

На правах рукописи



003444805

Попова Анастасия Геннадьевна

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РАБДОВИРУСОВ НИЗШИХ
ПОЗВОНОЧНЫХ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИХ ДИАГНОСТИКИ С ПОМОЩЬЮ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ И ГИБРИДИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ
КИСЛОТ**

03 00 03 – «молекулярная биология»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2008

Работа выполнена в ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Минздравсоцразвития России

Научный руководитель
к х н С Ф Орешкова

Официальные оппоненты
д б н , профессор Загребельный Станислав Николаевич
к б н Бабкина Ирина Николаевна

Ведущая организация
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Защита состоится «23» __мая__ 2008 года в 9 часов на заседании диссертационного совета Д 208 020 01 при Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» по адресу ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской области, 630559, тел (383)336-74-28

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ ВБ «Вектор»

Автореферат разослан «18» __апреля__ 2008 года

Ученый секретарь

диссертационного совета



Л И Карпенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

История аквакультуры насчитывает тысячи лет, беря свое начало в государствах Древнего Востока. Однако, за последние 20–25 лет в ее развитии произошли революционные изменения, вызванные истощением биологических ресурсов океана и континентальных пресных вод, издавна служивших человеку источником высокоценных пищевых объектов. Будучи сегодня самым перспективным и быстрорастущим сектором сферы производства продуктов питания, аквакультура все больше замещает промышленный промысел гидробионтов в дикой природе.

Серьезным препятствием на пути успешного развития аквакультуры являются болезни объектов культивирования, при этом основной ущерб наносят вирусные инфекции рыб. Несмотря на то, что современная ихтиовирусология – сравнительно молодая наука, уже обнаружено около 350 вирусов гидробионтов. Список открываемых вирусов, как правило, пополняется после введения в аквакультуру новых объектов разведения (Щелкунов И. С., 2006).

Рабдовирусы составляют группу особо значимых вирусных патогенов культивируемых видов рыб. Наиболее интенсивно изучались вирусы, инфицирующие лососевые породы, такие как вирус инфекционного некроза гемопозитической ткани (ИНГТ, IHNV) и вирусной геморрагической септицемии (ВГС, VHSV), так как именно эти патогены имеют наибольшее экономическое значение для мирового производства рыбы. В России, наряду с ИНГТ, весьма масштабной проблемой является весенняя виремия карпа (ВВК), вызываемая вирусом SVCV.

В последнее время большое внимание уделяется разработке методов молекулярно-генетической диагностики вирусных инфекций рыб, основанных на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР). Эти методы обладают рядом очевидных достоинств, среди которых быстрота получения результата, высокая чувствительность и специфичность, возможность осуществления генетического типирования изолятов.

Для создания эффективной системы ПЦР-диагностики очень важны данные по изменчивости геномов патогенных штаммов вируса, выделенных от хозяев из разных географических областей. Эти данные необходимы для создания тест-систем, способных различать генетические варианты вируса и, тем самым, проследить пути распространения инфекции.

Цели и задачи исследования

Целью настоящего исследования было создание эффективных диагностических тест-систем на вирусы SVC и IHNV на основе методов ПЦР и молекулярной гибридизации, изучение генетического разнообразия данных патогенов, а также разработка методов их генотипирования с помощью молекулярно-биологических методик

В ходе работы решались следующие задачи

- 1 Разработка метода ОТ-пгПЦР для выявления вирусов весенней виремии карпа и инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых
- 2 Конструирование зондов и создание системы детекции IHNV с помощью гибридизационного анализа
- 3 Определение чувствительности и специфичности разработанных методов идентификации SVCV и IHNV в зараженной культуре клеток и в клиническом материале от инфицированных рыб
- 4 Разработка способов генетического типирования штаммов SVCV и IHNV на основании методов ПЦР и анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДФ)
- 5 Филогенетический анализ штаммов SVCV и IHNV на основе данных о нуклеотидной последовательности участков генов нуклеопротеина

Положения, выносимые на защиту

- 1 Системы ОТ-пгПЦР-диагностики на вирусы весенней виремии карпа (SVCV) и инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) позволяющие выявлять вирусную РНК с высокой чувствительностью и специфичностью в препаратах культуральных вирусов и в клиническом материале от больных рыб
- 2 Способ генотипирования рабдовирусов рыб с помощью ПДФ-анализа. Все исследуемые изоляты SVCV образуют пять генетических групп. Исследованные изоляты IHNV принадлежат к трем основным геногруппам (U, M и L)
- 3 Филогенетическое исследование участков гена нуклеопротеина для восемнадцати изолятов SVCV и тринадцати изолятов IHNV. Изоляты SVCV образуют генетические группы в зависимости от географии их выделения. Камчатский изолят IHNV генетически близок североамериканским изолятам геногруппы U, а изоляты, выделенные в подмосковном регионе, образуют обособленную подгруппу в составе геногруппы U

Научная новизна и практическая ценность работы

В результате проделанной работы, на основе методов полимеразной цепной реакции и гибридизации нуклеиновых кислот впервые созданы тест-системы для идентификации РНК вирусов весенней виремии карпа и инфекционного некроза гемопозитической ткани в инфицированных культурах клеток и в органах и тканях от рыб. Разработаны методы генетического типирования изолятов указанных патогенов с помощью ПЦР и ПДРФ-анализа. Впервые проведен филогенетический анализ последовательностей гена нуклеопротеина для 12 российских и 6 европейских изолятов SVCV и показано их различие на генетическом уровне. Также выполнен филогенетический анализ последовательностей гена нуклеопротеина для изолятов IHNV. Проведено сравнение изолятов, выделенных из естественных водоемов Камчатки и из форелевых рыбоводных хозяйств Московской и Тверской областей с изолятами, распространенными на Тихоокеанском побережье Северной Америки.

Результаты настоящих исследований могут представлять интерес для практического рыбоводства, так как позволяют специфично, с высокой чувствительностью и в короткие сроки выявлять патогены, вызывающие наиболее опасные заболевания разводимых видов рыб (карповых и лососевых). Знание эпизоотической обстановки как в естественных водоемах, так и на рыбоводных заводах и в хозяйствах позволяет оценивать риск распространения опасных вирусных агентов среди разводимой рыбы, и, как следствие, избегать экономических потерь. Информация, полученная с помощью разработанных методов генотипирования SVCV и IHNV, поможет проследить перемещение генетических вариантов вирусов как в России, так и за рубежом при перевозке икры и живой рыбы для воспроизводства, что позволит своевременно и эффективно осуществлять соответствующие профилактические мероприятия.

