

Научная статья

УДК: [619:616-002.4:616.9-07]:639.371.1

EDN ZYXINU

Методы диагностики инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб (обзор)

Ксения Андреевна Балахнина¹, аспирант, специалист лаборатории по болезням аквакультуры ВНИИЗЖ

Научный руководитель – Владимир Петрович Мельников², кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией по болезням аквакультуры ВНИИЗЖ

^{1,2}Федеральный центр охраны здоровья животных, г. Владимир, Россия

¹balahnina@arriah.ru, ²melnikov@arriah.ru

Аннотация. В настоящее время развитие аквакультуры – актуальная сфера деятельности на территории Российской Федерации. Вирусные заболевания гидробионтов являются важным фактором, несущим экономический ущерб, связанный с финансовыми затратами на диагностику и меры борьбы с заболеваниями. Инфекционный некроз гемопоэтической ткани (далее, ИНГТ) лососевых рыб характеризуется высокой смертностью и ухудшением товарной кондиции выживших рыб. ИНГТ внесен Всемирной организацией здравоохранения животных (ВОЗЖ) в список опасных и экономически значимых болезней, обязательных к уведомлению. Единственным способом борьбы на территории Российской Федерации с ИНГТ является своевременная диагностика.

Ключевые слова: вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани, ИНГТ, выделение вируса, перевиваемая культура клеток, ИФА, ПЦР

Для цитирования: Балахнина К. А. Методы диагностики инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб (обзор) // Актуальные исследования молодых ученых – результаты и перспективы : материалы науч.-практ. конф. (Благовещенск, 8 февраля 2024 г.). Благовещенск : Дальневосточный ГАУ, 2024. С. 32–40.

Original article

Diagnostic methods for infectious necrosis hematopoietic virus in salmonid fish (review)

Ksenia A. Balakhnina¹, graduate student, specialist of the Aquaculture Diseases Laboratory at VNIIZhZh

Scientific supervisor – Vladimir P. Melnikov², candidate of Veterinary Sciences, Head of the Aquaculture Diseases Laboratory at VNIIZhZh

^{1,2}Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia

¹balahnina@arriah.ru, ²melnikov@arriah.ru

Abstract. Currently, the development of aquaculture is a relevant area of activity in the Russian Federation. Viral diseases of hydrobionts are an important factor carrying economic damage associated with financial costs for diagnosis and disease control measures. Infectious necrosis hematopoietic virus (hereinafter - IHNV) of salmonid fish is characterized by high mortality and deterioration of marketability of surviving fish and is included by the World Organization for Animal Health (WOAH) in the list of dangerous and economically significant diseases mandatory for notification. The only way to prevent this disease on the territory of the Russian Federation is timely diagnosis.

Keywords: infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV, virus isolation, grafted cell culture, ELISA, PCR

For Citation: Balakhnina K. A. Metody diagnostiki infektsionnogo nekroza gemopoeticheskoy tkani lososevykh ryb (obzor) [Diagnostic methods of infectious necrosis of hematopoietic tissue of salmonid fish (review)]. *Aktual'nye issledovaniya molodykh uchennykh – rezul'taty i perspektivy* : materialy nauch.-prakt. konf. (Blagoveshchensk, 8 fevralya 2024 g.). Blagoveshchensk, Dal'nevostochnyj gosudarstvennyj agrarnyj universitet, 2024, pp. 32–40. (in Russ.).

Введение. Инфекционный некроз гемопоэтической ткани (ИНГТ) – вирусное заболевание лососевых рыб, характеризующееся высоким уровнем смертности (90–100 %), снижением производительности и производства рыбной продукции, что приводит к огромным экономическим потерям и практически полному разорению владельца хозяйства.

В настоящее время на территории РФ нет доступных препаратов для проведения специфической профилактики против ИНГТ. Основным методом предотвращения заноса и вспышек заболевания является своевременная диагностика.

Диагностика. Предварительный диагноз на наличие вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани у лососевых рыб основан на обнаруженных клинических признаках, патологоанатомических изменениях и анализе эпизоотологических данных [4].

