

СФЕРИЧЕСКИЙ БАКУЛОВИРУС (БАКУЛОВИРУС ТИПА *PE NAE US MONODON*)

1. Область применения¹

В целях настоящей главы, сферический бакуловирус рассматривается в качестве инфекции бакуловирусом типа *Penaeus monodon*. Синонимы: MBV от *P. monodon* был определен как PmSNPV (вирус ядерного полиэдроза в единичной оболочке от *P. monodon*) в соответствии с руководствами по вирусной номенклатуре, опубликованными Международным комитетом по Таксономии вирусов (ICTV) (Murphy с соавт., 1995), также он представлен сомнительными видами *P. monodon* NPV или PemoNPV, в 7-ом и 8-ом Отчетах ICTV (Fauquet с соавт., 2005; Van Regenmortel с соавт., 2000). Несмотря на то, что PemoNPV может являться наиболее правильным названием вируса, в большинстве случаев для обозначения этого вируса в настоящем *Водном Руководстве* будет использоваться термин бакуловирус *P. monodon* (MBV).

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Этиологический возбудитель: бакуловирус *P. monodon* (MBV), описанный Lightner и Redman, 1981, Lightner с соавт., 1983 и Mari с соавт., 1993.

Международный комитет по таксономии вирусов называют MBV (Spherical Baculovirus) в качестве одного из предположительных видов PemoNPV рода Nucleopolyherdovirus (Fauquet с соавт., 2005).

Штаммы возбудителя: в связи с широким ареалом и разнообразием видов-хозяев MBV, вероятно существование различных штаммов MBV. Тесты с полимеразной цепной реакцией (ПЦР), созданные для восточных и юго-восточных изолятов MBV с недавних пор демонстрируют ложноотрицательные результаты у *P. Monodon* (*гигантская тигровая креветка*) из Африки, зараженной MBV (Lightner, неопубликованные данные), предполагая также, что MBV (или виды PemoNPV) состоит более чем из одного штамма.

2.1.2. Выживаемость за пределами хозяина

Информация отсутствует.

¹ NB: Версия, принятая Мировой Ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2012 г. Настоящая болезнь более не входит в список МЭБ.

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Информация отсутствует.

2.1.4. Жизненный цикл

Не применимо.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяина

Инфекции MBV отмечались у одного и более видов рода и подрода семейства Penaeidae (последние написаны в скобках): *Penaeus* (*Penaeus*), *Penaeus* (*Metapenaeus*), *Penaeus* (*Fenneropenaeus*) и *Penaeus* (*Melicertus*) (Doubrovsky с соавт., 1988; Нао с соавт., 1999; Lester с соавт., 1987; Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1981; Spann & Lester, 1996). Экспериментальное водное и пероральное заражение японской тигровой креветки *Penaeus* (*Marsupenaeus*) *japonicus*, однодневных постличинок (PL) MBV не дало инфекций, поддающихся обнаружению (Fukuda с соавт., 1988). Таким же образом, несмотря на симультанную культуру MBV-инфицированных тигровых креветок (*P. monodon*) в ряде ферм в различных странах Северной и Южной Америки (Эквадор, Бразилия, Пуэрто-Рико, штаты Техаса, Южная Калифорния и Гавайи Соединенных штатов Америки), и последующее подвергание прямому воздействию MBV определенных представителей семейства Penaeidae из этого региона (а именно *Penaeus vannamei*, *P. stylirostris* и *P. Californiensis*), вирус не продуцировал инфекции в этих видах, а также не был установлен на фермах по разведению креветок или в диких стадах в регионах, подвергнутых воздействию (Lightner, 1996; Lightner с соавт., 1983).

2.2.2. Восприимчивые этапы хозяина

Восприимчивые стадии хозяина: все жизненные этапы, за исключением икринок и науплии, восприимчивы к инфекции MBV.

2.2.3. Предрасположенность видов и субпопуляции (вероятность обнаружения)

Информация отсутствует.

2.2.4. Органы-мишени и зараженная ткань

MBV является исключительно кишечным вирусом, инфицирующим слизистые эпителиальные клетки сосудов гепатопанкреаса и передней средней кишки (Anderson с соавт., 1987; Brock & Lightner, 1990; Couch, 1991; Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996; Lightner с соавт., 1983).

2.2.5. Персистирующая инфекция с пожизненными носителями

Персистирующая инфекция и пожизненные носители: персистирующая инфекция возникает обычно у представителей семейства Penaeidae – хозяев MBV. Было доказано, что дикие взрослые женские особи *P. monodon*, которые сильно заражены MBV, выделяют фекалии, контаминированные MBV во время нереста, контаминируя таким образом икринки, и передавая вирус следующему поколению. (Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996).

2.2.6. Переносчики инфекции

Неизвестны переносчики при естественных инфекциях.

2.2.7. Известные или предполагаемые дикие водные животные-переносчики

Информация отсутствует.

2.3. Клиническая картина болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача MBV происходит горизонтально, путем поглощения зараженной ткани (канибализм), фекалий, окклюзивных телец или вирус-контаминированного детрита, или воды (Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996). MBV передавался экспериментальным путем в лаборатории путем подвергания личинок или молодых особей *P. monodon* водному или пероральному заражению. Окклюзивные тельца MBV выявлялись через два дня после заражения в гепатопанкреатических клетках, когда PL-1 были заражены при 28°C в 33 ppt морской воде (Natividad & Lightner, 1992a; Natividad & Lightner, 1992b; Paynter с соавт., 1992).

2.3.2. Превалентность

Превалентность MBV крайне изменчива, от <1% в диких и культивируемых популяциях до 100% в культивируемых популяциях в бассейнах для выращивания личинок и прудах для молоди (Anderson с соавт., 1987; Chayaburakul с соавт., 2004; Chen с соавт., 1989b; Chen с соавт., 1989c; Chen с соавт., 1990; Lightner, 1996; Natividad & Lightner, 1992a; Vijayan с соавт., 1995).

