vol.15. – P.163-169.
126. OIE Aquatic code 2006[Электронный ресурс]/ Available . – Режим доступа: http://www.oie.int/eng/normes/fcode/en_chapitre_1.2.3.htm. (Дата обращения: 25.06.2012).
127. Okamoto, N. The relation between the change of quantities of infectious pancreatic necrosis virus in infected rainbow trout fry and the disease process/ N. Okamoto, N. Tanigughi, Y. Seno, T. Sano// Fish PathoL. – 1984. – Vol.19. – P.1–4.
128. Olesen, N.J. Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF), and plaque neutralization tests (50% PNT)/ N.J. Olesen, N. Lvretlzen, P.E.V. Jsrgensen// Dis Aquat Org. – Vol.1991. – Vol.10. – P.31–38
129. Olesen, N.J. Isolation of an IPN-like virus belonging to the serogroup II of the aquatic birnaviruses from dab *(Limanda limanda)*/ N.J. Olesen, P.E.V. Jorgensen, B. Bloch, S. Mellergaard// J. Fish Dis. – 1988. – Vol.11. – P.449–451.

130. Ooi, E.L. Functional characterization of the Japanese flounder, Paralichthys olivaceus, Mx promoter/ E.L. Ooi, I. Hirono, T. Aoki// Fish and Shellfish Immunology. – 2006. – Vol.21, №3. – P.293–304.
131. Ortega, C. Distribution of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Based on Surveillance Programs in Freshwater Trout Farms of Mexico/ C. Ortega, B. Valladares, D. Arguedas, F. Vega, R. Montes de Oca, A.G. Murray// J. Aquat. Anim. Health. –2016. – Vol. 28, №1. – P.21–26.
132. Rajendran, K.V. A Taqman real-time RT-PCR for quantifying Mourilyan virus infection levels in penaeid shrimp tissue/ K.V. Rajendran, J.A. Cowley, R.J. McCulloch, P.J. Walker// J. Virol. – 2006. – Meth. 137. – P.265–271.
133. Randall, R.E. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures/ R.E. Randall, S. Goodbourn// J. Gen. Virol. – 2008. – Vol.89, № 1. – P.1–47.
134. Reed, L.J. A simple method of estimating fifty percent end-points/ L.J. Reed// American J. Hyhiene. – 1938. – Vol.27. – P.493–497.
135. Reno, P.W. Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: Woo, P.T., Bruno, D.W. (Eds.), Fish Diseases and Disorders/ P.W. Reno// Bacterial and Fungal Infections. CABI publishers, UK. – 1999. – Vol.3: Viral. – P.1–55.
136. Ririe, K.M. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction/ K.M. Ririe, R.P. Rasmussen// Anal. Biochem. – 1997. – Vol.245. – P.154–160.
137. Rivas, C. Marine environment as reservoir of birnaviruses from poikilothermic animals/ C. Rivas, C. Cepeda, C. P. Dopazo, B. Novoa, et al.// Aquaculture. – 1993. –Vol.115. – P.183–194.
138. Robertsen, B. Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity/ B. Robertsen, V. Bergan, T. Rokenes, R. Larsen// J. Interferon Cytokine Res. – 2003. – Vol.2, № 10. – P.601–612.

139. Robertsen, B. Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination/ B. Robertsen// Fish Shellfish Immunol. – 2008. – Vol.24, № 5. – P.351–357.
140. Robertsen, B. Immunology of fishes. Cytokines/ B. Robertsen, P.-P. Pastoret, P. Griebel, H. Bazin// Handbook of Vertebrate Immunology. Academic Press, London. – 1998. – P.11–13.
141. Robertsen, B. Molecular cloning of doublestranded RNA inducible MX genes from Atlantic salmon (Salmo salar L.)/ B. Robertsen, G. Trobridge J.A. Leong// Dev Comp Immunol. – 1997. – Vol.21. – P.397–412.
142. Robertsen, B. The interferon system of teleost fish/ B. Robertsen// Fish Shellfish Immunol. – 2006. – Vol.20. – P.172–191.
143. Rodger, H.D. Clinical infectious pancreatic necrosis virus infection in farmed halibut in the United Kingdom/ H.D. Rodger, G.N. Frerichs// Vet. Rec. – 1997. – Vol.140. – P.401-402.
144. Ruane, N.M. Phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Ireland reveals the spread of a virulent genogroup 5 subtype previously associated with imports/ N.M. Ruane, S.J. McCleary, L.J. McCarthy, K. Henshilwood// Arch Virol. – 2015. – Vol.160, №3. – P.817–824.
145. Saint-Jean, S.J. Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish/ S.J. Saint-Jean, J.J. Borrego, S.I. Perez-Prieto// J. Virol. Meth. – 2001. – Vol.97. – P.23–31.
146. Salama, N.K. A comparison of modelling approaches to assess the transmission of pathogens between Scottish fish farms: the role of hydrodynamics and site biomass/ N.K. Salama, A.G. Murray// Prev Vet Med. – 2013. – Vol.108, №4. – P.285–293.
147. Sano, M. Infectious pancreatic necrosis virus plaque size depends on the larger RNA segment and is not linked to virulence/ M. Sano, N. Okamoto, T. Sano// J. Fish. Dis. –1994. – Vol.17. – P.657–659.