Апробация работы и публикации

По материалам диссертации опубликовано три статьи в реферируемых научных журналах и одна в книге «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов». Полученные результаты были представлены на трех международных конференциях: Second United States and Russia Bilateral Conference "Aquatic & Marine Animal Health" (Shepherdstown, West Virginia, USA, 2003), 2-ой международной конференции (Москва, МГУ, 2004), международной научно-практической конференции «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера» (Новосибирск, 2006).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из шести разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список использованной литературы.

(117 наименований). Работа изложена на 121 страницах машинописного текста и содержит 12 таблиц, 38 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Разработка методов выявления вируса весенней виремии карпа (SVCV) на основе полимеразной цепной реакции

Для амплификации фрагментов генома SVCV на основании полной нуклеотидной последовательности референсной линии Fijan (код доступа GenBank U18101) были подобраны праймеры к консервативным участкам гена нуклеопротеина (таблица 1, рис. 1).

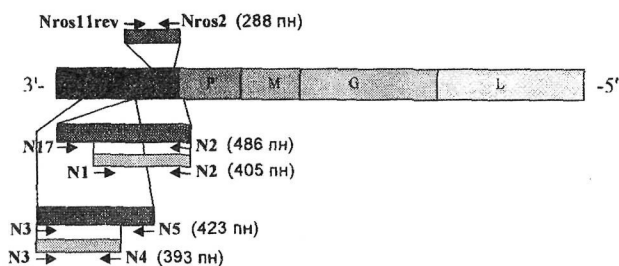


Рис. 1 Схема расположения праймеров и размеры получаемых ПЦР-продуктов на N-гене SVCV.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

№ п/п	Праймер	Ориентация	Последовательность	Положение на геноме
1	IHNV2Rev	прямой	5'-ACAGAACAAGCAGAACTATTT	111 - 131
2	IHNV1	обратный	5'-TGATGAGAATGATCCCATAG	748 - 770
3	IHNV2	обратный	5'-GAAGAGGAGGCCGGTCAC	553 - 570
4	GSout	прямой	5'-AGAGATCCCTACACCAGAGAC	3507 - 3527
5	GSin	прямой	5'-TCACCCTGCCAGACTCATTGG	3567 - 3587
6	GASin	обратный	5'-ATAGATGGAGCCTTTGTGCAT	4028 - 4049
7	N17	прямой	5'-CAGCTTGTGTCTGCATTATG	968 - 987
8	N1	прямой	5'-AATGCAAGCTTGTCTGATGGCT	1049 - 1069
9	N2	обратный	5'-AACTGCAGCATACGCTTTGAGGCTT	1434 - 1453
10	N3	прямой	5'-AGTCTAGATTGTAGCCTGTGTGGACA	639 - 662
11	N4	обратный	5'-ATAGATCTCGTCAGGCTGTCTTGC	1010 - 1033
12	N5	обратный	5'-CCCAAGCTTGCATTGAGATCGAC	1039 - 1062
13	Nros1 rev	прямой	5'-CAGCCCTGATATTGAGCAG	1084 - 1102
14	Nros2	обратный	5'-CTTCTATTATCACTTAAAATTGTC	1348 - 1371

Примечание: 1 - 3 - праймеры, комплементарные последовательности N-гена IHNV; 4 - 6 - праймеры, комплементарные последовательности G-гена IHNV; 7 - 14 - праймеры, комплементарные последовательности N-гена SVCV. Нумерация нуклеотидов дана от 5'-конца генома IHNV штамма WRAC (код доступа GenBank L40883) и генома SVCV штамма Fijan (коды доступа GenBank U18101, AJ318079).

При разработке метода идентификации вируса ВВК в культуре клеток на основе ОТ-ПЦР применялись два альтернативных набора праймеров. С целью повышения чувствительности была разработана методика полугнездовой ПЦР (пг-ПЦР), которая заключалась в использовании в первом раунде реакции в качестве внешней пары праймеров N17 и N2 (или N3 и N5), а во втором – внутреннего праймера N1 (или N4). Было показано, что оба варианта ОТ-пгПЦР при их использовании для детекции культурального вируса дают продукты ожидаемого размера для всех изученных изолятов SVCV уже в первом раунде реакции.

Для определения специфичности метода ОТ-пгПЦР в реакции были использованы препараты РНК российских и европейских штаммов и изолятов SVCV, а также препараты РНК других рабдовирусов рыб, относящихся к родам *Vesiculovirus* (PFRV, *Rh anguilla*), и *Novirhabdovirus* (IHNV, VHSV). Было показано, что при проведении реакции с праймерами N17 и N2 специфичный продукт (486 пн) синтезировался для всех испытанных изолятов SVCV, тогда как в случае PFRV, IHNV, VHSV и *Rh anguilla* продукт реакции отсутствовал. Интересно, что проведение реакции с праймерами N1 и N2 приводило к образованию продукта 405 пн не только в случае SVCV, но также для изолятов PFRV (рабдовирус мальков щуки, вызывающий сходное заболевание). Проведение ОТ-пгПЦР в системе с использованием праймеров N3, N4 и N5 давало образование продуктов 423 пн (первый раунд) и 393 пн (второй раунд) только для всех изученных изолятов SVCV.

Чувствительность выявления вируса определяли с помощью серии последовательных десятикратных разведений вирусной РНК, выделенной из образцов культурального вируса. В первом раунде ОТ-ПЦР для двух пар праймеров (N1-N2 и N3-N5) чувствительность составила $\sim 10^6$ ТЦД₅₀/мл. После проведения второго раунда ПЦР с праймерами N3 и N4 чувствительность возросла до $10^{0,9}$ ТЦД₅₀/мл. Определение чувствительности метода в патологическом материале от карпов, экспериментально зараженных штаммом ЗЛ4 проводили с праймерами N17, N1 и N2. Чувствительность ОТ-пгПЦР значительно варьировала в зависимости от вида тестируемого клинического материала. После проведения второго раунда она составила: мозг - $< 10^1$ ТЦД₅₀/г, экссудат - $\sim 10^2$ ТЦД₅₀/мл, плавники - $< 10^3$ ТЦД₅₀/г, кожа - 10^3 ТЦД₅₀/г, почка - 10^4 ТЦД₅₀/г. Таким образом, наиболее ценными для ПЦР-диагностики вируса SVCV являются образцы мозга, экссудата и плавников больных рыб, тогда как в пробах почки имело место выраженное ингибирование реакции.