2.3.3. Географическое распределение

MBV является энзоотическим вирусом у диких представителей семейства penaeids в следующих регионах, граничащих с Индо-тихоокеанским: Восточная и юго-восточная Азия, Индостан, Средний Восток, Австралия, Индонезия, Новая Каледония, Восточная Африка и Мадагаскар. За пределами нормального географического распространения *P. monodon*, MBV не был обнаружен у диких пенеидных креветок. Однако, сообщения о MBV поступали из мест, в которых завезенные креветки *P. monodon* культивировались на Средиземноморье, Западной Африке, Таити и Гавайских островах, а также из различных мест в Северной и Южной Америке и Карибских островах, но только в завезенных стадах *P. monodon* (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner, 1996).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Стадии личинки (а именно протозоа и мизидая стадия) и ранние стадии PL являются жизненными стадиями, во время которых могут наблюдаться значительная смертность, и особи наиболее легко инфицируются в лабораторных контрольных заражениях (Chen с соавт., 1989b; Natividad & Lightner, 1992a; Paynter с соавт., 1992). В энзоотических регионах, в которых культивируют *P. monodon*, превалентность MBV и тяжесть инфекции могут быть высокими (от 50% и почти до 100%) у молодых и взрослых особей, но без ассоциированной смертности и заболеваемости. Инфекции MBV по всей видимости хорошо переносятся *P. monodon*, если они не отягощены (Chayaburakul с соавт., 2004; Chen с соавт., 1989a; Chen с соавт., 1989b; Chen с соавт., 1989c; Lightner, 1996; Lightner с соавт., 1992; Natividad & Lightner, 1992b). Тем не менее, тяжелые инфекции MBV у искусственно выращенных *P. monodon* могут подавлять уровень роста, приводить к сниженной выживаемости и снижать общее функционирование культуры (Anderson с соавт., 1987; Baticados с соавт., 1991; Chayaburakul с соавт., 2004; Fegan с соавт., 1991; Lightner, 1996; Nash с соавт., 1988; Natividad & Lightner, 1992b).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Информация отсутствует.

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Не было разработано эффективных методов вакцинации от MBV.

2.4.2. Химиотерапия

Научно-обоснованные сообщения об эффективной химиотерапии отсутствуют.

2.4.3. Иммуностимуляция

Научно-обоснованные сообщения об эффективной иммуностимуляции отсутствуют.

2.4.4. Резистентное разведение

MBV-резистентных стад с восприимчивыми видами не наблюдалось.

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

Неприменимо в отношении MBV.

2.4.6. Блокирующие агенты

О блокирующих агентах не сообщалось.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

В виду того, что MBV передается от взрослых особей их потомству через фекальную контаминацию нерестовых личинок, профилактика инфекции в инкубаториях может быть достигнута за счет принятия дополнительных мер во избежание фекальной контаминации нерестовых икринок и личинок за счет тщательной промывки науплии или икринок формалином, йодофорами и чистой морской водой (Chen с соавт., 1990).

2.4.8. Общие практики животноводства

2.4.8.1. Инкубатор

Для профилактики инфекций и болезни MBV применялись различные практики животноводства. Предварительный скрининг маточного стада на MBV был в некоторой степени эффективен для обнаружения тяжело пораженных переносчиков вируса, снижая таким образом передачу болезни от родителя к потомству. Используя не летальные методы тестирования, это достигается путем простого микроскопического исследования фекальных нитей при свете (или ПЦР исследование фекальных нитей, в случае если оборудование для ПЦР тестирования доступно для использования). В другом варианте, маточное стадо может быть умерщвлено после нереста и может проводиться простое исследование в оптическом микроскопе давленного препарата гепатопанкреаса (или иссеченный гепатопанкреас может быть исследован при помощи ПЦР), чтобы определить статус инфекции MBV у нерестующей особи. В виду того, что MBV передается от взрослых особей их потомству путем фекальной контаминации нерестовых икринок, профилактика инфекции в инкубаторах может быть достигнута за счет принятия дополнительных мер во избежание фекальной контаминации нерестовых икринок и личинок путем тщательной промывки науплии или икринок формалином, йодофорами и чистой морской водой (Chen с соавт., 1990).

2.4.8.2. Пруды для молоди и нагульные пруды

MBV инфекции остаются частым явлением в прудах с земляным дном в Индо-Тихоокеанском регионе, где вирус является энзоотическим (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Chayaburakul с соавт., 2004; Lightner, 1996), но частота возникновения и превалентность MBV инфекций может быть снижена в облицованных прудах для молоди и нагульных прудах.

3. Отбор образцов

3.1. Отбор индивидуальных образцов

Подходящие образцы для тестирования на инфекцию MBV с использованием молекулярных методов (Например, ПЦР, *in-situ* гибридизация и т.д.) включают постличинок (PL), молодые и взрослые особи. Наряду с тем, что MBV может подвергать

инфицированию все жизненные этапы, тяжесть инфекции, и, следовательно, вирусная нагрузка может быть ниже уровней обнаружения у нерестовых икринок и в личиночных стадиях, эти жизненные этапы могут быть не подходящими образцами для обнаружения MBV или подтверждения свободы от болезни MBV.

3.2. Сохранение образцов для представления

Для получения информации о рутинной гистологии или молекулярных исследованиях, а также руководства по сохранению образцов для предполагаемого метода тестирования, см. Главу 2.2.0.

3.3. Объединение образцов

Образцы, отобранные для молекулярных тестов, могут быть скомбинированы в качестве объединенных образцов, представляющих собой не более пяти видов на объединенный образец молодых, подросших и взрослых особей. Однако для икринок, личинок и постличинок (PL) объединение большого количества (например, ~150 или более икринок или личинок, или 50-150 постличинок в зависимости от их размера/возраста) может быть необходимо для получения достаточного материала образца (выделенная нуклеиновая кислота) для проведения диагностического исследования. См. также Главу 2.2.0.

