Применение полимеразной цепной реакции для выявления возбудителей некоторых особо опасных вирусных болезней рыб

А. С. Тарасова¹, А. В. Перчун², В. П. Мельников³

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0002-0387-2694, e-mail: 686778562@mail.ru

² ORCID 0000-0003-4807-4335, e-mail: perchun@arriah.ru

³ ORCID 0000-0003-2766-2875, e-mail: melnikov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В настоящее время основной ущерб мировой аквакультуре наносят вирусные болезни рыб. Возбудители болезней часто проникают из одних рыболовных хозяйств в другие при перевозках инфицированных рыб из неблагополучных хозяйств в благополучные. Поэтому завоз рыбопосадочного материала в Россию из стран с различной эпизоотологической ситуацией требует мониторинга и прогнозирования на основе возможных рисков. Ведущее место в комплексе мероприятий по предотвращению распространения вирусных инфекций рыб занимает диагностика. На сегодняшний день лабораторная диагностика болезней рыб вирусной природы основана на выделении возбудителя и его идентификации серологическими методами, которые требуют больших затрат времени и выполняются только в крупных научно-исследовательских институтах, имеющих профильные лаборатории. Более чувствительными и высокопроизводительными являются молекулярные методы диагностики. В статье представлены результаты применения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией по выявлению ряда особо опасных вирусных болезней рыб семейства лососевых. В результате проделанной работы были подобраны праймеры и оптимизированы температурно-временные условия проведения реакции для идентификации инфекционного некроза гемопоэтической ткани, вирусной геморрагической септицемии и инфекционной анемии лососевых. Результаты, полученные в ходе исследований, позволили установить, что данный диагностический метод является высокоспецифичным с аналитической чувствительностью для вируса инфекционной анемии лососевых – $2,5 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, инфекционного некроза гемопоэтической ткани – $2,9 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и вирусной геморрагической септицемии – $4,2 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. С помощью описанного метода была проведена идентификация референтных и полевых штаммов, имеющихся в референтной лаборатории по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ» и выделенных в разные годы в рыболовческих хозяйствах на территории Российской Федерации. Данные, полученные в ходе исследований, коррелировали с результатами вирусного выделения на культуре клеток и иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов. Предложенная методика проведения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией позволяет обнаружить возбудителей болезней у рыб как с явными клиническими признаками, так и со скрытым вирусоносительством.

Ключевые слова: болезни рыб, инфекционная анемия лососевых, вирусная геморрагическая септицемия, инфекционный некроз гемопоэтической ткани, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, специфичность, аналитическая чувствительность.

Для цитирования: Тарасова А. С., Перчун А. В., Мельников В. П. Применение полимеразной цепной реакции для выявления возбудителей некоторых особо опасных вирусных болезней рыб. *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 11–16. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-11-16.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Перчун Алексей Валерьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: perchun@arriah.ru.

UDC 619:639.3.09:577.2

Polymerase chain reaction for detection of some highly dangerous viral fish disease agents

A. S. Tarasova¹, A. V. Perchun², V. P. Melnikov³

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0002-0387-2694, e-mail: 686778562@mail.ru

² ORCID 0000-0003-4807-4335, e-mail: perchun@arriah.ru

³ ORCID 0000-0003-2766-2875, e-mail: melnikov@arriah.ru

SUMMARY

Today viral fish diseases cause major losses in the world aquaculture. Pathogen spread often occurs during the transportation of fish from infected farms to the disease-free ones. Therefore, the import of fish stocking material to Russia from countries with a different epidemic situation requires risk-based monitoring and