Следующим этапом работы было определение эффективности выявления вируса SVCV методом ОТ-пгПЦР в полевых материалах от рыб, отбор которых производился в четырех рыбхозах Тверской и Московской областей. С помощью реакции нейтрализации в лаборатории ихтиопатологии ФГУП «ВНИИПРХ» вирусные агенты были выделены из двух проб от годовика и от трехлетков карпа из двух хозяйств. Параллельно нами было проведено

тестирование клинических проб в ОТ-пгПЦР с праймерами N3, N4 и N5, которое показало присутствие специфичных для SVCV продуктов во всех четырех хозяйствах. Следовательно, метод ПЦР значительно превосходит традиционный метод выделения вируса в культуре клеток по эффективности выявления вируса весенней виремии карпа на стадиях скрытого и хронического течения болезни.

Определение эффективности метода ОТ-пгПЦР в ходе развития инфекции на пробах от экспериментально зараженных карпов проводилось на пробах, отобранных из различных тканей рыб на разные сутки после инфицирования. Образцы отбирались на 13-ые-14-ые (из внутренних органов и экссудата), 30-ые (из внутренних органов и экссудата), 45-ые (из внутренних органов и жабр), 60-ые (из внутренних органов и кожи) и 90-ые (из внутренних органов и кожи) сутки после инфицирования (р. i.) и были исследованы в лаборатории ихтиопатологии ФГУП «ВНИИПРХ» в реакции нейтрализации на культуре клеток.

Нами был проведен анализ полученного материала с помощью метода ОТ-пгПЦР с праймерами N17, N1 и N2, а также в альтернативном варианте с праймерами N3, N4 и N5 (рис.2).

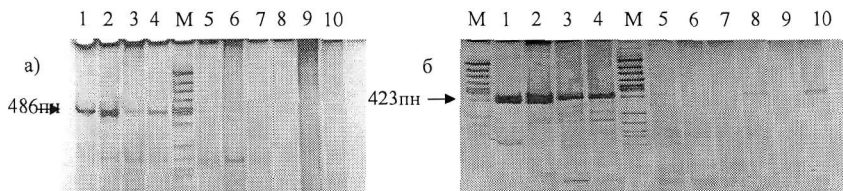


Рис.2 Первый раунд ОТ-пгПЦР с праймерами N17-N2 (а) и N3-N5 (б) на пробах от карпов в ходе развития инфекции.

Дорожки 1, 2- 13-14 суток. (1 – внутренние органы (пч+пн+сел), 2 - экссудат);
 3, 4 – 30 суток р. i. (3 - внутренние органы (пч+пн+сел), 4 - экссудат);
 5, 6 - 45 суток р. i. (5 - внутренние органы (пч+пн+сел), 6 – жабры);
 7, 8 - 60 суток р. i. (7 - внутренние органы (пч+пн+сел), 8 – кожа);
 9, 10 – 90 суток р. i. (9 - внутренние органы (пч+пн+сел), 10- кожа);
 М – ДНК-маркер.

Анализ полученных данных показал, что при исследовании традиционными вирусологическими методами на 13-ые-14-ые сутки р. i. и на 30-ые сутки р. i. SVCV выделялся как из образцов внутренних органов, так и из экссудата всех зараженных рыб. На 45-ые сутки р. i. вирус удалось выделить лишь из проб, взятых от двух рыб из пяти, причем его титр значительно снизился. Ни на 60-ые, ни на 90-ые сутки р. i. вирус выделить не удалось.

При применении метода ОТ-пгПЦР к исследованным образцам было показано, что на 13-ые-14-ые сутки р. i. вирусная РНК надежно детектируется уже в первом раунде при

использовании праймеров N3 и N5, тогда как при амплификации с праймерами N17, N1 и N2 в некоторых пробах, положительных на культуре клеток, продукт не выявлялся даже после проведения второго раунда. На 30-ые сутки р1 РНК вируса выявлялась во всех пробах в системе с праймерами N3, N4 и N5, а при использовании праймеров N17, N1 и N2 вирус выявлялся в пяти пробах их десяти. На 45-ые сутки р1 праймеры N17, N1 и N2 детектировали вирус только в тех пробах, где он был обнаружен традиционными вирусологическими методами, а с помощью праймеров N3, N4 и N5 удалось обнаружить вирусную РНК в пробах, отрицательных на культуре клеток. На 60-ые и 90-ые сутки р1 удалось выявить вирус только с помощью праймеров N3, N4 и N5, хотя с помощью традиционных вирусологических методов вирус выделить не удалось. В системе ОТ-пГПЦР с праймерами N17, N1 и N2 не было выявлено ни одной положительной пробы.

Очевидно, что выделение вируса традиционными вирусологическими методами от переболевших или устойчивых к заболеванию рыб, которые могут продолжительное время оставаться вирусоносителями, не представляется возможным. Однако эффективность выявления вируса SVC на стадиях скрытого и хронического течения болезни методом ОТ-пГПЦР с праймерами N3, N4 и N5 значительно превосходит этот метод. Таким образом, предложенная методика предоставляет возможность выявления скрытого вирусоносительства в популяциях внешне здоровых рыб, что особенно важно для регионов, неблагополучных по данному заболеванию.

Оценка эффективности выявления вируса SVC методом ОТ-пГПЦР с использованием в реакции обратной транскрипции праймеров прямой и обратной ориентации. Во всех предыдущих исследованиях для выявления SVCV в препаратах культуральных вирусов и клинических проб от рыб в реакции обратной транскрипции нами были использованы праймеры прямой ориентации, комплементарные геномной РНК вируса. В то же время известно, что N-ген рабдовирусов в инфицированных клетках транскрибируется первым и с наивысшей эффективностью. В связи с этим нами были проведены исследования по определению эффективности ОТ-пГПЦР при использовании в реакции обратной транскрипции праймеров обратной ориентации (N2 и N5, таблица 1, рис 1), комплементарных мРНК N-гена SVCV. На культуральном вирусе ВБК было показано, что эффективность амплификации при использовании в ревертазной реакции праймеров обратной ориентации выше, чем праймеров прямой ориентации.