3.4. Наиболее подходящие органы и ткани

MBV это кишечный вирус и может обнаруживаться в гепатопанкреасе.

Фекальные образцы могут быть отобраны, когда требуется проведение нелетального тестирования (например, нелетальное тестирование ценного маточного стада).

3.5. Неподходящие образцы/ткани

MBV это кишечный вирус (например, гепатопанкреас, средняя кишка и ее пилорический придаток) и не реплицирует систематически.

4. Методы диагностики

4.1. Полевые диагностические методы

4.1.1. Клинические признаки

См. Раздел 4.2 для получения информации о макропатологических клинических признаках, которые проявляют креветки, зараженные MBV.

Инфицирование гепатопанкреаса бакуловирусом типа *P. monodon* (MBV) является одной из болезней тигровых креветок мелкого и крупного размера. Окклюзивные тельца, сформированные вирусом, очень заметны и легко проявляются с помощью прямой оптической микроскопии со свежими образцами или посредством рутинных гистологических методов с фиксированными срезами. Прямые

микроскопические методы наиболее подходят для стадий постличинок, которые подвергаются частым перемещениям при региональной или международной торговле. Высокочувствительные молекулярные методы для MBV также доступны и предусматривают наиболее чувствительные методы для программ наблюдения, в особенности для нелетального тестирования маточного стада.

4.1.1.1. Прямое микроскопическое исследование

4.1.1.1.1. Влажные препараты свежей ткани

Диагноз инфекций MBV ставится за счет демонстрации единичных или множественных, преимущественно сферических окклюзивных телец во влажных образцах давленных препаратов гепатопанкреаса или средней кишки, исследованных фазово-контрастной или светопольной микроскопией. В тщательно подготовленных неокрашенных препаратах, окклюзивные тельца MBV визуализируются как единичные или множественные, в незначительной степени рефракционные, зеленоватые внутриядерные включения, диаметр которых составляет от менее 0.1 мкм - до приблизительно 20 мкм. Окрашивание давленного препарата ткани 0.05% водным раствором малахитового зеленого способствует демонстрации окклюзивных телец за счет их более интенсивного окрашивания, чем у подобных сферических объектов аналогичного размера, таких как нормальные ядра клеток-хозяина, ядрышки, секреторные гранулы, фаголизосомы и липидные капли (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner, 1988; Lightner, 1996; Lightner с соавт., 1983).

4.1.1.1.2. Влажные препараты фекальных нитей

Этот метод может использоваться в качестве нелетального метода скрининга переносчиков MBV. Настоящий метод можно применять к молодым или более взрослым креветкам, и он, вероятно, наиболее подходит в качестве нелетального метода скрининга ценного маточного стада. Фекальные нити отбирают с помощью прозрачной сифонной лопатки (воздухопровод, оснащенный секцией с пластиковой пипеткой в качестве наконечника, является идеальным вариантом) и помещают в лабораторный стакан, чашу или другой подходящий контейнер. Фекальные нити могут быть преобразованы во влажные препараты и напрямую исследоваться на окклюзивные тельца. Окклюзивные тельца MBV условно представляют собой сферические, рефракционные тельца, которые могут возникать единично или кластерами. В очень свежих фекальных нитях, они могут возникать кластерами, скрепленными ядерной мембраной. Добавление капли 0.05% водного раствора малахитового зеленого во влажный препарат способствует демонстрации окклюзивных телец MBV за счет окрашивания их в более интенсивный зеленый, чем другие круглые объекты в фекалиях (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner, 1996).

4.1.1.1.3. Отобранные фекальные образцы

Отобранные фекалии также могут использоваться в качестве примера нелетального тестирования на MBV методом ПЦР. ПЦР обеспечит большую диагностическую чувствительность для стертых инфекций по сравнению с прямым микроскопическим исследованием (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner & Redman, 1998).

4.1.2. Изменения в поведении

Помимо вялости у сильно пораженных постличинонок, о поведенческих изменениях зараженных носителей не сообщалось.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

В протозоа, мизидной стадии и ранней постличиночной стадии с тяжелыми ВР инфекциями может наблюдаться белесая средняя кишка (в виду присутствия окклюзивных телец и клеточного детрита в фекальном материале) (Lightner, 1996). Молодые и взрослые особи не демонстрируют макропатологических признаков, имеющих диагностическую значимость, также, как и личинки с менее тяжелыми инфекциями.

4.2.2. Клиническая биохимия

Не предусмотрено.

4.2.3. Микроскопическая патология

См. Раздел 4.2.6

4.2.4. Влажные препараты.

См. Раздел 4.1.1

4.2.5. Мазки

Не предусмотрено.

4.2.6. Фиксированные срезы

4.2.6.1. Гистопатология

Гистология может использоваться для доказательной диагностики инфекции MBV. Поскольку 10% забуференный формалин и другие фиксаторы обеспечивают, в лучшем случае, достаточную фиксацию только гепатопанкреаса креветки (основной орган-мишень для MBV), использование фиксатора Дэвидсона (содержащего 33% этилового спирта [95%], 20% формалина [приблизительно 37% формальдегида], 11.5% безводной уксусной кислоты и 33.5% дистиллированной или водопроводной воды) строго рекомендуется для всех рутинных гистологических исследований креветок (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996). Для получения наилучших результатов не следует использовать

мертвых креветок. Следует выбирать только живых, умирающих или ослабленных креветок для фиксации и гистологического обследования. Отобранных креветок умерщвляют инъекцией фиксатора непосредственно в гепатопанкреас; оболочка на головогрудь и брюшинной полости ровно поперечная относительно спинной средней линии вскрывается хорошо заточенными хирургическими ножницами, чтобы усилить проникновение фиксатора (брюшная полость может быть удалена или выброшена), цельную креветку (или головогрудь, за исключением брюшинного отдела) помещают в фиксатор на 24 - 48 часов (не более) и затем переносят в 70% этиловый спирт для хранения. После переноса в 70% этиловый спирт, фиксированные образцы могут транспортироваться (по почте или курьером в диагностическую лабораторию), завернутыми в ткань или бумажное полотенце, пропитанное 70% этиловым спиртом и упакованными в герметичные пластиковые пакеты.

