DOI: 10.48612/sbornik-2025-1-63
УДК 639.371.12Л.09

МАРКЕРНЫЕ НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ ПЦР-ИНДИКАЦИИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ

Додонова Екатерина Алексеевна
Громова Елизавета Алексеевна, канд. биол. наук
Миргазов Динис Анатолиевич
Горбунова Мария Евгеньевна, канд. биол. наук
Осянин Константин Анатольевич, канд. биол. наук
ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация

В рамках исследования был проведён биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей вирусов инфекционного некроза гемопоэтической ткани, инфекционной анемии лососёвых и вирусной геморрагической септицемии. Подобраны маркерные локусы, характеризующиеся наименьшим количеством нуклеотидных замен в геномах исследуемых возбудителей вирусных болезней рыб. Сконструированы три пары праймеров и зондов, предназначенных для выявления исследуемых вирусов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Подобрана программа амплификации и оптимальный состав реакционной смеси для проведения ОТ-ПЦР-РВ. Экспериментально установлено, что разработанные олигонуклеотидные затравки обладают 100 % специфичностью.

Ключевые слова: инфекционный некроз гемопоэтической ткани; инфекционная анемия лососевых; вирусная геморрагическая септицемия; ПЦР-РВ; генетические маркеры

MARKER NUCLEOTIDE SEQUENCES FOR PCR INDICATION OF VIRAL DISEASES IN FISH

Dodonova Ekaterina Alekseevna
Gromova Elizaveta Alekseevna, PhD Biol. Sci.
Migrazov Dinis Anatolyevich
Gorbunova Maria Evgenievna, PhD Biol. Sci.
Osyanin Konstantin Anatolyevich, PhD Biol. Sci.
Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation

As part of the study, a bioinformatics analysis of the nucleotide sequences of infectious hematopoietic necrosis virus, infectious salmon anemia virus and viral hemorrhagic septicemia virus was conducted. Marker loci characterized by the lowest number of nucleotide substitutions in the genomes of the studied pathogens of viral fish diseases were selected. Three pairs of primers and probes were designed to detect the studied viruses by the polymerase chain reaction method in real time. The amplification program and the optimal composition of the reaction mixture for RT-PCR-RV were selected. It was experimentally established that the developed oligonucleotide primers have 100% specificity.

Key words: infectious necrosis of hematopoietic tissue; infectious anemia of salmon; viral hemorrhagic septicemia; PCR-RV; genetic markers

Вирусные болезни рыб представляют собой глобальную проблему, наносящую огромный ущерб аквакультуре во всем мире. Среди наиболее распространенных и опасных болезней выделяются инфекционный некроз гемопоэтической ткани (ИНГТ), инфекционная анемия лососевых (ИАЛ) и вирусная геморрагическая септицемия (ВГС) [7]. Данные заболевания негативно сказываются на скорости роста рыб, внешнем виде и качестве рыбной продукции, а также приводят к высокой смертности, особенно молоди [4]. Инфицированные рыбы демонстрируют такие внешние симптомы заболевания как вялость, анорексию, изменение окраски чешуи и плавников, повреждения кожи и внутренних орга-

нов. В результате, рыбоводческие хозяйства несут значительные экономические потери из-за снижения продуктивности и необходимости уничтожения заражённых особей.

В борьбе с этими заболеваниями ключевую роль играет своевременная и эффективная диагностика [1]. Традиционно, диагностика ИНГТ, ИАЛ и ВГС основывается на серологических методах, которые требуют значительных временных затрат и могут быть реализованы только в крупных научно-исследовательских институтах, где есть специализированные лаборатории [4, 5, 7,]. Наиболее оптимальными способами диагностики являются подходы, основанные на молекулярно-генетических методах, в частности на полимеразной цепной реакции (ПЦР) [3].

Данный метод лежит в основе современных экспресс тест-диагностикумов инфекционных заболеваний животных и человека, характеризующихся высокой чувствительностью и эффективностью [7, 4]. Однако на сегодняшний день в России практически отсутствуют отечественные ПЦР-тест-системы для выявления ИНГТ, ИАЛ и ВГС. Рынок заполнен импортными наборами реагентов и диагностикумами, доступ к которым сейчас ограничен из-за санкций [7].

Таким образом, разработка отечественных ПЦР-тест-систем, нацеленных на индикацию возбудителей вирусных болезней рыб является актуальной задачей.

Целью настоящей работы явился подбор оптимальных праймеров и зондов для идентификации возбудителей вирусных болезней рыб семейства лососевых методом ПЦР в режиме реального времени.