forecasting. Diagnostics is of primary importance in the complex of measures to prevent the spread of viral infections in fish. To date, laboratory diagnostics of viral fish diseases is based on pathogen isolation and its identification using serological methods which require a lot of time and are performed only in large research institutes with specialized laboratories. Molecular diagnostic methods are more sensitive and high-performance. The article presents the results of using reverse transcription polymerase chain reaction to detect a number of highly dangerous viral diseases of fish (*Salmonidae*). As a result of this work, primers were selected and the temperature and time conditions of the reaction were optimized for the identification of infectious hematopoietic necrosis, viral hemorrhagic septicemia and infectious salmon anemia. The results obtained during the research allowed us to establish that this diagnostic method is highly specific with analytical sensitivity to infectious salmon anemia virus of $2.5 \lg \text{TCD}_{50}/\text{cm}^3$, to infectious hematopoietic necrosis – $2.9 \lg \text{TCD}_{50}/\text{cm}^3$ and to viral hemorrhagic septicemia – $4.2 \lg \text{TCD}_{50}/\text{cm}^3$. The described method was used to identify reference and field strains available at the FGBI ARRIAH Reference Laboratory for Aquaculture Diseases and isolated in different years in fish farms in the territory of the Russian Federation. The research data correlated with the results obtained from virus neutralization in cell culture and ELISA performed using commercial kits. The proposed method of RT-PCR allows to detect pathogens both in fish with pronounced clinical signs and in latent virus carriers.

Key words: fish diseases, infectious salmon anemia, viral hemorrhagic septicemia, infectious hematopoietic necrosis, reverse transcription polymerase chain reaction, specificity, analytical sensitivity.

For citation: Tarasova A. S., Perchun A. V., Melnikov V. P. Polymerase chain reaction for detection of some highly dangerous viral fish disease agents. *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 11–16. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-11-16.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Alexey V. Perchun, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher of the Reference Laboratory for Aquaculture Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: perchun@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Болезни рыб вирусной природы очень широко распространены во всем мире. Около четверти выявленных вирусов вызывают заболевания, наносящие серьезный ущерб аквакультуре. К наиболее опасным относятся инфекционный некроз гемопоэтической ткани, инфекционная анемия лососевых, вирусная геморрагическая септицемия и др.¹ Несмотря на то что большинство инфекций не представляют прямой угрозы здоровью человека, они отрицательно влияют на темп роста рыб, товарный вид, качество рыбопродукции, а также сопровождаются высокой летальностью [1].

Во всем мире главным направлением в борьбе с заразными болезнями рыб является профилактика, а именно – предотвращение проникновения патогенов в регионы, где они отсутствуют. Из этого следует, что завоз рыбопосадочного материала в Россию из стран с различной эпизоотологической ситуацией требует мониторинга и прогнозирования на основе возможных рисков [2, 3, 4].

В комплексе мероприятий по предотвращению распространения вирусных инфекций рыб ведущее место принадлежит диагностике. На сегодняшний день лабораторная диагностика всех перечисленных заболеваний основана на выделении вируса и его идентификации серологическими методами, которые требуют больших затрат времени и выполняются только в крупных научно-исследовательских институтах, имеющих профильные лаборатории [1, 5].

Молекулярные методы диагностики более чувствительны и требуют меньше времени, чем культивирование и серологические методы, традиционно используемые для идентификации возбудителей вирусных заболеваний рыб. В течение последних десятилетий молекулярная диагностика заболеваний значительно продвинулась, в том числе и при выявлении заболеваний рыб. К числу таких методов относится полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая позволяет обнаружить вирус у рыб как с явными

клиническими признаками, так и со скрытым вирусоносительством².

В России отсутствуют методы, сочетающие невысокую стоимость анализа, простоту в использовании, а главное, высокую чувствительность. На отечественном рынке предлагаются только импортные наборы и тест-системы для диагностики вирусных болезней рыб.

Целью настоящего исследования являлась оценка возможности применения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для индикации и идентификации таких особо опасных возбудителей вирусных болезней рыб семейства лососевых, как вирусная геморрагическая септицемия, инфекционный некроз гемопоэтической ткани и инфекционная анемия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали: штамм «Оренбург/14» вируса весенней виремии карповых (ВБК), штамм «Аркус 32/87» вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани (ИНГТ), штамм «FLD/2004» вируса инфекционного некроза поджелудочной железы (ИНПЖ) и штамм «Аланд» вируса геморрагической септицемии лососевых (ВГС), находящиеся на хранении в коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ», а также штамм «ССВВ» вируса инфекционной анемии лососевых (ИАЛ), полученный в 2019 г. из Американской коллекции типовых культур (ATCC).