Для начала гистологической процедуры, фиксированную креветку «надрезают» (см. Bell & Lightner, 1988, чтобы увидеть руководство с фотографиями этой процедуры), чтобы способствовать последующему изготовлению срезов гепатопанкреаса и средней кишки. После дегидратации, образцы заливают в парафин и делают срезы толщиной 4–6 мкм. Рутинные гистологические окрашивания, такие как гематоксилин по Майеру или Харрису, и эозин (H&E) могут использоваться для демонстрации диагностических сферических окклюзивных телец MBV в гепатопанкреасе, эпителиальных клетках или просвете кишки. В большинстве случаев, гепатопанкреатические (или в редких случаях, присущие средней кишке) клетки, зараженные MBV, будут представлять явно гипертрофированные ядра с единичными, или более часто, множественными эозинофильными окклюзивными тельцами наряду с диминуцией и маргинацией хроматина. Окклюзивные тельца могут быть окрашены ярко красным при использовании гематоксилина и эозина, и интенсивно, но многообразно при окрашивании тканей по Грамму. Например, гистологическая окраска по Грамму методом Брауна-Брена, несмотря на то, что оно неспецифично для окклюзивных телец бакуловируса, приводит к более интенсивному окрашиванию окклюзий (в красный или пурпурный, в зависимости от толщины среза, времени обесцвечивания и т.п.), чем окружающая ткань, что может способствовать обнаружению их присутствия при вялотекущих инфекциях (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Brock & Lightner, 1990; Lester с соавт., 1987; Lightner, 1988; Lightner, 1996; Vogt, 1992).

4.2.6.2. Метод аутофлуоресценции с окрашиванием флоксином

Другой метод обнаружения окклюзивных телец MBV основывается на флуоресценции флоксин-окрашенных окклюзивных телец. Водный 0.001% раствор флоксина можно добавить в давленные препараты ткани для того, чтобы сделать влажные препараты гепатопанкреаса или фекалий для прямого исследования. Гистологические срезы, окрашенные рутинным ГЭ, содержащим 0,005% флоксина, также доступны для этой процедуры. Окклюзии MBV во

влажных препаратах ткани, фекалий или в гистологических срезах высвечиваются ярко желто-зеленым на бледно-зеленом фоне при эпифлуоресценции (барьерный фильтр 0-515 нм и 490 нм фильтр излучения возбудителя). Другие объекты в тканях и окклюзивные тельца бакуловируса насекомых не высвечиваются этим методом. Следовательно, этот метод может обеспечивать быстрый и специфичный диагноз (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner, 1996; Thurman с соавт., 1990).

4.2.6.3. In situ гибридизация

См. Раздел 4.3.1.2.3 ниже.

4.2.6.4. Методы на основе антител

Поликлональные антитела, продуцированные в кроликах для обнаружения полиэдрина тетраэдрического бакуловируса (BP) (Lewis, 1986) дают перекрестную реакцию с MBV при использовании методов непрямой иммунофлуоресценции (IFAT) (Lightner, 1996), но недоступны для рутинной диагностики инфекций MBV.

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Инфекция MBV может быть подтверждена путем демонстрации вируса (или патогномических окклюзивных телец с окклюзированными вирионами) в срезах, или демонстрацией вируса в частично очищенном вирусном препарате, приготовленном из гепатопанкреаса (Couch, 1991; Fegan с соавт., 1991; Johnson & Lightner, 1988; Lightner с соавт., 1983; Lu с соавт., 1996; Mari с соавт., 1993).

4.3. Обнаружение возбудителя и методы идентификации

4.3.1. Прямые методы обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

См. Раздел 4.1.1

4.3.1.1.2. Мазки

См. Раздел 4.2.5

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

См. Раздел 4.2.6

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственная среда

На сегодняшний день сообщений нет.

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе антител

См. Раздел 4.2.6

4.3.1.2.3. Молекулярные техники

4.3.1.2.3.1. Молекулярные методы с использованием ДНК для MBV

Были разработаны нерадиоактивные ДИГ-маркированные генетические зонды для MBV (Lightner с соавт., 1994; Lu с соавт., 1995; Mari с соавт., 1993; Spann с соавт., 1993). ДИГ-маркированные ДНК зонды для MBV доступны на рынке в виде наборов ShrimProbe™, выпускаемых DiagXotics (Lawrenceville, New Jersey, USA). Зонды имеют маркировку нерадиоактивных, дигоксигенин -11-dUTP (DIG). Эти зонды хорошо работают только с методом *in-situ* гибридизации с гистологическими срезами, поскольку в гепатопанкреасе и фекалиях креветки присутствуют субстанции, которые дают как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты с образцами, которые напрямую окрашены и не удаляются перед зондированием.

4.3.1.2.3.2. Процедура дот-блот гибридизации для MBV

Хотя специфические ДНК зонды доступны, их применение в процедурах дот-блот гибридизации не рекомендовано для наиболее рутинных диагностических областей применения. Пигменты, присутствующие в гепатопанкреасе, оставляют окрашенное пятно на мембране для гибридизации, которое может привести к маскировке положительного теста или ложной интерпретации отрицательного теста. Аналогичным образом, хитиновая крошка (которая неспецифично связывает ДНК-зонды), пигменты и другие материалы, присутствующие в фекальном образце, также могут привести к ложноположительным и ложноотрицательным тестам дот-блот гибридизации. Выделение ДНК из гепатопанкреаса или фекалий перед блоттингом или использование хемилюминесцентных или радиоактивно маркированных зондов, может обойти эти проблемы и рекомендовано. Тем не менее, адекватность других тестовых методов (например, прямые влажные препараты, гистология, ПЦР) не указало на необходимость дальнейшего совершенствования и применения дот-блот метода (Lightner, 1996; Lightner с соавт., 1983).

