



Федеральное агентство по регулированию
рыбного хозяйства и океанографии
«Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии»
ФГБНУ «ВНИРО»

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ ГЕРПЕСВИРУСНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ УСТРИЦ В ЧЕРНОМ МОРЕ



Мальцев В.Н., зав. сектором ихтиопатологии, кандидат биологических наук

Отдел «Керченский» Азово-Черноморского филиала ФГБНУ «ВНИРО», ул. Свердлова, 2, г. Керчь, 298300, Россия.
E-mail: maltsev66@mail.ru



Живые устрицы, 20 %
Мертвые устрицы, 80 %

Рис. 1. Соотношение живых (20 %) и мертвых устриц (80 %), излеченных из садка во время эпизоотии. В мае 2018 г. в одной из устричных ферм в районе г. Анапы кумулятивная смертность молоди устриц с длиной (высотой) раковины 18-42 мм достигала 90-100 %, а товарных устриц с длиной (высотой) раковины 75-116 мм – 30-40 % [Мальцев, 2020].

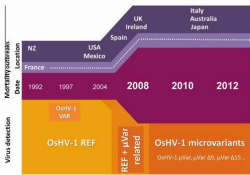


Рис. 2. Схема распространения OsHV-1 по Мировому Референтный штамм герпесвируса устриц впервые был обнаружен в 1992 году во Франции и Новой Зеландии. В 1997 г. во Франции выявлен патогенный его микровариант. С 2004 года он распространился в США, Мексике, Испании, Великобритании, Ирландии, Италии, Австралии, Японии, вызывая в некоторых из этих стран значительные эпизоотии и падение производства [Solomieu, Renault, Travers, 2015]

Материал и методы исследования

- В работе применен личный опыт эпизоотических обследований устричных хозяйств Крыма и Кавказа, а также навыки лабораторных клинических, патолого-анатомических, микроскопических, гистологических исследований тихоокеанских устриц в Черном море, выполненных автором в рамках прикладных НИР по заказу Росрыболовства в течение 2019-2021 гг. (Государственные работы № 076-00005-20; 076-00002-21-00). Клинически осмотрено более 5000 экз. устриц; лабораторно исследовано около 200 экз. в возрасте от сеголеток (0+) до 3-х годовиков.
- Основанием для проведения исследований послужил случай массовой гибели тихоокеанских устриц в морских фермах Кавказского побережья Черного моря в мае-июне 2018 г., предположительно вызванный герпесвирусным заболеванием устриц [Мальцев, 2020].
- Анализ мировой литературы выполнен с использованием реферативных баз данных Scopus и Pro Quest (Web of Science оказалась недоступной), а также полнотекстовых источников Google Академия, ScienceDirect (Wiley Online Library доступ ограничен), к которым сотрудники ФГБНУ «ВНИРО» и его филиалов имеют доступ в рамках национальной подписки.

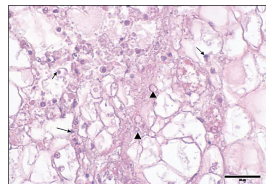


Рис. 4. Гистологический срез через ткани тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas*, инфицированной OsHV-1; срез окрашен гематоксилином и эозином. На нём видны сморщенные гипербазофильные ядра (стрелки) и ядра с маргинальным хроматином (острие стрелок). Масштабная линейка – 10 мкм [Viruses infecting marine molluscs, 2017]

Результаты. Гистологический метод диагностики

- При подготовке информационных материалов за основу взяты международные стандарты - рекомендации Международного эпизоотического бюро (МЭБ) [OIE - Aquatic Animal ..., 2019; OIE - Manual of Diagnostic Tests ..., 2019], характеризующие общепринятые методы диагностики этого заболевания, дополненные «свежими» научными публикациями.
- Гистологический метод является наиболее информативным и не дорогим.
- Сущность метода состоит в выявлении характерных для поражения OsHV-1 тканевых и клеточных изменений в соединительной ткани (фибробласто-подобных клетках) мантии, околоротовых щупалец, жабр и пищеварительной железы (рис. 4).
- Этот метод имеет низкую специфичность, при этом его чувствительность является хорошей при средней и сильной интенсивности инфекции, и низкой при слабой инфекции.
- Рекомендуется применять этот метод для дифференциальной диагностики (от протозойных, бактериальных и иных болезней), и использовать его в совокупности с молекулярными методами.
- Он не рекомендован для осуществления программ мониторинга, так как не дает однозначных окончательных результатов.

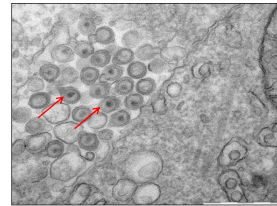


Рис. 6. Микрофотография, сделанная с помощью трансмиссионного электронного микроскопа, на которой виден срез через клетку инфицированной личинки тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas*, и оболочечные вирусные частицы OsHV-1 (красные стрелки). Масштабная линейка внизу – 500 нм [Viruses infecting marine molluscs, 2017]



Рис. 7. Анализатор нуклеиновых кислот «АНК-32», предназначен для качественного и количественного определения фрагментов нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-PB, real-time PCR) (фото с сайта: <https://www.ld.ru/PCR/rlist-4314.html>)