148. Sano, M.N. Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated with the larger RNA segment (RNA segment A)/ M.N. Sano, H. Okamoto, M. Fukuda, et al.// J. Fish. Dis. – 1992. – Vol.15. – P.283–293.
149. Santi, N. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus/ N. Santi, V. N. Vakharia, O. Evensen// Virology. – 2003. –Vol.322. – P.31–40.
150. Santi, N. Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence/ N. Santi, H. Song, V.N. Vakharia// J. Virol. – 2005. – Vol.79. – P.9206–9216.
151. Sasson, A. Biotechnologies: challenge sand promises/ A Sasson// 2nd edition. – Unesco, 1985. – P.196.
152. Scherrer, R. Le virus de la Necrose Pancreatique Infectieuse (NPI): erude de la replication et de l'induction de la synthese d'interferon en fonction de l'hete et de la temperature/ R. Scherrer, E. Bic, J. Cohen// Annales de Microbiologie (Institut Pasteur). – 1974. – Vol.125A. – P.455–467.
153. Schroder, K. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions/ K. Schroder, P.J. Hertzog, T. Ravasi, D.A. Hume// J. Leukocyte Biol. – 2004. – Vol.75. – P.163–189.
154. Shivappa, R.B. Development of a subunit vaccine for infectious pancreatic necrosis virus using a baculovirus insect/larvae system/ R.B. Shivappa, P.E. McAllister, G.H. Edwards, N. Santi// Dev. Biol. (Basel). – 2005. – Vol.121. – P.165–174.
155. Smail, D.A Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus Sp serotype in farmed Atlantic salmon, Salmo salar L., post-smolls associated with mortality and clinical disease/ D.A Smail, D.W. Bruno, G. Dear, L.A. McFarlane, K. Ross// J. Fish Dis. – 1992. – Vol.15. – P.77-83.
156. Somogyi, P. Virus-specific RNA synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus/ P. Somogyi, P. Dobos// J. Virol. – 1980. – Vol.33, № 1. – P.129–139.

157. Song, H., Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation/ H. Song, N. Santi, O. Evensen, V.N. Vakharia// Journal of Virology. – 2005. – Vol.79. – P.10289-10299.
158. Stangeland, K. Experimental induction of infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, Salmo salar L. post-smolts// K. Stangeland, S. Hoie, T. Taksdal// J. Fish Dis. – 1996. – Vol.19. – P.323-327.
159. St-Hilaire, S., Epidemiological investigation of infectious hematopoietic necrosis virus in salt water net-pen reared Atlantic salmon in British Columbia, Canada/ S. St-Hilaire, C.S. Ribble, C. Stephen, E. Anderson, G. Kurath, M.L. Kent// Aquaculture. – 2002. – Vol.212. – P.49 –67.
160. Sun, B. Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties/ B. Sun, B. Robertsen, Z. Wang, B. Liu// Developmental and Comparative Immunology. – 2009. – Vol.33, №4. – P.547-558.
161. Suzuki, S. Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription-and nested PCR/ S. Suzuki, N. Hosono, R. Kusuda// J. Marine Biotech. – 1997. – №5. – P.205-209.
162. Tarrab, E. Antigenic characterization of serogroup ‘A’ of infectious pancreatic necrosis virus with three panels of monoclonal antibodies/ E. Tarrab, L. Berthiaume, J. Heppell// J. Gen. Virol. – 1993. – Vol.74. – P.2025–2030.
163. Tjissen, P. Practica and theory of enzyme immunoassay / P. Tjissen // Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology. – Amsterdam; New York; Oxfort, 1985. – P. 194–280.
164. Van Regenmortel, M. H. V. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses/ M. H. V. Van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, R. B. Wickner// San Diego: Academic Press. – 2000.

165. Vandesompele, J. Accurate normalization of real-time quantitative RT PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes/ J. Vandesompele, K.D. Preter, F. Pattyn, B. Poppe// Genome Biol. – 2002. – № 3. – P.341–344.

166. Vestergard-Jorgensen, P. Infectious pancreatic necrosis (IPN) in Danish rainbow trout. Their serological and pathogenic properties/ P. Vestergard-Jorgensen, N.P. Kehlet// Nordisk Veterinoer medicin. – 1971. – Vol.23. – P.568 – 575.

167. Vestergard-Jorgensen, P. Problems in the serological typing of IPN virus/ P. Vestergard-Jorgensen, P.C. Eratmalle// Aeta Veterinaria Seandinaviea. – 1970. – №12. –P.145–147.

168. Villanueva, R.A. Genome assembly and particle maturation of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus/ R.A. Villanueva, J.L. Galaz, J.A. Valdes, M.M. Jashes et all// J. Virol. – 2004. – Vol.78, № 24. – P.13829–13838.

