

УДК: 639.3.09

DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.2.30

ИЗЫСКАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ПЦР-РВ ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ВИРУСНОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ СЕПТИЦЕМИИ РЫБ

Громова Е.А.* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0416-6193); Миргазов Д.А. – мл. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-4709-314X); Додонова Е.А. – мл. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-6919-4064); Осянин К.А. – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-2763-8605); Горбунова М.Е. – канд. биол. наук, науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0707-2117); Макаева А.Р. – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0891-9826)

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

*elizaveta-real@mail.ru

Ключевые слова: вирусная геморрагическая септицемия, ОТ-ПЦР, чувствительность, специфичность, генетические маркеры, диагностика.

Key words: viral hemorrhagic septicemia, RT-PCR, sensitivity, specificity, genetic markers, diagnosis.

Поступила: 11.03.2025

Принята к публикации: 06.06.2025

Опубликована онлайн: 20.06.2025

РЕФЕРАТ



Вирусная геморрагическая септицемия является одной из наиболее опасных болезней рыб, наносящих существенный урон экономическому развитию аквакультуры. В Российской Федерации диагностические мероприятия по выявлению данного возбудителя, как правило, базируются на серологических подходах. Однако, наиболее быстрыми и точными являются молекулярно-генетические методы диагностики, в основе которых лежит полимеразная цепная реакция. Целью данной работы явилась разработка комбинации праймеров и зонда, пригодной для специфической ПЦР-индикации вируса геморрагической септицемии в режиме реального времени. На первом этапе работы был осуществлен биоинформационный анализ доступных, на сегодняшний день, нуклеотидных последовательностей геномов возбудителя вирусной геморрагической септицемии. Проанализировав последовательности данного вируса, в пределах гена N, кодирующего нуклеопротеин, определен маркерный локус размером 180 п.о. В пределах данного локуса разработаны праймеры и зонд, пригодные для выявления изолятов вирусной геморрагической септицемии в формате полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. В результате серии экспериментов, проведенных на кДНК, выделенных из вирусных культур VHSV ЧФ 1.2, VHSV 22-ARM, IHNV и IPN, была определена программа амплификации и состав реакционной смеси. Установлено, что разработанные праймеры обладают 100 % специфичностью, а чувствительность может достигать 12 копий вирусных частиц на микролитр. Таким образом, подобранные в рамках данной работы нуклеотидные маркеры и сконструированные на их основе праймеры и зонд обладают всеми необходимыми характеристиками для использования их в качестве основы тест-системы, позволяющей проводить быструю ПЦР-индикацию вируса для выявления и идентификации возбудителя вирусной геморрагической септицемии.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Вирусная геморрагическая септицемия (VHS) – это высоко контагиозная болезнь дикой и аквакультурной рыбы, которой подвержены особи всех возрастов отрядов лососеобразных, камбалообразных и сельдеобразных. Клинические проявления заболевания выражаются в виде интенсивных кровоизлияний в кожных покровах, мышечной ткани, глазных яблоках, почках и печени зараженной рыбы, часто с летальным исходом (до 90 %) [1]. Высокая смертность преимущественно характерна для мальков и молоди видов *Oncorhynchus mykiss*, *Scophthalmus maximus* и *Paralichthys olivaceus* [2].

Возбудителем болезни является вирус геморрагической септицемии (VHSV), который относится к семейству *Rhabdoviridae*. Геном VHSV представлен несегментированной одноцепочечной РНК с отрицательной полярностью длиной около 11 килобаз, которая последовательно детерминирует шесть белков 3'-N (нуклеопротеин) - Р (связанный с полимеразой фосфопротеин) - М (матриксный белок) - G (гликопротеин) - NV (неструктурный белок) - L (РНК-зависимая полимераз) -5'. Наиболее активно транскрибируемым геном из вышеперечисленных является ген N [3].

