

УДК 578.825.1:639.3.091

UDC 578.825.1:639.3.091

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОМА ГЕРПЕСВИРУСА СИБИРСКОГО ОСЕТРА МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ РЫБОВОДНЫХ ХОЗЯЙСТВ

DETECTION OF SIBERIAN STURGEON HERPESVIRUS GENOME BY REAL-TIME PCR AND ITS APPLICATION FOR FISH FARM

Калабекова Фатима Султанхамидовна
аспирант

Kalabekova Fatima Sultankhamidovna
postgraduate student

Калабеков Исмаил Мусаевич
к.б.н.

Kalabekov Ismail Musaevich
Cand.Biol.Sci.

Щелкунов Игорь Степанович
к.б.н.

Schelkunov Igor Stepanovich
Cand.Biol.Sci.

*Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт ветеринарной вирусологии и
микробиологии Российской академии
сельскохозяйственных наук, г.Покров, Россия*

*State Research Institution National Research Institute
for Veterinary Virology and Microbiology of Russia of
the Russian Academy of Agricultural Science, Pokrov,
Russia*

В данной статье описаны исследования по разработке тест-системы для диагностики герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени и возможности ее применения при обследовании рыбоводных хозяйств

This article describes the research to develop a test system for the diagnosis of Siberian sturgeon herpes virus PCR in real time and its possible use in the examination of fish farms

Ключевые слова: ГЕРПЕСВИРУС СИБИРСКОГО ОСЕТРА, ГЕНОМ, ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ, ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА

Keywords: SIBERIAN STURGEON HERPESVIRUS, GENOME, REAL-TIME PCR, DIAGNOSTIC TEST-KIT

Актуальность проблемы

Герпесвирусная болезнь относится к одной из особо опасных болезней осетров, которая проявляется в виде некрогеморрагических синдромов. Это контагиозное заболевание сибирского осетра, вызванное ДНК-содержащим вирусом рода *Ictalurivirus* семейства *Alloherpesviridae* порядка *Herpesvirales* (SbSHV), который относится к группе герпесвирусов белого осетра 2 типа (Asipenserid Herpesvirus 2 – AsiHV-2) [1,3].

В Европе герпесвирус осетровых рыб впервые был обнаружен в Италии в 2003г. от завезенного туда из США белого осетра, а с 2006 г. регистрируется на территории России и Казахстана. На данный момент герпесвирусная болезнь широко распространена на территории

Российской Федерации и наносит большой экономический ущерб осетроводству [2,6]. В целях недопущения возникновения и распространения данной инфекции у выращиваемых рыб необходимо обследование рыбоводных хозяйств 2 раза в год – весной и осенью, когда температура воды (13-17°C) оптимальная для репродукции вируса.

На сегодняшний день лабораторная диагностика основана на выделении вируса и его идентификации серологическими методами, которые требуют больших временных затрат. Поэтому для своевременной постановки диагноза возникает необходимость разработки молекулярно-биологических тест-систем, отличающихся высокой специфичностью и экспрессностью. Одним из таких методов является ПЦР и ее модификации, которые, дополняя серологические и вирусологические методы диагностики, открывают новые возможности для быстрой идентификации возбудителя данного заболевания.

Целью данной работы является создание чувствительной и специфичной тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени, позволяющей выявлять геном SbSHV на ранних сроках болезни и отличающегося экспрессностью и точностью получаемых результатов.

Материалы и методы

Для проведения молекулярно-генетических исследований использовали различные изоляты герпесвируса сибирского осетра (SK1/0406, SK2/0506, BK/0506, SL/0708, SP1/1108, SA7/0310, RSS/0111, SSS/0111), выявленные на территории РФ, гетерологичные вирусы (вирус весенней виремии карпа, вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани, вирус инфекционного некроза поджелудочной железы, иридовирус карпа, герпесвирус болезни Ауески, герпесвирус инфекционного ринотрахеита КРС, герпесвирус инфекционного ларинготрахеита кур), и также интактные контрольные культуры клеток осетрового происхождения (SSO-1, SSO-2, SSO-3, SSF-1, SSF-2, WSS-2, WSSK-1). Клинический