Методика исследований. Объекты исследования – нуклеотидные последовательности ИНГТ, ИАЛ и ВГС, представленные в базе данных GenBank. Биоинформационный анализ с последующим дизайном праймеров и зонда проводили в соответствии с общими принципами, которые мы ранее применяли для изучения других инфекций [2, 3, 6]. Множественное выравнивание нуклеиновых последовательностей ИНГТ, ИАЛ и ВГС осуществляли с помощью онлайн-программ «Clustal Omega» и «BLASTn». Конструирование праймеров было выполнено с помощью программы Vector NTI 9.1., синтез в ЗАО «Синтол». Для апробации разработанных олигонуклеотидных затравок использовали инактивированные вирусные культуры штаммов VHSV ЧФ 1.2, VHSV 22-ARM, IHNV и ISA (ФКП «Ставропольская биофабрика»). Для выделения РНК был применен комплект реагентов «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия). Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора «Реверта-L» («АмплиСенс», Россия). Все манипуляции с нуклеиновыми кислотами выполнялись в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты исследований и их обсуждение. Биоинформационный анализ – это важнейший этап любого научного исследования, направленного на создание ПЦР-РВ тест-системы [3]. Из базы данных GenBank нами были получены нуклеотидные последовательности различных изолятов ИНГТ, ИАЛ и ВГС. Согласно данным литературы, наиболее перспективными для идентификации исследуемых вирусов являются нуклеотидные последовательности генов G вируса ИНГТ, нуклеокапсида N вируса ВГС и 8-го сегмента вируса ИАЛ [7]. На основании проведенного анализа геномных последовательностей ИНГТ, ИАЛ и ВГС, нами были определены последовательности данных геетических детерминант, после чего было проведено множественное выравнивание с целью определения маркерных локусов. По результатам проведенного сравнения, для идентификации изолятов ИНГТ был выбран локус последовательности гена G размером 160 п.о. (MF464272.1: 68-226), для ИАЛ подобран локус размером 137 п.о, локализованный на 8-м сегменте данного вируса (KX823925.1: 319-455), для ВГС выбран локус длиной 180 п.о, локализованный в области гена N (MF464272.1: 68-226).

В рамках данных локусов нами были разработаны три комбинации олигонуклеотидных затравок (прямой, обратный праймер и TagMan-зонд), пригодные для идентификации возбудителей вирусных болезней рыб, а именно ИНГТ, ИАЛ и ВГС (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика разработанных олигонуклеотидов

Наименование	Мишень	Локус	Канал детекции	Тип зонда и гасителя флуоресценции
IHNGF IHNGR IHNGP	ИНГТ – ген G	MF464272.1: 68-226	Fam/Green	FAM-BHQ1
ISAF ISAR ISAP	ИАЛ – 8-ой сегмент	KX823925.1: 319-455	Red/Cy5	Cy5- BHQ3
VHSF VHSR VHSP	ВГС – ген N	MN038344.1: 343-522	Orange/Rox	Rox-BHQ2

Специфичность разработанных праймеров и зондов была исследована с помощью онлайн утилиты BLASTn. Установлено, что разработанные праймеры и зонд обладают 100 % гомологией к большинству депонированных в базе данных GenBank искомым нуклеотидным последовательностям ИНГТ, ИАЛ и ВГС.

Для апробации, разработки и оптимизация протокола ПЦР-РВ идентификации вирусов ИНГТ, ИАЛ и ВГС была проведена серия экспериментов с использованием РНК вирусных культур штаммов VHSV ЧФ 1.2, VHSV 22-ARM, IHNV, ISA.

При амплификации РНК штаммов VHSV ЧФ 1.2 и VHSV 22-ARM с разработанными праймерами и зондом был получен ожидаемый результат — рост сигнала флуоресценции по каналу ROX. При проведении ОТ-ПЦР-РВ с РНК вирусов IHNV и ISA, наблюдали ожидаемую флуоресценцию по каналам FAM и Cy5, соответственно.

Анализ полученных экспериментальных данных позволил определить рабочую программу для проведения ОТ-ПЦР-РВ: обратная транскрипция 95 °С – 30 мин, начальная денатурация ДНК при 95 °С в течение 5 мин, далее 5 циклов: денатурация при температуре 95 °С – 10 с, отжиг олигонуклеотидов: при 56 °С – 30 с, элонгация: при 72 °С – 25 с; далее 39 циклов: денатурация при температуре 95 °С – 10 с, отжиг олигонуклеотидов: при 56° С – 30 с (детекция по каналам FAM, Cy5 и ROX), элонгация: при 72 °С – 25 с. Также был оптимизирован состав реакционной ОТ-ПЦР-РВ смеси, а именно подобрана концентрация праймеров и зонда – 0,25 мМ каждого.

