

На правах рукописи

УДК 639.3.091.577.2

Щелкунов Игорь Степанович

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМ  
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ВЕСЕННЕЙ ВИРЕМИИ КАРПА  
НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ГЕНОМА**

03.00.06 - вирусология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук



Покров - 2005 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном унитарном предприятии «Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства» (ФГУП «ВНИИПРХ»), Федеральном государственном унитарном предприятии «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор») и Государственном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» (ГНУ ВНИИВВиМ) Российской академии сельскохозяйственных наук.

**Научные руководители:**

доктор биологических наук, профессор  
Цыбанов Содном Жамьянович

кандидат химических наук, ст науч. сотр.  
Орешкова Светлана Федоровна

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук,  
профессор

Рыбаков Сергей Сергеевич

кандидат ветеринарных наук,  
старший научный сотрудник

Капустина Ольга Владимировна

**Ведущее учреждение** – ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им Я.Р. Коваленко» Россельхозакадемии (ГНУ «ВИЭВ»)

Защита диссертации состоится 23 декабря 2005 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.003.01 при Государственном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» Российской академии сельскохозяйственных наук по адресу: 601120, г Покров Владимирской области, ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии  
Тел./факс: (09243) 62125

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан 14 ноября 2005 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



кандидат биологических наук  
Савукова В Я

2006-4  
24966

2239497

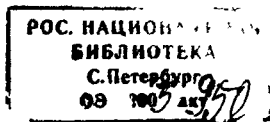
## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. **Актуальность проблемы.** Весенняя вирусная карпа (ВВК) — остропротекающая высококонтагиозная вирусная болезнь карпа, *Syngnis carpio* L., характеризующаяся развитием септического процесса и массовой гибелью рыб. Заболевание проявляется в виде экссудативно-геморрагического синдрома («краснуха»), обусловленного поражением вирусом эндотелия кровеносных капилляров и почек, что приводит к нарушению водно-минерального баланса и выходу плазмы и форменных элементов крови в окружающие ткани и полости тела (Рудиков, 1988, Fijan et al, 1971, Wolf 1988). По классификации Международного эпизоотического бюро (МЭБ) ВВК относится к категории особо опасных («декларируемых») болезней рыб (ОИЕ, 2004).

В аквакультуре вспышки заболевания провоцируются техногенными стрессами и происходят обычно весной, вскоре после пересадки рыб из зимовальных в нагульные пруды. Гибель рыб (преимущественно годовиков и двухлетков, реже – двухгодовиков и производителей) достигает 30-40%, а иногда и 70% (Fijan, 1999). При выращивании в поликультуре с карпом вирус выделяли также от белого амура, белого и пестрого толстолобиков, золотого карася, европейского сома и щуки (Инструкция, 1997).

ВВК установлена во всех европейских странах с развитым карповодством. С 2002 г регистрируется в США (Goodwin, 2002), а в 2004 г была выявлена в Китае (Liu et al, 2004). В последние годы наблюдается тенденция к глобализации инфекции. Основным путем распространения болезни являются межхозяйственные перевозки живой рыбы, в т.ч. декоративных карповых рыб (ОИЕ, 2004).

В бывшем СССР возбудитель ВВК был впервые выделен от больных рыб Н.И. Рудиковым (1972). Было обнаружено, что ВВК широко распространена в рыбхозах центральной и южной зон Европейской части страны (в т.ч. в Белгородской, Курской, Липецкой, Ростовской областях и Краснодарском крае России, а также в Украине, Молдове, Беларуси, Литве и Грузии), где она вызывала гибель до 30-57% карпа – главного объекта выращивания в отечественной аквакультуре (Мамыш и др., 1981, Надточий, Рудиков, 1975, Осадчая, 1977; Рудиков, 1975, 1980, 1988, Рудиков и др., 1986, Скурат и др., 1984, Щелкунов, Щелкунова, 1987, 1990, Щелкунов и др., 1984). В 1993-1995 и 2004 гг ВВК отмечали в рыбободных хозяйствах Свердловской и Тверской областей, а с 2003 г болезнь регистрируют в Московской области (Пичугина и др., 2004). Существует реальная опасность дальнейшего



распространения ВВК по территории страны, создающая угрозу значительных материально-экономических потерь в будущем, когда отечественное рыбководство вновь заработает в полную силу

В России диагноз на ВВК ставят на основании выполнения комплекса классических требований, включающих анализ эпизоотологических данных, клинических признаков заболевания и патологоанатомических изменений, подкрепленный результатами вирусологических исследований по выделению и серологической идентификации вируса с последующей постановкой биопробы. Вместе с тем, оставаясь «золотым стандартом», традиционные вирусологические методы, в силу их трудоемкости и продолжительности, уже не в полной мере отвечают требованиям сегодняшнего дня. Сегодня диагностика ВВК остро нуждается в экспрессных, чувствительных и специфичных методах детектирования возбудителя. Коммерческие наборы для быстрого выявления вируса с помощью поли- и моноклональных антител производят фирмы Чехии, Германии и Бельгии, однако эти наборы недостаточно специфичны. Разрабатываемые за рубежом молекулярно-генетические методы диагностики ВВК (зондовой антирибонуклеазной защиты, полугнездовой и гнездовой полимеразной цепной реакции, гибридизации *in situ* и обратной гибридизации) (Ahne et al., 1998, Dixon, 2003; Koutna et al., 2003, Liu et al., 1998, Sheppard et al., 2003, OIE, 2003), при всех их достоинствах, имеют ряд недостатков (необходимость использования культур клеток рыб, радиоизотопов и др.), ограничивающих их использование на практике.

Исследования последних лет показали, что избирательная амплификация участков вирусного генома с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), дополняя серологические методы, способна значительно расширить возможности выявления вируса ВВК непосредственно в клинических образцах.

Одним из перспективных направлений является применение метода ПЦР в сочетании с секвенированием ПЦР-продуктов и рестрикционным анализом. Данный подход позволяет осуществлять тонкую генетическую дифференциацию штаммов и изолятов вируса. Преимуществом этих методов является высокая чувствительность и специфичность, быстрота и уникальный дискриминативный потенциал. Поэтому изучение генома вируса ВВК с целью совершенствования имеющихся и разработки новых эффективных средств диагностики болезни является актуальной научной проблемой.

**1.2 Цель и задачи исследования** Целью настоящей работы является создание тест-систем для идентификации возбудителя весенней виiremии карпа на основе методов анализа генома

В соответствии с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи

- сконструировать ДНК-зонды комплементарные различным участкам генома вируса ВВК и оптимизировать условия проведения гибридизации,

- определить специфичность и чувствительность метода гибридизации для идентификации РНК вируса ВВК на панели вирусных изолятов;

- подобрать специфичные праймеры для амплификации различных участков генома вируса и оптимизировать условия проведения полимеразной цепной реакции,

- определить специфичность и чувствительность метода ПЦР для идентификации РНК вируса ВВК в зараженной культуре клеток и клиническом материале от искусственно и естественно инфицированных рыб,

- провести дифференциацию различных штаммов и полевых изолятов вируса на основе анализа первичной последовательности участков гена нуклеопротеина и рестрикционного анализа ПЦР-продуктов

### **1.3. Научная новизна:**

- впервые клонированы последовательности генома отечественного референсного штамма ЗЛ4 вируса ВВК и получены фаговые ДНК-зонды, пригодные для выявления РНК вируса ВВК в зараженной культуре клеток методом дот-гибридизации;