На основе филогенетического анализа последовательностей генов G, N и NV выделяют четыре генотипа VHSV, каждый из которых ассоциирован с распространением данного вируса в конкретном географическом регионе [1]. Генотип I представлен европейскими пресноводными изолятами, а также изолятами из северных морей. Генотип II включает в себя изоляты, выделенные от зараженных рыб в Балтийском море. Изоляты, относящиеся к III генотипу, встречаются в Северном море, а также в проливах Скагеррак и Каттегат. К IV генотипу относятся североамериканские и азиатские изоляты [2]. Отметим, что генотипы вируса VHSV отличаются по своей вирулентной способности у различных видов рыб. В частности, европейские пресноводные штаммы могут стать причиной серьезного за-

болевания у радужной форели, в то время как североамериканские или североамериканские морские изоляты обычно не представляют серьезной опасности для этого вида или вообще не вызывают заболевания [4].

По классификации Международного эпизоотического бюро (МЭБ) VHS относится к категории особо опасных болезней рыб, требующей обязательной декларации в случае его обнаружения [1]. Согласно данным МЭБ наиболее неблагоприятным по данному заболеванию являются страны европейские и азиатские страны. Что касается Российской Федерации, циркуляция вируса VHSV зарегистрировано в рыбных хозяйствах Республики Карелия [5].

Вирусные болезни рыб представляет серьезную проблему для рыбоводческих хозяйств с точки зрения экономики и социальной сферы, а также оказывает негативное воздействие на природные ресурсы и способствует исчезновению редких видов. Поэтому необходимость разработки и совершенствования методологических подходов для быстрой и точной индикации VHSV не вызывает сомнений.

В Российской Федерации лабораторная диагностика VHS проводится, как правило, серологическими методами путем исследования сывороток крови зараженных рыб (ИФА, НРИФ) [5]. Для оперативного и точного обнаружения и идентификации патогенов, вызывающих инфекционные заболевания, наиболее эффективным является метод ПЦР и его модификации. Однако, на сегодняшний день, на отечественном рынке отсутствуют ПЦР тест-системы, нацеленные на индикацию VHSV. Поэтому целью данной работы явилась разработка комбинации праймеров и зонда, пригодная для специфической ПЦР-индикации вируса геморрагической септицемии в режиме реального времени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

В исследовании использовали инaktivированные вирусные культуры штаммов VHSV ЧФ 1.2, VHSV 22-ARM, IHN

и IPN (ФКП «Ставропольская биофабрика»). Для выделения РНК был использован комплект реагентов «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия). Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора «Реверта-Л» («АмплиСенс», Россия). Все манипуляции с нуклеиновыми кислотами выполнялись в соответствии с протоколом производителя. Биоинформационный анализ проводили на основе представленных в базе GenBank нуклеотидных последовательностей геномов вируса VHSV. Подбор маркерных локусов и дизайн олигонуклеотидных затравок, пригодных для индикации VHSV молекулярными методами, выполняли с помощью программ «Vector NTI 9.1.0» и «BLASTn» согласно общепринятым методикам [6-8]. Множественное выравнивание проводили с помощью программы «Clustal Omega». Разработанную комбинацию праймеров и зонда синтезировали в ЗАО «Евроген» (Москва). Постановку ПЦР-РВ проводили с использованием набора реагентов ЗАО «Синтол» (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Вирусная геморрагическая септицемия – это опасная вирусная болезнь рыб, часто лососевых, которая наносит значительный экономический ущерб аквакультуре, ввиду высокой смертности среди молоди. Для мониторинга и выявления возбудителя VHS, а также минимизации риска его распространения важное значение имеет проведение быстрой и точной диагностики, используя самые передовые методические подходы. В мировой практике в качестве надежного инструмента для индикации и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний водных и наземных животных все чаще применяется метод ПЦР-РВ. Данный метод характеризуется высокой степенью специфичности и чувствительности, что позволяет обнаруживать даже единичные копии инфекционного агента в исследуемом образце [5].