материал (слизь с поверхности тела, ротовой аппарат, почку, печень, селезенку, сердце, жабры, грудные плавники, плавательный пузырь, мозг и задний отдел кишечника) от экспериментально зараженных и контрольных осетровых рыб, а также из хозяйств, неблагополучных по данной болезни. Для накопления, выделения и титрования изолятов герпесвируса сибирского осетра использовали перевиваемые клеточные линии SSO-2 (пул внутренних органов сибирского осетра) и WSS-2 (селезенка белого осетра)[5].

Выделение ДНК проводили методом нуклеосорбции.

Подбор праймеров и олигонуклеотидного зонда осуществляли с помощью программы Oligo 4.0 на основе представленной в GenBank нуклеотидной последовательности фрагмента гена ДНК-полимеразы SbSHV [4]. Постановку ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени проводили на приборе RotorGene-6000 («CorbettResearch», Австралия). Полученные в ходе экспериментов данные анализировали с помощью программного обеспечения, входящего в комплект прибора.

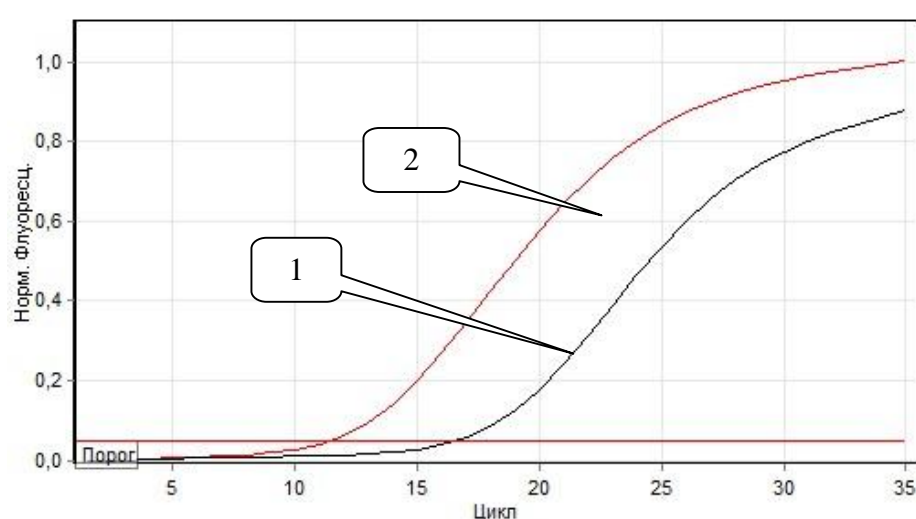
Результаты исследований

На основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генома SbSHV были рассчитаны специфические праймеры и олигонуклеотидный зонд, комплементарные к гену ДНК-полимеразы (как наиболее хорошо изученному гену герпесвирусов рыб), фланкирующие фрагмент длиной 89 пн для ПЦР в режиме реального времени.

Таблица 1- Праймеры и олигонуклеотидный зонд для ПЦР в режиме реального времени

Код	5`- 3` Последовательность
SbSHV1-F	gCAACAaggCTCggATAgATg
SbSHV1-R	gCgTAgCggAATTgTTTCTgg
SbSHV1-Z	[FAM]-TgTgTTggCggTTggCTTCAAACA-[BHQ1]

Первым этапом стало применение ПЦР для обнаружения генома герпесвируса в двух препаратах культурального вируса, хранившегося около года при 4°C, в которых инфекционный вирус уже не удавалось выделить (рис.1).



Примечание: 1 и 2 – номера тестируемых проб культурального вируса

Рис. 1 – Результаты постановки ПЦР в режиме реального времени с ДНК культурального герпесвируса сибирского осетра

Аналитическую чувствительность определяли амплификацией ДНК герпесвируса, выделенной из последовательных десятикратных разведений образцов культурального герпесвируса, штамм SK1/0406 с титром инфекционной активности $7,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Пределом чувствительности считали максимальное разведение, при котором регистрировали положительный результат (рис 3). Рассчитанное значение аналитической чувствительности составило $2,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.