- определены праймеры и отработаны условия постановки ПЦР, позволяющие идентифицировать вирус ВВК в зараженной культуре клеток и клиническом материале от рыб,

- впервые определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена нуклеопротеина 7 европейских и 12 отечественных изолятов вируса ВВК с целью установления их генетического родства,

- показано, что европейские изоляты вируса ВВК отличаются от изолятов из бывшего СССР более высоким уровнем консервативности гена нуклеопротеина, выявленные различия легли в основу разработки метода рестрикционного анализа для генетического типирования и дифференциации вирусных штаммов в зараженной культуре клеток и клиническом материале от рыб,

- обнаружен комплекс точечных мутаций в последовательности между генами нуклеопротеина и фосфопротеина, характерный для представителей отечественной мажорной геногруппы вируса, выявленная особенность использована при разработке штаммоспецифической ПЦР для быстрой идентификации агентов данной группы

**1.4. Практическая значимость.** Разработаны методы, наборы препаратов и инструкции по применению молекулярной гибридизации и ПЦР для выявления РНК вируса весенней виремии карпа, которые прошли комиссионные испытания, одобрены Ученым советом и утверждены заместителем генерального директора ФГУП «ВНИИПРХ»

Разработаны методы рестрикционного анализа ПЦР-продуктов и штаммоспецифической ПЦР и на их основе предложена схема дифференциации штаммов и полевых изолятов вируса ВВК

Разработанные методы и наборы препаратов рекомендованы для включения в схему лабораторных исследований при диагностике болезни

#### **1.5. Основные положения, выносимые на защиту:**

- наборы препаратов для выявления РНК вируса ВВК на основе методов молекулярной гибридизации и полимеразной цепной реакции с использованием праймеров комплементарных различным областям вирусного генома,

- способы молекулярно-генетической идентификации полевых изолятов и штаммов вируса ВВК в зараженной культуре клеток и пробах клинического материала,

- методы дифференциации штаммов и полевых изолятов вируса ВВК с помощью штаммоспецифической ПЦР и рестрикционного анализа

**1.6. Апробация результатов работы.** Материалы диссертации доложены на заседаниях Ученого совета ФГУП «ВНИИПРХ» и совместных заседаниях Научно-консультативного совета по болезням рыб Межведомственной ихтиологической комиссии и Секции патологии рыб и охраны гидробионтов Отделения ветеринарной медицины РАСХН (1999 – 2005 г г), Научно-практической конференции «Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре» (21-22 ноября 2000 г, г Москва), Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб» (16-18 июля 2003 г, г Борок Ярославской обл.), Второй международной научной конференции «Биотехнология – охране

окружающей среды» (25-27 мая 2004, МГУ, г Москва) Международной научно-практической конференции «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» (26-27 мая 2005 г, г Щелково Московской обл), Всероссийской научно-практической конференции-семинаре «Эпизоотологический мониторинг в аквакультуре состояние и перспективы» (13-14 сентября 2005 г, г Москва), Четвертом Международном симпозиуме по вирусам низших позвоночных (12-15 мая 1998 г, г Веймут Великобритания), Первом и Втором российско-американских симпозиумах по охране здоровья рыб и других гидробионтов (12-19 июля 1998 г, п Рыбное Московской обл и 21-28 сентября 2003 г, г Шефердстаун, США), Девятой и Десятой международных конференциях Европейской ассоциации ихтиопатологов (19-24 сентября 1999 г, Родос, Греция и 9-14 сентября 2004 г, г Дублин, Ирландия), Семинаре референтных лабораторий Евросоюза по диагностике болезней карповых рыб (2-4 июня 2003 г, г Веймут, Великобритания) и 30-ой Восточной конференции по охране здоровья рыб (13-17 июня 2005 г, г Шефердстаун, США)

**1.7. Публикация результатов.** По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ

**1.8 Участие соискателя в получении научных результатов.** Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Идентификацию вируса ВВК методом ПЦР и рестрикционного анализа продуктов амплификации проводили совместно с к.х.н Орешковой С.Ф.

**1.9. Объем и структура работы.** Материалы диссертации изложены 97 страницах машинописного текста и состоят из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, список литературы, содержащий 149 отечественных и зарубежных источников, приложение. Диссертация иллюстрирована 9 таблицами и 12 рисунками.

## **2. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **2.1. Материалы и методы**

В работе было использовано 26 штаммов вируса ВВК, по два штамма рабдoviруса мальков щуки (PFRV) и инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV, шт. ФР 1/00 и ФР 2/00) и по одному штамму рабдoviрусов угря *Rhabdovirus anguilla* (шт. УФ) и вирусной геморрагической септицемии (VHSV, шт. ЧФ - 1,2)

Вирусы ВВК, PFRV и VHSV накапливали на постоянной линии эпидермальных клеток карпа EPC (Fijan et al, 1983), вирус IHNV – на линии клеток сердца кеты СНН-1 (Lannan et al, 1984), а рабдовирус угря – на линии клеток черного толстоголова FHM (Gravell, Malsberger, 1965) или трансформированных клетках хвостового плавника карпа STF/T (Щелкунов, Щелкунова, неопубл.) Культуры клеток двух первых линий выращивали на среде Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов и 10% сыворотки крови эмбрионов коров (2MEM-10) соответственно при 25°C и 19,3°C, а клетки STF/T – на среде 199 с 10% сыворотки крови эмбрионов коров (199-10) при 25°C Суточные культуры клеток инокулировали вирусами при замене ростовой среды на поддерживающую (2MEM-2 и 199-2, соответственно) и инкубировали далее при 21,5°C (ВВК и PFRV), 14°C (VHSV и IHNV) или 19,3°C (*Rhanguilla*) до полного разрушения клеточного монослоя вирусом, после чего культуральную жидкость использовали для приготовления препаратов для тестирования гибридационными зондами и методом ПЦР Количество инфекционного вируса определяли методом титрования по Риду и Менчу Перечень использованных в работе вирусных штаммов и изолятов приведен в табл 1

Инфицированный материал от рыб получали, заражая карпов средней массой 25 - 30 г вирусом ВВК путем внутривентральной инъекции или внесения вируса в воду Рыбу содержали при температуре воды 13-15°C От погибших особей отбирали пробы тканевого материала и экссудата из брюшной полости Аналогичные пробы отбирали от незараженных рыб Полевые клинические материалы от рыб отбирали в ходе комиссионных обследований рыбхозов Краснодарского края, Московской и Тверской областей

Суммарную РНК выделяли модифицированным методом Chomczynski-Sacchi (1987) с использованием 6М раствора гуанидинтиоцианата

При разработке ДНК-зондов синтез кДНК и клонирование выполняли с помощью набора фирмы «Сибэнзим» В качестве праймеров использовали «рассеянную затравку», а также олигонуклеотиды длиной 19-25 оснований, комплементарные опубликованным последовательностям генов матриксного белка (М-ген) и нуклеопротеина (N-ген) зарубежных штаммов вируса весенней виремии карпа Матрицей служила РНК российского референтного штамма ЗЛ4 вируса ВВК

Трансформацию клеток E coli вели по стандартной методике (Маниатис и др, 1984) Рекомбинантные клоны идентифицировали рестрикционным анализом и гибридизацией