Так, на сегодняшний день иностранными учеными разработаны различные способы обнаружения вируса VHS методом ПЦР-РВ, в том числе позволяющие

проводить количественный анализ вирусных частиц в исследуемом материале и генотипировать новые изоляты VHSV [2, 3, 9, 10]

Единичные работы проводятся на территории РФ, в частности, предложен подход для диагностики вируса геморрагической септицемии у лососевых рыб методом гнездовой ОТ-ПЦР [5]. Однако, в большинстве случаев диагностические подходы, разработанные российскими учеными, базируются на использовании классической ПЦР с последующей электрофоретической детекцией и не находят широкого применения на практике [11, 12].

Действительно, до 2022 года на отечественном рынке были представлены исключительно импортные ПЦР-диагностикумы для выявления вирусных заболеваний рыб, в том числе и VHS. Из-за наложенных санкционных ограничений данные тест-наборы более не поставляются, что создает необходимость разработки собственных молекулярно-генетических подходов к диагностике вирусных болезней рыб. В рамках настоящей работы была исследована возможность создания способа индикации вируса VHS с применением ПЦР-РВ.

На сегодняшний день в базе данных GenBank представлена информация о 1932 полногеномных нуклеотидных последовательностях вируса VHSV (январь 2025 г.). Данные последовательности были загружены с помощью онлайн ресурса «NCBI Virus» (www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus) и использованы нами для дальнейшего биоинформационного анализа. Для подбора маркерных локусов, пригодных для индикации VHSV методами ПЦР, был выбран ген N, поскольку он является наиболее активно транскрибируемым в геноме данного вируса и находит активное применение при генотипировании [2]. Анализ вариативности нуклеотидных последовательностей гена N различных штаммов VHSV производился относительно их геномов, депонированных в базе данных GenBank под следующими номерами: FN665788.1,

AB672614.1, KC778774.1, AB839745.1, MK829392.1, MK829393.1, MK829395.1, MK829401.1, MK829408.1, MK829410.1, MK829411.1, MK829412.1, MK829413.1, MK829675.1, MK829677.1, MK829678.1, MK829679.1, MK829680.1, MK829681.1, MK829682.1, MK829683.1, MK829684.1, MK829685.1, MK829686.1, MK829706.1, MN038325.1, MN038327.1, MN038329.1, MN038330.1, MN038331.1, MN038337.1, MN038338.1, MN038339.1, MN038340.1, MN038341.1, MN038342.1, MN038343.1, MN038344.1, MN856666.1, MT162443.1, MT162444.1, MT162445.1, MT162446.1, MT162447.1, MT162448.1, MT162449.1, MT162450.1, MT162451.1, MW507000.1, MT162443.1.

Проведенное множественное выравнивание позволило определить маркерный locus размером 180 п.о. локализованный в области от 343 до 522 нуклеотидов геномов VHSV (относительно последовательностей MN038344.1, MN038339.1, MN038337.1, MK829412.1, MK829410.1, MK829395.1, MW507000.1, KC778774.1, MT162443.1, MT162449.1), характеризующийся наименьшим количеством единичных полиформизмов.

Далее в пределах данного локуса были сконструированы праймеры и флюоресцирующий зонд, обладающие оптимальными для проведения ПЦР-РВ параметрами, а именно процентным содержанием GC, температурой плавления (T_m) и длиной праймеров (рисунок 1).

	Правый праймер	Зонд	Обратный праймер
MK829411.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MT162444.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MK829413.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MN038340.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MN038337.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
NC_000855.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
KC778774.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MT162449.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MK829395.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MT162443.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
FN665788.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MK792283.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MK829706.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MT162439.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MK829398.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MT162440.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
293414.2	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MT162441.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
AB839747.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MK829415.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
AB839748.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
F1460591.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MK829405.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MK829402.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
MK829400.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG
AB839745.1	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG	CCGAGCTGTACAGCGCTTCCCGTCTCTCTCTATCTCTCAAGGGAACACACAGGAGGACTAGAAACAAGTGCAGGCTCCACAGCATGGGCTTCAAGGTACACAGGCGAGTCAGGGCCACAGCATCGAGGCGGAATCATGATCCATGAGAGAACTGGCCCTACTG

Рисунок 1 – Сравнение нуклеотидных последовательностей маркерного локуса гена *N* различных штаммов VHSV.