4.3.1.2.3.3. Процедура *in-situ* гибридизации

Протокол *in-situ* гибридизации, подробно представленный для тетраэдрического бакуловируса (BV) в Разделе 4.3.1.2.3 Главы 2.2.10, использует аналогичный метод, за исключением того, что используется ДИГ-маркированный зонд для MBV.

4.3.1.2.3.4. Полимеразная цепная реакция для MBV

Некоторые ПЦР методики были разработаны для MBV и могут подходить для определенных областей применения (Chang с соавт., 1993; Lu с соавт., 1993; Umeha с соавт., 2003; Vickers с соавт., 1992; Vickers с соавт., 1994). Однако, в последнее время были разработаны и продемонстрированы более чувствительные методы для обнаружения MBV из различных географических регионов (Belcher & Young, 1998; Surachetpong с соавт., 2005).

Обнаружено, что вещества в гепатопанкреасе и фекалиях креветок ингибируют ДНК полимеразу, используемую в ПЦР анализе. Следовательно, необходима экстракция ДНК до того момента, когда можно успешно применить ПЦР для обнаружения этого вируса (Belcher & Young, 1998; Chang с соавт., 1993; Hsu с соавт., 2000). Наборы для выделения ДНК удобны и имеются в продаже.

В каждое ПЦР исследование для MBV должны быть включены следующие контроли: известный отрицательный образец ткани или фекалий, известный положительный образец ткани или фекалий (это может быть клон ДНК из которого был создан специфичный набор праймеров); и «безматричный» контроль.

Метод гнездовой ПЦР для MBV (Belcher & Young, 1998): такой метод гнездовой ПЦР способен обнаруживать низкие концентрации MBV (вплоть до 8 вирусных геномных эквивалентов). Два внешних и внутренних праймера были созданы с использованием ДНК последовательности, полученной из плазмиды p4Ec196, которая была сконструирована из 7.4 кб *EcoRI* фрагмента австралийского изолята MBV. Последовательности праймеров:

Праймер	Последовательность	Температура
MBV1.4F	5'-CGA-TTC-CAT-ATC-GGC-CGA-ATA-3'	62°C (68.9°C)
MBV1.4r	5'-TTG-GCA-TGC-ACT-CCC-TGA-GAT-3'	64°C (70.8°C)
MBV1.4NF	5'-TCC-AAT-CGC-GTC-TGC-GAT-ACT-3'	64°C (70.8°C)
MBV1.4NR	5'-CGC-TAA-TGG-GGC-ACA-AGT-CTC-3'	66°C (72.8°C)

Температура плавления праймеров соответствует формуле $2(A+T) + 4(G+C)$, или процентам метода ГХ (значения указаны в скобках).

4.3.1.2.3.4.1. ДНК экстракция

- i) Belcher & Young, 1998 было отмечено, что ингибиторы ПЦР присутствовали в ДНК образцах ДНК, приготовленных из целых образцов постличинок *Penaeus monodon*, зараженных MBV, при использовании метода экстракции, рекомендованного Wang с соавт., 1996 для ВР, который включает протеиназу К. Однако при использовании горячего фенола для экстракции ДНК, этот ингибирующий эффект был устранен.

- ii) При использовании метода с горячим фенолом, образец, предназначенный для тестирования (постличинки, гепатопанкреас, фекалии) лиофилизируют и измельчают до порошкообразного состояния в жидком азоте с помощью мотора или пестика.
- iii) Приблизительно 300 мг готового материала незамедлительно помещают в 400 мкл предварительно нагретого (65°C) лизирующего буфера (100 mM Трис/HCl, 100 mM этилендиаминтетрауксусная кислота [ЭДТА], 1% додецилсульфат натрия, pH 8.0) и инкубируют при 65°C в течение 5–10 минут.
- iv) Полученную суспензию подвергают грубой гомогенизации путем спот-центрифугирования и гомогенизации с помощью пестика в микроцентрифужной пробирке. Добавляют Трис/HCl-забуференный фенол, pH 8.0 (600 мкл) и инкубируют смесь в течение 2 часов при 65°C с эпизодической инверсией.
- v) После центрифугирования при 12,000 g в течение 10 минут при комнатной температуре водный слой переносят в свежую микроцентрифужную пробирку и проводят экстракцию дважды с равным объемом фенола/хлороформа (1/1). Затем 50 мкл водного слоя переносят в свежую микроцентрифужную пробирку, содержащую 150 мкл буфера для разведения и проводят экстракцию еще раз с равным объемом фенола/хлороформа (1/1) с последующей экстракцией хлороформа.
- vi) Ацетат аммония добавляют в водный слой до итоговой концентрации 2.5 M, быстро перемешивают, и добавляют два объема этанола (–20°C) с 1 мкл 20 мг литр⁻¹ гликогена для осаждения ДНК.
- vii) ДНК выделяется путем инкубации при –20°C в течение ночи или путем инкубации при –70°C в течение 1 часа.
- viii) ДНК осаждается центрифугированием при 12,000 g в течение 15 минут при 4°C. Получившуюся осажденную ДНК промывают дважды, сначала 500 мкл 80% холодного этанола и центрифугируют при 12,000 g в течение 10 минут при 4°C, далее проводят аналогичное промывание и центрифугирование при комнатной температуре.
- ix) Конечную осажденную ДНК высушивают *in vacuo*, ресуспензируют в 100 мкл буфере для разведения (10 mM Трис/HCl, pH 8.0, 0.1 mM ЭДТА, pH 8.0) при комнатной температуре в течение ночи или при

37°C в течение 2 часов. После спектрофотометрического анализа и перед ПЦР, ДНК разводят до 50 нг мкл⁻¹ в буфере для разведения.