Выделение суммарной РНК исследуемых вирусов проводили с использованием коммерческого набора реагентов «РНК-Экстрен» («Синтол», Россия) согласно

¹ Васильков Г. В., Грищенко Л. И., Енгашев В. Г., Канаев А. И., Ларькова З. И., Осетров В. С. Болезни рыб: справочник. Под ред. В. С. Осетрова. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат; 1989. 288 с.

² Воронин В. Н., Кузнецова Е. В., Стрелков Ю. А., Чернышева Н. Б. Болезни рыб в аквакультуре России: практическое руководство. СПб.: ФГБУ «ГосНИОРХ»; 2011. 264 с.

рекомендациям фирмы-производителя. Для получения кДНК на матрице выделенной РНК использовали комплект реагентов «ОТ-1» («Синтол», Россия) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Реакционную смесь для постановки ПЦР готовили в объеме 25 мкл с использованием набора реактивов «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген», Россия) согласно инструкции к набору. ПЦР проводили в термоциклере «PTC-200 DNA Engine Cycler» (Bio-Rad, США). Последовательности праймеров, используемых для постановки ПЦР, были опубликованы ранее [6, 7, 8]. Праймеры были синтезированы в компании «Синтол» (Россия).

Полученные в ходе ПЦР ампликоны анализировали с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле с добавлением бромистого этидия (10 мг/мл) в течение 1 ч при напряжении 10 В/см в 1× трисборатном буфере. В лунку геля вносили по 15 мкл продукта ПЦР. В качестве маркера молекулярных весов использовали «M100» с шагом в 100 п. н. («Синтол», Россия) в количестве 5 мкл. По окончании электрофореза гель анализировали с помощью системы гель-документирования «Gel Doc XR+» (Bio-Rad, США).

Аналитическую чувствительность оценивали путем исследования серии последовательных десятикратных разведений кДНК, полученной из анализируемых вирусов. Пределом чувствительности считали наибольшее разведение, при котором регистрировали положительный результат.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании проведенного анализа последовательностей генома исследуемых вирусов, представленных в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации США (NCBI), и рекомендаций Всемирной организации здравоохранения животных (OIE) были выбраны праймеры к консервативным участкам 8-го сегмента вируса ИАЛ, нуклеокапсида (N) вируса ВГС и гена G вируса ИНГТ, позволяющие идентифицировать максимальное количество известных штаммов и изолятов этих вирусов. Последовательности праймеров представлены в таблице 1.

При проведении серии экспериментов были подобраны температурные и временные условия постановки ПЦР. При амплификации фрагмента генома вируса ИНГТ количество циклов было увеличено с 30 до 35, что позволило наработать большее число ампликонов, тем самым увеличилась чувствительность реакции. При амплификации фрагмента генома вируса ИАЛ время отжига праймеров было уменьшено с 45 до 30 с, а синтеза – с 90 до 60 с, что позволило сократить время реакции без потери ее эффективности. При амплификации фрагмента генома вируса ВГС температура отжига праймеров была увеличена с 52 до 55 °С, что позволило увеличить специфичность реакции.

Оптимизированные параметры амплификации для исследуемых инфекций представлены в таблице 2.

Специфичность подобранных праймеров была проверена экспериментально при исследовании культур после инокуляции вирусами ВВК, ВГС, ИНПЖ, ИНГТ и ИАЛ с помощью ОТ-ПЦР. Полученные после амплификации фрагменты геномов данных вирусов анализировали с помощью гель-электрофореза. Гель просматривали в коротковолновом УФ-свете (длина волны 312 нм) и результаты реакции интерпретировали по наличию или отсутствию светящихся полос.