В качестве флуорофора и гасителя была выбрана комбинация (ROX) – (BNQ2). Специфичность разработанных праймеров была исследована с помощью онлайн утилиты BLASTn. Установлено, что разработанные праймеры и зонд дают 100 % гомологией к большинству депонированных в базе данных GenBank нуклеотидным последовательностям гена *N* вируса VHSV.

После синтеза комбинации олигонуклеотидов была проведена серия экспериментов с использованием кДНК вирусных культур штаммов VHSV ЧФ 1.2 и VHSV 22-ARM, целью которых явились разработка и оптимизация протокола ПЦР-РВ

индикации вируса VHSV.

Анализ полученных экспериментальных данных позволил определить рабочую программу для проведения ПЦР-РВ: начальная денатурация ДНК при 95 °C в течение 5 мин, далее 5 циклов: денатурация при температуре 95 °C – 10 с, отжиг олигонуклеотидов: при 56 °C – 30 с, элонгация: при 72 °C – 25 с; далее 39 циклов: денатурация при температуре 95 °C – 10 с, отжиг олигонуклеотидов: при 56 °C – 30 с (детекция по каналу ROX), элонгация: при 72 °C – 25 с. Максимальная величина порогового цикла (C_t), при котором результат реакции считается положительным – $C_t < 31$. Также был оптимизи-

рован состав реакционной ПЦР-РВ смеси, а именно подобрана концентрация праймеров и зонда. Для выявления наилучшего соотношения олигонуклеотидов в реакционной смеси были рассмотрены концентрации праймеров в диапазоне от 0,15 мкМ до 1 мкМ. В ходе проведенного анализа было показано, что повышение концентрации праймеров в реакционной смеси не оказывает существенного влияния на результативность ПЦР-индикации целевого вируса. В дальнейших исследованиях в рабочей реакционной ПЦР-РВ смеси были использованы праймеры в

концентрации 0,4 мкМ каждого.

Также был проведен анализ чувствительности разработанной праймерной ПЦР-РВ системы. Предел обнаружения вирусных частиц в исследуемом материале определяли путем серии десятикратных разведений кДНК штамма VHSV 22-ARM из начальной концентрации 132 нг/мкл, что соответствует $1,12 \times 10^{10}$ вирусным частицам на один микролитр (в.ч./мкл), и до $1,32 \times 10^{-9}$ нг/мкл равной 1 в.ч./мкл. ПЦР-РВ проводили в трех повторностях. Результаты проведенного эксперимента представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Предел обнаружения VHSV разработанной праймерной ПЦР-РВ системой

Концентрация образца, нг/мкл	Значение Ct			Среднее значение Ct $M \pm SD$	Результат
132	9,61	9,67	9,52	9,6 $\pm$ 0,075	+
13,2	9,99	10,03	10,05	10,02 $\pm$ 003	+
1,32	11,2	11,32	11,41	11,31 $\pm$ 0,105	+
$1,32 \times 10^{-1}$	14,58	14,32	14,79	14,56 $\pm$ 0,235	+
$1,32 \times 10^{-2}$	15,02	15,32	15,12	15,15 $\pm$ 0,152	+
$13,2 \times 10^{-3}$	16,59	17,01	16,42	16,67 $\pm$ 0,303	+
$13,2 \times 10^{-4}$	18,09	17,87	18,02	17,99 $\pm$ 0,112	+
$13,2 \times 10^{-5}$	20,99	21,24	21,04	21,09 $\pm$ 0,132	+
$13,2 \times 10^{-6}$	25,02	25,65	25,44	25,37 $\pm$ 0,32	+
$13,2 \times 10^{-7}$	27,02	27,34	27,19	27,18 $\pm$ 0,16	+
$13,2 \times 10^{-8}$	32,04	30,87	29,78	30,89 $\pm$ 1,13	$\pm$
$13,2 \times 10^{-9}$	NV	NV	NV	-	-
Отрицательный контроль	NV	NV	NV	-	-