4.3.1.2.3.4.2. *Этапы гнездовой ПЦР, Belcher & Young, 1998*

- i) Перед ПЦР, выделенную общую ДНК денатурируют в кипящей воде в течение трех минут с последующим быстрым охлаждением в ледяной воде.
 - ii) Всего 100 нг выделенной ДНК используется в качестве матрицы.
 - iii) Каждая реакционная пробирка содержит 50 mM KCl, 10 mM Трис/НСl, pH 9, 0.1% Тритон X-100, по 0.2 mM каждого из ранее указанных дНТФ, 1.5 mM MgCl₂, по 0.25 μM каждого из ранее указанных MBV1.4F и MBV1.4R, 2.5 U *Taq*, и доводят до конечного объема 50 мкл.
 - iv) Реакционные смеси покрывают минеральным маслом (при необходимости).
 - v) Условия для первого этапа амплификации: один цикл при 96°C в течение 5 минут; 40 циклов по 94°C в течение 30 секунд, 65°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 60 секунд; и один цикл при 72°C в течение 7 минут.
 - vi) Второй этап гнездовой ПЦР выполняется с 0.5 мкл первичной ПЦР реакции, используемой в качестве матрицы с внутренними праймерами.
 - vii) Второй этап реакции амплификации включает 50 mM KCl, 10 mM Трис/НСl, pH 9.0, 0.1% Тритон X-100, 1.5 mM MgCl₂, по 0.2 mM каждой из ранее указанных дНТФ, по 0.25 μM каждого из ранее указанных праймеров MBV1.4NF и MBV1.4NR, и 2.5 U *Taq*, и доводят до конечного объема 50 мкл.
 - viii) Реакционные смеси покрывают минеральным маслом (при необходимости).
 - ix) Условия для второго этапа амплификации: один цикл при 96°C в течение 5 минут; 35 циклов при 94°C в течение 30 секунд, 60°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 60 секунд; и один цикл при 72°C в течение 7 минут.
 - x) Демонстрация продуктов ПЦР (533 bp первый этап и 361 bp второй этап) сопровождается добавлением 1 мкл гелевого загрузочного буфера (0.25% [масса/объем] бромфенолового синего, 15% [масса/объем]
-

Фикола - 400, 100 mM ЭДТА, pH 8.0) к 10 мкл каждой перечисленной реакционной смеси и электрофорезом с 0.8% агарозным гелем в ТАЕ буфере (40 mM Трис-ацетат, 1 mM ЭДТА, pH 8.0), содержащим 0.5 g литр⁻¹ бромида этидия.

4.3.1.2.3.4.3. Альтернативный одноэтапный ПЦР-метод

Альтернативный одноэтапный ПЦР-метод используется Референтной лабораторией МЭБ в Университете Аризоны, поскольку он менее подвержен контаминации (Surachetpong с соавт., 2005). Этот метод использует вид образца и методы экстракции, которые описаны ранее в этом разделе.

Праймеры: одна пара прямого и обратного праймера (261F/261R), отобранная из клона GC7 и помещенная в базу генетических данных под учетным номером AY819785 продуцирует ампликон размером 261 п.о. (Surachetpong с соавт., 2005).

Последовательности для этих праймеров:

261F	5'-AAT-CCT-AGG-CGA- TCT-TAC-CA-3'
261R	5'-CGT-TCG-TTG-ATG- AAC-ATC-TC-3'

4.3.1.2.3.4.3.1. Матрицы ДНК

- i) Выделенные из гепатопанкреаса (замороженные или фиксированные этанолом);
- ii) Выделенные из цельных постличинок (замороженные или фиксированные этанолом);
- iii) Выделенные из фекалий (замороженные или фиксированные этанолом).

4.3.1.2.3.4.3.2. Реакционная смесь для ПЦР

Реагент (концентрация)	25 µl ПЦР «шарики» ¹
Дистиллированная H ₂ O	23.5 мкл
Праймер 261F (0.3 µM)	0.5 мкл
Праймер 261R (0.3 µM)	0.5 мкл
Матрица ДНК (50–450 нг ДНК)	0.5 мкл

¹ PuReTaq™ Ready-To-Go PCR beads™, Amersham Biosciences, Бакингемпшир, Великобритания.

4.3.1.2.3.4.3.3. Параметры цикла ПЦР

Праймеры	Смесь/«шарики»	Время	Температура °С	Кол-во циклов
261F/261R	«Шарики» ¹	5 минут	95	1
		30 секунд	94	35
		30 секунд	60	
		30 секунд	72	
		7 минут	72	1

4.3.1.2.4. Обеззараживание возбудителя

Отсутствует.

4.3.2. Серологические методы

Не применяются.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели их применения

Методы, доступные в настоящее время для надзора, выявления и диагностики MBV перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице, указывают: а = метод является рекомендуемым методом исходя из соображений доступности, функциональности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод представляет собой стандартный метод с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы существенно ограничивают его применение; и d = метод, в настоящее время не рекомендованный и/или недоступный для этой цели. Это несколько субъективно, поскольку соответствие метода охватывает вопросы надежности, чувствительности, специфичности и функциональности. Несмотря на это, не все тесты, перечисленные под категориями а или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинное применение и тот факт, что они широко использовались без неточных результатов, делает их приемлемыми.