Таблица 1

Использованные в работе штаммы и изоляты рабдовирусов

№ п/п	Штамм или изолят	Хозяин	Выделение	
			Регион	Год
	<b><u>BVK</u></b>			
1	ЗЛ 4	каrp	Краснодарский край	1991
2	Кр 1	-«-	-«-	1984
3	Р 4	-«-	Ростовская обл	1983
4	ККК	-«-	Курская обл	1986
5	ЛК/03	-«-	Московская обл	2003
6	KL/0604	-«-	-«-	2004
7	KB7/0505	-«-	-«-	2005
8	Уд	-«-	Тверская обл	1994
9	KU/0204	-«-	-«-	2004
10	1 4	-«-	Свердловская обл	1993
11	FB1/03	радужная форель	лабор-ные условия	2003
12	N 1	пестрый толстолобик	Украина	1986
13	N 3	белый амур	-«-	1986
14	N 5	каrp	-«-	1986
15	1/99	-«-	-«-	1999
16	M2	белый толстолобик	Молдова	1983
17	2/90	каrp	-«-	1990
18	«Fijan»	-«-	Хорватия	1971
19*	435	-«-	Германия	?
20*	450	-«-	-«-	?
21*	17314/5	-«-	Венгрия	?
22*	17417/3	европейский сом	-«-	?
23*	3587	золотая рыбка	?	?
24	V 500	каrp	Чехия	1996
25	V 539	-«-	-«-	1997
26	V 541	-«-	-«-	1998
27*	RVC 1	?	?	?
	<b><u>PFRV</u></b>			
28*	Ref. str.	щука	Нидерланды	1973
29*	"Hecht"	-«-	?	?
	<b><u>Rhabdovirus anguilla</u></b>			
30	УФ	европейский угорь	Германия	1985
	<b><u>VHSV</u></b>			
31	ЧФ 1,2	радужная форель	Грузия	1981
	<b><u>IHNV</u></b>			
32	ФР 1/00	-«-	Московская обл	2000
33	ФР 2/00	-«-	-«-	-«-

Примечание штаммы вирусов были любезно предоставлены «Fijan» – д-ром Н Bjorklund (Финляндия), \* - д-ром N Lorenzen (Дания), V500, V539 и V541 – д-ром T Vesely (Чехия), ЛК/03 - с н с, к б н Т Д Пичугиной (ВИЭВ) Остальные выделены в лаборатории ихтиопатологии ФГУП «ВНИИПРХ»

Биотинилирование ДНК-зондов выполняли по Адаричеву и др (1987) Дот-гибридизацию вели на нейлоновых фильтрах (Sigma) Биотиновые группы на фильтрах выявляли с помощью конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза и красителей 5-бром-3-индолилфосфата и нитротетразолевого синего Величину сигналов гибридизации оценивали визуально или на денситометре ДО-1

При разработке ПЦР-методов для выявления и дифференциации вируса в реакции обратной транскрипции использовали праймер N3 и M-MuLV – обратную транскриптазу (СибЭнзим) В полимеразной цепной реакции использовали термофильную ДНК-полимеразу, олигонуклеотиды-праймеры N3 и N5 в первом раунде и пару N3-N4 во втором (полугнездвая ПЦР) Праймеры были подобраны на консервативные участки гена нуклеопротеина с учетом опубликованной последовательности гена для европейского референтного штамма “Fijan” вируса ВВК Размеры ПЦР-продуктов определяли электрофорезом в 1%-ном агарозном или 6%-ном полиакриламидном гелях В качестве альтернативного варианта реакции испытывали вариант с использованием праймера N17 в обратной транскрипции и пар N17 – N2 и N1 – N2, соответственно, в первом и втором раундах ПЦР. Специфичность получаемых ПЦР-продуктов проверяли их гидролизом рестриктазами RsaI и FokI (СибЭнзим), соответственно

Рестрикционный анализ ПЦР-продуктов N1-N2 проводили соответствующими подобранными ферментами (СибЭнзим) и разделяли с помощью электрофореза в 6%-ном полиакридамидном геле

Эксперименты проводили не менее чем в трехкратных повторностях Статистическую обработку результатов исследований осуществляли принятыми в биологии методами (Лакин, 1990)

Компьютерный анализ и сравнение первичных последовательностей нуклеиновых кислот проводили с использованием прикладной программы ClustalX (Thompson et al, 1997)

## **2.2. Результаты собственных исследований**

### *2.2.1 Клонирование фрагментов генома вируса ВВК и получение ДНК-зондов*

Для получения фрагментов генома вируса весенней виремии карпа и конструирования на их основе специфичных ДНК-зондов были использованы методы обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции Амплифицированные ДНК-копии фрагментов М- и N-генов после обработки эндонуклеазами рестрикции PstI—ClaI были встроены в полилинкерную область

плазмиды pUC18, а затем переклонированы в однонитевой фаговый вектор M13mp8 по соответствующим сайтам рестрикции. Таким образом были получены и затем помечены биотином два ДНК-зонда: зонд M13-SVCV-M8 (на геномную РНК вируса) содержал вставку M-гена размером 248 н.о. из средней части гена (позиции 134 – 381), а зонд M13-SVCV-N8 (на вирусную мРНК) содержал вставку N-гена, размером 405 н.о. из второй половины гена (позиции 979 – 1383).

### *1.2.2. Разработка тест-системы для идентификации вируса ВВК методом дот-гибридизации*

Отработку состава реакционной смеси и режима проведения дот-гибридизации (температура гибридизации от 45<sup>0</sup>С до 70<sup>0</sup>С, продолжительность гибридизации от 3ч до 24ч) вели на матрице РНК вирусного штамма ЗЛ4. Оптимальные для обоих зондов результаты были получены при 16-часовой гибридизации при температуре 65<sup>0</sup>С в гибридизационном растворе, состоящем из 6хSSC, 5х Denhardt, 0,5% SDS, 0,05 мг/мл денатурированной ДНК лосося и ДНК-зонда в концентрации 100 нг/мл.

Результаты сравнительного анализа специфичности выявления РНК вируса ВВК ДНК-зондами в инфицированной культуре клеток показали, что получаемые с их помощью данные хорошо согласовывались между собой. Из 19 испытанных штаммов вируса ВВК зондами четко выявлялись 16. Для трех штаммов (№1, 3597 и M2) реакция была пониженной. Один ("Hecht") из двух испытанных штаммов PFRV дал слабую реакцию с зондами. Зонды практически не гибридизовались с пробами других рабдовирусов рыб (*Rhabdovirus anguilla*, IHNV и VHSV) и препаратами нуклеиновых кислот контрольных культур клеток. Гибридизации не было также с РНК вирусов гепатита А, классической чумы свиней, диареи крупного рогатого скота, а также с ДНК бычьего герпесвируса типа 1, которые были взяты в качестве отрицательных контролей. Это свидетельствовало о специфичности работы зондов на препаратах культуральных вирусов. Интересно, что зонды распознавали европейские штаммы вируса ВВК, которые не нейтрализовались отечественными гипериммунными антисыворотками на вирус ВВК (штамм M2) (табл. 2).