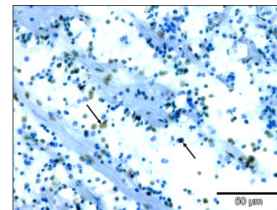
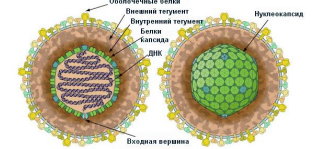


Рис. 8. Гистологический срез через сердце тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* экспериментально зараженной OsHV-1, обработанный по методу специфической in-situ гибридизации. Инфицированные герпесвирусом клетки имеют коричневые ядра и коричневую цитоплазму (красные стрелки). Масштабная линейка – 50 мкм [Detection and distribution of oyster herpesvirus 1 ..., 2016]

Рис. 5. Схематическое изображение герпесвируса устриц 1 (OsHV-1) [caifr ViralZone, <https://viralzone.expasy.org/530>]



Просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия

- Этот метод позволяет обнаруживать и идентифицировать вирусные частицы в клетках заболевших животных. Внутри клеток видны двадцатиградные (5-6-ти сторонние) вирусные частицы диаметром 70-120 нм, имеющие один слой и, иногда, плотный нуклеоид (многогранный центр). Внеклеточный оболочечный вирион герпесвируса OsHV-1 может достигать в диаметре 100-180 нм (рис. 5, 6).
- Он обладает хорошей специфичностью и чувствительностью, поэтому считается стандартным подтверждающим методом (тестом) для данного заболевания.
- Из-за значительной трудоёмкости и дороговизны, этот метод не рекомендован для осуществления программ мониторинга при исследовании большого числа проб (моллюсков).
- Методика тестирования состоит из следующих этапов: фиксация тканей, декальцинация образцов (при необходимости), обезживание, пропитывание тканей и монтирование блоков, изготовление срезов и их контрастирование, электронное микрофотографирование.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-PB)

- Этот метод диагностики герпесвируса OsHV-1 обладает высокой специфичностью и чувствительностью, считается стандартным подтверждающим тестом для данного заболевания. Наиболее часто используются ПЦР-PB (рис. 7) с применением специфических реагентов SYBR® Green [Pepin et al., 2008] и с применением специфических реагентов TaqMan® [Martenot et al., 2010]. Они дают более надёжные и быстрые результаты, чем традиционные ПЦР.
- Три набора праймеров (B4/B3, C9/C10 и Gr4/Gr7), нацеленные на три региона вирусной ДНК, а именно на регионы ORF99, ORF4 и ORF88 могут быть использованы.
- Метод тестирования предназначен для постановки как предварительных, так и окончательных диагнозов, а также благодаря автоматизации при обработке большого количества проб удобен для выполнения программ мониторинга.
- Недостатком метода является то, что ПЦР-PB окончательно не валидован ко всем изолятам (генотипам) этого вируса, а также то, что он при ненадлежащей лабораторной практике может дать как ложные положительные, так и ложно отрицательные результаты.

Гистохимический метод специфической in-situ гибридизации (ИСТ)

- Метод позволяет определять положение герпесвируса OsHV-1 непосредственно в ткани моллюска. Видимое под световым микроскопом специфическое темно-коричневое внутриклеточное окрашивание на метафазных хромосомах или в интерфазных ядрах клеток указывает на присутствие в них ДНК герпесвируса OsHV-1 (см. фото)
- Метод основан на обработке тканевых срезов растворами, содержащими помеченные диоксигенином ДНК зонды; для синтеза зондов применяют пару праймеров C1/C6 [Lipart, Renault, 2002].
- Этот метод считается стандартным с хорошей чувствительностью и специфичностью. Он может использоваться для подтверждения ложных предварительных диагнозов, однако из-за высокой трудоёмкости не рекомендован для выполнения программ мониторинга.
- Он способен обнаруживать типичный герпесвирус OsHV-1 и его микроварианты, но не позволяет разделять его генотипы.

Выводы (заключение)

- Герпесвирусное заболевание представляет значительную эпизоотическую угрозу для черноморской устричной индустрии, основанной на выращивании тихоокеанских устриц. Частые случаи массовых гибелей устриц в Черном море, а также причины значительного падения производства товарных устриц в этом регионе необходимо проверить на предмет их герпесвирусной этиологии.
- Нами обобщены данные о методах диагностики герпесвирусного заболевания устриц (гистология, электронная микроскопия, ПЦР-PB, ИСТ), которые являются международно признанными (соответствуют рекомендациям МЭБ, регламентам ЕС, стандартам США). Они обладают достаточной чувствительностью и специфичностью для обнаружения тканевых и внутриклеточных признаков этого заболевания, выявляют качественно и количественно генетические материалы возбудителя в органах и тканях инфицированных моллюсков.
- Эти методы диагностики могут применяться при исследовании больных моллюсков с целью подтверждения предварительного (эпизоотического) диагноза, при карантинировании моллюсков, при мониторинге хозяйств (регионов) с целью ранней диагностики болезни, а также для эпизоотического зонирования (районирования) акваторий.
- Обобщенные нами данные заполняют образовавшийся пробел в области отечественного научного знания о лабораторной диагностике этого заболевания. Результаты исследований могут быть применены для разработки ветеринарных инструкций в РФ. Своевременная и точная диагностика герпесвирусного заболевания устриц позволяет предотвратить его вспышки, уменьшить возможные потери, может обеспечить условия для стабильной продуктивной работы устричных хозяйств в Черном море.