Таблица 1

Структура праймеров для выявления возбудителей инфекционной анемии лососевых, вирусной геморрагической септицемии и инфекционного некроза гемопоэтической ткани

Table 1

Structure of primers for detection of pathogens of infectious salmon anemia, viral hemorrhagic septicemia and infectious hematopoietic necrosis

Последовательность (5' –3') праймеров	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Источник
ИАЛ		
F – GAAGAGTCAGGATGCCAAGACG	211	M. Devold et al. [6]
R – GAAGTCGATGAAGTCAGCGA		
ВГС		
F – GGGGACCCAGACTGT	811	OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals [8]
R – TCTCTGTACCTTGATCC		
ИНГТ		
F – AGAGATCCCTACACCAGAGAC	693	E. J. Emmenegger et al. [7]
R – GGTGGTGTGTTTCCTGCAA		

F – forward (прямой праймер);
R – reverse (обратный праймер).

На рисунке 1 представлены электрофореграммы проведенного анализа.

Из представленных на рисунке 1 данных видно, что в лунках № 2 со штаммами вирусов ИНГТ, ИАЛ и ВГС наблюдаются четкие фрагменты на уровне 693 п. н. (а), 211 п. н. (б) и 811 п. н. (с) соответственно. В остальных лунках, включая отрицательный контроль реакции, данные фрагменты не наблюдаются, что свидетельствует о высокой специфичности подобранных праймеров для выявления возбудителей вышеперечисленных инфекций и отсутствии контаминации используемых реагентов исследуемой или посторонней РНК.

Аналитическую чувствительность оценивали путем исследования серии последовательных десятикратных разведений кДНК, полученной после проведенной

Таблица 2

Параметры амплификации

Table 2

Amplification parameters

Стадия ПЦР	Количество циклов	Температура, °С	Длительность стадии, мин
Предварительная денатурация	1	94	3
Денатурация	35	94	1/2
Отжиг праймеров		59 (ИАЛ) 50 (ИНГТ) 55 (ВГС)	1/2
Синтез	72		1
Заключительный синтез	1	72	7
Хранение	1	4	20

Рис. 1. Электрофореграммы результатов тестирования специфичности метода ОТ-ПЦР для выявления вирусов ИНГТ (а), ИАЛ (б) и ВГС (с)

- а) 1 – маркер молекулярных весов «М100»;
2 – штамм «Аркус 32/87» вируса ИНГТ;
3 – штамм «Аланд» вируса ВГС;
4 – штамм «FLD/2004» вируса ИНПЖ;
5 – штамм «Оренбург/14» вируса ВВК;
6 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз);
- б) 1 – маркер молекулярных весов «М100»;
2 – штамм «ССВВ» вируса ИАЛ;
3 – штамм «Оренбург/14» вируса ВВК;
4 – штамм «Аланд» вируса ВГС;
5 – штамм «Аркус 32/87» вируса ИНГТ;
6 – штамм «FLD/2004» вируса ИНПЖ;
7 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз);
- с) 1 – маркер молекулярных весов «М100»;
2 – штамм «Аланд» вируса ВГС;
3 – штамм «Аркус 32/87» вируса ИНГТ;
4 – штамм «FLD/2004» вируса ИНПЖ;
5 – штамм «Оренбург/14» вируса ВВК;
6 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз).

Fig. 1. Electrophoregrams showing RT-PCR specificity testing results for detection of infectious hematopoietic necrosis (IHN) (a), infectious salmon anemia (ISA) (b) and viral hemorrhagic septicemia (VHS) (c) viruses

- а) 1 – molecular weight markers "M100";
2 – Arcus 32/87 strain of the IHN virus;
3 – Aland strain of the VGS virus;
4 – FLD/2004 strain of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus;
5 – Orenburg/14 strain of the spring viraemia of carp (SVC) virus;
6 – negative control (sterile water free of RNase and DNase);
- б) 1 – molecular weight markers "M100";
2 – CCBB strain of the infectious salmon anemia (ISA) virus;
3 – Orenburg/14 strain of the spring viraemia of carp (SVC) virus;
4 – Aland strain of the VGS virus;
5 – Arcus 32/87 strain of the IHN virus;
6 – FLD/2004 strain of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus;
7 – negative control (sterile water free of RNase and DNase);
- с) 1 – molecular weight markers "M100";
2 – Aland strain of the VGS virus;
3 – Arcus 32/87 strain of the IHN virus;
4 – FLD/2004 strain of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus;
5 – Orenburg/14 strain of the spring viraemia of carp (SVC) virus;
6 – negative control (sterile water free of RNase and DNase).