Рис. 2 - Результаты постановки ПЦР-РВ с разными разведениями герпесвируса сибирского осетра

Примечание: номера проб соответствуют номерам образцов в табл. 2

Таблица 2 – Пробы культурального герпесвируса сибирского осетра, использованные для определения аналитической чувствительности метода ПЦР в режиме реального времени

	Материал для исследования	Характеристика
1	Исходный материал	7,1 lg ТЦД ₅₀ /см ³
2	Разведенный в 10 раз	6,1 lg ТЦД ₅₀ /см ³
3	Разведенный в 100 раз	5,1 lg ТЦД ₅₀ /см ³
4	Разведенный в 1000 раз	4,1 lg ТЦД ₅₀ /см ³
5	Разведенный в 10 000 раз	3,1 lg ТЦД ₅₀ /см ³
6	Разведенный в 100 000 раз	2,1 lg ТЦД ₅₀ /см ³
7	Разведенный в 1 000 000 раз	1,1 lg ТЦД ₅₀ /см ³

Экспериментальное заражение рыб герпесвирусом сибирского осетра (сибирский осетр и стерлядь) проводили методом ванн (штамм SK1/0406; доза заражения - 10^{4,1} ТЦД₅₀/см³; экспозиция 1 час при температуре воды 15-17 °С).

Патматериал отбирали на разных стадиях течения инфекции: инкубационный период, стадия разгара заболевания и завершения

заболевания. Вирус из патологического материала выделяли в культуре клеток. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча.

В качестве контрольных образцов использовали пробы тех же органов и тканей от клинически здоровых рыб, предварительно обследованных на отсутствие вирусоносительства.

В экспериментах по заражению рыб проводили исследования диагностической чувствительности метода на разных стадиях заболевания: инкубационный период, разгар заболевания, завершение заболевания. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Диагностическая чувствительность разрабатываемой тест-системы при выявлении герпесвируса сибирского осетра у экспериментально зараженных рыб

Стадии инфекционного процесса	Количество и вид тестируемых проб	Диагностическая чувствительность, %	
		ПЦР-РВ	Выделение в культуре клеток SSO-2
Инкубационный период	20 (слизь)	60	30
	20 (плавники)	30	15
Разгар заболевания	8*	75	100
	8*	100	100
	11*	100	91
	5 (слизь)	100	100
Завершение заболевания	8*	100	25

Примечание: * пробы наружных и внутренних органов рыб

Установлено, что геном герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени выявляли на разных стадиях эпизоотического процесса. Диагностическая чувствительность метода ПЦР в режиме реального времени, в инкубационном периоде и на стадии завершения эпизоотии превосходила таковую метода вирусыведения. В острой фазе оба метода работали примерно одинаково.

При определении специфичности разработанной тест-системы использовали образцы, приведенные в таблицах 1-3 и патологический материал от экспериментально зараженных рыб. Всего было исследовано 24 пробы, из которых 16 были заведомо положительными. Результаты исследований методом ПЦР в режиме реального времени представлены на рисунке 3.