Анализ чувствительности выявления вирусной РНК в инфицированной культуре клеток показал, что оба биотинилированных ДНК-зонда выявляли связанный с клетками вирус ВВК с титром не ниже 10<sup>5</sup>ТЦД<sub>50</sub> в пятне (примерно 10<sup>6</sup>ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>), тогда как свободный вирус можно было выявить при титрах не менее 10<sup>8</sup> ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Таблица 2

Репрезентативные результаты гибридизации ДНК-зондов на вирус ВВК с различными вирусными штаммами и контрольными препаратами

n = 3

Тестируемый материал	Нейтрализация антисывороткой на вирус ВВК	Гибридизация с зондами		Титр вируса, ТЦД <sub>50</sub> /мл
		М13-SVCV-M8	М13-SVCV-N8	
<b><u>ВВК</u></b>				
ЗЛ4 (Россия)	+	+	+	7,85
Кр1 (-)	+	±	+	8,1
Р4 (-)	+	+	+	7,85
ККК (-)	+	+	+	8,32
1 4 (-)	+	+	+	7,85
Уд (-)	+	+	+	7,35
М2 (Молдова)	+	±	+	7,32
2/90 (-)	+	+	+	8,1
Н1 (Украина)	+	±	±	8,27
Н3 (-)	+	±	+	9,35
Н5 (-)	+	+	+	8,1
1/99 (-)	+	+	+	7,85
V 539 (Чехия)	-	+	+	7,1
435 (Германия)	+	+	+	8,1
450 (-)	-	+	+	8,1
"Фиан" (Хорватия)	-	+	+	8,1
17314/5 (Венгрия)	-	+	+	8,35
17417/3 (-)	-	+	+	8,1
3587 (?)	-	±	±	8,85
<b><u>PFRV</u></b>				
Ref. str.(Нидерланды)	-	-	-	7,1
"Hecht" (?)	-	±	±	8,1
<b><u>Rhabdovirus anguilla</u></b>				
УФ (Германия)	-	-	-	7,35
<b><u>VHSV</u></b>				
ЧФ 1,2 (Грузия)	-	-	-	7,57
<b><u>IHNV</u></b>				
ФР2/00 (Россия)	-	-	-	7,32
<b><u>Культуры клеток</u></b>				
ЕРС	-	-	-	-
СНН-1	-	-	-	-
СНСЕ-214	-	-	-	-
ФНМ	-	-	-	-

Примечание «+» - положительный результат, «-» - отрицательный  
«±» - сомнительный результат

При сравнении эффективности выявления вируса ВВК в клинических материалах от экспериментально инфицированных карпов (153 пробы) методами выделения на культуре клеток и гибридизации было установлено, что оба зонда в

целом работали согласованно, хотя и уступали методу выделения вируса Зонд M13-SVCV-N8 несколько превосходил зонд M13-SVCV-M8 по величине гибридизационного сигнала и частоте выявления вируса Зонды одинаково хорошо выявляли вирусы обоих испытанных штаммов (M2 и ЗЛ4) Вирусная РНК выявлялась во всех видах исследованного материала, но наибольшей диагностической ценностью обладали пробы экссудата, мозга и кожи Все 40 проб от контрольных рыб в реакции с зондами дали отрицательный результат Чувствительность детектирования составила примерно  $10^6$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>

Была оптимизирована процедура пробоподготовки (объем образца, режим депротеинизации) и проведения анализа (термоденатурация РНК и зонда, блокирование фальш-позитивных реакций), что позволило повысить величину сигнала и специфичность работы зондов при тестировании материалов от рыб

Таким образом, в ходе проведенной работы были созданы биотинилированные ДНК-зонды, позволяющие методом дот-гибридации быстро (1-2 суток) идентифицировать вирус весенней виремии карпа в зараженной культуре клеток Зонды могут быть использованы и для выявления вируса в пробах от инфицированных рыб, хотя и с меньшей эффективностью

Оптимизирован режим и условия проведения реакции, создан «Набор препаратов по выявлению РНК вируса ВВК методом дот-гибридации» Разработана, одобрена Ученым советом и утверждена заместителем генерального директора ФГУП «ВНИИПРХ» «Инструкция по применению тест-системы для идентификации вируса весенней виремии карпа методом молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот» Успешно проведены ее комиссионные испытания (Заключения от 22.08.01 и 27.08.01)

### *2.2.3 Разработка тест-системы для выявления вируса ВВК методом полимеразной цепной реакции»*

Основными задачами данного этапа исследований являлись подбор специфических праймеров и оптимизация условий постановки ПЦР, оценка специфичности и чувствительности выявления РНК вируса ВВК методом полимеразной цепной реакции в зараженной культуре клеток и клиническом материале от искусственно и естественно инфицированных рыб

#### *2.2.3.1 Подбор праймеров и оптимизация условий постановки ПЦР*

Оценивали возможность применения для идентификации вируса ВВК

«наружных» праймеров N3 и N5, комплементарных гену нуклеопротеина (табл 3) Эти праймеры направляют синтез ПЦР-продукта размером 418 п н С целью повышения чувствительности метода применяли методику полугнездовой ПЦР, которая заключалась в использовании в первом цикле реакции «наружных» праймеров N3 и N5, а во втором – «внутреннего» праймера N4 в паре с праймером N3 (ПЦР-продукт размером 388 п н )

Таблица 3

Использованные в работе последовательности праймеров, комплементарных гену нуклеопротеина вируса ВВК

Праймер	Ориентация	Последовательность	Положение на гене
N17	Прямой	5'- CAGCTTGTGCTGCATTATG	898-917
N1	Прямой	5'- AATGCAAGCTTGCTGATGGCT	979-999
N2	Обратный	5'- AACTGCAGCATACGCTTTGAGGCTT	1364-1383
N3	Прямой	5'- AGTCTAGATTGTAGCCTGTGTGGACA	573-593
N4	Обратный	5'- ATAGATCTCGTCAGGCTGTCTTGC	940-960
N5	Обратный	5'- CCCAAGCTTGCATTTGAGATCGAC	969-990
Nros11rev	Прямой	5'- CAGCCCTGATATTGAGCAG	1014-1032
Nros2	Обратный	5'- CTTCTATTATCACTTAAAAATTGTC	1278-1301

Нумерация нуклеотидов дана от 5 - конца N-гена европейского референсного шт "Fijan" вируса ВВК

В ходе оптимизации условий постановки обратной транскрипции и ПЦР были испытаны различные объемы реакционной смеси, буферные системы, количество вносимой РНК и кДНК, праймеров, ферментов, концентрации ионов  $Mg^{+2}$  и дНТФ, режимы амплификации. Оптимальный результат ревертазной реакции был получен при синтезе кДНК в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл РНК, буфер REVx1 (50 мМ трис-НСl, рН 8,3, 3 мМ  $MgCl_2$ , 75 мМ КCl, 10мМ ДТТ), 0,5 мМ смесь дНТФ, 100 мкг/мл праймера N3 и 800 ед/мл M-MuLV – обратной транскриптазы (Сибэнзим). После инкубации при 42°C в течение 2 часов полученную кДНК прогревали при 95°C в течение 3 мин и использовали в ПЦР.

Оптимальный результат амплификации РНК вируса ВВК в первом раунде ПЦР был получен при использовании реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 1 мкл кДНК, буфер TAQx1 (60 мМ трис-НСl, рН 8,5, 1,5 мМ  $MgCl_2$ , 25 мМ КCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% тритон X-100), 0,2 мМ смесь дНТФ, по 0,2 мкг праймеров N3 и N5 и 2 ед Taq-полимеразы (Сибэнзим). Амплификация состояла из 30 циклов 95°C, 1 мин, 60°C, 1 мин и 72°C, 1,5 мин. В конце реакции - завершающий синтез при 72°C в течение 3 мин. Условия постановки второго раунда были такими же, как и в первом, за исключением температуры отжига праймеров, равной 62°C.