Клиническое обследование всех производственных объектов проводят на наличие погибшей рыбы или рыбы с аномальным поведением, когда

температура воды опускается ниже 15 °С. Особое внимание необходимо уделить местам водосброса, где чаще всего собирается ослабленная рыба.

Рыбу для исследования доставляют в лабораторию живой или в охлажденном виде, при этом транспортировка не должна превышать 12 часов для живой рыбы и 24 часа для охлажденной. Наилучшим способом является отбор проб патологического материала непосредственно на рыбоводческом предприятии и транспортировка его в питательных средах или сбалансированных солевых растворах, время которой не должно превышать 48 часов (*Важно!* Соблюдение холодовой цепи).

Окончательный диагноз ставится на основании результатов вирусологических исследований, которые включают вирусовыделение на культуре клеток, молекулярно-генетическую и серологическую идентификацию вируса, постановку биопробы [3,4,5,13].

Для лабораторного исследования патологического материала рыб проводят отбор фрагментов внутренних органов: головной мозг или сердце, передняя часть почки, селезенка. В некоторых случаях необходимо исследовать половые органы самцов и половой секрет самок.

Полевые методы диагностики. У больных рыб наблюдаются изменения в поведении, такие как апатия, попеременно с приступами ненормальной активности (плавание по спирали, рывки, судорожное плавание и плескание) [2,3,4].

Клинически у рыбы наблюдаются потемнение кожи, анемичные жабры, асцит, экзофтальм, петехиальные геморрагии в соединительной ткани глаз и у основания плавников, отмечается гидроцефалия среди мальков [2,3,5,14].

При патологоанатомическом вскрытии отмечают наличие свободной жидкости в брюшной полости, кровоизлияния в тканях и органах, отсутствие кормовых масс в кишечнике. Желудок наполнен слизью молочного цвета с примесью крови. Печень, почки и селезенка бледные [3,4,5,14].

При проведении гистологического исследования выявляют дегенеративный некроз в тканях гемопоэза, почках, печени, поджелудочной железе, пищеварительном тракте [3,4,5].

Выделение вируса на культуре клеток. Чувствительными к вирусу ИНГТ являются следующие перевиваемые клеточные линии рыб: ЕРС (*эпидермиома больного осной карпа*), АS (*внутренние органы атлантического лосося*), ВF-2 (*хвостовой стебель синезаберного солнечника*), CHSE-214 (*нормальный эмбрион чавычи*), FHM (*хвостовой стебель черного толстоголова*), ICO (*яичник неполовозрелого карпа*), RTH-149 (*гепатома радужной форели*), RTG-2 (*гонады радужной форели*) и STE-137 (*эмбрионы стальноголового лосося*). Всемирная организация здравоохранения животных (ВОЗЖ) рекомендует использовать перевиваемые культуры клеток ЕРС и FHM [1,3,9,10,13].

Специфический цитопатический эффект (ЦПД) в культуре клеток обнаруживается через 32–48 часов после инокуляции вируса, однако учёт и интерпретация результатов проводится ежедневно (не менее 3 раз в неделю) в течение 7–10 суток при помощи фазово-контрастной микроскопии (согласно рекомендациям ВОЗЖ) [3,4].

Если развитие цитопатического действия вируса не наблюдается после первичной инкубации в течение 7–10 дней, проводят второй пассаж на свежих культурах с соблюдением посевной концентрации клеток аналогично первому пассажу. В случае положительного результата незамедлительно приступают к идентификации вируса.

Несмотря на трудоёмкость, данный метод диагностики является «Золотым стандартом». После выделения вируса в культуре клеток проводят его серологическую или молекулярно-генетическую идентификацию [6].

Методы на основе антител для обнаружения антигена. Серологическую идентификацию вируса ИНГТ проводят с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), непрямой реакции флуоресцирующих

антител (непрямой метод РИФ), реакции вирусной нейтрализации в культуре клеток (РН).

Реакция нейтрализации служит эталоном при оценке других серологических реакций. Принцип основан на образовании комплекса «Антиген + антитело» при взаимодействии антигена (вируса) с гомологичными антителами, в результате которого нейтрализуется инфекционность вируса. Однако преимуществами метода ИФА является меньшая трудоемкость и длительность в сравнении с другими методами [7,8,10,13].