Таблица 5.1. Сферический бакуловир (бакуловир типа *Reovirus monodon*): наблюдение, выявление и диагностические методы

Метод	Целевой надзор				Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	PLs	Молодые особи	Взрослые особи		
Макропатологические признаки	c	d	d	d	d	d
Биопроба	d	d	d	d	c	c

Прямая LM	b	b	c	c	a	a
Гистопатология	b	b	c	c	a	a
Передача EM	d	d	d	d	d	a
Анализы на основе антител	d	d	d	c	d	d
ДНК зонды <i>in situ</i>	c	c	c	c	a	a
ПЦР	a	a	a	a	a	a
Секвенирование	d	d	d	d	d	a

PLs = постличинки; LM = оптическая микроскопия; EM = электронная микроскопия; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Тест (ы) рекомендуемые для целевого надзора для признания свободы от инфекции сферического бакуловirus (бакуловirus типа *Penaeus monodon*)

Два года истории негативных результатов тестов на MBV с использованием:

- ПЦР, проводимой на образцах соответствующего вида и размера;
- Влажных проб и/или гистологических результатов, в которых не наблюдалось сферических окклюзивных телец в образцах соответствующего вида и размера.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Для личинок (в особенности, мизидная стадия и ранние постличиночные стадии) восприимчивых видов: смертность с личинками, представляющими белые средние кишки. Для молодых особей: плохой рост или плохая эффективность культуры в популяциях, имеющих историю инфекции MBV или в регионах, в которых превалирует MBV.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Комбинация минимум двух из трех нижеперечисленных методов (с положительными результатами):

- Обнаружение на микроскопическом уровне сферических окклюзивных телец в влажных пробах целой личинки или иссеченных гепатопанкреатических железах. Для более взрослых постличинок, молодых и взрослых особей: сферические окклюзивные тельца, видимые в давленных препаратах влажных препаратов и/или гистологических срезах гепатопанкреатической железы или фекалий.

- *In situ* гибридизация с положительным гистологическим сигналом на поражения, типичные для MBV (т.е. гипертрофированное ядро с содержанием или без патогномичных сферических окклюзивных телец).
- Положительные результаты ПЦР на MBV.

8. Список литературы

ANDERSON I.G., SHARIFF M., NASH G. & NASH M. (1987). Mortalities of juvenile shrimp *Penaeus monodon*, associated with *Penaeus monodon* baculovirus, cytoplasmic reo-like virus and rickettsial and bacterial infections, from Malaysian brackish water ponds. *Asian Fish. Sci.*, **1**, 47–64.

BATICADOS M.C.L., PITOGO C.L., PANER M.G., DE LA PEZA L.D. & TENDENCIA E.A. (1991). Occurrence and pathology of *Penaeus monodon* baculovirus infection in hatcheries and ponds in the Philippines. *Israeli J. Aquaculture Bamidgeh*, **43**, 35–41.

BELCHER C.R. & YOUNG P.R. (1998). Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* postlarvae. *J. Virol. Methods*, **74**, 21–29.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 240 pp.

BROCK J.A. & LIGHTNER D.V. (1990). Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganisms. *In: Diseases of Marine Animals*, Vol. III. Kinne O., ed. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 245–349. CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANPIPAT P., SRIURAIRATANA S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.

CHANG P.S., LO C.F., KOU G.H. & SHEN S.N. (1993). Purification and amplification of DNA from *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). *J. Invertebr. Pathol.*, **62**, 116–120.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1989a). Observation on pathogenicity and epizootiology of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in cultured shrimps in Taiwan. *Fish Pathol.*, **24**, 189–195.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1990). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. *In: Diseases of*

Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

CHEN S.N., CHANG P.S., KOU G.H. & LIGHTNER D.V. (1989b). Studies on virogenesis and cytopathology of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and the red tail prawn (*Penaeus penicillatus*). *Fish Pathol.*, **24**, 89–100.

CHEN S.N., LO C.F., LIU S.M. & KOU G.H. (1989c). The first identification of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in cultured sand shrimp, *Metapenaeus ensis*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **9**, 62–64.

COUCH J.A. (1991). Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Viruses. Part 2. Nuclear Polyhedrosis Viruses of Invertebrates Other Than Insects. In: Atlas of Invertebrate Viruses. Adams J.R. & Bonami J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 205–226.

DOUBROVSKY A., PAYNTER J.L., SAMBHI S.K., ATHERTON J.G. & LESTER R.J.G. (1988). Observations on the ultrastructure of baculovirus in Australian *Penaeus monodon* and *Penaeus merguensis*. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, **39**, 743–749.

FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 1259 pp.

FEGAN D.F., FLEGEL T.W., SRIURAIRATANA S. & WAIYAKRUTTHA M. (1991). The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in Southern Thailand. *Aquaculture*, **96**, 205–217.

FUKUDA H., MOMOYAMA K. & SANO T. (1988). First detection of monodon baculovirus in Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 45–48.

HAO N.V., THUY D.T., LOAN L.T.T., PHI T.T., PHUOC L.H., DUONG H.H.T., CORSIN F. & CHANRATCHAKOOL P. (1999). Presence of the two viral pathogens WSSV and MBV in three wild shrimp species (*Penaeus indicus*, *Metapenaeus ensis* and *Metapenaeus lysianassa*) cultured in the mangrove forest of Ca Mau Province. *Asian Fish. Sci.*, **12**, 309–325.

HSU Y.L., WANG K.H., YANG Y.H., TUNG M.C., HU C.H., LO C.F., WANG C.H. & HSU T. (2000). Diagnosis of *Penaeus monodon*-type baculovirus by PCR and by ELISA of occlusion bodies. *Dis. Aquat. Org.*, **40**, 93–99.

JOHNSON P.T. & LIGHTNER D.V. (1988). Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans: gut-infecting species. *Dis. Aquat. Org.*, **5**, 123–141.

LESTER R.J.G., DOUBROVSKY A., PAYNTER J.L., SAMBHI S.K. & ATHERTON J.G. (1987). Light and electron microscope evidence of baculovirus infection in the prawn *Penaeus plebejus*. *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 217–219.

LEWIS D.H. (1986). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting penaeid baculovirus. *J. Fish Dis.*, **9**, 519–522.

LIGHTNER D.V. (1988). Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. *In: Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*. Sindermann C.J. & Lightner D.V., eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 8–127.

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., BELL T.A., REDMAN R.M., MOHNEY L.L., NATIVIDAD J.M., RUKYANI A. & POERNOMO A. (1992). A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indopacific. *In: Diseases in Asian Aquaculture I*. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 57–80.