реакции обратной транскрипции с выделенной РНК, произведенной из культуральных штаммов вирусов ИАЛ, ВГС и ИНГТ с исходным титром их инфекционной активности 5,5; 7,2 и 6,9 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно. Пределом чувствительности считали наибольшее

разведение, при котором регистрировали положительный результат. Рассчитанные значения аналитической чувствительности оптимизированной ПЦР составили 2,5 lg ТЦД₅₀/см³ для вируса ИАЛ, 2,9 lg ТЦД₅₀/см³ для вируса ИНГТ и 4,2 lg ТЦД₅₀/см³ для вируса ВГС.

Результаты тестирования аналитической чувствительности представлены на рисунке 2 и в таблице 3.

Таким образом, предложенный метод ОТ-ПЦР позволяет выявлять вирусы ИАЛ, ИНГТ и ВГС с минимальным титром инфекционной активности 2,5; 2,9 и 4,2 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно. Специфичность подобранных праймеров была проверена с помощью программы BLAST, а также экспериментально. Результаты ПЦР, представленные на рисунке 1, показали, что выбранные праймеры гибридизируются только с фрагментами, комплементарными искомым вирусам, и не взаимодействуют с РНК других вирусов.

С помощью описанного метода была проведена идентификация референтных и полевых штаммов, имеющих в референтной лаборатории по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ» и выделенных в разные годы в рыбоводческих хозяйствах на территории Российской Федерации. Данные, полученные в ходе исследований с применением ОТ-ПЦР, коррелировали с результатами, полученными методом вирусыведения на культуре клеток и методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов фирм-производителей TestLine Clinical Diagnostics Ltd (Чехия) и Bio-X Diagnostics S.A. (Бельгия).

Представленные в статье результаты по использованию классической ОТ-ПЦР с детекцией результатов в агарозном геле хоть и подтверждают эффективность данного диагностического метода, проверенного временем, но все же он уступает более современным молекулярно-генетическим методам диагностики, таким как ОТ-ПЦР в режиме реального времени и ОТ-ПЦР в формате микрочипов. Основными преимуществами последних двух методов являются: большая чувствительность, меньшие затраты времени на постановку и проведение самой реакции, а также снижение контаминации в связи с отсутствием стадии гелеэлектрофореза. Несмотря на ряд преимуществ ОТ-ПЦР в режиме реального времени, данный метод в нашей стране при диагностике вирусных болезней рыб не получил широкого распространения и был реализован только М. И. Дорониным с соавт. совместно с сотрудниками компании ООО «Люмэкс-маркетинг» (г. Санкт-Петербург) при выявлении ИНГТ и ВГС [9].

Отметим, что в России данные по использованию метода ОТ-ПЦР в диагностике таких вирусных болезней рыб, как ИНГТ, ВГС и ИАЛ, малочисленны. Имеется лишь ограниченное число публикаций по разработке и использованию этого молекулярно-генетического метода [2, 9, 10, 11], в то время как за рубежом он получил широкое распространение. Во многих странах избирательная амплификация отдельных участков вирусного генома с помощью ПЦР с последующим секвенированием используется не только для диагностики вирусов ИНГТ, ВГС и ИАЛ, но и для разработки методов по их типированию [12, 13, 14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были подобраны праймеры и оптимизированы температурно-временные условия проведения ПЦР для выявления

Таблица 3
Результаты определения аналитической чувствительности оптимизированной ОТ-ПЦР