В результате проведенных исследований с этими парами праймеров в первом и втором раундах ПЦР на матрице РНК вируса ВВК (шт "Fijan") были получены четкие ПЦР-продукты ожидаемых размеров (соответственно 418 и 388 п н) ВВК-специфичность продукта N3-N4 подтверждена гидролизом эндонуклеазой рестрикции RsaI на фрагменты ожидаемого размера (172 и 216 п н)

### 2.2.3.2 *Определение специфичности и чувствительности выявления РНК вируса ВВК методом ПЦР*

При проверке специфичности полимеразной цепной реакции с вышеуказанными праймерами в качестве матриц были использованы препараты РНК десяти отечественных и европейских штаммов и изолятов вируса ВВК, РНК, выделенная из патматериала от зараженных вирусом рыб, а также нуклеиновые кислоты различных РНК- и ДНК-геномных гетерологичных вирусов PFRV, Rhabdovirus anguilla, VHSV, IHNV, вируса бешенства (шт «ТС-80») и вируса болезни Ауески (шт «БУК»)

В результате РНК вируса ВВК была выявлена во всех инфицированных им пробах культурального материала и пробах органов зараженных рыб. Культуральный вирус без труда выявлялся в обоих раундах ПЦР, тогда как при тестировании клинических материалов от рыб имевших признаки острой формы заболевания, вирусоспецифические продукты в первом и даже втором раунде выявлялись не всегда, что, вероятно, было обусловлено присутствием ингибиторов ПЦР в тканях рыб. Специфичность полученных продуктов N3-N4 была подтверждена их гидролизом на фрагменты ожидаемого размера эндонуклеазой рестрикции RsaI. При использовании в качестве матриц препаратов РНК и ДНК других вирусов, а также РНК, экстрагированной из проб неинфицированных культур клеток и органов здоровых карпов, специфичные для вируса ВВК ампликоны обнаружены не были (табл 4)

Чувствительность выявления вируса ВВК в культуре клеток определяли тестированием серийных 10-кратных разведений вирусной РНК. В первом раунде ПЦР (праймеры N3 и N5) для трех испытанных вирусных изолятов (N1, M2 и 1 4) она была примерно одинаковой и для осветленных образцов культурального вируса составила около  $10^{3.7}$  ТЦД<sub>50</sub>/пробу или примерно  $10^{6.4}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл. После второго раунда (праймеры N3 и N4) возросла примерно до  $10^{4.7}$  ТЦД<sub>50</sub>/проба (около  $10^{0.9}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл)

Чувствительность выявления вируса ВВК в патологическом материале определяли тестированием в ПЦР серийных 10-кратных разведений РНК выделенной из разных тканей и выделений двух зараженных вирусным штаммом ЗЛ4 рыб имевших признаки острой формы заболевания. Учитывая, что в материалах от рыб могут присутствовать ингибиторы ПЦР, для создания одинаковых условий микросреды в тестируемых препаратах разведения готовили на РНК, выделенной из этих же тканей контрольных рыб

Таблица 4  
Репрезентативные результаты определения специфичности ПЦР  
с праймерами N3, N4 и N5, комплементарными гену нуклеопротеина

n = 5

Образцы тестируемого материала	Наружные праймеры N3 + N5	Внутренние праймеры N3 + N4	Рестрикция RsaI	Титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>
<b>Культуральный вирус ВВК</b>				
шт ЗЛ4, исходная суспензия	+	+	+	8,85
шт ЗЛ4, осветл супернатант	+	+	+	8,85
шт ЗЛ4, 10x концентрат	+	+	+	9,1
шт "Fijan", исходная суспензия	+	+	+	7,6
шт "Fijan", осветл супернатант	+	+	+	7,25
шт "Fijan", 10x концентрат	+	+	+	8,36
<b>Патматериал от больных карпов, зараженных штаммом KB7/0505 вируса ВВК</b>				
Жабры	-	+	+	6,35
Селезенка	+	+	+	6,1
Кожа	-	-	н д	6,35
<b>Контрольные образцы</b>				
Жабры здорового карпа	-	-	н д.	-
Селезенка здорового карпа	-	-	н д	-
Кожа здорового карпа	-	-	н д	-
Rhabdovirus anguilla, шт УФ	-	-	н д.	-
VHSV, шт. ЧФ 1,2	-	-	н д	-
Вирус бешенства, шт ТС-80	-	-	н д	-
Вирус болезни Ауески, шт БУК	-	-	н д	-
Культура клеток СНН -1	-	-	н д	-
Культура клеток ЕРС	-	-	н д	-

Примечание «+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат  
«н д» - не делали

Установлено, что чувствительность метода была аналогичной для материалов от обеих рыб и зависела от вида тестируемого клинического материала. После первого раунда она составила: мозг -  $>10^5$  ТЦД<sub>50</sub>/г, экссудат -  $<10^2$  ТЦД<sub>50</sub>/г, кожа -  $\sim 10^5$  ТЦД<sub>50</sub>/г, плавники -  $< 10^4$  ТЦД<sub>50</sub>/г и почка  $> 10^6$  ТЦД<sub>50</sub>/г. Чувствительность



после второго раунда мозг -  $<10^1$  ТЦД<sub>50</sub>/г, экссудат -  $<10^2$  ТЦД<sub>50</sub>/г, кожа -  $\sim 10^3$  ТЦД<sub>50</sub>/г, плавники -  $< 10^4$  ТЦД<sub>50</sub>/г и почка  $\sim 10^4$  ТЦД<sub>50</sub>/г. Следовательно, диагностически наиболее ценными для ПЦР-диагностики ВВК-инфекции являются образцы мозга и экссудата больных рыб, тогда как в пробах почки имела место выраженная ингибция реакции. Феномен ингибции удалось в значительной мере устранить простым разведением РНК в 10 – 100 раз. При этом существенно возрастала как частота выявления вируса, так и величина специфического ПЦР-сигнала.

Таким образом, подобранные пары праймеров позволяют специфически идентифицировать вирус ВВК в зараженной культуре клеток и клиническом материале от рыб. В результате проведенных исследований был разработан «Набор препаратов для выявления РНК вируса ВВК методом ПЦР». Специфичность набора подтверждена комиссионными испытаниями (Акт от 02.12.2003). Разработана и утверждена заместителем генерального директора ФГУП «ВНИИПРХ» «Инструкция по выявлению РНК вируса весенней виремии карпа методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции».

### *2.2.3.3 Сравнительная эффективность выявления вируса ВВК в материалах от рыб методом ПЦР*

Полевые материалы от карпов отбирали в четырех рыбхозах Тверской и Московской областей (табл. 5) в связи с подозрением на ВВК или в ходе мониторинга хозяйств, проводимого по распоряжению Департамента ветеринарии Минсельхоза России (№ 13-3-18/2096 от 03.11.03). Работу проводили совместно с представителями органов местной ветеринарной службы и документировали соответствующими актами.

Для выделения вируса ВВК доставленный материал (12 проб по 5 рыб/проба) был исследован в соответствии с требованиями национальных и международных нормативных документов по вирусологическому исследованию рыб («Методические указания по идентификации вирусов и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб», № 13-4-2/1054, утв. Департаментом ветеринарии Минсельхоза России 10.10.97, OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 4<sup>th</sup> ed., 2003). Пробами материала инокулировали перевиваемую культуру клеток ЕРС и инкубировали при температуре  $+21,5^{\circ}\text{C}$ .