LIGHTNER D.V., HEDRICK R.P., FRYER J.L., CHEN S.N., LIAO I.C. & KOU G.H. (1987). A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. *Fish Pathol.*, **22**, 127–140.

LIGHTNER D.V., POULOS B.T., BRUCE L., NUNAN L., PANTOJA C., MARI J. & BONAMI J.R. (1994). Development and application of genomic probes for use as diagnostic and research reagents for the penaeid shrimp parvoviruses IHHNV and HPV and the baculoviruses MBV and BP. USMSFP 10th Anniversary Review, GCRL Special Publication No. 1, 59–85.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1981). A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *J. Invertebr. Pathol.*, **38**, 299–302.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BELL T.A. (1983). Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, **32**, 209–233.

LU C.C., TANG K.F.J. & CHEN S.N. (1996). Morphogenesis of the membranous labyrinth in penaeid shrimp cells infected with *Penaeus monodon* baculovirus (MBV). *J. Fish Dis.*, **19**, 357–364.

LU C.C., TANG K.F.J., KOU G.H. & CHEN S.N. (1993). Development of a *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) DNA probe by polymerase chain reaction and sequence analysis. *J. Fish Dis.*, **16**, 551–559.

LU C.C., TANG K.F.J., KOU G.H. & CHEN S.N. (1995). Detection of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) infection in *Penaeus monodon* Fabricius by in situ hybridization. *J. Fish Dis.*, **18**, 337–345.

MARI J., BONAMI J.R., POULOS B. & LIGHTNER D.V. (1993). Preliminary characterization and partial cloning of the genome of a baculovirus from *Penaeus monodon* (PmSNPV = MBV). *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 207–215.

MURPHY F.A., FAUQUET C.M., MAYO M.A., JARVIS A.W., GHABRIAL S.A., SUMMERS M.D., MARTELLI G.P. & BISHOP D.H.L. (1995). Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* (Suppl. 10). Springer-Verlag, Vienna, Austria and New York, USA, 586 pp.

NASH G., POERNOMO A. & NASH M.B. (1988). Baculovirus infection in brackishwater pond cultured *Penaeus monodon* Fabricius in Indonesia. *Aquaculture*, **73**, 1–6.

NATIVIDAD J.M. & LIGHTNER D.V. (1992a). Prevalence and geographic distribution of MBV and other diseases in cultured giant tiger prawns (*Penaeus monodon*) in the Philippines. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*. Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 139–160.

NATIVIDAD J.M. & LIGHTNER D.V. (1992b). Susceptibility of the different larval and postlarval stages of black tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius, to monodon baculovirus (MBV). *In: Diseases in Asian Aquaculture I*. Shariff

M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 111–125.

PAYNTER J.L., VICKERS J.E. & LESTER R.J.G. (1992). Experimental transmission of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). *In: Diseases in Asian Aquaculture I*. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 97–110.

POULOS B.T., MARI J., BONAMI J.R., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1994). Use of non-radioactively labeled DNA probes for the detection of a baculovirus from *Penaeus monodon* by in situ hybridization on fixed tissue. *J. Virol. Methods*, **49**, 187–194.

SPANN K.M. & LESTER R.J.G. (1996). Baculovirus of *Metapenaeus bennettiae* from the Moreton Bay region of Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 53–58.

SPANN K.M., LESTER R.J.G. & PAYNTER J.L. (1993). Efficiency of chlorine as a disinfectant against monodon baculovirus (MBV). *Asian Fish. Sci.*, **6**, 295–301.

SURACHETPONG W., POULOS B.T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Improvement of PCR method for the detection of monodon baculovirus (MBV) in penaeid shrimp. *Aquaculture*, **249**, 69–75.

THURMAN R.B., LIGHTNER D.V., BELL T.A. & HAZANOW S. (1990). Unique physicochemical properties of the occluded penaeid shrimp baculoviruses and their use in diagnosis of infections. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**, 128–131.

UMESHA R.K., UMA A., OTTA S.K., KARUNASAGAR I. & KARUNASAGAR I. (2003). Detection by PCR of hepatopancreatic parvovirus (HPV) and other viruses in hatchery-reared *Penaeus monodon* postlarvae. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 141–146.

VAN REGENMORTEL M.H.V., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., CARSTENS E.B., ESTES M.K., LEMON S.M.,

MANILOFF J., MAYO M.A., MCGEOCH D.J., PRINGLE C.R. & WICKNER R.B. (2000). Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, California, USA, 1162 pp.

VICKERS J.E., LESTER R.J.G., SPRADBROW P.B. & PEMBERTON J.M. (1992). Detection of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) in digestive glands of postlarval prawns using polymerase chain reaction. *In: Diseases in Asian Aquaculture I*. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 127–133.

VICKERS J.E., LESTER R.J.G., SPRADBROW P.B. & PEMBERTON J.M. (1994). Evidence for homology between polyhedrin genes of baculoviruses of a prawn and an insect. *J. Invertebr. Pathol.*, **63**, 207–208.

VIJAYAN K.K., ALAVANDI S.V., RAJENDRAN K.V. & ALAGARSWAMI K. (1995). Prevalence and histopathology of monodon baculovirus (MBV) infection in *Penaeus monodon* and *P. indicus* in shrimp farms in the south-east coast of India. *Asian Fish. Sci.*, **8**, 267–272.

VOGT G. (1992). Transformation of anterior midgut and hepatopancreas by monodon baculovirus (MBV) in *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquaculture*, **107**, 239–248.

WANG S.Y., HONG C. & LOTZ J.M. (1996). Development of a PCR procedure for the detection of *Baculovirus penaei* in shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 123–131.

*

* *

NB: В настоящий момент нет Референтной лаборатории МЭБ по Сферическому бакуловirusу (бакуловirus типа *Reovirus monodon*) (см. Таблицу в конце настоящего *Водного Руководства* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).