Table 3
Determination of optimized RT-PCR analytical sensitivity

№ п/п	Разведение	Титр инфекционной активности вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	Результат ОТ-ПЦР
ИАЛ			
1	исходный образец	5,5	+
2	10^{-1}	4,5	+
3	10^{-2}	3,5	+
4	10^{-3}	2,5	+
5	10^{-4}	1,5	–
6	10^{-5}	0,5	–
ИНГТ			
1	исходный образец	6,9	+
2	10^{-1}	5,9	+
3	10^{-2}	4,9	+
4	10^{-3}	3,9	+
5	10^{-4}	2,9	+
6	10^{-5}	1,9	–
ВГС			
1	исходный образец	7,2	+
2	10^{-1}	6,2	+
3	10^{-2}	5,2	+
4	10^{-3}	4,2	+
5	10^{-4}	3,2	–
6	10^{-5}	2,2	–

«+» – положительный результат реакции;

«–» – отрицательный результат реакции.

таких вирусных болезней рыб, как вирусная геморрагическая септицемия, инфекционный некроз гемопоэтической ткани и инфекционная анемия лососевых.

Показано, что данный диагностический метод является высокоспецифичным и имеет аналитическую чувствительность $2,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ при выявлении вируса инфекционной анемии лососевых, $2,9 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ – вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани и $4,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ – вируса вирусной геморрагической септицемии. Метод ОТ-ПЦР позволил сократить время проведения анализа до 5 ч, в то время как «золотой» стандарт – вирусывыделение – занимает несколько недель.

Предложенная ОТ-ПЦР может быть использована для выявления вирусов ИАЛ, ИНГТ и ВГС при мониторинговых исследованиях проб патологического материала от рыб семейства лососевых. Особенностью данной реакции является то, что она позволяет выявить инфицированных рыб до появления клинических

Рис. 2. Электрофореграммы результатов тестирования аналитической чувствительности ПЦР для выявления вирусов ИАЛ (а), ИНГТ (б) и ВГС (с)

- а) 1 – маркер молекулярных весов «М100»;
2 – исходный образец (штамм «ССВВ» вируса ИАЛ);
3–7 – серия десятикратных разведений штамма «ССВВ» вируса ИАЛ (10^{-1} – 10^{-5});
8 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз);
б) 1 – маркер молекулярных весов «М100»;
2 – исходный образец (штамм «Аркус 32/87» вируса ИНГТ);
3–7 – серия десятикратных разведений штамма «Аркус 32/87» вируса ИНГТ (10^{-1} – 10^{-5});
8 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз);
с) 1 – маркер молекулярных весов «М100»;
2 – исходный образец (штамм «Аланд» вируса ВГС);
3–7 – серия десятикратных разведений штамма «Аланд» вируса ВГС (10^{-1} – 10^{-5});
8 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз).

Fig. 2. Electrophoregrams showing PCR analytical sensitivity testing results for detection of ISA (a), INGV (b) and HCV (b) viruses

- а) 1 – molecular weight markers “M100”;
2 – original sample (CCBB strain of the ISA virus);
3–7 – a series of ten-fold dilutions of CCBB strain of the ISA virus (10^{-1} – 10^{-5});
8 – negative control (sterile water free of RNase and DNase);
б) 1 – molecular weight markers “M100”;
2 – original sample (Arcus 32/87 strain of the IHNV virus);
3–7 – a series of ten-fold dilutions of CCBB strain of the ISA virus (10^{-1} – 10^{-5});
8 – negative control (sterile water free of RNase and DNase);
с) 1 – molecular weight markers “M100”;
2 – original strain (Aland strain of the VGS virus);
3–7 – a series of ten-fold dilutions of Aland strain of the VGS virus (10^{-1} – 10^{-5});
8 – negative control (sterile water free of RNase and DNase).

признаков, в случае скрытого вирусоносительства, что особенно важно при трансграничных перевозках гидробионтов.