Молекулярные методы. Среди различных методов обнаружения ИНГТ молекулярно-генетические методы диагностики являются наиболее быстрыми и чувствительными, позволяют выявить рыб-вирусоносителей без клинических признаков заболевания. К ним относят *полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)* и *полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ)* с праймерами для генов G и N для выявления РНК вируса [10,11,12,13].

Метод ОТ-ПЦР – это модификация ПЦР, которую используют для выявления молекул РНК. На первом этапе (обратная транскрипция) происходит ферментативный синтез копий к ДНК с матрицы РНК. На втором этапе полученные молекулы к ДНК могут служить мишенью для проведения классической ПЦР.

В ходе заключительного этапа анализа происходит детекция продуктов амплификации путём электрофоретического разделения ПЦР-смеси на агарозном геле, который окрашен бромистым этидием, что позволяет идентифицировать продукт ПЦР по длине. Исследуемые пробы оценивают по наличию в соответствующей дорожке полосы, которая располагается на том же уровне, что и полоса положительного контроля [15].

В основе технологии ПЦР в реальном времени лежит принцип флуоресцентной детекции продуктов ПЦР во время амплификации. Технология дает возможность осуществлять регистрацию непосредственно в

реакционной пробирке, что исключает попадание продуктов реакции в окружающую среду и контаминацию лаборатории [16].

Детекция накопления ампликонов происходит при помощи олигонуклеотидного зонда, гибридизующегося с участком мишени между праймерами. Зонд содержит флуорофор (F) и блокирующий флуоресценцию гаситель (Q). В ходе синтеза комплиментарной цепи полимераза расщепляет зонд, в результате чего возникает флуоресценция [17].

Заключение. Инфекционный некроз гемопоэтической ткани представляет значительную угрозу рыбоводству нашей страны. Единственными мерами борьбы против данного заболевания на территории Российской Федерации являются профилактика и своевременная диагностика. В настоящее время существует множество методов диагностики, которые позволяют минимизировать риски заноса и появление вспышек в рыбоводческих хозяйствах.

Список источников

1. Акиншина Г. Т., Белоконов В. С., Билько Н. М. Животная клетка в культуре: (методы и применение в биотехнологии). Москва : Спутник+, 2009. 652 с. ISBN 978-5-9973-0214-6.
2. Healthy fish // Riitta Rahkonen, Pia Wennerstrom, Pyavi Rintamaki, Risto Kannel Prevention, diagnosis and treatment of the disease. Helsinki : Research Institute of Hunting and Fisheries of Finland, 2013. pp. 43–44.
3. Богданова Е. А. Болезни лососевых и сиговых рыб в аквакультуре. Санкт-Петербург : ГосНИОРХ, 1994. 184 с.
4. Васильков Г. В., Грищенко Л. И., Енгашев В. Г., Канаев А. И., Ларькова З. И., Осетров В. С. Болезни рыб : справочник. 2-е изд., перераб. и доп. Москва : Агропромиздат, 1989. 288 с.
5. Ванятинский В. Ф., Мирзоева Л. М., Поддубная А. В. Болезни рыб : учебник. Москва: Пищевая промышленность, 1979. 232 с.
6. Тарасов В. Е., Рудакова С. Л., Бочкова Е. В., Шепеляковская А. О. Сравнительный анализ ИФА и "золотого стандарта" при идентификации вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани у половозрелой нерки // Современные проблемы и перспективы развития рыбохозяйственного комплекса : сборник трудов IX науч.-практ. конф. молодых учёных с междунар. участием. Москва: Всероссийский научно-исследовательский

институт рыбного хозяйства и океанографии, 2021. С. 163–166. EDN [ZGBPAG](#)

7. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Aquatic Animals. Paris, 2014. vol. 1. pp. 300–313.