Таблица 5

## Данные обследования рыбоводных хозяйств

Хозяйство	Срок отбора	Температура воды, °С	Возраст рыбы	Клиническая картина	Отобранный материал	
					вид	кол-во проб
НЦ "Селекцентр"	28 02 04	8-10	годовик	норма	пч+пн+сел*	12
Рыбхоз "Клинский"	20 04 04	6	годовик	норма	пч+пн+сел	12
"Бисеровский рыбокомбинат"	26 04 04	4-6	годовик	норма	пч+пн+сел	12
"Рыбокомбинат Лотошинский"	04 06 04	15	двухлетки и трехлетки	хроническая форма ВВК	ж+жк+сел**	12

Примечание \*объединенные пробы почки, печени и селезенки

\*\* объединенные пробы жабр, жаберных крышек и селезенки

Идентификацию выделенных цитопатогенных агентов проводили в реакции нейтрализации с гипериммунной кроличьей антисывороткой на штамм М2 вируса ВВК Параллельно в отобранных пробах материала вели поиск вируса методом ПЦР

В результате проведенных исследований вирусные агенты были выделены из пробы 7 от годовика карпа из ООО «НЦ Селекцентр» и пробы 1 от трехлетков карпа из ЗАО «Рыбокомбинат Лотошинский» В реакции нейтрализации, выделенные агенты были идентифицированы как вирус ВВК Индексы нейтрализации составили  $10^{5.75}$  и  $10^{4.5}$  при разведении антисыворотки в реакционной смеси 1:20 и 1:40, соответственно Идентификация изолятов была также подтверждена методом ПЦР путем выявления во втором раунде вирусоспецифических ампликонов N3-N4 размером 388 п н

ПЦР-тестирование клинических проб показало присутствие вирусоспецифических продуктов размером 388 п н в материалах из всех четырех хозяйств Специфичность выявленных ПЦР-продуктов была доказана их гидролизом рестриктазой RsaI с образованием фрагментов ожидаемой длины - 172 и 216 п н (табл 6)

Таким образом, результаты исследования показали, что по эффективности выявления вируса ВВК на стадиях скрытого и хронического течения болезни метод ПЦР значительно (в 12 и более раз) превосходит традиционный метод вирусовыделения в культуре клеток Эта закономерность не всегда проявляется при остром течении заболевания, что обусловлено присутствием ингибиторов ПЦР в

тканях рыб, приводящих к появлению фальш-негативных реакций. Для устранения феномена ингибции анализируемые пробы РНК следует разводить в 10 – 100 раз.

2.2.4 Дифференциация изолятов вируса ВВК на основе анализа вирусного генома. Для дифференциации различных штаммов и изолятов вируса ВВК были использованы два подхода: рестрикционный анализ ПЦР-продуктов и штаммоспецифическая ПЦР на основе праймеров, комплементарных варибельному участку гена нуклеопротеина вируса.

#### 2.2.4.1 Дифференциация изолятов вируса ВВК методом рестрикционного анализа

Целью данного этапа исследований была разработка метода дифференциации штаммов и изолятов вируса посредством рестрикционного анализа ампликонов N1-N2. Амплификацию проводили в полугнездовой ПЦР с использованием наружных праймеров N17 и N2 и внутренних N1 и N2. Указанные праймеры направляли синтез продуктов длиной 486 и 405 п.н., соответственно.

Таблица 6  
Сравнительная эффективность выявления вируса ВВК в полевых материалах от рыб методами выделения в культуре клеток и ПЦР

Хозяйство	Метод выявления	Результат выявления вируса в отобранных пробах												% выявления
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
ООО "НЦ Селекцентр"	к-ра клеток	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	8,3
	ОТ-ПЦР	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	8,3
	ОТ-пгПЦР	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
ЗАО "Р/к-т Лотошинский"	к-ра клеток	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,3
	ОТ-ПЦР	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	33,3
	ОТ-пгПЦР	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
ЗАО "Рыбхоз Клинский"	к-ра клеток	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	ОТ-ПЦР	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	ОТ-пгПЦР	нд	+	нд	+	нд	+	нд	+	нд	+	нд	+	100 (6/6)
ОАО "Бисеровский р/к-т"	к-ра клеток	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	ОТ-ПЦР	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	ОТ-пгПЦР	нд	+	нд	+	нд	+	нд	+	нд	+	нд	+	100 (6/6)

Примечание: нд – не делали; ОТ-пгПЦР – обратная транскрипция – полугнездовая полимеразная цепная реакция

Отбор ферментов рестрикции проводили на основании выравнивания и компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента N1-N2 гена нуклеопротеина для 8 европейских и 10 отечественных штаммов и изолятов вируса ВВК. Была установлена высокая степень гомологии последовательности референсного европейского штамма "Fijan" с таковыми у других европейских штаммов. В отличие от них, штаммы вируса из бывшего СССР имели

множественные закономерные замещения нуклеотидов на этом промежутке как в области N-гена, так и в области перехода между генами нуклеопротеина и фосфопротеина, что говорило о возможности осуществления на этой основе их генетической дифференциации. В результате было отобрано 6 эндонуклеаз рестрикции (RsaI, ClaI, BsoMAI, Tfu9I, PstI и FokI), имеющих сайты связывания в области N1-N2, которые были использованы для разработки метода рестрикционной дифференциации вирусных изолятов.

Полученные результаты позволили разделить 24 исследованных штамма вируса ВВК на пять генетических групп. Мажорная группа 1 (n=7) образована европейскими штаммами. Мажорная группа 5 (n=7) и три минорных группы - 2 (n=2), 3 (n=2) и 4 (n=3) – состоят из штаммов, выделенных на территории бывшего СССР. Один отечественный и два европейских изолята вируса образуют группу агентов с уникальными рестрикционными профилями (табл. 7).

В целом, европейские штаммы вируса ВВК оказались генетически более однородными, в отличие от изолятов из бывшего СССР, что совпадает с данными Stone et al (2003). В частности, представители трех минорных групп имеют рестрикционные сайты, характерные для мажорных групп 1 и 5, что позволяет рассматривать данные группы как переходные между группами 1 и 5.

Разработанный метод рестрикционного анализа дает возможность с высокой точностью отличать европейские штаммы и изоляты вируса от изолятов из бывшего СССР. Факт генетического различия двух данных вирусных кластеров подкрепляет сделанный нами ранее вывод об их серологическом (антигеном) различии. Следовательно, различия между данными кластерами вируса проявляются не только на уровне ответственного за нейтрализацию поверхностного гликопротеина (а, значит, и его гена), но и на уровне более консервативного внутреннего нуклеопротеинового гена В. То же время, рестрикционный анализ, в отличие от реакции нейтрализации, позволил выделить среди отечественных изолятов три промежуточных минорных группы, что еще раз показывает, что молекулярно-генетические методы типирования вирусов превосходят по своему дискриминативному потенциалу серологические.

