

УДК 619: 617

ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ЭКСПЕРТИЗА ИКРЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО» ВРЕМЕНИ ПРИ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ БОЛЕЗНИ

*Резванова Ю.Р., студентка 4 курса ФВМиБ
Научные руководители: Калабеков И.М., кандидат биологических
наук, старший научный сотрудник ВНИИВВиМ,
Мерчина С.В., кандидат биологических наук, доцент УГСХА,
Молофеева Н.И., кандидат биологических наук, доцент.
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА*

Ключевые слова: аквакультура, герпесвирус, икра, ПЦР, флюоресценция.

Работа посвящена ветеринарно-санитарной экспертизе икры осетровых рыб методом ПЦР в режиме «реального» времени при герпесвирусной болезни.

Одним из основных объектов аквакультуры в последнее время в России стали осетровые рыбы. Существует большая угроза исчезновения ценных видов осетровых, но вместе с тем спрос на деликатесную продукцию – мясо осетровых и икру с каждым днём растёт.

Вместе с тем опыт показывает, что интенсификация аквакультуры сопряжена с появлением ряда негативных факторов, одним из главных среди которых являются вирусные болезни объектов разведения.

Первые работы по изучению вирусных болезней осетровых рыб в середине 80-х годов прошлого столетия были выполнены в США Р. Хедриком, в лаборатории которого получены первые линии клеток белого осетра и впервые выделены вирусы осетровых рыб. Из 10 обнаруженных болезней, вызванные вирусами, самыми опасными являются аденовирус, иридовирус и два герпесвируса белого осетра. Эти вирусы вызывают болезни у мальков и сеголетков белого осетра [1, 2].

Самое страшное то, что вирусы, вызывая болезни у рыб самок, могут жить и в икрах. Таким образом, икра, как и сама рыба, может быть вирусоносителем.

Следует помнить, что возбудитель герпесвирусной болезни осетровых для человека и плотоядных животных не опасен. Рыбу из неблагополучного водоема, если она не потеряла товарного вида и качества, допускают в пищу людям без ограничений. Больную рыбу, не отвечающую товарному виду и кондиции, по усмотрению ветеринарного врача-ихтиопатолога направляют в корм сельскохозяйственным животным в проваренном виде или при соответствующей подготовке скармливают пушным зверям [3, 4]

Икра прежде чем попасть на стол потребителям, конечно же проходит ветеринарно-санитарную экспертизу. При ВСЭ органолептическими и лабораторными методами нельзя обнаружить такую болезнь, вызванную вирусом как герпесвирус. Поэтому для обнаружения и идентификации герпесвируса в икре проводилась ПЦР диагностика в реальном времени (рис.1).



Рисунок 1 - Постановка ПЦР.

Герпесвирусная болезнь сибирского осетра - особо опасная болезнь и характеризуется высокой контагиозностью, острым течением и массовой гибелью разновозрастной молоди сибирского осетра *Acipenser baeri* с признаками некрогеморрагического синдрома. Возбудитель высоко лабилен и быстро инактивируется в условиях водной среды (на 99,99% за 5 суток при 15°C). Переболевшие рыбы, как и их икры являются вирусоносителями [5, 6].

Цель данной работы: рассмотреть выделение герпесвируса из икры осетровых рыб путём ПЦР в реальном времени.

Актуальность: самое экономически значимый информационный агент промышленного осетроводства.

Для того чтобы разработать набор праймеров для выявления герпесвируса, сначала были отобраны из 4 банок с осетровой икрой 4 пробы с соблюдением условий асептики, исключая возможность попадания микроорганизмов из внешней среды.

Для выявления генома герпесвируса икры осетровых рыб проводилось выделение ДНК методом нуклеосорбции. При выделении использовались растворы -№1, №2, №3, 30 мкл сорбента, буфер для растворения нуклеиновых кислот для элюции ДНК с сорбента. Так же кроме 4 пробирок с пробами, было взято 2 пробирки отрицательным контролем и с положительным. Напомню, что в пробирке с отрицательным контролем был буфер, с положительным – ДНК герпесвируса [7, 8].

Для выявления герпес вируса в икре осетровых рыб проведена ПЦР.

Проведение ПЦР в реальном времени прибором «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия) с определенным для каждой реакционной смеси температурным режимом (рис. 2). В отдельной пробирке готовили общую реакционную смесь на 4 образцов, в число которых входили положительный и отрицательный контроли. Общая реакционная смесь состоит из: 1) Буфера для ПЦР на 1 пробирку 17, 5 мкл; 2) Праймеры, 2, 5 мкл;

3) Фермент Taq-полимераза.

