

## ОСТРЫЙ ГЕПАТОПАНКРЕАТИЧЕСКИЙ НЕКРОЗ

### 1. Предмет рассмотрения

«Острый гепатопанкреатический некроз» (АНПНД) означает инфекцию штаммами *Vibrio parahaemolyticus* ( $V_{PAHPND}$ ), которые содержат плазмиду из ~70 тысяч пар нуклеотидов с генами, которые кодируют гомологи связанных с насекомыми рода *Photorhabdus* (Pir) токсинов PirA и PirB. Несмотря на то, что известны случаи выделения других видов *Vibrio* из клинических случаев АНПНД, было продемонстрировано, что только  $V_{PAHPND}$  вызывает АНПНД.

### 2. Информация о болезни

#### 2.1. Особенности возбудителя

##### 2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

АНПНД имеет бактериальную этиологию (Kondo *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013a; Tran *с соавт.*, 2013b). Его вызывают особые вирулентные штаммы *V. parahaemolyticus* ( $V_{PAHPND}$ ) которые содержат плазмиду из ~70 тысяч пар нуклеотидов с генами, которые кодируют гомологи связанных с насекомыми рода *Photorhabdus* (Pir) бинарных токсинов PirA и PirB (Gomez-Gil *с соавт.*, 2014; Gomez-Jimenez *с соавт.*, 2014; Han *с соавт.*, 2015a; Kondo *с соавт.*, 2014; Lee *с соавт.*, 2015; Yang *с соавт.*, 2014). Плазида, содержащаяся в  $V_{PAHPND}$ , была обозначена как pVA1, и ее размер может немного различаться. Удаление (или «устранение») pVA1 лишает штаммы  $V_{PAHPND}$  возможности вызывать АНПНД.

Внутри популяции  $V_{PAHPND}$ -бактерий, у нескольких особей может встречаться естественная делеция оперона Pir<sup>vp</sup> (Lee *с соавт.*, 2015; Tinwongger *с соавт.*, 2014). Данная делеция обусловлена нестабильностью, вызванной повторяющимися последовательностями или транспозазой, которые фланкируют оперон Pir-токсина. Когда происходит делеция, это означает, что штамм  $V_{PAHPND}$  утратит способность индуцировать АНПНД. Однако, если последовательность Pir-токсина используется в качестве мишени для обнаружения, то колония, в которой имеется данная делеция, даст отрицательный результат, даже если колония была получена из изолята  $V_{PAHPND}$ , вызывающего АНПНД.

Плазида pVA1 также несет кластер генов, связанных с конъюгативным переносом, что означает, что данная плазида потенциально способна передаваться другим бактериальным клеткам.

##### 2.1.2. Выживание вне хозяина

Предполагается, что  $V_{PAHPND}$  обладает свойствами, аналогичными с другими штаммами *V. parahaemolyticus*, обнаруженными в морепродуктах, которые выживают до 9 и 18 дней в отфильтрованной воде эстуария и отфильтрованной морской воде при температуре окружающей среды  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  (Karunasagar *с соавт.*, 1987).

### **2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)**

Экспериментальные исследования продемонстрировали, что *V<sub>рАНРND</sub>* не может передаваться через замороженных зараженных креветок (Tran *с соавт.*, 2013а). Аналогичным образом известно, что другие штаммы *V. parahaemolyticus* чувствительны к замораживанию, охлаждению, нагреванию и к обычным дезинфицирующим средствам (Andrews *с соавт.*, 2000; Muntada-Garriga *с соавт.*, 1995; Su & Liu, 2007; Thomson & Thacker, 1973).

### **2.1.4. Жизненный цикл**

Не применимо.

## **2.2. Особенности хозяина**

### **2.2.1. Восприимчивые виды хозяев**

К видам, которые отвечают критериям для включения в список в качестве восприимчивых к АНРND в соответствии с требованиями Главы 1.5. *Ветеринарно-санитарного кодекса водных животных (Кодекса по водным животным)*, относятся: гигантская тигровая креветка (*Penaeus monodon*) и белоногая креветка (*Penaeus vannamei*).

### **2.2.2. Виды, в отношении которых недостаточно доказательств об их восприимчивости**

К видам, которые не полностью отвечают критериям для включения в список в качестве восприимчивых к АНРND в соответствии с требованиями Главы 1.5. *Кодекса по водным животным*, относятся: китайские белые креветки (*Penaeus chinensis*).

Кроме того, положительные результаты патоген-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) были зарегистрированы в следующих организмах, но без активной инфекции: японские тигровые креветки (*Penaeus japonicus*).

### **2.2.3. Стадии развития хозяев, на которых организмы наиболее восприимчивы к инфекции**

Гибель наступает в течение 30–35 дней, и уже в течение 10 дней после посадки в пруды послеличинок (PL) или молоди креветок (Joshi *с соавт.*, 2014b; Leña & Mohan, 2012; Nunan *с соавт.*, 2014; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013b). de la Peña *с соавторами*, 2015 г., сообщали о вспышках болезни на Филиппинах, которые произошли через 46–96 дней после посадки креветок в пруды.

### **2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)**

Не применимо.

### **2.2.5. Органы-мишени и инфицированные ткани**

Органы и ткани кишечника.

### **2.2.6. Персистентная инфекция**

Нет данных или неизвестно.