169. Voller, A. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) / A. Voller, D.E. Bidwell, A. Bartlett – London, 1979. – P. 58.

170. Whipple, M.J. The effect of heat and low pH on selected viral and bacterial fish pathogens/ M.J. Whipple, J.S. Rohovec// Aquaculture. –1994. – Vol.123. – P.179–189.

171. Williams, K. Multiples reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses/ K. Williams, S. Blake, A. Sweeney// J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol.37. – P.4139–4141.

172. Wilson, M.B. Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxides (HRPO) to antibodies/ M.B. Wilson, P.K. Nakane// Biomedical press. – 1978. – P.215–244.

173. Wolf, K. Fish viruses and fish viral diseases/ K. Wolf// Cornell University Press, Ithaca, N.Y. – 1988. P.476.

174. Wolf, K. Nature of infectious pancreatic necrosis virus in trout/ K. Wolf, S.F. Snieszko, C.E. Dunbar E.A. Pyle// Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. – 1960. – Vol.104. – P.105–108.
175. Wolf, K. Poikilotherm vertebrate cell line and viruses: a current listing for fishes/ K. Wolf, J. A. Mann// In Vitro. – 1980. – Vol.16, №2. – P.168–179.
176. Wolf, K. Salmonid viruses: infectious pancreatic necrosis virus. Morphology, pathology and serology of first European isolations/ K. Wolf, M.C. Quimby// Arehivfiir die Gesamte Virusforschung. – 1971. – Vol.34. – P.144–156.
177. Wolf, K. The fish viruses. In Advances in Virus Research/ K.Wolf, K.M. Smith, M.A. Lauffer // New York: Academic Press. – 1966. – Vol.12. – P.35–101.
178. Yamamoto, T. Frequency of detection and survival of infectious pancreatic necrosis virus in a carrier population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in a lake/ T. Yamamoto// Journal of the Fisheries Research Board of Canada. – 1975. – Vol.32. – P.568–570.
179. Yao, K. Generation of infectious pancreatic necrosis virus from cloned cDNA/ K. Yao, V.N. Vakharia// J. Virol. – 1998. – Vol.72, №11. – P.8913-8920.
180. Zou, J. Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates/ J. Zou, C. Tafalla, J. Truckle, C.J. Secombes// J. Immunol. – 2007. – Vol.179, № 6. – P.3859–3871.

9. ПРИЛОЖЕНИЕ

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ

ГНУ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
им. Я.Р.КОВАЛЕНКО (ВИЭВ Россельхозакадемии)

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ВИЭВ Россельхозакадемии,
академик РАСХН

_____ М.И.Гулюкин
«__» _____ 2013г.

НАСТАВЛЕНИЕ

по применению набора для диагностики инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN) методом иммуноферментного анализа

Москва, 2013 г.

Наставление разработано в лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ им.Я.Р.Коваленко Россельхозакадемии.

Авторы: заведующая лабораторией, к.б.н. Завьялова Е.А.;
в.н.с., к.б.н. Дрошнев А.Е., м.н.с. Карпова М.А.

Рецензенты: в.н.с. отдела вирусологии, к.б.н Алексеенкова С.В.
В.н.с. лаборатории лейкозвологии, к.б.н. Иванова Л.А.

Предназначено для специалистов научно-исследовательских учреждений, ветеринарных диагностичееких лабораторий, преподавателей и студентов биологичееких ВУЗов и техникумов.

Наставления рассмотрены и одобрены Ученым советом
ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко 10. октября 2013 года, протокол № 4

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ

ГНУ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
им. Я.Р.КОВАЛЕНКО (ВИЭВ Россельхозакадемии)

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ВИЭВ им.Я.Р.Коваленко,
академик РАСХН

_____ М.И.Гулюкин
«10» октября 2013г.

Инструкция
по применению набора для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб (IPNV) методом иммуноферментного анализа «IPNV-ИФА-ВИЭВ»

Москва, 2013 г.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ им.Я.Р.Коваленко»
(ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ГНУ «Всероссийский
научно-исследовательский
институт экспериментальной
ветеринарии им.Я.Р.Коваленко»
М.И.Гулюкин
«6» сентября 2013 г.

СТАНДАРТ ГНУ ВИЭВ

НАБОР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ (IPNV) МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА «IPNV-ИФА-ВИЭВ»

СТО 004961-65-0022-2013
Технические условия

Москва, 2013 г.

УДК 619 ОКС 11.220 ОКП 93847000

Ключевые слова: **диагностика, инфекционный некроз поджелудочной железы, лососевые рыбы, набор для диагностики, специфичность, антигенная активность, иммуноферментный анализ**

РАЗРАБОТЧИКИ:

Заведующая лабораторией ихтиопатологии ВИЭВ Россельхозакадемии Завьялова Е.А.

Ведущий научный сотрудник лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ Россельхозакадемии Дрошнев А.Е.

Младший научный сотрудник лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ Россельхозакадемии Карпова М.А.