

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ НА НАЛИЧИЕ ГЕРПЕСВИРУСА И ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ОЦЕНКА ПОЛУЧЕННОГО ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ

*Васильев Д.А., Мерчина С.В., Калабеков И.М., Кавеева А.Р.  
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»*

*Ключевые слова: SbSHV - герпесвирус, нуклеиновые кислоты, полимеразная цепная реакция (ПЦР), GeneBank.*

## Введение

Промышленному выращиванию осетровых рыб уделяется возрастающее внимание во всем мире. Это обусловлено, с одной стороны, угрозой исчезновения ценных видов осетровых рыб, а с другой, - значительным увеличением спроса на деликатесную продукцию - икру и мясо осетровых.

Вместе с тем опыт показывает, что интенсификация аквакультуры сопряжена с появлением ряда негативных факторов, одним из главных среди которых являются болезни объектов разведения. Как и в аквакультуре в целом, основной ущерб осетроводству наносят вирусные болезни [Hedrick et al., 2001]. Первые работы по изучению вирусных болезней осетровых рыб были выполнены в США Р. Хедриком в середине 80-х годов прошлого столетия, в лаборатории которого получены первые линии клеток белого осетра и впервые выделены вирусы осетровых рыб. На сегодня у североамериканских видов осетровых обнаружено 10 разных вирусов, наиболее опасными из которых являются: аденовирус, иридовирус и два герпесвируса белого осетра [Hedrick et al., 1985; Watson et al, 1995; Georgiadis et al., 2000]. Эти вирусы вызывают болезни у мальков и сеголетков белого осетра, которые обычно развиваются весной или в начале лета, реже - осенью. Осетроводство в России в последние годы становится одной из наиболее перспективных отраслей аквакультуры. В результате обследований культивируемых осетровых рыб вирусных агентов до последнего времени обнаружено не было [Щелкунов И.С, 2000; 2006]. Весной 2006 г. на племенном рыбоводном предприятии - Конаковском заводе товарного осетроводства (КЗТО, Тверская обл.) наблюдали массовую гибель сеголетков сибирского осетра, *Acipenser baeri*, которая в отдельных партиях доходила до 100%. Аналогичные вспышки болезни регистрировали позднее в других осетровых хозяйствах.

Исключение паразитов и бактерий как возможных возбудителей указывало на необходимость проведения исследований по установлению роли вирусов в этиологии этой болезни.

Целью данной работы является аппликация метода ПЦР в структуру ветеринарно-санитарной экспертизы промысловых рыб.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Выделить нуклеиновые кислоты из исследуемых проб рыбы семейства осетровых.

2. Поставить ПЦР в режиме «реального» времени.

3. Проанализировать полученный результат.

Материалы и методы исследований

Материалом для выполнения исследования послужили внутренние органы охлажденной рыбы семейства осетровых из Московской области, г.Орехово-Зуево, ООО «МИГЕКО». Были отобраны 7 проб от биоматериала :

- Сердце
- Печень
- Почки
- Ротовой аппарат
- Жабры
- Мышечная ткань у хвоста
- Верхние плавники

Отбор проб проводили с соблюдением условий асептики, исключая возможность попадания микроорганизмов из внешней среды. Для анализа пробы отбирали стерильными инструментами по (20-30г) в стерильные полипропиленовые пробирку на 1,5см<sup>3</sup> и подписывали маркером.

Для анализа нуклеотидного состава ДНК герпесвируса осетра были использованы базы данных GeneBank. Для разработки специфических праймеров и зондов использовали пакет прикладных программ «Oligo 6.0». Специфичность рассчитанных олигонуклеотидов проверяли при помощи интернет-сервиса BLAST (<http://www.ncbi.gov.nlm.com>).

Для проведения ПЦР-РВ был использован программируемый термоциклер «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия). Постановку полимеразной цепной реакции проводили в микропробирках емкостью 0.2мл.

**Таблица. Состав реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ:**

№ п/п	Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на N проб (мкл)
1	Бидистиллированная вода	9.5	9.5 x (N+1)
2	5-кратный ПЦР буфер	5	5 x (N+1)
3	Смесь праймеров (10pM)	2	2 x (N+1)
4	dNTP	1	1 x (N+1)
5	Магний хлористый (25mM)	2	2 x (N+1)
6	Зонд (10pM)	0,5	0,5 x (N+1)
7	Фермент Taq-полимераза	0,15	0,15 x (N+1)

Реактивы вносили в последовательности, приведенной в таблице. В последнюю очередь добавляли фермент. Смесь перемешивали и разливали по 20 мкл в предварительно промаркированные пробирки для ПЦР. В соответствующие пробирки вносили по 5мкл нуклеиновой кислоты. Пробирки с готовой ПЦР-смесью встряхивали на смесителе на смесителе, все капли со стенок осаждали центрифугированием в течение 5-10 сек.