8. Доронин М. И., Пыльнов В. А., Мудрак Н. С. Разработка метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб // Научный альманах. 2015. №. 8 (10). С. 1052–1057. DOI: [10.17117/na.2015.08.963](#)

9. Рудакова, С. Л. Описательное моделирование распространения вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани в популяции нерки // Известия ТИНРО. 2008. Т. 152. С. 173–185. EDN [JVUIDN](#)

10. Доронин М. И., Пыльнов В. А., Назаров Н. А., Рыбаков С. С. Выявление антигенов вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб с помощью метода латекс-агглютинации // Ветеринария. 2014. №. 9. С. 56–61. EDN [SLPLCR](#)

11. Dhar A. K., Bowers R. M., Licon K. S., Lapatra S. E. Detection and quantification of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by SYBR Green real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction // J. Virol. Methods. 2008. vol. 147. no. 1. pp. 157–166. DOI: [10.1016/j.jviromet.2007.08.026](#)

12. Overturf K., LaPatra S., Powell M. Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids // J. Fish Dis. 2001. no. 24. pp. 325–333. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00296.x>

13. Hostnik P., Barlic-Maganja D., Strancar M., Jencic V., Toplak I., Grom J. Influence of storage temperature on infectious hematopoietic necrosis virus detection by cell culture isolation and RT-PCR methods // Diseases of aquatic organisms. 2002. vol. 52. no. 3. pp. 179–184. DOI: [10.3354/dao052179](#)

14. Воронин В. Н., Кузнецова Е. В., Стрелков Ю. А., Чернышева Н. Б. Болезни рыб в аквакультуре России : практическое руководство. Санкт-Петербург : ГосНИОРХ, 2011. 265 с.

15. Коницев А. С., Цветков И. Л., Попов А. П., Шамшина Т. Н., Комаров А. Б. Молекулярная биология. Практикум : учебное пособие. 2-е изд. Москва : Юрайт, 2020. 169 с.

16. Ребриков Д. В., Трофимов Д. Ю. ПЦР "в реальном времени": подходы к анализу данных (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 5. С. 520–528. EDN [OPCZAN](#)

17. Ребриков Д. В., Саматов Г. А., Трофимов Д. Ю., Семёнов П. А., Савилова А. М., Кофиади И. А., Абрамов Д. Д. ПЦР в реальном времени. 8-е изд. Москва : Лаборатория знаний, 2020. 224 с. ISBN 978-5-00101-794-3.

References

1. Akinshina G. T., Belokon V. S., Bilko N. M. Zhivotnaya kletka v kul'ture: (metody i primeneniye v biotekhnologii) [Animal cell in culture: (methods and applications in biotechnology)]. Moscow, Sputnik+, 2009, 652 p. ISBN 978-5-9973-0214-6. (in Russ.).
2. Healthy fish. Riitta Rahkonen, Pia Wennerstrom, Pyavi Rintamaki, Risto Kannel Prevention, diagnosis and treatment of the disease. Helsinki, Research Institute of Hunting and Fisheries of Finland, 2013, pp. 43–44.
3. Bogdanova E. A. Bolezni lososevykh i sigovykh ryb v akvakul'ture [Diseases of salmon and whitefish in aquaculture]. St. Petersburg, GosNIORKh, 1994, 184 p. (in Russ.).
4. Vasilkov G. V., Grishchenko L. I., Engashev V. G., Kanaev A. I., Larkova Z. I., Osetrov B. C. Bolezni ryb [Fish diseases]: spravochnik. 2-e izd., pererab. i dop. Moscow, Agropromizdat, 1989, 288 p. (in Russ.).
5. Vanyatinskiy V. F., Mirzoeva L. M., Poddubnaya A. V. Bolezni ryb [Fish diseases]: uchebnik. Moscow, Pishchevaya promyshlennost', 1979, 232 p. (in Russ.).
6. Tarasov V. E., Rudakova S. L., Bochkova E. V., Shepelyakovskaya A. O. Sravnitel'nyy analiz IFA i "zolotogo standarta" pri identifikatsii virusa infektsionnogo nekroza gemopoeticheskoy tkani u polovozreloy nerki [Comparative analysis of ifa and "gold standard" in identification of infectious hematopoietic tissue necrosis virus in sexually mature seals]. *Sovremennyye problemy i perspektivy razvitiya rybokhozyaystvennogo kompleksa : sbornik trudov IX nauch.-prakt. konf. molodykh uchenykh s mezhdunar. uchastiem*. Moscow, Vserossiyskiy nauchno-issledovatel'skiy institut rybnogo khozyaystva i okeanografii, 2021, pp. 163–166. (in Russ.). EDN [ZGBPAG](#)
7. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Aquatic Animals. Paris, 2014, vol. 1, pp. 300–313.
8. Doronin M. I., Pyl'nov V. A., Mudrak N. S. Razrabotka metoda OT-PTsR v rezhime real'nogo vremeni dlya vyyavleniya virusa infektsionnogo nekroza gemopoeticheskoy tkani lososevykh ryb [Development of a real-time RT-PCR method for detection of infectious hematopoietic tissue necrosis virus in salmonid fishes]. *Nauchnyy al'manakh*. 2015;8(10):1052–1057. DOI: [10.17117/na.2015.08.963](#) (in Russ.).
9. Rudakova, S. L. Opisatel'noe modelirovaniye rasprostraneniya virusa infektsionnogo nekroza gemopoeticheskoy tkani v populyatsii nerki [Descriptive model of the infectious hematopoietic necrosis virus distribution in a sockeye population]. *Izvestiya TINRO*. 2008;152:173–185. (in Russ.). EDN [JVUIDN](#)
10. Doronin M. I., Pyl'nov V. A., Nazarov N. A., Rybakov S. S. Vyyavlenie antigenov virusa infektsionnogo nekroza gemopoeticheskoy tkani lososevykh ryb s pomoshch'yu metoda lateks-agglyutinatsii [Latex-agglutination tests for detection