### **2.2.7. Виды-переносчики**

Не известны, хотя в связи с тем, что *Vibrio* spp. повсеместно распространены в морской среде, можно предположить, что виды-переносчики существуют.

## **2.3. Модель болезни**

### **2.3.1. Механизмы передачи**

*Vp<sub>AHPND</sub>* передавались экспериментально путем погружения, кормления (перорально) и введения Pir-токсина с помощью инъекции (Dabu *с соавт.*, 2017; Joshi *с соавт.*, 2014b; Nunan *с соавт.*, 2014; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013b), что воспроизводило естественную горизонтальную передачу пероральным путем и передачу в условиях совместного обитания.

### **2.3.2. Превалентность**

В регионах, где АHPND является энзоотической болезнью у разводимых на фермах креветок, существует почти 100% превалентность (Tran *с соавт.*, 2014a).

### **2.3.3. Географическое распределение**

Заболевание было зарегистрировано в Китае (Китайская Народная Республика) (2010 г.), Вьетнаме (2010 г.), Малайзии (2011 г.), Таиланде (2012 г.) (Flegel, 2012 г.; Lightner *с соавт.*, 2012 г.), Мексике (2013 г.) (Nunan *с соавт.*, 2014) и на Филиппинах (2014 г.) (Dabu *с соавт.*, 2017; de la Peña *с соавт.*, 2015).

### **2.3.4. Смертность и заболеваемость**

АHPND характеризуется внезапной массовой гибелью (до 100%), как правило, в течение 30–35 дней после посадки в нагульные пруды послеличинок (PL) или молоди креветок (ФАО, 2013; Hong *с соавт.*, 2016; НАСА, 2012). Болезнь может также поражать молодь более старшего возраста (de la Peña *с соавт.*, 2015).

### **2.3.5. Факторы окружающей среды**

Слабосоленая вода (<20 ppt (частей на тысячу)), по-видимому, снижает заболеваемость. Пик заболеваемости, вероятно, приходится на жаркий и сухой сезон с апреля по июль. Перекармливание, плохое качество молоди, плохое качество воды, плохое качество кормов, цветение воды также являются факторами, которые могут привести к возникновению АHPND в эндемичных районах (ФАО, 2013; НАСА, 2012).

## **2.4. Профилактика и борьба с болезнью**

### **2.4.1. Вакцинация**

Не применимо.

### **2.4.2. Лекарственное лечение**

Лекарственные средства отсутствуют.

### **2.4.3. Иммуностимуляция**

Эффективные методы неизвестны.

#### **2.4.4. Разведение для получения резистентной популяции**

Не применимо.

#### **2.4.5. Повторное заселение резистентными видами креветок**

Отсутствуют.

#### **2.4.6. Блокирующие агенты**

Отсутствуют.

#### **2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок**

Не известно.

#### **2.4.8. Общие практики ведения деятельности по выращиванию креветок**

Как и в случае с другими инфекционными заболеваниями креветок, вероятно, будет целесообразным использование установленных надлежащих санитарных практик и практик биобезопасности, таких как улучшение санитарных условий в инкубатории и скрининг послеличинок; надлежащее управление маточным стадом, использование послеличинок высокого качества и надлежащее управление фермами по разведению креветок, включая строгий контроль частоты кормления, надлежащую плотность посадки и т.д., - все это хорошо зарекомендовавшие себя практики, снижающие воздействие заболеваний, включая АНPNД (НАСА, 2012).

### **3. Отбор образцов**

#### **3.1. Отбор отдельных особей**

Для диагностики АНPNД следует отбирать образцы умирающих креветок или креветок, демонстрирующих клинические признаки (см. Раздел 4.1.1). Предполагается, что взрослые особи (маточное стадо) могут нести штаммы *Vp<sub>АНPNД</sub>* (Lee *с соавт.*, 2015; Nunan *с соавт.*, 2014; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013b). Таким образом, маточное стадо без клинических признаков также можно отбирать для диагностического тестирования.

#### **3.2. Консервирование образцов**

Образцы должны быть представлены в следующем виде: (i) свежие и охлажденные на льду для выделения бактерий, (ii) фиксированные в 90% этаноле для обнаружения при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) и (iii) консервированные с использованием фиксатора АФА Дэвидсона для гистологии (Joshi *с соавт.*, 2014a; Joshi *с соавт.*, 2014b; Leño & Mohan, 2012; Lee *с соавт.*, 2015; Nunan *с соавт.*, 2014; Sirikharin *с соавт.*, 2015; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013b).

#### **3.3. Объединение образцов в пулы**

То, как объединение в пулы влияет на диагностическую чувствительность, не оценивалось, поэтому креветки большего размера следует обрабатывать и тестировать по отдельности. Однако, может понадобиться объединить в пулы особи на ранних стадиях развития (послеличинки или особи до 0,5 г) для получения достаточного количества материала для молекулярных исследований.

### **3.4. Наиболее подходящие органы или ткани**

Наиболее подходящими являются образцы органов и тканей кишечника, такие как гепатопанкреас, желудок, средняя кишка и задняя кишка. Кроме того, у маточного стада ценных видов креветок можно отбирать фекальные образцы (до гибели).

### **3.5. Неподходящие образцы/ткани**

Неподходящими являются образцы органов и тканей, не относящихся к кишечнику (ФАО, 2013; НАСА, 2012; НАСА, 2014; Nunan *с соавт.*, 2014; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013b).