На следующем этапе была определена эффективность детекции вирусной РНК с праймеров обратной ориентации в клинических пробах от экспериментально зараженных карпов с острой формой ВБК. В работе была использована система ОТ-пГПЦР с праймерами N3, N4 и N5. Реакцию обратной транскрипции вели параллельно с праймеров прямой (N3), и

обратной (N5) ориентации После проведения первого раунда амплификации на кДНК, полученной с праймера N5, выявилось 60% положительных проб (12 из 20), тогда как на кДНК, полученной с праймера N3 - 45% (9 из 20) Второй раунд ОТ-пгПЦР с праймерами N3-N4 был проведен для проб, в которых в первом раунде ПЦР продукт не выявлялся Во всех пробах, где ревертазная реакция была проведена с праймера N5, был получен нужный фрагмент 393 пн, тогда как в пробах, где обратную транскрипцию вели с праймера N3, этого фрагмента не обнаружили Таким образом, чувствительность метода ОТ-пгПЦР для выявления РНК SVCV в клинических образцах от зараженных рыб гораздо выше при использовании в реакции обратной транскрипции праймера обратной ориентации, комплементарного мРНК N-гена SVCV

Ранее было показано, что при использовании в обратной транскрипции прямого праймера N3 возможно проведение дифференциальной диагностики SVCV и PFRV Однако при применении в ревертазной реакции обратного праймера N5 после проведения первого раунда ПЦР с праймерами N3 и N5 был получен продукт амплификации как для SVCV, так и для PFRV В связи с этим для дифференциальной диагностики SVCV и PFRV целесообразно использовать в ревертазной реакции только прямой праймер N3

Генетическое типирование изолятов SVCV с помощью анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ)

На основании полученных данных о нуклеотидной последовательности N1-N2 фрагмента восьми европейских и десяти отечественных изолятов SVCV был проведен поиск сайтов гидролиза для эндонуклеаз рестрикции, позволяющий проводить генетическое типирование с помощью рестриционного анализа Для исследования было выбрано пять эндонуклеаз рестрикции (*Clal*, *RsaI*, *BsoMAI*, *PsiI* и *Tru9I*), в сайтах узнавания которых на фрагменте 405 пн разных изолятов SVCV имелись нуклеотидные замены (таблица 2)

Таблица 2 Рестриционный анализ фрагмента N1-N2 гена нуклеопротеина SVCV

Изолят (место выделения)	Эндонуклеаза рестрикции					
	<i>Clal</i>	<i>RsaI</i>	<i>BsoMAI</i>	<i>PsiI</i>	<i>Tru9I</i>	<i>FokI</i>
Группа 1						
Г1ап (Хорватия)	405	303 102	294 71 40	313 92	405	210 195
500 (Чехия)	405	303 102	294 71 40	313 92	405	210 195
541 (Чехия)	405	303 102	294 71 40	313 92	405	210 195
17314/5 (Венгрия)	405	303 102	294 71 40	313 92	405	210 195
17417/3 (Венгрия)	405	303 102	294 71 40	313 92	405	210 195
450 (Германия)	405	303 102	294 71 40	313 92	405	210 195
3587 (Австрия ?)	405	303 102	294 71 40	313 92	405	210 195
Группа 2						
M2 (Молдова)	405	303 102	294 71 40	405	405	210 195
2/90 (Молдова)	405	303 102	294 71 40	405	405	210 195
Группа 3						

Уд (Россия)	277 128	405	294 71 40	313 92	405	210 195
Р4 (Россия)	277 128	405	294 71 40	313 92	405	210 195
Группа 4						
LK/03 (Россия)	277 128	303 102	365 40	313 92	309 96	210 195
KU/0204 (Россия)	277 128	303 102	365 40	313 92	309 96	210 195
KL/0604 (Россия)	277 128	303 102	365 40	313 92	309 96	210 195
Группа 5						
ЗЛ4 (Россия)	277 128	405	230 71 64 40	405	309 96	210 195
Кр 1 (Россия)	277 128	405	230 71 64 40	405	309 96	210 195
ККК (Россия)	277 128	405	230 71 64 40	405	309 96	210 195
1 4 (Россия)	277 128	405	230 71 64 40	405	309 96	210 195
N1 (Украина)	277 128	405	230 71 64 40	405	309 96	210 195
N3 (Украина)	277 128	405	230 71 64 40	405	309 96	210 195
N5 (Украина)	277 128	405	230 71 64 40	405	309 96	210 195
Изоляты с уникальными профилями рестрикции						
1/99 (Украина)	277 128	303 102	294 71 40	313 92	309 96	210 195
RVC-1 (Зап Европа ?)	405	405	230 71 64 40	405	309 96	210 195
435 (Германия)	405	303 102	294 71 40	313 92	309 96	210 195

Примечание цифрами указаны размеры фрагментов, полученных после гидролиза ампликона N1-N2 (405 пн) эндонуклеазами рестрикции

Анализ полученных результатов позволил разделить двадцать четыре исследованных штамма SVCV на пять рестрикционных генетических групп, куда не вошли три штамма с уникальными профилями рестрикции (один отечественный и два европейских) Группа 1 образована семью европейскими изолятами, тогда как группы 2 – 5 – изолятами из бывшего СССР Отечественные изоляты, составляющие группы 2 (два изолята), 3 (два изолята) и 4 (три изолята) имеют сайты рестрикции, характерные как для группы 1, так и для группы 5, что позволяет рассматривать их как переходные между этими большими группами Подобная корреляция распределения генетических вариантов вирусов по группам с географией их выделения была установлена в аналогичных работах для вирусов VHS и IHN Таким образом, разработанный метод ПДРФ-анализа позволил разделить все исследованные изоляты SVCV на две разобщенные генетические группы европейскую и из бывшего СССР, причем европейские штаммы оказались генетически более гомогенными Географическое распределение рестрикционных генотипов SVCV, циркулирующих на территории Европы и европейской части России, представлено на рисунке 3

Разработанный метод рестрикционного анализа был успешно применен для типирования изолятов SVCV непосредственно в клинических материалах, без выделения вируса от рыб.



- Геногруппа 1; ✕ Геногруппа 2; * Геногруппа 3; ■ Геногруппа 4;
- ▲ Геногруппа 5.

Рис. 3 Географическое распределение генетических вариантов SVCV на территории Европы и европейской части России.

Разработанный метод рестрикционного анализа был успешно применен для типирования изолятов SVCV непосредственно в клинических материалах, без выделения вируса от рыб.