Наиболее близко к европейской геногруппе 1 располагается геногруппа 2, представленная молдавскими изолятами М2 и 2/90. Очевидно, это объясняется тем, что Молдова находится на западном рубеже бывшего СССР и располагается в бассейне Дуная, приносящего воды с водосбора, занимающего значительную часть

территории южной Европы где распространена данная инфекция

Таблица 7  
Генотипирование вируса ВВК методом рестрикционного анализа ампликона N1-N2

Изолят (место выделения)	Эндонуклеаза рестрикции					
	RsaI	ClaI	BsoMAI	Tru9I	PsiI	FokI
Группа 1						
"Ђяп" (Хорватия)	+	-	-	-	+	+
450 (Германия)	+	-	-	-	+	+
500 (Чехия)	+	-	-	-	+	+
541 (Чехия)	+	-	-	-	+	+
3587 (Австрия ?)	+	-	-	-	+	+
17314/5 (Венгрия)	+	-	-	-	+	+
17417/3 (Венгрия)	+	-	-	-	+	+
Группа 2						
M 2 (Молдова)	+	-	-	-	-	+
2/90 (Молдова)	+	-	-	-	-	+
Группа 3						
Уд (Россия)	-	+	-	-	+	+
P 4 (Россия)	-	+	-	-	+	+
Группа 4						
ЛК/03 (Россия)	+	+	-	+	+	+
KU/0204 (Россия)	+	+	-	+	+	+
KL/0604 (Россия)	+	+	-	+	+	+
Группа 5						
ЗЛ 4 (Россия)	-	+	+	+	-	+
Кр 1 (Россия)	-	+	+	+	-	+
ККК (Россия)	-	+	+	+	-	+
1.4 (Россия)	-	+	+	+	-	+
N 1 (Россия)	-	+	+	+	-	+
N 3 (Украина)	-	+	+	+	-	+
N 5 (Украина)	-	+	+	+	-	+
Изоляты с уникальными рестрикционными профилями						
435 (Германия)	+	-	-	+	+	+
1/99 (Украина)	+	+	-	-	-	+
RVC-1 (Зап. Европа ?)	-	-	+	+	-	+

Примечание: «+» - ампликон гидролизуеться, «-» - ампликон не гидролизуеться

Геногруппа 4 состоит из изолятов, выделенных в подмосковном регионе ( ЗАО «Рыбокомбинат Лотошинский» и ООО «НЦ Селекцентр», г Удомля) Интересно, что выделенный нами в 2004 г в г Удомля изолят KU/0204 по своему рестрикционному профилю отличается от штамма Уд (геногруппа 3), изолированного там же в 1994 г

Разработанный метод был успешно апробирован для типирования вирусных

штаммов непосредственно в клинических материалах (in situ) из ЗАО «Рыбокомбинат Лотошинский» ЗАО «Рыбхоз Клинский» и ОАО «Бисеровский р/к-т» без выделения вируса от рыб

Таким образом, предложенный метод типирования вируса ВВК с помощью рестрикционного анализа фрагмента N1-N2 гена нуклеопротеина дает возможность производить тонкую дифференциацию вирусных изолятов, тем самым, позволяя оперативно отслеживать перемещение вирусных штаммов по территории страны

#### *2 2 4 2 Разработка метода штаммоспецифической ПЦР*

Для типирования вируса ВВК методом штаммоспецифической ПЦР использовали праймеры Nros11Rev и Nros2 (табл 3) Структура праймеров была определена исходя из последовательности N-гена европейского референсного штамма "Fijan" Последовательность прямого праймера Nros11Rev полностью соответствовала участку 1014 – 1032 N-гена данного штамма, а последовательность обратного праймера Nros2, соответствующая участку 1278 – 1301 N-гена, учитывала замены нуклеотидов, характерные для большинства российских и некоторых европейских изолятов Так, были учтены следующие замены Т→С в позиции 1280 и Т→G в позиции 1291 для российских штаммов ЗЛ4, 1 4, N1, N3, N5, Кр1, ККК и европейского RVC1 G→A в позиции 1288 для российских штаммов ЗЛ4, 1 4, N1, N3, N5, Кр1, ККК и европейских RVC1 и 435 А→Т в позиции 1296 для российских штаммов ЗЛ4, 1 4, N1, N3, N5, Кр1, ККК, Уд, Р4 и европейского RVC1 Таким образом, праймеры должны направлять синтез фрагмента размером 288 п н лишь в случае тех штаммов, для которых при выборе обратного праймера было учтено наибольшее количество замен Такими штаммами являются ЗЛ4, 1 4, N1, N3, N5, Кр1, ККК и RVC1 Реакция проводилась в тех же условиях, что указаны выше, и состояла из 30 циклов 95°C, 1 мин; 64°C, 1 мин и 72°C, 1 мин Заключительный этап 3-минутный прогрев смеси при 72°C

Для проверки метода были выбраны 5 российских (Уд, ЗЛ4, Р4, 1 4 и N3) и 5 европейских изолятов (3587, "Fijan", V 500, 450 и 17314/5) При проведении ПЦР продукт 288 п н синтезировался в случае российских изолятов ЗЛ4, 1 4 и N3, входящих в мажорную генетическую группу 5, и не синтезировался в случае всех пяти исследованных европейских изолятов и российских изолятов Уд и Р4, представляющих другие генетические группы (табл 8)

Таким образом, разработанный метод штаммоспецифической ПЦР позволяет быстро выявлять представителей основной генетической группы вируса ВВК,

циркулирующей на территории бывшего СССР (мажорная группа 5)

Таблица 8  
Результаты дифференциации штаммов и полевых изолятов вируса ВВК  
методом штаммоспецифической ПЦР

Штаммы и изоляты	Результаты ПЦР
n=5	
Отечественные штаммы	
Уд	-
ЗЛ4	+
Р4	-
1 4	+
№3	+
Европейские штаммы	
3587	-
"Fijap"	-
500	-
450	-
17314/5	-

Примечание «+» - положительный результат;  
«-» - отрицательный результат.

## 2. ВЫВОДЫ

1 Путем клонирования в однокитевый фаговый вектор M13mp8 фрагментов размером 248 н.о. М-гена вируса ВВК (позиции 134 – 381) и 405 н.о. N-гена (позиции 979 – 1383) получены и помечены биотином два ДНК-зонда: зонд M13-SVCV-M8 (на геномную РНК вируса) и зонд M13-SVCV-N8 (на вирусную мРНК). Оптимальные результаты при использовании обоих зондов были получены после 16-часовой гибридизации при температуре 65°C в гибридизационном растворе, состоящем из 6xSSC, 5xDenhardt, 0,5% SDS, денатурированная ДНК лосося в концентрации 0,05 мг/мл, ДНК-зонд в концентрации 100 нг/см<sup>3</sup>.

2 Методом дот-гибридизации оба зонда специфически выявляли РНК 10-и испытанных штаммов вируса ВВК и не реагировали с образцами нуклеиновых кислот других вирусов, контрольных культур клеток и тканей здоровых рыб. ДНК-зонды выявляли вирус ВВК с титром не ниже 10<sup>5</sup>ТЦД<sub>50</sub> в пятне (примерно 10<sup>6</sup>ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>).

3 В результате анализа первичных последовательностей генома вируса весенней-виремии карпа подобран набор из 8 специфичных праймеров для амплификации различных участков гена вирусного нуклеопротеина (N-гена) и

оптимизированы условия проведения ПЦР-анализа

4 Использование в первом раунде ПЦР праймеров N3 и N5 (отжиг при 60°C, продукт 418 п н) и во втором раунде праймеров N3 и N4 (отжиг при 62°C, продукт 388 п н) позволяло в обоих раундах специфически выявлять РНК всех 10-и испытанных изолятов вируса ВВК. Специфичность получаемых продуктов была подтверждена их гидролизом эндонуклеазой рестрикции RsaI на фрагменты ожидаемого размера. Образование аналогичных продуктов с образцами нуклеиновых кислот других вирусов, контрольных культур клеток и тканей здоровых рыб не наблюдали.