## **4. Методы диагностики**

### **4.1. Полевые методы диагностики**

#### **4.1.1. Клинические признаки**

Появление клинических признаков и случаев гибели может начаться уже через 10 дней после посадки креветок в пруды. К клиническим признакам относятся: бледно-белый гепатопанкреас (НР), значительная атрофия гепатопанкреаса, мягкий панцирь, кишечник с неоднородным или отсутствующим содержимым, черные пятна или полосы, видимые внутри гепатопанкреаса (из-за меланизации канальцев). Кроме того, гепатопанкреас не сдвигается легко между большим и указательным пальцем (вероятно, из-за увеличения фиброзной соединительной ткани и гемоцитов) (НАСА, 2012; НАСА, 2014).

#### **4.1.2. Изменение поведения**

Не применимо.

### **4.2. Клинические методы**

#### **4.2.1. Клиническая химия**

Не известно.

#### **4.2.2. Микроскопическая патология**

Болезнь имеет две различные фазы:

i) Острая фаза характеризуется обширной и прогрессирующей дегенерацией канальцев гепатопанкреаса от проксимальных до дистальных, со значительным округлением и отслаиванием эпителиальных клеток канальцев гепатопанкреаса в канальцы НР, собирающие протоки НР и заднюю стенку желудка при отсутствии бактериальных клеток (ФАО, 2013; Nunan *с соавт.*, 2014; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013a; Tran *с соавт.*, 2013b; Tran *с соавт.*, 2014a; Tran *с соавт.*, 2014b).

ii) Конечная фаза характеризуется выраженным межканальцевым гемоцитарным воспалением и развитием обширных вторичных бактериальных инфекций, которые возникают в сочетании с отмиранием и отслаиванием клеток канальцев НР (ФАО,

2013; Leño & Mohan, 2012; NACA, 2012; NACA, 2014; Nunan *с соавт.*, 2014; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013a; Tran *с соавт.*, 2013b; Tran *с соавт.*, 2014a; Tran *с соавт.*, 2014b).

#### **4.2.3. Влажные препараты**

Не применимо.

#### **4.2.4. Мазки**

Не применимо.

#### **4.2.5. Фиксированные срезы ткани (для гибридизации *in-situ*)**

Гибридизации *in-situ* в настоящее время не имеется (октябрь 2015 г.).

#### **4.2.6. Электронная микроскопия / цитопатология**

Не применимо.

### **4.3. Методы обнаружения и идентификации агента**

#### **4.3.1. Метод прямого обнаружения**

##### **4.3.1.1. Микроскопические методы**

###### *4.3.1.1.1. Влажные препараты*

Не применимо.

###### *4.3.1.1.2. Мазки*

Не применимо.

###### *4.3.1.1.3. Фиксированные срезы ткани*

См. Раздел 4.2.5.

##### **4.3.1.2. Выделение и идентификация агента**

*V<sub>РАHPND</sub>* можно выделить на стандартной среде, используемой для выделения бактерий из заболевших креветок (Lee *с соавт.*, 2015; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015). Идентификация видов бактерий может быть проведена с использованием ПЦР, нацеленной на 16S рРНК (Weisburg *с соавт.*, 1991) или ПЦР, нацеленной на *toxR* (Kim *с соавт.*, 1999) и секвенирования. АHPND-специфичные методы ПЦР, нацеленные на гены токсина *V<sub>РАHPND</sub>*, описаны в разделе 4.3.1.2.3.1.

###### *4.3.1.2.1. Культура клеток /искусственные среды*

См. разделы 4.3.1.2.3.1. и 4.3.1.2.2.

###### *4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов*

На данный момент отсутствуют (октябрь, 2015 г.).

###### *4.3.1.2.3. Молекулярные методы*

#### 4.3.1.2.3.1 Протоколы ПЦР для обнаружения бактерий, вызывающих АНPNД, в культурах или зараженных креветках

Были разработаны методы ПЦР, которые нацелены на гены токсина  $Vp_{АНPNД}$ . Метод AP3 является одношаговой ПЦР, которая нацелена на ген PirA<sub>vp</sub> массой 12,7 кДа (Sirikharin *с соавт.*, 2015). Данный метод был валидирован на 100% прогностическую ценность положительного и отрицательного результата путем тестирования 104 изолятов  $Vp_{АНPNД}$  и непатогенных бактерий (включая другие виды *Vibrio* и виды, не относящиеся к *Vibrio*), которые ранее были протестированы с использованием биопробы (Sirikharin *с соавт.*, 2015). Впоследствии Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015 г., с использованием 9  $Vp_{АНPNД}$  и 11 непатогенных изолятов *V. parahaemolyticus*, продемонстрировали, что метод AP3 дал самую высокую прогностическую ценность положительного (90%) и отрицательного (100%) результата пяти протестированных методов ПЦР.

Методы одношаговой ПЦР, такие как AP3 и другие, например, VpPirA-284, VpPirB-392 (Han *с соавт.*, 2015a) и TUMSAT-Vp3 (Tinwongger *с соавт.*, 2014), имеют относительно низкую чувствительность, когда используются для выявления  $Vp_{АНPNД}$  на низких уровнях (например, бессимптомная инфекция) или в пробах окружающей среды, таких как наносы и биопленки. Для таких проб рекомендуется предварительный этап обогащения (см. Раздел 4.3.1.2.3.1.1).