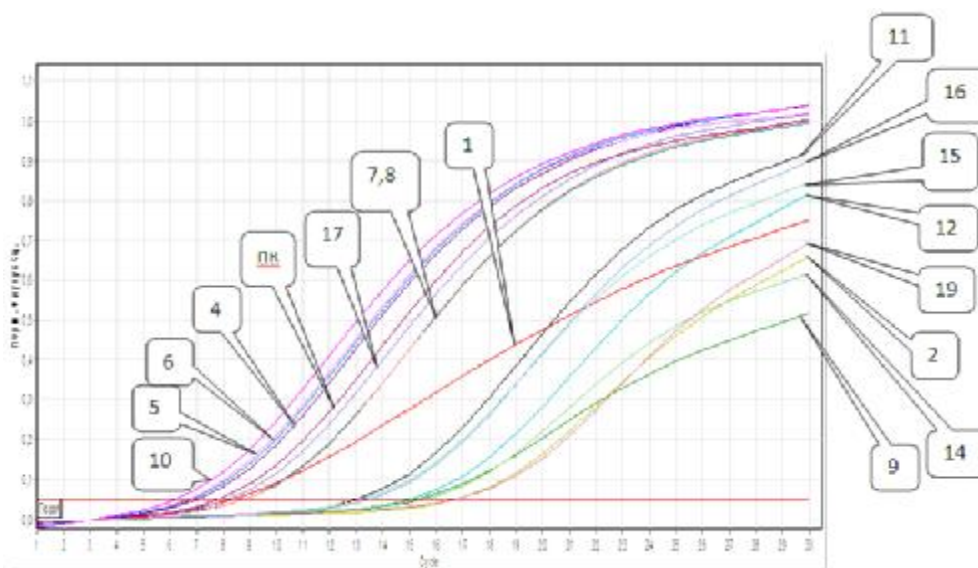


Рис.3 - Результаты оценки специфичности разрабатываемой тест-системы

Примечание: №№ 1, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 17 – изоляты герпесвируса сибирского осетра; №№ 2, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 19 – пробы слизи и патматериала от экспериментально зараженных рыб; ПК- положительный контроль ПЦР

В результате было показано, что тест-система обеспечивала специфическую амплификацию ДНК SbSHV, выделенной из испытуемых образцов и не взаимодействовала с генетическим материалом других вирусов, контрольных культур клеток и клиническим материалом от здоровых рыб.

С помощью разработанной тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени были исследованы пробы патматериала, отобранные в хозяйствах Псковской, Вологодской и Смоленской областей (2010-2012 гг).

В декабре 2010 г. отбирали материал от 8 - летних производителей и двухлетков сибирского осетра в рыботоварной фирме Вологодской области и двухлетков сибирского осетра, выращиваемых на рыбоводном предприятии Псковской области. В качестве материала для выделения в культуре клеток и для ПЦР в режиме реального времени использовали пробы слизи с поверхности тела рыб. Пробы исследовали на наличие ДНК герпесвируса сибирского осетра методом ПЦР в режиме реального времени. Параллельно эти же пробы исследовали в культуре клеток.

В ходе проведенного ПЦР-анализа геном герпесвируса сибирского осетра выявлен во всех образцах слизи рыб обеих возрастных групп, отобранных в Вологодской области (рис. 4), тогда как в культуре клеток вирусных цитопатогенных агентов обнаружено не было. Однако в сыворотках крови этих же рыб, сотрудниками лаборатории здоровья гидробионтов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, были обнаружены вируснейтрализующие антитела к герпесвирусу сибирского осетра, что косвенно подтверждает наличие герпесвирусной инфекции в хозяйстве.