Результаты амплификации учитывали через 70 мин путем анализа кривых флуоресценции по соответствующему каналу. При идентификации генома герпесвируса флуоресценцию измеряли по каналу Orange (ROX). Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линии (treshhold), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов [9]. Результат учитывали только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения нуклеиновых кислот.

Образец считали положительным на наличие генома герпесвируса сибирского осетра, если значение «Ct» по каналу Orange (ROX) составляло менее 30. Образец считали отрицательным, если по каналу Orange значение «Ct» для него отсутствовало [9].

С применением выше описанного метода ПЦР в режиме «реального» времени ДНК герпесвируса сибирского осетра в 6 пробах не было выявлено.



Рисунок 2 - «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия)

Так же существуют и другие методы проведения ПЦР. Современную медицину нельзя представить без проведения ПЦР. Основные достоинства ПЦР: специфичность, универсальность, высокую чувствительность, малый объём биологического материала, высокую скорость получения результатов [10].

Библиографический список

1. Сульдина Е.В. Применение метода молекулярно-генетического анализа для видовой идентификации мяса | Сульдина Е.В., Колбасова О.Л., Мерчина С.В. Сб. «Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии» М. V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. УГСХА, 2012.- С 227-231.
2. Васильев Д.А. Разработка методики выявления специфического участка ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale* с помощью ПЦР в режиме «реального времени / Васильев Д.А., Мاستиленко А.В., Молофеева Н.И., Разорвина А.С. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2009. № 3 (10). С. 54-57.
3. Применение метода real-time pcr для видовой идентификации мясного сырья в мелкоизмельченных полуфабрикатах и готовых мясных продуктах Сульдина Е.В., Колбасова О.Л., Мерчина С.В. В сборнике: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия, кафедра МВЭиВСЭ, Главный редактор Д.А. Васильев; составители: С.Н. Золотухин, Е.Н. Ковалева. 2012. С. 236-240.

4. Определение видовой принадлежности мясного сырья в мелкоизмельченных полуфабрикатах и готовых мясных продуктах методом днк-диагностики. Сульдина Е.В., Колбасова О.Л., Мерчина С.В. /В сборнике: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия, кафедра МВЭиВСЭ, Главный редактор Д.А. Васильев; составители: С.Н. Золотухин, Е.Н. Ковалева. 2012. С. 231-235.
5. Определение видовой принадлежности мяса методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального» времени /Сульдина Е.В., Колбасова О.Л., Мерчина С.В. В сборнике: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия, кафедра МВЭиВСЭ, Главный редактор Д.А. Васильев; составители: С.Н. Золотухин, Е.Н. Ковалева. 2012. С. 241-244.
6. 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. |В сборнике: Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения Материалы V Международной научно-практической конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия; Главный редактор А.В. Дозоров; ответственные редакторы: В.А. Исайчев, И.И. Богданов. 2013. С. 112-115.
7. ПЦР для диагностики герпесвируса сибирского осетра /Абушаев Р., Калабеков И.М., Молофеева Н.И. В сборнике: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы VI-й Международной студенческой научной конференции. ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА», кафедра МВЭиВСЭ. 2013. С. 71-76.
8. Использование бактериофага на выявление в продуктах питания энтеропатогенных бактерий *Escherichia coli* серотипа O157. Молофеева Н.И., Мерчина С.В., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. В сборнике: Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности Международная научно-практическая конференция посвященная 80-летию заслуженного ученого, профессора В.Л. Зайцева. 2015. С. 207-211.

9. Обоснование необходимости в разработке технологических параметров, исключающих контаминацию пищевых продуктов *Vacillus cereus*. Мерчина С.В. /Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И.Вавилова. Саратов, 2003.- 21с.
10. Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации энтерогемморагической кишечной палочки *E. coli* O 157:H7 и O157:H в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов. /Золотухин С.Н., Молофеева Н.И., Васильев Д.А., Каврук Л.С. Научное издание / Москва, 2005. – 29с.

VETERINARY-SANITARY EXAMINATION OF EGGS OF STURGEON BY PCR IN “REAL” TIME WITH HERPES VIRUS DISEASES.

Rezanova Yu.R.

Key words: aquaculture, herpes virus, caviar, PCR, fluorescence.

The work is devoted to veterinary-sanitary examination of eggs of sturgeon by PCR in “real” time with herpes virus diseases.