По результатам проведенных исследований были подготовлены и утверждены на ученом совете ФГБУ «ВНИИЗЖ» методические рекомендации по выявлению возбудителей ИНГТ, ВГС и ИАЛ методом ОТ-ПЦР с детекцией результатов в агарозном геле.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 6–8, 11–14 см. REFERENCES)

- Павлов Д. К., Пичуева А. А. Анализ эпизоотической ситуации в мире по вирусным болезням рыб. *Ветеринария сегодня*. 2015; 2 (13): 54–58. Режим доступа: <https://veterinary.aria.ru/jour/article/view/196>.
- Завьялова Е. А., Кандрин Н. Ю., Ломакина Н. Ф., Гулюкин М. И. Идентификация и идентификация некоторых особо опасных вирусов рыб методом ПЦР. *Рыбоводство и рыбное хозяйство*. 2015; 3: 21–25. eLIBRARY ID: 23833996.

3. Рахконен Р., Веннерстрем П., Ринтамяки П., Каннел Р. Здоровая рыба – профилактика, диагностика и лечение болезни. 2-е изд., перераб. и доп. Хельсинки: НИИ охотничьего и рыбного хозяйства Финляндии; 2013. 177 с. Режим доступа: <https://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/537337/Terve%20kala.rus.pdf?sequence=1>.

4. Щелканов М. Ю., Шульгина М. А., Степанков А. П., Львов Д. Н., Какарека Н. Н., Шестопалов А. М., Галкина И. В., Шевченко О. Г. Инфекционная анемия лососевых. *Юг России: экология, развитие*. 2017; 12 (2): 120–134. DOI: 10.18470/1992-1098-2017-2-120-134.

5. Жигалева О. Н., Колбасова О. Л., Цыбанов С. Ж., Колбасов Д. В., Щелкунов И. С., Щелкунова Т. И. Выявление РНК возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб методом ПЦР. *Ветеринария*. 2006; 9: 24–26. eLIBRARY ID: 9242745.

9. Доронин М. И., Котова Е. В., Никитин М. М., Мудрак Н. С. Одновременная идентификация вирусов лососевых рыб с помощью метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в формате микрочипов. *Молекулярная диагностика 2017: сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. Под ред. В. И. Покровского. Т. 2. Тамбов: ООО «Фирма Юлис», 2017; 367–368. Режим доступа: https://kpfu.ru/staff_files/F1634184337/Tom_2_s_oblozhkoj.pdf.

10. Попова А. Г., Орешкова С. Ф., Щелкунов И. С., Рудакова С. Л., Щелкунова Т. И., Тикунова Н. В., Блинова Н. Н., Ильичев А. А. Методы идентификации и типирования вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб на основе ОТ-ПЦР. *Вопросы вирусологии*. 2008; 53 (3): 39–43. eLIBRARY ID: 11519442.

REFERENCES

1. Pavlov D. K., Pichuyeva A. A. Analysis of fish viral disease epidemic situation worldwide. *Veterinary Science Today*. 2015; 2 (13): 54–58. Available at: <https://veterinary.arriah.ru/jour/article/view/196>. (in Russian)

2. Zavyalova E. A., Kandrina N. Yu., Lomakina N. F., Gulyukin M. I. Indication and indication of dangerous and quarantine fish diseases based on reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR). *Rybovodstvo i rybnoe hozyajstvo*. 2015; 3: 21–25. eLIBRARY ID: 23833996. (in Russian)

3. Rahkonen R., Wennerstrom P., Rintamaki P., Kannell R. Healthy fish-prevention, diagnosis and treatment of the disease. 2nd ed., revised. Helsinki: Finnish Game and Fisheries Research Institute; 2013. 177 p. Available at: <https://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/537337/Terve%20kala.rus.pdf?sequence=1>. (in Russian)

4. Shchelkanov M. Y., Shulgina M. A., Stepan'kov A. P., Lvov D. N., Kakareka N. N., Shestopalov A. M., Galkina I. V., Shevchenko O. G. Infectious Salmon anemia. *South of Russia: ecology, development*. 2017; 12 (2): 120–134. DOI: 10.18470/1992-1098-2017-2-120-134. (in Russian)