Филогенетический анализ изолятов SVCV на основании нуклеотидной последовательности фрагмента N-гена (405 пн)

Для проверки достоверности результатов, полученных с помощью ПЦР-ПДРФ, на основании нуклеотидной последовательности участка N-гена величиной 405 пн был проведен филогенетический анализ восемнадцати изолятов SVCV, принадлежащих к пяти рестрикционным геногруппам. В созданной дендрограмме (рис. 4) выделяются три кластера. Первый кластер образуют изоляты из бывшего СССР, принадлежащие к рестрикционным геногруппам 5 и 3. Внутри кластера выделяются несколько групп российских и украинских штаммов, причем российские изоляты, входящие в рестрикционную геногруппу 3, с высокой надежностью образуют обособленную подгруппу. Второй кластер также образован изолятами из бывшего СССР, принадлежащими к другим рестрикционным группам: 2 и 4. С высоким индексом статистической надежности группируются российские изоляты, выделенные в подмосковном регионе (геногруппа 4), а молдавский изолят M2 (геногруппа 2) демонстрирует наиболее значительные отличия от всех изученных штаммов SVCV. Третий кластер состоит только из европейских изолятов (геногруппа 1). Происхождение изолята RVC-1 точно не установлено, и по результатам ПДРФ его не удалось отнести ни к одной из выделенных

генеогрупп Филогенетический анализ показал, что указанный изолят и изоляты из Европы, очевидно, имеют монофилетическое происхождение

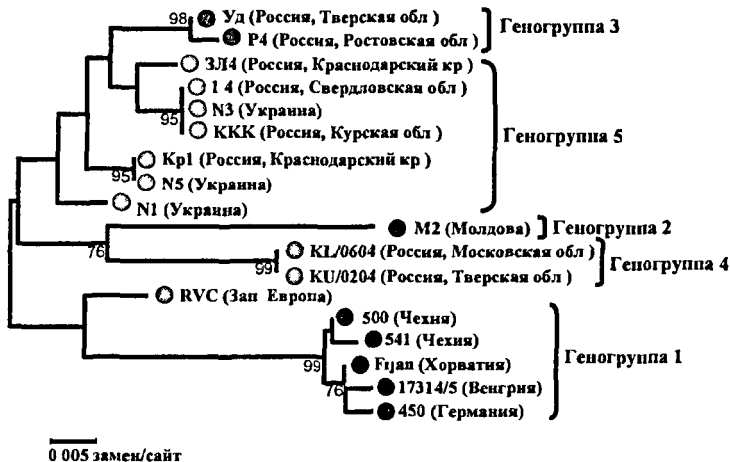


Рис 4 Дендрограмма, построенная методом объединения ближайших соседей, отражающая уровень нуклеотидных различий фрагмента N-гена величиной 405 пн генома различных штаммов SVCV Цифры на дендрограмме показывают индексы статистической надежности узлов дерева

Исследование полученной дендрограммы выявило наличие большого генетического разнообразия среди изолятов из бывшего СССР, в отличие от европейских штаммов, которые оказались генетически гомогенными в исследованной группе штаммов В целом полученные результаты генотипирования SVCV согласуются с данными филогенетического анализа вируса, полученными Stone et al (2003) Таким образом, проведенный филогенетический анализ подтвердил достоверность результатов, полученных с помощью ПЦР-ПДРФ Исследованные изоляты имеют тенденцию образовывать генетические группы в зависимости от географии их выделения, причем данные, полученные с помощью двух разных методов, практически полностью совпадают Так как методика секвенирования с последующим филогенетическим анализом требует больших временных и финансовых затрат, ПДРФ-анализ представляет возможность быстро и сравнительно недорого охарактеризовать большое количество изолятов, что позволяет использовать метод в диагностических лабораториях для проведения широкомасштабных эпидемиологических исследований

Разработка методов выявления вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани (IHNV) на основе гибридизационного анализа

Для конструирования ДНК-зондов, специфичных в отношении IHNV, в настоящей работе было выполнено клонирование участка N-гена IHNV из плазмиды pGEM-TEasy-N-IHNV, любезно предоставленной сотрудницей университета г Турку К Киппасто, содержащей полноразмерную копию гена, в RF ДНК фага M13mp8 (рис 5) Таким образом, в составе фага M13mp8 нами был получен ДНК-зонд для геномной РНК рабдовируса (на минус-цепь IHNV)

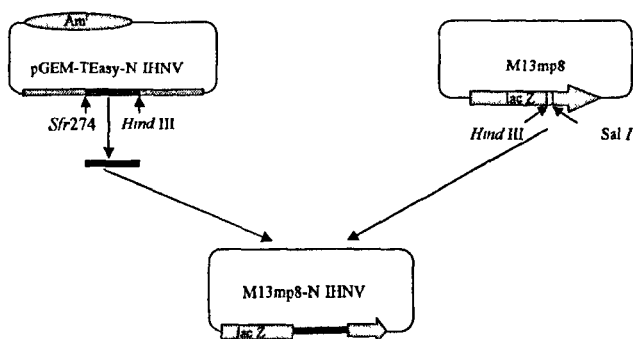


Рис 5 Схема конструирования ДНК-зонда для выявления IHNV

Для проведения гибридизационного анализа полученный одновитовой ДНК-зонд в составе фага M13 был биотинилирован. После проведения дот-гибридизации были получены следующие результаты: зонд гибридизовался с одинаковой эффективностью со всеми изолятами IHNV и с изолятом VHSV, и не гибридизовался с неинфицированной культурой клеток. Это отражает тот факт, что оба вируса относятся к одному роду рабдовирусов *Novirhabdovirus*. Таким образом, полученный зонд оказался пригодным для выявления рабдовирусов рода *Novirhabdovirus* в культуре клеток.

Метод гибридизации нуклеиновых кислот является достаточно простым и удобным способом выявления вирусных заболеваний, однако к недостаткам полученного нами зонда следует отнести невысокую специфичность для дифференцировки между IHNV и VHSV, что ограничивает возможности применения метода для массового скрининга проб в ихтиовирусологии. Поэтому основные усилия были направлены нами на разработку метода ОТ-пгПЦР для диагностики IHNV, а также метода ПДФ-анализа для генетического типирования вируса.

Разработка метода выявления вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани (IHNV) с помощью ОТ-ПЦР

На основании опубликованных данных нами были выбраны праймеры к консервативным участкам последовательностей N- и G-генов вируса IHNV (таблица 1, рис. 6).

