



Южный университет
«Институт управления
бизнеса и права» (ИУБП)



Аспирант



НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ

№ 5 / 2019

г. Ростов-на-Дону — 2019

УДК 578.2:639.3

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ (ОТ-ПЦР)

Алонцева Дарья Александровна

М.н.с., Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И.Скрябина и Я.Р.Коваленко Российской Академии Наук»
E-mail: azdf1961@yandex.ru

В статье описана методика постановки полимеразно-цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для диагностики таких вирусных заболеваний лососевых рыб, как инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых (IPN), инфекционный некроз гемопоэтической ткани (IHN) и вирусная геморрагическая септицемия (VHS), представлен способ отбора образцов для исследования, нуклеотидная последовательность использованных праймеров и температурный цикл амплификации, обсуждается значимость диагностики вирусных заболеваний рыб при помощи ПЦР для развития аквакультуры в РФ.

Ключевые слова: аквакультура, гидробионты, лососевые, инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых, инфекционный некроз гемопоэтической ткани, вирусная геморрагическая септицемия, ПЦР, ОТ-ПЦР, вирусология, вирусносительство.

Введение. Аквакультура в Российской Федерации носит комплексный многоотраслевой характер за счет использования крупнейшего в мире объема внутренних водоемов и прибрежных акваторий морей. Основными факторами, сдерживающими развитие производства, являются болезни культивируемых объектов, значительную долю которых занимают вирусные болезни рыб – такие, как инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых (Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV), инфекционный некроз гемопоэтической ткани (Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) и вирусная геморрагическая септицемия (Viral Haemorrhagic Septicaemia, VHS). Нарастание объемов производства, активная торговля рыболовным материалом между областями и странами, а также увеличение плотности посадки и количества хозяйств в локальных акваториях способствует распространению многочисленных заболеваний. Во всем мире главными направлениями по борьбе с вирусными болезнями являются своевременная диагностика и специфическая профилактика болезней.

В прошлом основным способом диагностики вирусных заболеваний рыб являлось использование культур клеток, что требовало значительных временных и финансовых ресурсов [1]. В настоящее время одним из распространенных и эффективных способов диагностики является полимеразно-цепная реакция (ПЦР), широко используемая в научных и диагностических лабораториях [2].

Отбор проб. Для диагностики вирусных заболеваний рыб при помощи полимеразно-цепной реакции осуществляли отбор небольших кусочков 0,5×0,5 см², которые помещали в среду ИГЛА MEM с добавлением 10%-ного раствора гентамицина для предотвращения развития вторичной микрофлоры. Данная среда выступает в роли буфера и позволяет в дальнейшем провести посев на культуру клеток. Для диагностики отбирали пробы согласно патогенезу вирусных болезней - из печени, почки и селезенки, для диагностики ISA также производят отбор кусочков жабр. Хранение образцов производили в морозильной камере при -20°C, перед постановкой реакции образцы размораживали при +4 - +6°C и взбалтывали при помощи мультитротатора [3].

Выделение генетического материала вируса. IHN, IPN и VHS относятся к РНК-содержащим вирусам, выделение РНК возбудителя из образцов проводилось при помощи готового коммерческого набора «РИБО-преп» производства AmpliSens [4].

Подготовка к амплификации. Перед амплификацией производился сбор реакционной смеси для ОТ-ПЦР (полимеразно-цепной реакции с обратной транскрипцией), которая включала в себя следующие компоненты: бидистиллят (ddH₂O) в качестве среды для прохождения реакции, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP), служащие строительными блоками для синтеза ДНК, ПЦР-буфер с красителем, MgCl₂ (ионы калия (KCl) способствуют отжигу праймеров, ионы магния служат кофактором для ДНК-полимеразы), Taq ДНК-полимеразу - фермент для репликации ДНК, MMLV-ревертазу - фермент для синтеза ДНК на матрице РНК, матрицу (образец выделенной РНК) и специфические праймеры (прямой и обратный) [5].

Праймеры. Праймеры представляют собой короткие нуклеотидные последовательности (синтетические олигонуклеотиды около 15-30 оснований длиной), которые спариваются с реплицируемой ДНК матрицей [5]. В зависимости от диагностируемого заболевания использовалась одна или несколько пар праймеров.

Таблица 1. Праймеры для диагностики IPN, IHN и VHS у лососевых рыб при помощи ОТ-ПЦР

Название болезни	Название праймера	Нуклеотидная последовательность (от 5'-концу к 3'-концу)
IPN	B37	ACG TTG GTG GCA CCC GAC ATA C
	B853r	TGT CGG ACA TCT TCA ACT CAC C
	B123	CAG TCG AGG CAG AGC GGC ATC
	B320r	GTG TCT CCT TTGGTT TTGCCT ATG
IHN	IHN-12F	TTC-GCA-GAT-CCC-AAC-AAC-AA
	IHN-12R	GCG-CAC-AGT-GCC-TTG-GCT
VHS	VN-forward	ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG
	VN-reverse	GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C

В целях диагностики IPN специалистами лаборатории иктиопатологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН был разработан и запатентован метод полимеразно-цепной реакции (Патент 2508547). Согласно данному методу, осуществляют 2 раунда ПЦР, и для каждого раунда предусмотрена своя пара праймеров: B37-B853r (1 раунд) и B123-B320r (2 раунд) [6,7].