5. Zhigalyeva O. N., Kolbasova O. L., Tsybanov S. Zh., Kolbasov D. V., Schelkunov I. S., Schelkunova T. I. Differentiation of RNA of the virus for fish

haemorrhagic septicemia with the PCR method. *Veterinariya*. 2006; 9: 24–26. eLIBRARY ID: 9242745. (in Russian)

6. Devold M., Krossøy B., Aspehaug V., Nylund A. Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Dis. Aquat. Organ*. 2000; 40 (1): 9–18. DOI: 10.3354/dao040009.

7. Emmenegger E. J., Meyers T. R., Burton T. O., Kurath G. Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska. *Dis. Aquat. Organ*. 2000; 40 (3): 163–176. DOI: 10.3354/dao040163.

8. Viral haemorrhagic septicaemia. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. OIE. 2019. Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_vhs.pdf.

9. Doronin M. I., Kotova E. V., Nikitin M. M., Mudrak N. S. Simultaneous identification of salmon viruses using reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) in microchip format [Odnovremennaya identifikatsiya virusov lososyevykh ryb s pomoshch'yu metoda obratnoy transkripcii i polimeraznoy cepnoj reakcii v rezhime real'nogo vremeni (OT-PCR-RV) v formate mikrochipov]. *Molecular diagnostics 2017: Proceedings of the IX all-Russian scientific and practical conference with international participation*. Ed. by V. I. Pokrovsky. Vol. 2. Tambov: ООО «Юлис», 2017; 367–368. Available at: https://kpfu.ru/staff_files/F1634184337/Tom_2_s_oblozhkoj.pdf. (in Russian)

10. Popova A. C., Oreshkova S. F., Shchelkunov I. S., Rudakova S. L., Shchelkunova T. I., Tikunova N. V., Blinova N. N., Ilyichov A. A. RT-PCR-based methods for identification and typing of infectious hemopoietic necrosis virus in salmon. *Voprosy Virusologii*. 2008; 53 (3): 39–43. eLIBRARY ID: 11519442. (in Russian)

11. Rudakova S. L., Kurath G., Bochkova E. V. Occurrence and genetic typing of infectious hematopoietic necrosis virus in Kamchatka, Russia. *Dis. Aquat. Organ*. 2007; 75 (1): 1–11. DOI: 10.3354/dao075001.

12. Einer-Jensen K., Ahrens P., Lorenzen N. Parallel phylogenetic analyses using the N, G or Nv gene from a fixed group of VHSV isolates reveal the same overall genetic typing. *Dis. Aquat. Organ*. 2005; 67 (1–2): 39–45. DOI: 10.3354/dao067039.

13. Johansson T., Einer-Jensen K., Batts W., Ahrens P., Björklund C., Kurath G., Björklund H., Lorenzen N. Genetic and serological typing of European infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates. *Dis. Aquat. Organ*. 2009; 86 (3): 213–221. DOI: 10.3354/dao02108.

14. Kibenge M. J., Iwamoto T., Wang Y., Morton A., Routledge R., Kibenge F. S. Discovery of variant infectious salmon anaemia virus (ISAV) of European genotype in British Columbia, Canada. *Virol. J*. 2016; 13:3. DOI: 10.1186/s12985-015-0459-1.

Поступила 09.12.19

Принята в печать 03.03.20

Received on 09.12.19

Approved for publication on 03.03.20

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Тарасова Алена Сергеевна, аспирант референтной лаборатории по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Перчун Алексей Валерьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Мельников Владимир Петрович, кандидат ветеринарных наук, заведующий референтной лабораторией по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Alyona S. Tarasova, Post-Graduate Student of the Reference Laboratory for Aquaculture Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexey V. Perchun, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher at the Reference Laboratory for Aquaculture Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Vladimir P. Melnikov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the Reference Laboratory for Aquaculture Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.