Как видно из таблицы 1, минимальная концентрация VHSV в образце, при которой наблюдается положительная амплификация ($C_t < 31$) для всех трех повторностей, составляет $13,2 \times 10^{-9}$ нг/мкл, что соответствует 112 копиям в.ч./мкл. Однако отметим, что в двух из трех повторностях образца с концентрацией $13,2 \times 10^{-8}$ нг/мкл, также наблюдалась флуоресценция по каналу ROX. Таким образом, заключили, что чувствительность разработанной комбинации праймеров и зонда может достигать 12 копий в.ч./мкл.

Для апробации и оценки видоспецифичности разработанной праймерной системы использовали разнообразные вирусные культуры, включающие в себя как возбудителей вирусной геморрагической септицемии (штаммы VHSV ЧФ 1.2 и VHSV 22-ARM), так и других болезней рыб. В частности, использованы штаммы вирусов IHNV (инфекционный некроз гемопоэтической ткани) и IPN (инфекционный некроз поджелудочной железы).

При амплификации кДНК 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 ПЦР-РВ с кДНК вирусов IHNV и IPN ни одного ложноположительного результата зафиксировано не было, что служит подтверждением высокой специфичности разработанного способа индикации ВГС методом ПЦР-РВ.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В рамках настоящей работы разработана праймерная система ПЦР-РВ индикации опасной болезни рыб — вирусной геморрагической септицемии. Сконструированы специфические праймеры и Taq-Man-зонд, мишенью для которых является ген N вируса VHSV, детерминирующий один из основных факторов вирулентности данного вируса. В исследованиях проведенных *in silico* показано, что разработанные олигонуклеотиды комплементарны к искомым последовательностям данного гена большинства депонированных в базе данных GenBank гено-

мов VHSV. Экспериментально было установлено, что специфичность разработанных олигонуклеотидов составила 100 %, а чувствительность может достигать 12 копий в.ч./мкл. Также определены оптимальные условия для проведения ПЦР-РВ и состав реакционной смеси. Таким образом, можно заключить, что сконструированная комбинация олигонуклеотидных затравок обладают всеми необходимыми параметрами для использования их в качестве основы для построения ПЦР-РВ тест-системы, нацеленной на индикацию вируса VHSV. Такой диагностикум позволит быстро и высокоспецифично выявлять VHSV как в патологическом материале, так и в крови зараженных рыб, в ходе мониторинга и диагностических мероприятий вирусных болезней рыб.

AN INVESTIGATION OF GENETIC MARKERS FOR PCR-RT INDICATION OF THE VIRAL HEMORRHAGIC SEPTICEMIA CAUSATIVE AGENT

Gromova E.A.* – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher (ORCID 0000-0002-0416-6193); Mirgazov D.A. – Junior Researcher (ORCID 0000-0002-4709-314X); Dodonova E.A. – Junior Researcher (ORCID 0000-0002-6919-4064); Osyannin K.A. – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0003-2763-8605); Gorbunova M.E. – Candidate of Biological Sciences, Researcher (ORCID 0000-0002-0707-2117); Makaeva A.R. – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher (ORCID 0000-0002-0891-9826)

Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety"