В качестве альтернативы был разработан метод гнездовой ПЦР, AP4, с прогностической ценностью положительного результата, составляющей 100% для  $Vp_{АНPNД}$ , с использованием тех же 104 бактериальных изолятов, которые применялись для валидации вышеописанного метода AP3 (Dangtip *с соавт.*, 2015). Данный метод обладает большей чувствительностью (1 фг ДНК, экстрагированной из  $Vp_{АНPNД}$ ), что позволяет использовать его непосредственно с образцами ткани и пробами окружающей среды без стадии обогащения.

Кроме того, методы ПЦР в реальном времени, например метод  $Vp_{АНPNД}$ -специфичной ПЦР в реальном времени (по технологии TaqMan), разработанный Han *с соавт.*, 2015b, и метод петлевой изотермической амплификации (LAMP), разработанный Koivai *с соавт.*, 2016, также имеют высокую чувствительность и могут использоваться непосредственно с образцами ткани и пробами окружающей среды без стадии обогащения.

##### 4.3.1.2.3.1.1. Обогащение образцов перед выделением ДНК

Предварительное обогащение культуры для выявления  $Vp_{АНPNД}$  в случае бессимптомных инфекций или в пробах окружающей среды можно проводить с использованием любой подходящей бактериологической питательной среды (например, триптического соевого бульона или щелочной пептонной воды с добавлением 2,5% NaCl), инкубированной в течение 4 часов при 30°C при встряхивании. Затем, после осаждения дебриса, бактерии в культуральном бульоне осаждают центрифугированием. После удаления надосадочной жидкости, ДНК можно выделить из бактериального осадка при подготовке к анализу ПЦР.

#### 4.3.1.2.3.1.2. Выделение агента

*V<sub>PAHPND</sub>* можно выделить в чистой культуре, полученной из заболевших креветок, креветок с бессимптомной инфекцией или из проб окружающей среды с использованием стандартных микробиологических сред для выделения видов *Vibrio* из данных материалов (Lightner, 1996; Tran *с соавт.*, 2013a; Tran *с соавт.*, 2013b). Подтверждение идентификации *V<sub>PAHPND</sub>* можно провести с помощью ПЦР-анализа и биопробы.

#### 4.3.1.2.3.1.3. Выделение ДНК

Общепринятый метод выделения ДНК может быть использован для выделения ДНК из ткани желудка или гепатопанкреаса предположительно зараженных креветок, из культур очищенных бактериальных изолятов или из бактериального осадка, полученного из обогащенных культур (см. выше). Количество ДНК-матрицы для реакционной смеси ПЦР объемом 25 мкл должно составлять 0,01–1 нг ДНК при выделении из бактериальных изолятов (то есть непосредственно из очищенной культуры) и 10–100 нг общей ДНК при выделении из тканей креветок или из бактериального осадка, полученного из обогащенной культуры.

#### 4.3.1.2.3.1.4. Выявление плазмиды *pVA1* при помощи одношаговой ПЦР

Здесь описаны два метода одношаговой ПЦР (AP1 и AP2) для обнаружения плазмиды *pVA1* в обогащенных бульонных культурах. Праймеры, ген-мишень и размер ожидаемых ампликонов указаны в Таблице 4.1.

**Таблица 4.1.** Праймеры ПЦР для выявления бактерий, вызывающих АHPND, при помощи одношаговой ПЦР

Название метода	Праймеры	Ген-мишень	Размер ожидаемых ампликонов	Ссылка
AP1	AP1F: 5'-CCT-TGG-GTG-TGC-TTA-GAG-GAT-G-3' AP1R: 5'-GCA-AAC-TAT-CGC-GCA-GAA-CAC-C-3'	<i>pVA1</i>	700 пар оснований	Flegel & Lo, 2014
AP2	AP2F: 5'-TCA-CCC-GAA-TGC-TCG-CTT-GTG-G-3' AP2R: 5'-CGT-CGC-TAC-TGT-CTA-GCT-GAA-G-3'	<i>pVA1</i>	700 пар оснований	Flegel & Lo, 2014

#### 4.3.1.2.3.1.5. Протокол для методов ПЦР AP1 и AP2

Данный протокол соответствует методу, описанному Flegel & Lo, 2014. Реакционная смесь для ПЦР состоит из 2,5 мкл 10 × ПЦР смеси, 0,7 мкл 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 мкл 10 мМ dNTP, 0,5 мкл 10 мкМ AP3-F1, 0,5 мкл 10 мкМ AP3-R1, 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы и приблизительно 0,01-1 нг матричной ДНК в реакционной смеси объемом 25 мкл, доведенной до нужного объема дистиллированной водой. ПЦР реакция: денатурация при 94°C в течение 5 мин; затем 25-30 циклов при 94°C в течение 30 секунд, при 60°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 60 секунд со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 10 минут; затем реакционную смесь можно хранить при 4°C.



([http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication\\_id=1128](http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication_id=1128))

#### 4.3.1.2.3.1.6. Выявление генов токсинов PirA/PirB при помощи одношаговой ПЦР

Здесь описаны четыре метода одношаговой ПЦР (AP3, TUMSAT-Vp3, VpPirA-284 и VpPirB-392) для обнаружения генов Pir-токсинов в обогащенных бульонных культурах. Праймеры, ген-мишень и размер ожидаемых ампликонов указаны в Таблице 4.2.