5 Чувствительность выявления вируса ВВК методом ПЦР в зараженной культуре клеток составила  $10^{6.4}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл в первом раунде и достигала  $10^{0.9}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл во втором. Чувствительность выявления вируса в клинических материалах от больных рыб варьировала в зависимости от вида материала и достигала 10 ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. По частоте выявления вируса у рыб со скрытым и хроническим течением ВВК-инфекции метод полугнездовой ПЦР в 12 и более раз превосходил традиционный метод выделения вируса на культуре клеток (соответственно 100% и 8,3%), тогда как при тестировании клинических образцов от рыб с острой формой ВВК уступал ему примерно в 2 раза.

6 Предложен метод генетического типирования вируса ВВК с помощью рестрикционного анализа с использованием набора из 6 эндонуклеаз рестрикции (RsaI, ClaI, BsoMAI, Tru9I, PstI и FokI) фрагмента N1-N2 гена вирусного нуклеопротеина. Метод позволил разделить 24 исследованных штамма вируса ВВК на пять генетических групп: две мажорные (соответственно, европейские и отечественные изоляты) и три переходные минорные (отечественные изоляты) группы. Установлено, что европейские и отечественные изоляты вируса образуют два самостоятельных генетических кластера, что подкрепляет имеющиеся литературные данные и сделанный нами ранее вывод об их антигенном различии. При этом европейские изоляты вируса отличаются более высоким уровнем взаимной гомологии N-гена (около 95%). Выявлена географо-генетическая корреляция для групп 2 и 4, представленных изолятами из бывшего СССР.

7 Предложенная штаммоспецифическая ПЦР позволяет дифференцировать российские изоляты ЗЛ4, 14 и N3, входящие в мажорную генетическую группу 5, от пяти исследованных европейских изолятов и российских изолятов Уд и Р4, относящихся к другим генетическим группам. Это создает возможность для быстрого



выявления представителей основной генетической группы вируса ВВК, циркулирующих на территории бывшего СССР

#### 4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

4.1 Разработаны и утверждены заместителем генерального директора ФГУП «ВНИИПРХ» «Инструкция по применению тест-системы для идентификации вируса весенней виремии карпа методом молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот» и «Инструкция по выявлению РНК вируса весенней виремии карпа методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции» и наборы препаратов к ним

4.2 Разработанные тест-системы на основе дот-гибридизации и полимеразной цепной реакции могут быть использованы для идентификации штаммов и полевых изолятов вируса ВВК и рекомендованы для включения в схему и порядок лабораторных исследований при диагностике болезни

4.3 Предложенные методы штаммоспецифической ПЦР и рестрикционного анализа варибельного участка N1-N2 гена нуклеопротеина могут быть использованы для тонкой дифференциации и генетического типирования вируса, в том числе без выделения его от рыб. Это позволит оперативно отслеживать перемещение вирусных штаммов по территории страны и своевременно принимать необходимые меры профилактики и борьбы с болезнью

#### 5. СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1 Щелкунов, И С, Щелкунова, Т И *Rhabdovirus carpio* у растительноядных рыб (выделение, идентификация, патогенность) // Сборник науч тр / ВНИИПРХ - 1987 - Т.50.- С 3-11.

2 Shchelkunov, I S, Shchelkunova, T I *Rhabdovirus carpio* in herbivorous fishes isolation, pathology and comparative susceptibility of fishes // *Viruses of Lower Vertebrates* / W Ahne, E Kurstak (Eds) - Berlin, Heidelberg Springer-Verlag, 1989 - P 333-348.

3 Oreshkova, S F, Tikunova, N V, Shchelkunov, I S, Ilychev, A.A Detection of spring viraemia of carp virus isolates by hybridization with biotinylated DNA-probes // *Vet Res* - 1995 - Vol 26 - P 533-537

4 Орешкова, С Ф, Тикунова, Н В, Щелкунов, И С, Щелкунова, Т И, Ильичев, А А Обнаружение вируса весенней виремии карпа гибридизацией с нерадиоактивными ДНК-зондами // *Мол генетика, микробиол, вирусол* - 1996, №2 - С 22-25

5 Oreshkova, S F, Shchelkunov, I S, Tikunova, N V, Shchelkunova, T I, Puzyrev, A T, Ilychev, A A Detection of spring viraemia of carp virus isolates by hybridization with non-radioactive probes and amplification with PCR // *Virus Res* - 1999 - Vol 63 - P 3-10

6 Oreshkova, S F, Shchelkunov, I S, Nikolenko, G N, Tikunova, N V, Shchelkunova,

T I , Zherakovskaya E V , Ilyichev, A A Detection and characterization of spring viraemia of carp virus isolates using PCR technique // Diseases of Fish and Shellfish Abstract book of the 10th Int Conference of the EAFF, Dublin, Ireland, 9-14 Sept 2001 - Dublin, 2001 - P-173

7 Щелкунов, И С , Щелкунова, Т И , Купинская, О А , Орешкова, С Ф , Тикунова, Н В , Ильичев, А А Гибридизационная тест-система для экспресс-диагностики весенней вiremии карпа // Избранные труды ВНИИПРХ – М , 2002 - Кн 1 -Т 2 - С 471-473

8 Einer-Jensen, K , Bjorklund, H , Oreshkova, S F , Shchelkunov, I S , Vesely, T , Lorenzen, N Detection and typing of fish viruses // Bull Eur Ass Fish Pathol - 2002 -Vol 22, N 2 - P 158-165

9 Oreshkova, S F , Shchelkunov, I S , Voronova, O S , Popova, A G , Nikolenko, G N , Shchelkunova, T I , Ilyichev, A A Diagnosis and specific prevention of spring viraemia of carp // Aquatic & Marine Animal Health Second USA-Russia Bilateral Conference, Shepherdstown, West Virginia, 21-28 Sept 2003 - Shepherdstown, 2003 - P 19

10 Pichugina, T D , Borisova, M N , Shchelkunova, T I , Shchelkunov, I S , Zavalova, E A First report on spring viraemia of carp virus at a fish farm in Moscow province, Russia // Aquatic & Marine Animal Health Second USA-Russia Bilateral Conference, Shepherdstown, West Virginia, 21-28 Sept 2003 - Shepherdstown, 2003 - P 20

11 Пичугина, Т Д , Борисова, М Н , Завьялова, Е А , Щелкунов, И С , Щелкунова, Т И Весенняя вiremия карпов // Ветеринария - 2004 - № 5 - С 28-30

12 Щелкунов, И С , Орешкова, С Ф., Попова, А Г ,Щелкунова, Т И , Блинова, Н Н , Ильичев, А А Выявление вируса весенней вiremии карпа в материалах от рыб путем выделения на культуре клеток и методом ПЦР // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: материалы Междунар научно- практич конф , посв 35-летию института, Щелково, 26-27 мая 2005 – Щелково 2005 - С 243-247

13 Shchelkunov, I S , Oreshkova, S F , Popova, A G , Nikolenko, G.N , Shchelkunova, T I , Ilyichev, A A Development of PCR-based techniques for routine detection and grouping of spring viremia of carp virus // Health and Diseases of Aquatic Organisms. Bilateral Perspectives / R C Cipriano, I S Shchelkunov, M Faisal (Eds ) – East Lansing, Michigan Michigan State University, 2005 – P 260-284



■23735

РНБ Русский фонд

2006-4  
24966