Переносили пробирки в амплификатор и проводили ПЦР при следующих

температурных режимах:

- Активация TaqF-полимеразы при 95°C – 5мин
- Денатурация при 95°C – 20сек;
- Отжиг при 60°C – 20сек; 1этап в течение 5циклов
- Элонгация при 72°C – 20сек;
- Денатурация при 95°C – 20сек;
- Отжиг при 60°C – 20сек., учет сигнал 2этап – 35 циклов
- Элонгация при 72°C – 20сек.

Параллельно с исследуемыми образцами ставили отрицательный контрольный образец (с деионизированной водой). Смесь для контрольного образца готовили по той же прописи, что и для анализируемых образцов.

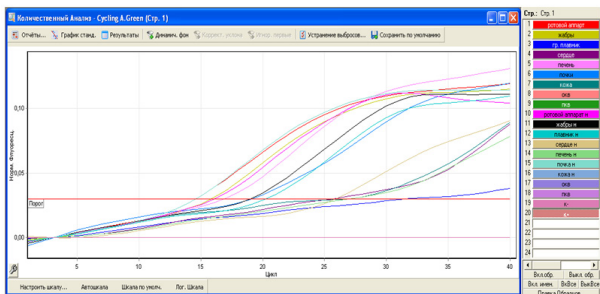
Результаты исследований

Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флюоресценции с установленной на соответствующем уровне (0.05) пороговой линии (treshhold) значения порогового цикла «Ct».

Образец считали отрицательным, если значение «Ct» по каналу FAM отсутствовало.

Результат учитывали только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения нуклеиновых кислот.

Результаты исследования образцов внутренних органов рыбы семейства осетровых с помощью ПЦР в режиме «реального» времени представлены на рисунке 1.



№	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта	Конц. Расч. (Ког)	Коефф. Ва	Сред. Ст
1	ротовой аппарат	Образец	14,60				14,60
2	жабры	Образец	15,86				15,86
3	гр. плавник	Образец	31,73				31,73
4	сердце	Образец	25,62				25,62
5	печень	Образец	16,92				16,92
6	почки	Образец	19,14				19,14
7	кожа	Образец	26,86				26,86
8	окв	Образец					
9	пкв	Образец					

Рис. 1. - Кривая флюоресценции проб №1, №2, №3, №4, №5, №6, №7, ОКВ, ПВК. Образец №4 и №5 дал положительный результат..

#### Заключение

В ходе данной работы нам удалось выделить нуклеиновые кислоты из всех 7 проб охлажденной рыбы семейства осетровых: Сердце, Печень, Почки, Ротовой аппарат, Жабры, Мышечная ткань у хвоста, Верхние плавники. Методом Real time PCR мы провели выявление герпесвируса (? ) анализируемых проб. Таким образом, в результате проведенных исследований были выявлены две пробы с положительным результатом, это №4- сердце и №5- печень, можно заключить, что данные две пробы контаминированы герпесвирусом .

В настоящее время нет доказательств заражения и клинических проявлений заболевания у людей. Поэтому ветеринарно - санитарная оценка при данной инфекции не разработана. Считаю необходимым работникам здравоохранения обратить особое внимание на указанное заболевание, так как возможность заражения человека герпесвирусом не исключена.

#### Библиографический список

1. Щелкунов А.И. Биологические, физико-химические и молекулярно-генетические свойства герпесвируса сибирского осетра. – 2010. №. – С.14 С.52
2. Герпесвирусная болезнь у осетровых рыб в России/ И.С. Щелкунов, Т.Н. Щелкунова, А.И. Щелкунов, Ю.П. Колбасова, Л.В. Диденко, А.Ф. Быковский// Российский вет. журнал. Сельскохозяйственные животные. - 2007. - № 1. - С. 10-12.
3. Щелкунов, А.И. Герпесвирусная болезнь сибирского осетра/ А.И. Щелкунов, И.С. Щелкунов//Ветеринария.-2010. -№ 1.-С. 18-21.
4. Щелкунов, А.И. Биологические свойства герпесвируса сибирского осетра in vitro/ Щелкунов А.И., Щелкунова Т.П. // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси: сб. науч. трудов. - Минск: РУП Институт рыбного хозяйства, 2008. - Вып. 24. - С. 501-503.

## MOLECULAR GENETIC RESEARCH METHODS FOR THE PRESENCE OF STURGEON HERPESVIRUS AND SANITARY AND VETERINARY EVALUATION OF THE FOOD RAW MATERIALS

*Vasilyev D.A., Merchina S.V., Kalabekov I.M., Kaveeva A.R.  
VPO «Ulyanovsk State Agricultural Academy named. PA Stolypin»*

**Keywords:** *SbSHV - herpes virus, nucleic acid polymerase chain reaction (PCR), GeneBank.*