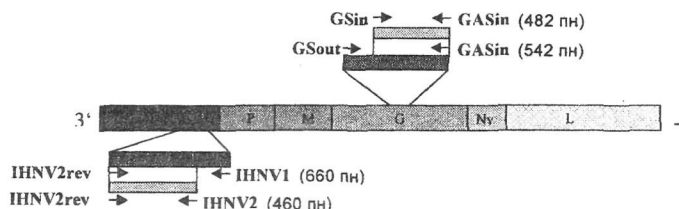


Рис.6 Схема расположения праймеров и размеры получаемых ПЦР-продуктов на геноме IHNV.

Для детекции вируса в культуре клеток использовали внешние праймеры IHNV2rev и IHNV1. Эта пара праймеров обеспечивала синтез фрагмента N-гена IHNV величиной 660 пн для всех изученных изолятов. Для проведения пгПЦР в качестве внутреннего праймера использовали олигонуклеотид IHNV2. Длина продукта амплификации после проведения второго раунда составляла 460 пн и соответствовала ожидаемой. Специфичность выбранных праймеров была продемонстрирована при использовании в ОТ-ПЦР реакции вируса весенней виiremии карпа и неинфицированных культур клеток. Аналогичные результаты были получены при использовании праймеров на G-ген. Для первого раунда ПЦР были использованы праймеры GSout и GASin, а для пгПЦР - GSin и GASin (таблица 1). После проведения реакции продукт ожидаемой длины (542 пн в первом раунде и 482 пн во втором) синтезировался только для IHNV, и не детектировался для вируса весенней виiremии карпа и вируса геморрагической септицемии, использованных в качестве отрицательного контроля.

Для определения чувствительности первого и второго раундов ПЦР была проведена серия десятикратных разбавлений исходного культурального вируса. Было показано, что чувствительность первого раунда составляет $\sim 10^5$ ТЦД₅₀/мл, а проведение второго раунда пгПЦР позволило достичь гораздо большей чувствительности: менее 10^{-1} ТЦД₅₀/мл как для N, так и для G-гена. Это особенно важно для тестирования вируса в клинических пробах от рыб, поскольку в них эффект ингибирования реакции тканевыми материалами бывает выражен значительно сильнее, чем компонентами клеток при работе с культуральными вирусами.

Метод полугнездовой ПЦР на N- и G-гене был использован для обнаружения исследуемого вируса в клинических материалах от предположительно инфицированной

половозрелой нерки Пробы были отобраны на рыбоводном заводе «Озерки» (Камчатская область) Для исследования были взяты внутренние органы рыб (почка, селезенка) в виде тканевого гомогената и супернатанта, полученного после центрифугирования его суспензии, а также овариальная жидкость Было показано, что лучше всего вирус выявляется в супернатанте внутренних органов как на N-, так и на G-гене, тогда как в гомогенате имеет место выраженный эффект ингибирования ПЦР Этот феномен был ранее показан при тестировании клинических проб для двух других рабдовирусов рыб VHSV и SVCV

Определение эффективности метода ОТ-пг ПЦР в ходе развития инфекции на пробах от экспериментально зараженных рыб Пробы для анализа отбирали из тканей двух рыб (плавники, слизь, жаберная крышка, жабры, мозг, печень, селезенка, почка) в ходе развития заболевания – через 8 и 36 суток после инфицирования ОТ-пг ПЦР проводили на N-гене IHNV с праймерами IHNV2rev, IHNV1 и IHNV2 На начальной стадии заболевания (8 суток) диагностически наиболее ценными оказались образцы жабр, селезенки, почки и печени больных рыб На 36-е сутки после заражения количество ПЦР-продукта (а значит и вируса) в пробах значительно снизилось вирусная РНК слабо детектировалась в пробах слизи, жабр, жаберной крышки, почки, печени и мозга (таблица 3)

Таблица 3 Результаты ОТ-пг ПЦР с праймерами IHNV2rev-IHNV2 на N-ген IHNV в пробах экспериментально зараженной форели в ходе развития инфекции

Сутки после заражения	Материал	IgГЦД ₅₀ /мл ГТЦ-буфера	ОТ-пгПЦР	IgГЦД ₅₀ /мл ГТЦ-буфера	ОТ-пгПЦР
		Рыба 1		Рыба 2	
8	Слизь	4,43	-	4,18	-
	Плавник	3,43	-	5,93	-
	Жаб крышка	4,93	+	3,93	-
	Жабры	5,93	++	6,18	+/-
	Мозг	3,43	-	4,43	-
	Печень	6,18	+	6,43	++
	Селезенка	6,43	++	7,18	++
	Почка	6,18	++	7,18	++
36	Слизь	н/в	+/-	н/в	-
	Плавник	н/в	-	н/в	-
	Жаб крышка	н/в	+/-	н/в	+
	Жабры	н/в	-	1,93	+
	Мозг	н/в	+/-	2,93	-
	Печень	н/в	-	3,93	+
	Селезенка	н/в	н/д	н/в	+/-
	Почка	н/в	+/-	н/в	+/-

Примечание н/в – не выделен, н/д - не делали, «-» - амплификат не детектировался, «+/-» - амплификат почти не детектировался, «+» - амплификат слабо детектировался, «++» - амплификат хорошо детектировался

Полученные результаты согласуются с литературными данными при исследовании иммуногистохимическими методами органов зараженных рыб на 8-е сутки после

инфицирования вирус был обнаружен Brudeseth et al. (2002) практически во всех органах, включая печень и мозг, однако количество вируса снижалось уже на 21-28 день после инфицирования.

Оценка эффективности выявления вируса ИHN методом ОТ-пгПЦР с использованием в реакции обратной транскрипции праймеров прямой и обратной ориентации. Для определения эффективности выявления РНК ИHNV в культуре клеток при использовании в ревертазной реакции праймеров прямой (IHNV2rev) и обратной (IHNV1) ориентации была проведена ОТ-ПЦР с исходными культуральными вирусами. После проведения первого раунда ПЦР с праймерами IHNV2rev и IHNV1 (таблица 1, рис. 6) фрагмент ожидаемого размера (660 пн) образовывался для всех исследованных штаммов ИHNV, однако количество наработанного амплификата было больше в случае использования в реакции обратной транскрипции обратного праймера IHNV1.