*elizaveta-real@mail.ru

ABSTRACT

Viral hemorrhagic septicemia is one of the most dangerous fish diseases, causing significant damage to the economic development of aquaculture. In the Russian Federation, diagnostic measures to identify this pathogen are usually based on serological approaches. However, the fastest and the

most accurate methods are molecular genetic diagnostic methods based on the polymerase chain reaction. The aim of this work was to develop a combination of primers and probe suitable for specific PCR indication of hemorrhagic septicemia virus in real time. At the first stage of the work, a bioinformatic analysis of the currently available nucleotide sequences of the genomes of the viral hemorrhagic septicemia causative agent was carried out. After analyzing the sequences of this virus, a marker locus of 180 bp was determined inside of the N gene encoding the nucleoprotein. Inside of this locus, primers and a probe suitable for detecting isolates of viral hemorrhagic septicemia in the real time polymerase chain reaction were developed. As a result of a series of experiments conducted on cDNAs isolated from VHSV CF 1.2 and VHSV 22-ARM virus cultures, the amplification program and the composition of the reaction mixture were determined. It has been established that the developed primers have 100% specificity, and sensitivity can reach 12 copies of virus particles per microliter. Thus, the nucleotide markers selected as part of that work and the primers and probe constructed on their basis have all the characteristics necessary for their use as the basis of a test system that allows for rapid PCR indication of the virus to detect and identify the causative agent of viral hemorrhagic septicemia.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Yusuff S., Kurath G., Kim M.S., Tesfaye T.M., Li J., McKenney D.G., Vakharia V.N. The glycoprotein, non-virion protein, and polymerase of viral hemorrhagic septicemia virus are not determinants of host-specific virulence in rainbow trout. *Virol J.* 2019; 16 (1):31. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1139-3>
2. Baillon L., Mérour E., Cabon J., Louboutin L., Vigouroux E, Alencar ALF, Cuenca A, Blanchard Y, Olesen NJ, Panzarin V, Morin T, Brémont M, Biacchesi S. The Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Markers of Virulence in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Front Microbiol.* 2020; 11:574231. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.574231>
3. Kim H.J., Cuenca A., Olesen N. J Validation of a novel one-step reverse transcription polymerase chain reaction method for detecting viral haemorrhagic septicaemia virus. *Aquaculture.* 2018; 492:170-183. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.047>
4. Ito T., Kurita J., Mori K., Olesen N.J. Virulence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype III in rainbow trout. *Vet Res.*; 47:4. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0303-z>
5. Пыльнов В. А., Бурлаченко И. В., Бычкова Л. И. Применение гнездового варианта ПЦР (ОТ-ПЦР) для диагностики вируса геморрагической септицемии у лососевых рыб. Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры: Сборник научных трудов Филиала по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»). 2023; 94:122-129.
6. Анисимова Е.А., Додонова Е.А., Миргазов Д.А., Фахрутдинов Н.А., Елизарова И.А., Панкова Е.В., Осянин К.А. Подбор оптимальных условий постановки ПЦР для идентификации возбудителя бруцеллеза собак. Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2023; 12(230):55-59. <https://doi.org/10.53083/1996-4277-2023-230-12-55-59>
7. Громова Е.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Горбунова М.Е., Осянин К.А. Разработка мультиплексной ПЦР-РВ тест-системы для выявления возбудителя бруцеллеза. Ветеринарный врач. 2024; 3:34-40. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_3_34
8. Громова Е.А., Осянин К.А., Додонова Е.А., Горбунова М.Е., Хаммадов Н.И., Макаева А.Р. Генетические маркеры для ПЦР-индикации вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб. Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2024; 5:88-94.
9. Chico V., Gomez N., Estepa A., Perez L.. Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time