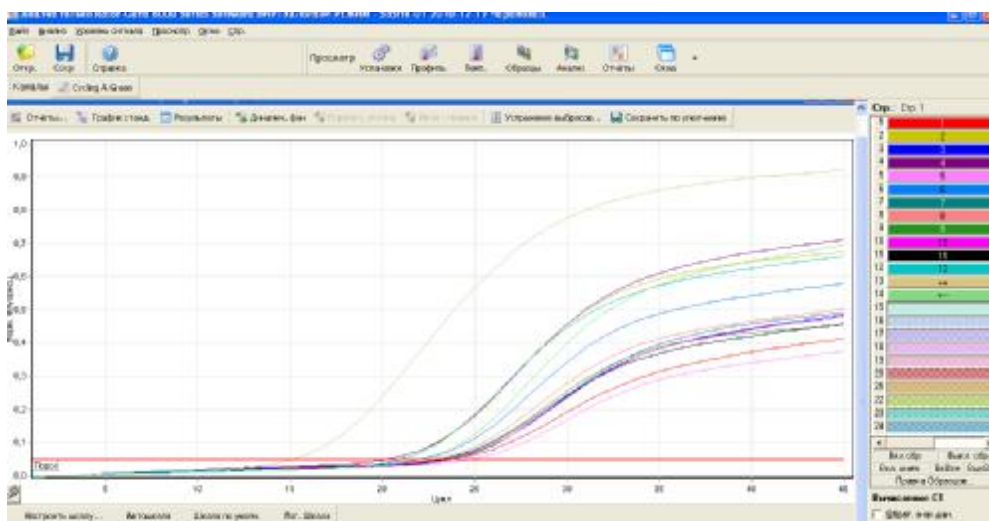


Рис.4 - Результаты постановки ПЦР-РВ с пробами из Вологодской области

В пробах, отобранных в Псковской области, результаты ПЦР-анализа и вирусыведения были отрицательными, тогда как в сыворотках крови больных рыб выявлены вируснейтрализующие антитела.

В январе 2011 г. обследовали хозяйство Смоленской области. В качестве материала для исследования от годовиков сибирского и русского осетров отобрали 8 проб слизи из области рта, которые исследовали методом ПЦР-РВ и в культуре клеток. В результате проведенных исследований из трех проб был выделен SbSHV, а с помощью ПЦР в режиме реального времени геном герпесвируса сибирского осетра выявлен во всех образцах обеих групп рыб (рис.5)

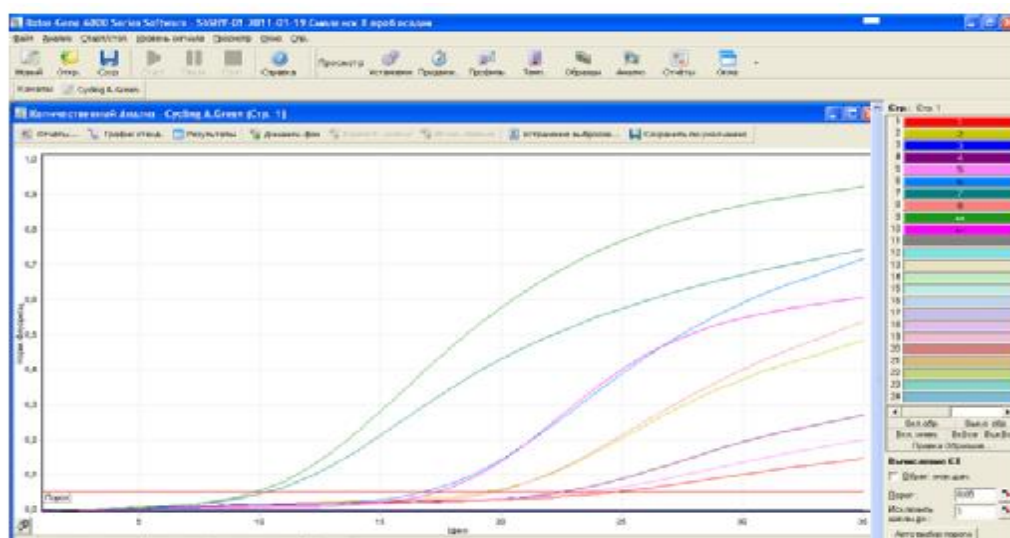


Рис.5 – Результаты постановки ПЦР-РВ с пробами из Смоленской области

В мае 2012г. в лабораторию здоровья гидробионтов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии для проведения лабораторных вирусологических и молекулярно – генетических исследований был доставлен патологический материал от больных сеголетков байкальского осетра из республики Бурятия. Патологическим материалом для исследования служили 5 объединенных проб кусочков грудных плавников. В результате проведенных исследований из всех проб плавников больных сеголетков байкальского осетра в обеих

использованных линиях клеток (WSS-2 и SSO-2) выделен цитопатогенный агент и методом ПЦР в режиме реального времени выявлен геном SbSHV во всех тестируемых пробах плавников (рис.6).

