

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 1,5см³ 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.

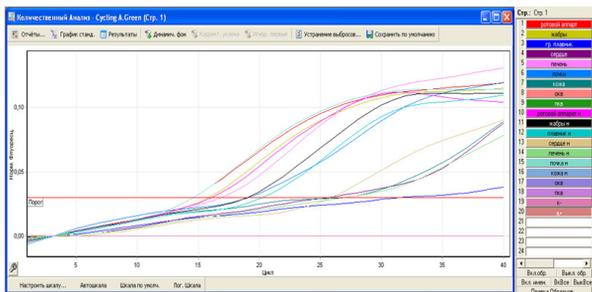
Результаты исследований

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.*