**Таблица 4.2.** Праймеры ПЦР для выявления бактерий, вызывающих АНPNД, при помощи одношаговой ПЦР

Название метода	Праймеры	Ген-мишень	Размер ожидаемых ампликонов	Ссылка
AP3	AP3-F: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3' AP3-R: 5'-GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA-3'	<i>pirAvp</i>	333 пар оснований	Sirikharin с соавт., 2014, 2015
TUMSAT-Vp3	TUMSAT-Vp3 F: 5'-GTG-TTG-CAT-AAT-TTT-GTG-CA-3' TUMSAT-Vp3 R: 5'-TTG-TAC-AGA-AAC-CAC-GAC-TA-3'	<i>pirAvp</i>	360 пар оснований	Tinwongger et al., 2014
VpPirA-284	VpPirA-284F: 5'-TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG-3' VpPirA-284R: 5'-CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA-3'	<i>pirAvp</i>	284 пар оснований	Нап с соавт., 2015a
VpPirB-392	VpPirB-392F: 5'-TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC-3' VpPirB-392R: 5'-TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA-3'	<i>pirAvp</i>	392 пар оснований	Нап с соавт., 2015a

#### 4.3.1.2.3.1.7. Протокол для метода AP3 ПЦР

Данный протокол соответствует методу, описанному Sirikharin с соавт., 2015. Реакционная смесь для ПЦР состоит из 2,5 мкл 10 × ПЦР смеси, 0,7 мкл 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 мкл 10 мМ dNTP, 0,5 мкл 10 мкМ AP3-F1, 0,5 мкл 10 мкМ AP3-R1, 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы и приблизительно 100 нг матричной ДНК в реакционной смеси объемом 25 мкл, доведенной до нужного объема дистиллированной водой. ПЦР реакция: денатурация при 94°C в течение 5 мин; затем 30 циклов при 94°C в течение 30 секунд, при 53°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 40 секунд со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 5 минут; затем реакционную смесь можно хранить при 4°C.

#### 4.3.1.2.3.1.8. Протокол для методов ПЦР VpPirA-284 и VpPirB-392

Данный протокол соответствует методу, описанному Нап с соавт., 2015b, с использованием ПЦР-сфер «PuReTaq ready-to-go PCR beads» (GE Healthcare). 25 мкл реакционной смеси для ПЦР готовят, используя ПЦР-сферы «PuReTaq ready-to-go PCR beads». Каждая реакция содержит 0,2 мкМ каждого праймера, 10 мМ Трис/НСl (рН 9,0), 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U Taq ДНК-полимеразы и 1 мкл экстрагированной ДНК. ПЦР реакция: денатурация при 94°C в течение 3 минут, затем

35 циклов при 94°C в течение 30 секунд, при 60°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 30 секунд со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 7 минут.

#### 4.3.1.2.3.1.9. Протокол для метода ПЦР TUMSAT-Vp3

Данный протокол соответствует методу, описанному Tinwongger *с соавт.*, 2014. Готовят 30 мкл реакционной смеси для ПЦР, содержащей 1 мкл матричной ДНК, 10 × ПЦР-буфера, 0,25 мМ dNTP-смеси, 0,6 мкМ каждого праймера и 0,01 U Taq-полимеразы. ПЦР реакция включает стадию предварительного нагрева при 95°C в течение 2 минут, затем 30 циклов денатурации при 95°C в течение 30 секунд, отжиг при 56°C в течение 30 секунд и стадию элонгации при 72°C в течение 30 секунд.

#### 4.3.1.2.3.1.10. Протокол для метода AP4 гнездовой ПЦР для обнаружения VpАНРND

Данный протокол соответствует методу, описанному Dangtip *с соавт.*, 2015. Первая реакционная смесь для ПЦР содержит 2,5 мкл 10 × ПЦР смеси, 1,5 мкл 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мкл 10 мМ dNTP, 0,5 мкл 10 мкМ AP4-F1, 0,5 мкл 10 мкМ AP4-R1, 0,3 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл) и приблизительно 100 нг матричной ДНК в реакционной смеси объемом 25 мкл, доведенной до нужного объема дистиллированной водой. Протокол ПЦР: денатурация при 94°C в течение 2 мин; затем 30 циклов при 94°C в течение 30 секунд, при 55°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 90 секунд со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 2 минут; затем реакционную смесь можно хранить при 4°C.

Реакционная смесь для гнездовой ПЦР состоит из 2,5 мкл 10 × ПЦР смеси, 1,5 мкл 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мкл 10 мМ dNTP, 0,375 мкл 10 мкМ AP4-F2, 0,375 мкл 10 мкМ AP4-R2, 0,3 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл) и 2 мкл первой реакционной смеси для ПЦР в объеме 25 мкл. Протокол гнездовой ПЦР: денатурация при 94°C в течение 2 мин; затем 25 циклов при 94°C в течение 20 секунд, при 55°C в течение 20 секунд и при 72°C в течение 20 секунд; затем реакционную смесь можно хранить при 4°C.

Праймеры для гнездовой ПЦР, созданные с использованием китайского (Китайская Народная Республика) изолята бактерий АНРND (Yang *с соавт.*, 2014), указаны в таблице 4.3. Размер ожидаемых ампликонов для внешних праймеров (AP4-F1 и AP4-R1) составляет 1269 пар оснований, и 230 пар оснований для внутренних праймеров (AP4-F2 и AP4-R2). При высоких концентрациях ДНК-мишени на этапе вложения могут возникать дополнительные ампликоны в виде продукта остаточного праймера AP4-F1, присоединившегося к AP4-R2 (357 пар оснований) или AP4-F2, присоединившегося к AP4-R1 (1142 пар оснований).