Для диагностики IHN и VHS использовались пары праймеров, рекомендованных Руководством МЭБ по диагностическим тестам для водных животных [8].

Температурный цикл. В процессе проведения практических экспериментов использовали оптимальные условия прохождения полимеразной цепной реакции с имеющимися праймерами. Предварительно проводят реакцию обратной транскрипции при 40° в течение 45 минут, затем полученную кДНК прогревают при 95° в течение 5 минут и используют для постановки ПЦР, включающую три этапа - 95°C - 20 секунд, 50°C - 30 секунд, 72°C - 40 секунд - которые повторялись 35 раз с последующей элонгацией при 72°C на протяжении 7 минут [7].

Детекция вирусного материала. Результаты ОТ-ПЦР оценивали при помощи горизонтального электрофореза в 2%-ом агаровом геле с добавлением бромистого этидия.

Заключение. Сотрудниками лаборатории иктиопатологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН на протяжении нескольких лет проводится диагностика вирусных заболеваний лососевых рыб при помощи полимеразно-цепной реакции по описанной в статье методике, а также постоянно

проводится ее усовершенствование, подбор оптимальных условий проведения реакции и разработка новых праймеров. Применение ПЦР в диагностике вирусных заболеваний рыб очень перспективно и имеет высокую эффективность, так как дополняя классические вирусологические методы, оно открывает

новые возможности для быстрой идентификации возбудителя, а также позволяет выявлять скрытое вирусоносительство в популяции внешне здоровых рыб, что особенно важно для успешного развития аквакультуры в Российской Федерации.

Список использованных источников

1 Завьялова Е. А., Пичугина Т. Д., Дьяконов Л. П., Борисова М. Н. Культуры клеток рыб для вирусологических исследований и диагностики вирусных заболеваний // Информационный бюллетень «Клеточные культуры» вып. 20, Харьков. – с. 53-57.

2 Завьялова Е. А., Кандрина Н. Ю., Ломакина Н. Ф., Гулюкин М. И. Полимеразная цепная реакция в диагностике вирусных болезней рыб // Межведомственный тематический научный сборник «Ветеринарная медицина-95». - Харьков, 2011, с. 59 – 60.

3 Завьялова Е. А., Дрошнев А. Е., Кандрина Н. Ю. и др. Выделение возбудителя вирусной геморрагической септицемии лососёвых от рыб в естественных водоёмах // В сб.: Матер. Междунар. Научно-практ. Конф. «Акт. Probl. Инф. Болезней холодняка и др. возр. Групп с/х животных, рыб и пчел». – М., 2011

4 Карпова М. А., Кандрина Н. Ю., Гулюкин М. И. Сравнительная характеристика биологических свойств штаммов вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV) // Материалы первой международной научно-практической конференции «Проблемы ветеринарной медицины и зооэкологии российского и азиатско-тихоокеанского регионов». – Благовещенск, 2012. – с. 109 – 113.

5 Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. Journal of Visualized Experiments : JoVE. 2012;(63):3998. doi:10.3791/3998.

6 Патент 2508547 на Способ диагностики вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых методом полимеразной цепной реакции, 2013, Кандрина П. Д., Ломакина Н. Ф., Гулюкин М. И.

7 Завьялова Е. А., Кандрина Н. Ю., Ломакина Н. Ф., Гулюкин М.И. Индикация и идентификация некоторых особоопасных вирусов рыб методом ПЦР // Рыбоводство и рыбное хозяйство, 2015. - № 3 – с. 21 - 25.

8 Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2018) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: – <http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=sommaire.htm>

METHOD OF DIAGNOSIS OF VIRAL DISEASES OF SALMONS BY MEANS OF REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

In article the technique of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for diagnosis of such viral diseases of salmon as infectious necrosis of a pancreas of salmon (IPN), infectious necrosis of hematopoietic tissue (IHN) and viral hemorrhagic septicemia (VHS) are described, a way of sampling for a research, the nucleotide sequence of the used primers and a temperature cycle of amplification are presented, the importance of diagnosis of viral diseases of fishes by means of RT-PCR for development of an aquaculture in the Russian Federation is discussed.

Keywords: aquaculture, hydrobionts, salmon, infectious pancreatic necrosis of salmon, infectious necrosis of hematopoietic tissue, viral hemorrhagic septicemia, PCR, RT-PCR, virology, virus-carriage.

Алонцева Дарья Александровна, 2019