of salmon infectious hematopoietic necrosis virus antigen]. Veterinariya. 2014;9:56–61. (in Russ.). EDN [SLPLCR](#)

11. Dhar A. K., Bowers R. M., Licon K. S., Lapatra S. E. Detection and quantification of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by SYBR Green real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J. Virol. Methods. 2008;147:1:157–166. DOI: [10.1016/j.jviromet.2007.08.026](#)

12. Overturf K., LaPatra S., Powell M. Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids. J. Fish Dis. 2001;24:325–333. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00296.x>

13. Hostnik P., Barlic-Maganja D., Strancar M., Jencic V., Toplak I., Grom J. Influence of storage temperature on infectious hematopoietic necrosis virus detection by cell culture isolation and RT-PCR methods. Diseases of aquatic organisms. 2002;52:3:179–184. DOI: [10.3354/dao052179](#)

14. Voronin V. N., Kuznetsova E. V., Strelkov Yu. A., Chernysheva N. B. Bolezni ryb v akvakul'ture Rossii [Fish diseases in Russian aquaculture] : prakticheskoe rukovodstvo. St. Petersburg, GosNIORKh, 2011, 265 p. (in Russ.).

15. Konichev A. S., Tsvetkov I. L., Popov A. P., Shamshina T. N., Komarov A. B. Molekulyarnaya biologiya. Praktikum [Molecular biology. Workshop] : uchebnoe posobie. 2-e izd. Moscow, Yurayt, 2020, 169 p. (in Russ.).

16. Rebrikov D. V., Trofimov D. Yu. PTsR "v real'nom vremeni": podkhody k analizu dannykh (obzor) [Real-time PCR: a review of approaches to data analysis]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006;42:5:520–528. (in Russ.). EDN [OPCZAN](#)

17. Rebrikov D. V., Samatov G. A., Trofimov D. Yu., Semenov P. A., Savilova A. M., Kofiadi I. A., Abramov D. D. PTsR v real'nom vremeni [Real-time PCR]. 8-e izd. Moscow, Laboratoriya znaniy, 2020, 224 p. ISBN 978-5-00101-794-3. (in Russ.).

© Балахнина К. А., 2024

Статья поступила в редакцию 25.01.2024; одобрена после рецензирования 16.02.2024; принята к публикации 06.03.2024.

The article was submitted 25.01.2024; approved after reviewing 16.02.2024; accepted for publication 06.03.2024.