**Таблица 4.3.** Праймеры для метода AP4 гнездовой ПЦР для обнаружения VpАНРND

Название метода	Праймеры	Размер ожидаемых ампликонов	Ссылка
AP4 Этап 1	AP4-F1: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3' AP4-R1: 5'-ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA-3'	1269 пар оснований	Dangtip <i>с соавт.</i> , 2015
AP4 Этап 1	AP4-F2: 5'-TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG-3' AP4-R2: 5'-GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC-3'	230 пар оснований	Dangtip <i>с соавт.</i> , 2015

#### 4.3.1.2.3.1.11. Анализ продуктов традиционной ПЦР при помощи электрофореза в агарозном геле

После проведения ПЦР ампликоны визуализируют с помощью электрофореза в агарозном геле. Двадцать мкл реакционной смеси ПЦР, с добавлением красителя в 6×-буфере наносят на 1,5% агарозный гель и проводят электрофорез при 90 В в течение 40 минут. Ампликоны визуализируют с помощью агарозного геля SYBR Safe gel stain (Invitrogen, кат. № 33102) согласно инструкциям производителя. Ампликоны ожидаемого размера, соответствующего используемым методам ПЦР (таблицы 4.2 и 4.3.), указывают на положительный результат. Положительные результаты должны быть подтверждены секвенированием.

#### 4.3.1.2.3.1.12. Протокол для AHPND-специфичного метода ПЦР в реальном времени

Данный протокол соответствует методу, описанному Han с соавт., 2015b. Используют реакционную смесь для ПЦР TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies), и экстрагированную ДНК добавляют к реакционной смеси для ПЦР в реальном времени, содержащей 0,3 мкМ каждого праймера и 0,1 мкМ зонда, до конечного объема 10 мкл. Постановка ПЦР в реальном времени: 20 секунд при 95°C, затем 45 циклов при 95°C по 3 секунды, и 30 секунд при 60°C. По завершении ПЦР в режиме реального времени с использованием технологии TaqMan, наличие ДНК PirA демонстрируется наличием специфических ампликонов, идентифицированных при помощи программно-генерируемых характерных кривых амплификации. Безматричные контроли не должны иметь признаков специфичных ампликонов.

Праймеры, зонд и ген-мишень для  $V_{pAHPND}$ -специфичной ПЦР в реальном времени указаны в Таблице 4.4.

**Таблица 4.4.** Праймеры и зонд для метода ПЦР в реальном времени для обнаружения  $V_{pAHPND}$

Название праймера/зонда	Последовательность	Ген-мишень	Ссылка
VpPirA-F	5'-TTG-GAC-TGT-CGA-ACC-AAA-CG-3'	pirA	Han с соавт., 2015b
VpPirA-R	5'-GCA-CCC-CAT-TGG-TAT-TGA-ATG-3'	pirA	Han с соавт., 2015b
VpPirA Probe	5'-6FAM-AGA-CAG-CAA-ACA-TAC-ACC-TAT-CAT-CCC-GGA-TAMRA-3'	pirA	Han с соавт., 2015b

#### 4.3.1.2.3.1.13. Контроли для всех методов ПЦР

Следующие контроли должны быть включены во все ПЦР для обнаружения  $V_{pAHPND}$ : а) отрицательный контроль экстракции, то есть матричная ДНК, выделенная из заведомо отрицательного образца; б) матричная ДНК, выделенная из заведомо положительного образца, такого как ткани креветок, зараженных  $V_{pAHPND}$ , или ДНК из  $V_{pAHPND}$ -положительной бактериальной культуры, или плазмидная ДНК, которая содержит целевой участок набора специфичных праймеров; в) безматричный контроль. Кроме того, необходим дополнительный контроль, чтобы

продемонстрировать, что экстрагированная нуклеиновая кислота не содержит ингибиторов ПЦР, например, выявление 18S рРНК декапод методом ПЦР для тканей креветок (Lo *с соавт.*, 1996) или выявление 16S рРНК методом ПЦР для бактерий (Weisburg *с соавт.*, 1991).

#### 4.3.2. Серологические методы

Не применимо.

#### 4.3.3. Биопробы

*V<sub>PAHPND</sub>* передавались экспериментально путем погружения, и введения Pir-токсина с помощью инъекции (Joshi *с соавт.*, 2014b; Nunan *с соавт.*, 2014; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013b), что воспроизводило естественную горизонтальную передачу пероральным путем и передачу в условиях совместного обитания. Таким образом, после выделения и очистки бактерии, которая предположительно вызывает АHPND, можно выполнить биопробу для подтверждения наличия возбудителя заболевания. Процедура погружения: 15 креветок погружают на 15 минут в суспензию (150 мл чистой искусственной морской воды), состоящую из  $2 \times 10^8$  клеток культивируемой бактерии/мл, с аэрацией. После данного начального 15-минутного периода креветки и инокулят переносят в большой резервуар с таким объемом чистой искусственной морской воды, при котором конечная концентрация бактерий составляет  $2 \times 10^6$  клеток/мл. Мониторинг креветок проводят с интервалами 6 - 8 часов. Мертвые креветки могут быть обработаны для ПЦР для обнаружения *V<sub>PAHPND</sub>*, и для секвенирования. Умирающих или выживших креветок обрабатывают для гистологии, повторного выделения бактерий, ПЦР и секвенирования. Положительную биопробу подтверждает следующее: обнаружение характерных гистологических поражений и обнаружение *V<sub>PAHPND</sub>* посредством ПЦР и секвенирования.