Сравнительное определение чувствительности ОТ-ПЦР с использованием праймеров различной ориентации проводили с помощью метода последовательных десятикратных разбавлений кДНК, полученной в параллельных ОТ-реакциях с праймеров IHNV2rev и IHNV1 (рис. 7). Чувствительность ОТ-ПЦР при использовании традиционного праймера прямой ориентации, комплементарного N-гену ИHNV ((-)-цепь РНК), составила $\sim 10^{6,07}$ ТЦД₅₀/мл после проведения первого раунда, тогда как при использовании обратного праймера, комплементарного мРНК ((+)-цепь), она увеличилась до значения $\sim 10^{3,07}$ ТЦД₅₀/мл. Таким образом, при использовании в реакции обратной транскрипции праймера обратной ориентации чувствительность метода сильно возросла уже после проведения первого раунда ОТ-ПЦР.

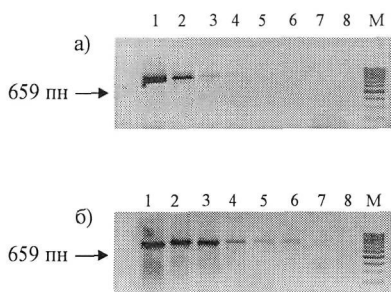


Рис. 7 Сравнительное определение чувствительности выявления исходного культурального вируса ИHN (штамм RBH) в первом раунде ОТ-пгПЦР с праймеров прямой (IHNV2rev, а) и обратной (IHNV1, б) ориентации.

Дорожки 1-8 – серия десятикратных разбавлений РНК ИHNV: 1 - 108,07ТЦД₅₀/мл; 2 - 107,07ТЦД₅₀/мл; 3 - 106,07ТЦД₅₀/мл; 4 - 105,07ТЦД₅₀/мл;

Генетическое типирование изолятов ИHNV с помощью анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ)

Был разработан метод типирования изолятов ИHNV с помощью ПДРФ-анализа на основании нуклеотидной последовательности участка N-гена. Группа исследователей из США провела филогенетический анализ более 300 изолятов вируса из разных регионов страны, что позволило разделить их на три основных геногруппы U, M и L, что соответствует их географическому распространению. Из представленных в GenBank последовательностей N-гена ИHNV мы выбрали десять изолятов, относящихся к трем указанным геногруппам, и провели выравнивание фрагмента 460 пн. С помощью программы VectorNTI 6.0 были получены карты рестрикции выровненных фрагментов N-гена, анализ которых показал, что определить принадлежность изолятов к одной из трех геногрупп можно с использованием эндонуклеаз рестрикции *Bsc4I* и *HgaI*. Использование двух других ферментов - *BseI* и *HpaII* - сделало возможным деление изолятов на подгруппы.

Таблица 4 Экспериментально полученные карты рестрикции фрагмента 460 пн N-гена 13-ти изолятов ИHNV

Изолят (место выделения)	Эндонуклеаза рестрикции			
	<i>BseI</i>	<i>Bsc4I</i>	<i>HpaII</i>	<i>HgaI</i>
Геногруппа U				
RBV (США)	267 98 95	460	297 152 11	460
10ис-26-4 (Россия)	267 98 95	460	297 152 11	460
58орг-4 (Россия)	267 98 95	460	297 152 11	460
Геногруппа M				
HAГ (США)	362 98	299 161	297 152 11	384 76
FR23/87 (Франция)	267 98 95	299 161	297 152 11	384 76
I-4008 (Италия)	267 98 95	299 161	297 152 11	384 76
DK-9995200(Германия)	267 98 95	299 161	297 152 11	384 76
DK-DF-4199(Германия)	н/о*	299 161	297 152 11	384 76
DK-9695338 (Австрия)	267 98 95	299 161	297 152 11	384 76
Геногруппа L				
TR (США)	362 98	299 161	297 152 11	460
Геногруппа не определена				
FR1/00 (Россия)	202 160 98	460	210 152 75 12 11	384 76
FR2/00 (Россия)	202 160 98	460	210 152 75 12 11	384 76
FU/0204 (Россия)	202 160 98	460	210 152 75 12 11	384 76

Примечание: цифрами указаны размеры фрагментов, полученных после гидролиза ампликона ИHNV2rev-ИHNV2 (460 пн) эндонуклеазами рестрикции, н/о – не определено

Карты гидролиза изолятов ИHNV, полученные с помощью компьютерного анализа, были экспериментально подтверждены рестрикцией тринадцати штаммов вируса с использованием четырех выбранных ферментов. Полученные результаты позволили определить принадлежность десяти исследованных изолятов ИHNV к трем основным геногруппам (таблица

4) Положение европейских изолятов в геногруппе М согласуется с литературными данными, как и положение камчатских изолятов в геногруппе U (личное сообщение Рудаковой С Л) Три российских изолята, выделенные в Московской (FR1/00 и FR2/00) и Тверской (FU/0204) областях, сформировали отдельную подгруппу. Распределение исследованных изолятов на группы коррелирует с географией их выделения и не зависит от вида-хозяина, что согласуется с данными по филогенетическому анализу вирусов VHS, SVC и IHN

Филогенетический анализ некоторых изолятов IHNV на основании нуклеотидной последовательности фрагмента N-гена

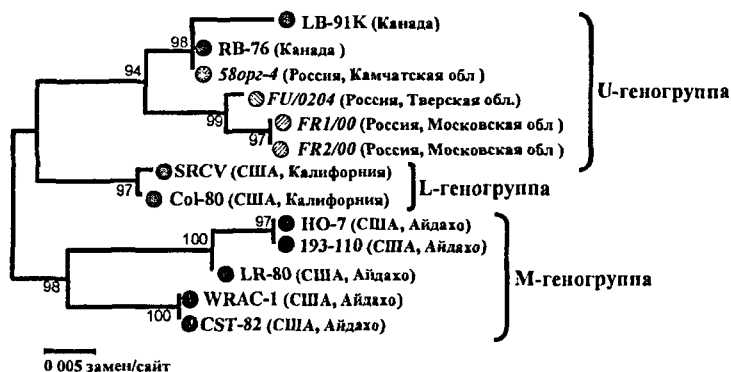


Рис 8 Дендрограмма, построенная методом объединения ближайших соседей, отражающая уровень нуклеотидных различий фрагмента N-гена величиной 460 пн генома различных штаммов IHNV. Курсивом выделены российские изоляты. Цифры на дендрограмме показывают индексы статистической надежности узлов дерева.