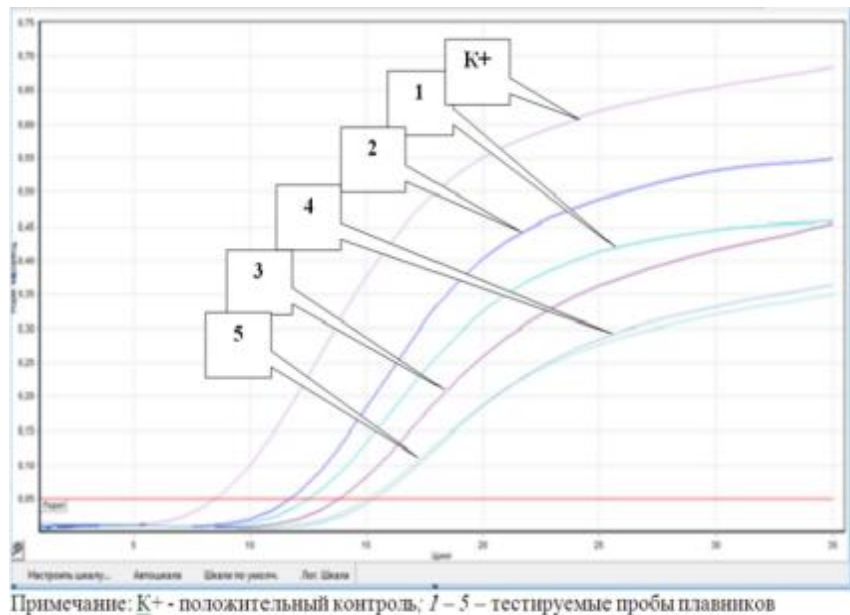


Рис.-6 Результаты постановки ПЦР с пробами из республики Бурятия

Выводы

Таким образом, разработана тест-система для диагностики герпесвируса сибирского осетра, позволяющая выявлять геном вируса SbSHV на ранних сроках болезни и возможность ее использования при мониторинге рыбоводных хозяйств на наличие возбудителя данной инфекции. Разработанная тест-система прошла комиссионные испытания на базе лаборатории Биофизики ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. В ходе проведенных комиссионных испытаний была определена аналитическая специфичность данной тест системы, которая составила 100% и аналитическая чувствительность равная $2,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Литература

1. Щелкунов И.С., Щелкунова Т.И., Щелкунов А.И., Колбасова Ю.П., Диденко Л.В., Быковский А.Ф. Герпесвирусное заболевание молоди осетровых рыб.- Тепловодная аквакультура и биологическая продуктивность водоемов аридного климата. Межд. симпоз. Материалы и доклады. Астрахань, изд. АГТУ, 2007. – С. 522-525
2. Щелкунов И.С., Щелкунова Т.И., Щелкунов А.И., Колбасова Ю.П., Диденко Л.В., Быковский А.Ф. Герпесвирусная болезнь у осетровых рыб в России. - Российский ветеринарный журнал (Сельскохозяйственные животные). - 2007. № 1. С. 10-12.
3. Щелкунов А.И., Щелкунов И.С. Герпесвирусная болезнь сибирского осетра // Ветеринария.- 2010.- №1.- С. 18-21.
4. Doszpoly A., Shchelkunov I.S. Partial genome analysis of Siberian sturgeon alloherpesvirus suggests its close relation to AcHV-2 // Acta Veterinaria Hungarica.- V.58.- 269-274.
5. A workshop on sturgeon diseases. / Hedrick R., LaPatra S., McDowell T., MacConnell B. // Conducted at the 4th Int. Symposium on Sturgeon. Oshkosh, Wisconsin, USA, 8-13 July 2001.- 25 p.
6. First detection of a viral agent causing disease in farmed sturgeon in Russia / Shchelkunov I.S, Shchelkunova T.I. Shchelkunov A.I., Kolbassova Y.P., Didenko L.V., Bykovsky A. Ph. // Diseases of Aquatic Organisms.- 2009.- 86.- 193-203.