### 5. Категории тестов в зависимости от их назначения

В качестве примера, методы, имеющиеся в настоящее время для целевого надзора и диагностики АHPND, перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод может применяться в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы строго ограничивают его применение; и d = метод в настоящее время не рекомендуется для данной цели. Это несколько субъективное разделение на категории, поскольку пригодность включает в себя надежность, чувствительность, специфичность и полезность. Хотя не все тесты, относящиеся к категории а или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и факт того, что они широко применялись без сомнительных результатов, делает их подходящими.

**Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики**

Метод	Надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	Послеличинки (PL)	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	d	d	d	c	d
Биопроба	d	d	d	d	d	a
Гистопатология	d	c	a	c	a	b
ПЦР в реальном времени	d	a	a	a	a	b
Гнездовая ПЦР и секвенирование	d	b	b	b	a	a

Одношаговая ПЦР и секвенирование	d	c	c	c	a	a
----------------------------------	---	---	---	---	---	---

PL=послеличинки; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

## 6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от АНПНД

Как указано в Таблице 5.1., ПЦР в режиме реального времени является рекомендуемым методом для целевого надзора по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности.

## 7. Подтверждающие диагностические критерии

### 7.1. Определение случая подозрения на болезнь

Подозрение на АНПНД возникает, если выполняется как минимум одно из следующих условий:

- i) Смертность и клинические признаки, указывающие на АНПНД;
- ii) Гистопатологическая картина, указывающая на АНПНД;
- iii) Обнаружение генов Pir-токсина с помощью ПЦР или ПЦР в реальном времени.

### 7.2. Определение подтвержденного случая болезни

Случай АНПНД следует рассматривать как подтвержденный, если выполняются два или более условий:

- i) Гистопатологическая картина, указывающая на АНПНД;
- ii) Обнаружение генов Pir-токсина в плазмиде pVA1, содержащейся в *Vibrio parahaemolyticus*, с помощью ПЦР и секвенирования;
- iii) Положительные результаты биопробы (характерные гистологические поражения и обнаружение  $V_{АНПНД}$  с помощью ПЦР и секвенирования).

## 8. Список литературы

ANDREWS L.S., PARK D.L & CHEN Y.P. (2000). Low temperature pasteurization to reduce the risk of *Vibrio* infections from raw shell-stock oysters. *Food Addit. Contam.*, **17**, 787–791.

DABU I.M., LIM J.J., ARABIT P.M.T, ORENSE S.J.A.B., TABARDILO J.A., CORRE V.L. & MANINGAS M.B.B. (2017). The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquacult. Res.*, **48**, 792–799.

DANGTIP S., SIRIKHARIN R., SANGUANRUT P., THITAMADEE S., SRITUNYALUCKSANA K., TAENGCHAIYAPHUM S., MAVICHAK R., PROESPRAIWONG P. & FLEGEL T.W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of АНПНД isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Rep.*, **2**, 158–163.

DE LA PEÑA L.D., CABILLON N.A., CATEDRAL D.D., AMAR E.C., USERO R.C., MONOTILLA W.D., CALPE A.T., FERNANDEZ D.D. & SALOMA C.P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Dis. Aquat. Org.*, **116**, 251–254.

DE SCHRYVER P., DEFOIRDT T. & SORGELOOS P. (2014). Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? *PLoS Pathog.*, **10**, e1003919.

FAO (2013). Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304), 2013. Hanoi, Viet Nam, 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053, Rome, Italy, 54 p.

FLEGEL T.W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 166–173.

FLEGEL T.W. & LO C.F. (2014). Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand.

GOMEZ-GIL B., SOTO-RODRÍGUEZ S., LOZANO R. & BETANCOURT-LOZANO M. (2014). Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00055-14.

GOMEZ-JIMENEZ S., NORIEGA-OROZCO L., SOTELO-MUNDO R.R., CANTU-ROBLES V.A., COBIAN-GUEMES A.G., COTA-VERDUGO R.G., GAMEZ-ALEJO L.A., DEL POZO-YAUNER L., GUEVARA-HERNANDEZ E., GARCIA-OROZCO K.D., LOPEZ-ZAVALA A.A. & OCHOA-LEYVA A. (2014). High-quality draft genomes of two *Vibrio parahaemolyticus* strains aid in understanding acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00800-14.

HAN J.E., TANG K.F.J., TRAN L.H. & LIGHTNER D.V. (2015a). *Photorhabdus* insect related (*Pir*) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **113**, 33–40.

HAN J.E., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (2015b). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, **442**, 12–15.

HONG X.P., XU D., ZHUO Y., LIU H.Q. & LU L.Q. (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **39**, 1085–1097.

JOSHI J., SRISALA J., SAKAEW W., PRACHUMWAT A., SRITUNYALUCKSANA K., FLEGEL T.W. & THITAMADEE S. (2014a). Identification of bacterial agent(s) for acute hepatopancreatic necrosis syndrome, a new emerging shrimp disease. *Suranaree J. Sci. Technol.*, **21**, 315–320.