Выводы. Разработанные в рамках данного исследования праймеры и зонды могут быть использованы в качестве основы для построения ПЦР тест-систем, пригодных для идентификации возбудителей инфекционного некроза гемопоэтической ткани, инфекционной анемии лососевых и вирусной геморрагической септицемии. Также возможно использование разработанных олигонуклеотидных затравок в качестве эффективного экспресс-инструмента для выявления данных инфекций в формате мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ, что значительно сократит время проведения анализа при мониторинговых и диагностических исследованиях вирусных болезней рыб.

Список литературы

1. Адиатулин И. Ф. Мониторинг ветеринарной безопасности районов добычи (вылова) водных биологических ресурсов как механизм обеспечения пищевой и биологической безопасности территории Российской Федерации (2017-2018) / И. Ф. Адиатулин, В. И. Белоусов, С. Б. Базарбаев // Ветеринарный врач. – 2023. – № 1. – С. 9–14.

2.Анисимова Е.А. Подбор оптимальных условий постановки ПЦР для идентификации возбудителя бруцеллеза собак. / Е. А. Анисимова, Е. А. Додонова, Д. А. Миргазов // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2023. – № 12(230). – С. 55–59.

3.Громова Е.А. Генетические маркеры для ПЦР-индикации вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб / Е. А. Громова, К. А. Осянин, Е. А. Додонова [и др.] // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2024. – № 5. – С. 88–94.

4. Перчун А. В. Обнаружение особо опасных вирусных болезней рыб семейства лососёвых (Salmo salar) с применением полимеразной цепной реакции / А. В. Перчун, В. В. Воробьев,

В. П. Мельников // Рыбное хозяйство. – 2022. – №5. – С. 88–93.

5. Пыльнов В. А. Применение гнездового варианта ПЦР (ОТ-ПЦР) для диагностики вируса геморрагической септицемии у лососевых рыб / В. А. Пыльнов, И. В. Бурлаченко, Л. И. Бычкова // Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры: Сборник научных трудов Филиала по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»). – 2023. – № 94. – С. 122–129.

6. Разработка мультиплексной ПЦР-РВ тест-системы для выявления возбудителя бруцеллеза / Е. А. Громова, Д. А. Миргазов, Е. А. Додонова [и др.] // Ветеринарный врач. – 2024. – № 3. – С. 34–40.

7. Тарасова А. С. Применение полимеразной цепной реакции для выявления возбудителей некоторых особо опасных вирусных болезней рыб / А. С. Тарасова, А. В. Перчун, В. П.Мельников // Ветеринария сегодня. – 2020. – №1(32). – С. 11–16.

DOI: 10.48612/sbornik-2025-1-64
УДК 619:615.272:615.9: 636.028

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗМОЖНЫХ РАЗДРАЖАЮЩИХ СВОЙСТВ НОВОЙ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ЭКТУЛИН

Жуганов Илья Вадимович, аспирант
Семененко Марина Петровна, д-р вет. наук
Железнякова Ксения Андреевна, канд. экон. наук
ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»,
г. Краснодар, Российская Федерация

Цель работы – изучение местно-раздражающих свойств кормовой добавки эктулин при нанесении на кожу и слизистые оболочки глаз лабораторных животных. Для исследования использовались морские свинки, кролики и белые беспородные крысы. Исследования кормовой добавки эктулин показали отсутствие у нее потенциальных раздражающих и аллергизирующих свойств при всех проводимых методах.

Ключевые слова: кормовая добавка эктулин; местно-раздражающее действие; лабораторные животные; кожные аппликации; конъюнктивальная проба; кожно-резорбтивное действие

IDENTIFICATION OF POSSIBLE IRRITANT PROPERTIES OF THE NEW HEPATOPROTECTIVE FEED ADDITIVE OF ECTULIN

Zhuganov Ilya Vadimovich, PhD student
Semenenko Marina Petrovna, Dr. Vet. Sci.
Zheleznyakova Ksenia Andreevna, PhD Econ. Sci.
Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine,
Krasnodar, Russian Federation

The aim of the work was to study the local irritant properties of the feed additive of ectulin when applied to the skin and mucous membranes of the eyes of laboratory animals. Guinea pigs, rabbits and white mongrel rats were used for the study. Studies of the feed additive of ectulin showed the absence of potential irritant and allergenic properties with all the methods used.

Key words: feed additive of ectulin; local irritant effect; laboratory animals; skin applications; conjunctival test; skin-resorptive effect

Продуктивность, сохранность и каче- ство продукции сельскохозяйственной птицы