Для подтверждения данных ПЦР-ПДРФ мы провели филогенетический анализ последовательностей фрагментов N-гена IHNV (460 пн), полученных из GenBank и в ходе данной работы. Исследование дендрограммы (рис 8) выявило высокую степень гомологии между изолятами, образующими U-геногруппу, и камчатским изолятом 58org-4. Данный факт согласуется с тем, что области нагула в океане для нерки, от которой был выделен вирус на Камчатке, и для популяций лососевых рыб из реки Колумбия и всех северных рек Северной Америки, являющихся хозяевами для изолятов U-геногруппы, частично перекрываются. Кроме того, было показано, что изоляты FR1/00, FR2/00 и FU/0204 с высокой надежностью по результатам перестановочного анализа образуют обособленную подгруппу в составе геногруппы U. Генетическое родство указанных изолятов с вариантом вируса, циркулирующим на Камчатке, косвенно подтверждается данными о том, что в 1990-е годы для исследовательских целей завозили кижуча с Камчатки и, вероятно, занесли патоген в

форелевые хозяйства материковой части страны (личное сообщение Щелкунова И С.) Можно предположить, что в европейской части России в дальнейшем произошла независимая эволюция IHNV, а изоляты, выделенные в данном регионе, имеют монофилетическое происхождение и наиболее близки к изолятам североамериканской геногруппы U, куда входят изоляты с Камчатки

ВЫВОДЫ

- 1 Разработаны методы ОТ-ПЦР и ОТ-пГПЦР диагностики вирусов весенней виремии карпа (SVCV) и инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых (IHNV), обладающие высокой чувствительностью и специфичностью. Методы позволяют детектировать РНК вирусов в культуре клеток и в клиническом материале от зараженных рыб
- 2 С помощью клонирования участка N-гена IHNV в односторонний вектор M13mp8 сконструирован ДНК-зонд на вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани. Показана пригодность зонда для детекции IHNV и VHSV в культуре клеток
- 3 Разработан метод генотипирования штаммов вируса весенней виремии карпа и инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа. Впервые проведено изучение генотипического разнообразия двадцати четырех изолятов SVCV и тринадцати изолятов IHNV

В рамках исследования

- показано, что все исследуемые изоляты SVCV подразделяются на пять генетических групп. Европейские штаммы входят в состав геногруппы 1, а изоляты из бывшего СССР образуют одну большую геногруппу 5 и три небольшие группы – 2, 3 и 4
 - определена принадлежность 10-ти исследованных изолятов IHNV к трем основным геногруппам (U, M и L), выявлена принадлежность камчатских изолятов к геногруппе U, подтверждена принадлежность европейских изолятов к геногруппе M
- 4 На основании нуклеотидной последовательности фрагмента гена нуклеопротеина впервые проведено филогенетическое исследование восемнадцати изолятов SVCV, принадлежащих к пяти геногруппам. Показано, что исследованные изоляты имеют тенденцию образовывать генетические группы в зависимости от географии их выделения. Филогенетический анализ подтвердил достоверность результатов, полученных с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа, что дает основания рекомендовать эту более простую методику к использованию в диагностических лабораториях для проведения широкомасштабных эпидемиологических исследований
 - 5 В результате проведенного филогенетического анализа изолятов IHNV на основании нуклеотидной последовательности фрагмента гена нуклеопротеина впервые обнаружено,

что на территории России наряду с камчатскими изолятами, генетически близкими североамериканским изолятам геногруппы U, в подмосковном регионе циркулируют штаммы, образующие отдельную подгруппу в составе геногруппы U, что указывает на их монофилетическое происхождение

Список публикаций.

1 Shchelkunov I S, Oreshkova S F, Popova A G, Nikolenko G N, Shchelkunova T I, Иlichev A A Development of PCR-based techniques for routine detection and grouping of spring viraemia of carp virus // In Health and Diseases of Aquatic Organisms Bilateral Perspectives Ed Michigan State University, 2005 -P 260-284

2 Shchelkunov I S, Popova A G, Shchelkunova T I, Oreshkova S F, Pichugina T D, Zavyalova E A, and Borisova M N First finding of spring viraemia of carp virus in Moscow Province, Russia // J Fish Dis -2005 -V 25, N5 -P 203-211

3 Щелкунов И С, Орешкова С Ф, Попова А Г, Щелкунова Т И, Блинова Н Н, Ильичев А А Выявление вируса весенней виремии карпа в материалах от рыб путем выделения на культуре клеток и методом ПЦР В кн «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» Матер между научно-практич конф -Щелково, 26-27 мая 2005г -С 243-247

4 Попова А Г, Орешкова С Ф, Щелкунов И С, Рудакова С Л, Щелкунова Т И, Тикунова Н В, Блинова Н Н, Ильичев А А Разработка методов идентификации и типирования вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых на основе ОТ-ПЦР // Вопросы вирусологии -2008 - №3 - С 37-41

Доклады и тезисы конференций:

1 Oreshkova S F, Shchelkunov I S, Voronova O S, Popova A G, Nikolenko G N, Shchelkunova T I, Иlichev A A Development of Methods for Diagnosis and Specific Prevention of Spring Viraemia of Carp In Abstr of the the Second United States and Russia Bilateral Conference “Aquatic&Marine Animal Health”, Shepherdstown, West Virginia, USA, September 21-28, 2003 - P 19

2 Попова А Г, Орешкова С Ф Разработка методов диагностики и типирования вируса весенней виремии карпа Доклад на конференции молодых ученых ГНЦ ВБ «Вектор» 2003

3 Щелкунов И С, Орешкова С Ф, Попова А Г, Щелкунова Т И, Блинов А Г, Ильичев А А Молекулярно-генетический анализ и типирование полевых изолятов *Rhabdovirus carpio* европейского ареала Науч труды Межд биотехнол центра МГУ, тез докл второй межд науч конф «Биотехнология – охране окружающей среды» и третьей школы-конф молодых ученых и

студентов «Сохранение биоразнообразия и рационального использования биологических ресурсов», Москва, МГУ, 25-27 мая 2004 г – С 194

4 Попова А Г , Щелкунов И С , Рудакова С Л , Орешкова С Ф , Блинова Н Н , Ильичев А А Разработка методов идентификации и типирования вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани лососевых на основе ОТ-ПЦР Материалы международной научно-практической конференции «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера», Новосибирск, 27-29 сентября 2006 г – С 298-299

Попова А Г

Попова Анастасия Геннадьевна

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РАБДОВИРУСОВ НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИХ ДИАГНОСТИКИ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ И ГИБРИДИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Автореф дисс на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Подписано в печать 16 04 2008 Заказ № 29

Формат 60х90/16 Усл печ л 1 Тираж 100 экз

Типография Института катализа им Г К Борескова СО РАН