JOSHI J., SRISALA J., TRUONG V.H., CHEN I.T., NUANGSAENG B., SUTHIENKUL O., LO C.F., FLEGEL T.W., SRITUNYALUCKSANA K. & THITAMADEE S. (2014b). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, **428–429**, 297–302.

KARUNASAGAR I., KARUNASAGAR I., VENUGOPAL M.N. & NAGESHA C.N. (1987). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine and sea water and in association with clams. *Syst. Appl. Microbiol.*, **9**, 316–319.

KIM Y.B., OKUDA J., MATSUMOTO C., TAKAHASHI N., HASHIMOTO S. & NISHIBUCHI M. (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1173–1177.

KOIWAI K., TINWONGGER S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2016). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease strain of *Vibrio parahaemolyticus* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **39**, 603–606.

KONDO H., TINWONGGER S., PROESPRAIWONG P., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R. & HIRONO I. (2014). Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00221-14.

KONDO H., VAN P.T., DANG L.T. & HIRONO I. (2015). Draft genome sequences of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc.*, **3**, e00978-15.

LEAÑO E.M. & MOHAN C.V. (2012). Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. *Global Aquaculture Advocate.*, **July/August**, 38–39.

LEE C.T., CHEN I.T., YANG Y.T., KO T.P., HUANG Y.T., HUANG J.Y., HUANG M.F., LIN S.J., CHEN C.Y., LIN S.S., LIGHTNER D.V., WANG A.H., WANG H.C., HOR L.I. & LO C.F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 10798–10803.

LIGHTNER D.V. (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp. LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., NOBLE B.L. & TRAN L. (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate.*, **January/February**, 40.

LO C.F., LEU J.-H., HO C.-H., CHEN C.H., PENG S.E., CHEN Y.-T., CHOU M.M.C., YEH P.-Y., HUANG C.J., CHOU H.Y., WANG C.H. & KOU G.H. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.

MUNTADA-GARRIGA J.M., RODRIGUEZ-JEREZ J.J., LOPEZ-SABATER E.I. & MORAVENTURA M.T. (1995). Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio*

*parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. *Lett. Appl. Microbiol.*, **20**, 225–227.  
NACA (2012). Report of the Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: Early mortality syndrome (EMS)/acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS), 9–10 August 2012 Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand.

NACA (2014). Acute hepatopancreatic necrosis disease card (updated June 2014). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand.

NUNAN L., LIGHTNER D., PANTOJA C. & GOMEZ-JIMENEZ S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Org.*, **111**, 81–86.

SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SRITUNYALUCKSANA K., THITAMADEE S., FLEGEL T.W., MAVICHAK R. & PROESPRAIWONG P. (2014). A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand, Source:  
[http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article\\_id=2030](http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030).

SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SANGUANRUT P., CHI T.D., MAVICHAK R., PROESPRAIWONG P., NUANGSAENG B., THITAMADEE S., FLEGEL T.W. & SRITUNYALUCKSANA K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS One*, **10**, e0126987. doi:10.1371/journal.pone.0126987.

SOTO-RODRIGUEZ S.A., GOMEZ-GIL B., LOZANO-OLVERA R., BETANCOURT-LOZANO M. & MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 1689–1699.

SU Y.C. & LIU C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol.*, **24**, 549–558.

TANIGUCHI H., OHTA H., OGAWA M. & MIZUGUCHI Y. (1985). Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes. *J. Bacteriol.*, **162**, 510–515.

THOMSON W.K. & THACKER C.L. (1973). Effect of temperature on *Vibrio parahaemolyticus* in oysters at refrigerator and deep freeze temperatures. *Can. Inst. Food Sci. Tech. J.*, **6**, 156–158.

TINWONGGER S., PROESPRAIWONG P., THAWONSUWAN J., SRIWANAYOS P., KONGKUMNERD J., CHAWEEPCK T., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2014). Development of PCR diagnosis method for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathol.*, **49**, 159–164.

TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014a). AHPND/EMS: From the academic science perspective to the production point of view. *Aquaculture Asia Pacific*, **10**, 14–18.



TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014b). Tilapia could enhance water conditions, help control EMS in shrimp ponds. *Global Aquaculture Advocate*, **January/February**, 11–12.

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R.M., LIGHTNER D.V. & FITZSIMMONS K. (2013a). EMS/AHPNS: Infectious disease caused by bacteria. *Global Aquaculture Advocate*, **July/August**, 18–20.

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R.M., MOHNEY L.L., PANTOJA C.R., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2013b). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org*, **105**, 45–55.

WEISBURG W.G., BARNS S.M., PELLETIER D.A. & LANE D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697–703.

YANG Y.T., CHEN I.T., LEE C.T., CHEN C.Y., LIN S.S., HOR L.I., TSENG T.C., HUANG Y.T., SRITUNYALUCKSANA K., THITAMADEE S., WANG H.C. & LO C.F. (2014). Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00816-14.

**NB:** Не существует Референтных лабораторий МЭБ по АНPNД  
(см. Таблицу в конце данного *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> ).

Для получения дальнейшей информации о АНPNД свяжитесь с Референтной лабораторией МЭБ.

**NB:** ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2017 ГОДУ; ПОСЛЕДНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2018 ГОДУ.