- RT-PCR. *J Virol Methods*. 2006; 132(1-2):154-9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.10.005>
 10. Warg J.V, Clement T., Cornwell E.R, Cruz A., Getchell R.G, Giray C., Goodwin A.E, Groocock G.H., Faisal M., Kim R., Merry G.E., Phelps N.B., Reising M.M., Standish I., Zhang Y., Toohey-Kurth K. Detection and surveillance of viral hemorrhagic septicemia virus using real-time RT-PCR. II. Diagnostic evaluation of two protocols. *Dis Aquat Organ*. 2014; 111(1):15-22. <https://doi.org/10.3354/dao02758>
 11. 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. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-1-32-11-16>
 12. Перчун А. В., Воробьев В. В., Мельников В. П. Обнаружение особо опасных вирусных болезней рыб семейства лососёвых (*Salmo salar*) с применением полимеразной цепной реакции. *Рыбное хозяйство*. 2022; 5:88-93. <https://doi.org/10.37663/0131-6184-2022-5-88-93>
- REFERENCES**
1. Yusuff S., Kurath G., Kim M.S., Tesfaye T.M., Li J., McKenney D.G., Vakharia V.N. The glycoprotein, non-virion protein, and polymerase of viral hemorrhagic septicemia virus are not determinants of host-specific virulence in rainbow trout. *Virol J*. 2019; 16(1):31. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1139-3>
 2. Baillon L., Mérour E., Cabon J., Louboutin L., Vigouroux E, Alencar ALF, Cuenca A, Blanchard Y, Olesen NJ, Panzarin V, Morin T, Brémont M, Biacchesi S. The Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Markers of Virulence in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Front Microbiol*. 2020; 11:574231. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.574231>
 3. Kim H.J., Cuenca A., Olesen N. J Validation of a novel one-step reverse transcription polymerase chain reaction method for detecting viral haemorrhagic septicaemia virus. *Aquaculture*. 2018; 492:170-183. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.047>
 4. Ito T., Kurita J., Mori K., Olesen N.J. Virulence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype III in rainbow trout. *Vet Res*; 47:4. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0303-z>
 5. Pylnov V.A., Burlachenko I.V., Bychkova L.I. Application of the nest PCR variant (RT-PCR) for the diagnosis of hemorrhagic septicemia virus in salmon fish. *Current issues of freshwater aquaculture : Collection of scientific papers of Branch for the freshwater fisheries of the Federal State Budget Scientific Institution "Russian Federal Research Institute of Fisheries and oceanography"*. 2023; 94:122-129 (In Russ.).
 6. Anisimova E.A., Dodonova E.A., Mirgazov D.A., Fakhrutdinov N.A., Elizarova I.A., Pankova E.V., Osyanin K.A. Selection of optimal conditions of PCR setup to identify canine brucellosis causative agent. *Bulletin of Altai State Agricultural University*. 2023; 12(230):55-59. <https://doi.org/10.53083/1996-4277-2023-230-12-55-59> (In Russ.).
 7. Gromova E.A., Mirgazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Gorbunova M.E., Osyanin K.A. Development of a multiplex RT-PCR test system for detecting the causative agent of brucellosis. *The Veterinarian*. 2024; 3:34-40. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_3_34 (In Russ.).
 8. Gromova E.A., Osyanin K.A., Dodonova E.A., Gorbunova M.E., Khammatov N.I., Makaeva A.R. Genetic markers for PCR indication of salmonid infectious hematopoietic necrosis virus. *Bulletin of Kursk State Agricultural Academy*. 2024; 5:88-94 (In Russ.).
 9. Chico V., Gomez N., Estepa A., Perez L. Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time RT-PCR. *J Virol Methods*. 2006; 132(1-2):154-9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.10.005>
 10. Warg J.V, Clement T., Cornwell E.R, Cruz A., Getchell R.G, Giray C., Goodwin A.E, Groocock G.H., Faisal M., Kim R., Merry G.E., Phelps N.B., Reising M.M., Standish I., Zhang Y., Toohey-Kurth K. De-

tection and surveillance of viral hemorrhagic septicemia virus using real-time RT-PCR. II. Diagnostic evaluation of two protocols. Dis Aquat Organ. 2014; 111(1):15-22. <https://doi.org/10.3354/dao02758>

11. Tarasova A. S., Perchun A. V., Melnikov V. P. Polymerase chain reaction for detection of some highly dangerous viral fish disease agents. Veterinary Science To-

day. 2020; 1(32):11-16. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-1-32-11-16>

12. Perchun A.V., Vorobyov V.V., Melnikov V.P. Detection of particularly dangerous viral diseases of salmon fish (*Salmo salar*) using polymerase chain reaction. Fisheries. 2022; 5:88-93. <https://doi.org/10.37663/0131-6184-2022-5-88-93>