

Глава 2.2.11.
ТЕТРАЭДРИЧЕСКИЙ БАКУЛОВИРУС
(BACULOVIRUS PENAЕI)

1. Предмет рассмотрения¹

В целях настоящей главы тетраэдрический бакуловирус рассматривается как инфекция *Baculovirus penaei*. Синонимы PvSNPV (Вирус одиночно-капсидного ядерного полиэдрома креветки *Penaeus vannamei*)

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

Этиологический агент: *Baculovirus penaei* (BP), описанный Couch (Couch, 1974; Couch, 1991), Summers, 1977, Overstreet, 1994 и Bonami et al, 1995.

Fauquet et al, 2005, в восьмом докладе Международного комитета по таксономии вирусов приводит родственный вирус MBV (сферический бакуловирус) как предполагаемый вид в роде *Nucleopolyherdovirus*. Таким образом, BP также следует рассматривать как предполагаемый вид в этом роде.

2.1.1. Этиологический агент, штаммы возбудителя

Штаммы возбудителей: имеется по меньшей мере три географических штамма: 1) юго-восточное побережье Атлантики, побережье Мексиканского залива в США и Карибского бассейна; 2) Тихоокеанское побережье Южной, Центральной и Северной Америки; и 3) Гавайи (Brock et al, 1986; Bruce et al, 1993; Durand et al, 1998).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Нет данных.

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Нет данных.

2.1.4. Жизненный цикл

Не применимо.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

¹ NB: Версия принята Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 года. Данная болезнь больше не входит в список болезней МЭБ

Инфекции ВР были зарегистрированы у одного или нескольких видов следующих представителей рода или подрода *Penaeid* (последние указаны в скобках): *Penaeus* (*Litopenaeus*), (*Farfantepenaeus*), (*Fenneropenaeus*), (*Melicertus*), (*Penaeus*), *Trachypenaeus* и *Protrachypene* (Bueno et al, 1990; Durand et al, 1998; Le Blanc et al, 1991; Lightner, 1996; Lightner et al, 1989; Machado et al, 1995; Overstreet, 1994). Все виды *Penaeid* могут быть потенциальными хозяевами (Lightner, 1996; Lightner, 1999; Overstreet, 1994).

2.2.2. Стадии восприимчивости хозяина

Стадии восприимчивости хозяина: хозяева являются восприимчивыми к инфекции ВР на всех стадиях жизни, кроме стадии яиц и науплий.

2.2.3. Видовая или субпопуляционная предрасположенность (вероятность обнаружения)

Нет данных.

2.2.4. Целевые органы и инфицированные ткани

ВР - это исключительно кишечная инфекция, которая инфицирует слизистые эпителиальные клетки гепатопанкреасовых канальцев и передней средней кишки (Brock & Lightner, 1990; Couch, 1974; Couch, 1991; Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996).

2.2.5. Персистирующая инфекция, передающаяся с пожизненными носителями

Персистирующая инфекция обычно встречается у пенеидных хозяев ВР. Имеются сведения, что дикие взрослые самки *P vannamei*, зараженные ВР, выделяют зараженные ВР фекалии во время нереста, тем самым заражая яйца и передавая вирус следующему поколению (Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996).

2.2.6. Векторы

Ни один из них не известен в естественных условиях, однако при экспериментальном заражении для передачи вируса личинкам *P vannamei* в качестве пассивных носителей ВР использовали коловраток *Brachionus plicatilis* и науплии *Artemia salina* (Overstreet et al, 1988; Stuck & Wang, 1996).

2.2.7. Известные или предполагаемые носители среди диких водных животных

Не выявлены.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача ВР происходит горизонтально при попадании в организм инфицированных тканей (каннибализм), фекалий, окклюзионных телец, контаминированного детрита или воды (Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996; Overstreet et al, 1988).

2.3.2. Превалентность

Высокая вариабельность, от <1% в диких и выращенных популяциях до 100% в искусственно выращенных популяциях, в резервуарах для разведения личинок и прудах для молоди (Brock & Lightner, 1990; Lightner, 1996).

2.3.3. Географическое распределение

ВР является энзоотическим для диких представители семейства Penaeidae в Северной и Южной Америке и на Гавайях. Вирус не был зарегистрирован у диких или культивируемых пенеидных креветок в восточном полушарии, несмотря на многочисленные ввозы американских пенеидных креветок в Азию и Индо-Тихоокеанский регион (Bondad-Reantaso et al, 2001; Brock et al, 1986; Lightner, 1996).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

В лабораторных контрольных исследованиях заражение происходило проще всего на личиночной стадии (конкретно протозоа и мизидная стадия) и в начале постличиночной (ПЛ) стадии (Bruce et al, 1994; Hammer et al, 1998; Le Blanc & Overstreet, 1990; Overstreet et al, 1988; Stuck & Overstreet, 1994; Stuck et al, 1996; Stuck & Wang, 1996). На этих стадиях на фермах по разведению пенеидной креветки также может наблюдаться самый высокий уровень смертности. Высокие уровни смертности по причине ВР не характерны для молоди и взрослых особей, но инфекция может быть причиной плохого роста и снижения выживаемости в прудах для выращивания личинок или в выростных прудах (Brock & Main, 1994; Lightner, 1996; Overstreet, 1994).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Нет данных.

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Нет каких-либо разработанных эффективных методов вакцинации против ВР.

2.4.2. Химиотерапия

Нет научно подтвержденных сообщений об эффективности химиотерапии.

2.4.3. Иммуностимуляция

Нет научно подтвержденных сообщений об эффективных методах иммуностимуляции.

2.4.4. Разведение резистентных к штаммам популяций

Доказан потенциал селективного разведения для выработки резистентности к ВР.

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

Не применимо к ВР.

2.4.6. Блокирующие агенты

О блокирующих агентах не сообщалось.

2.4.7. Дезинфекция яиц и личинок

Сообщалось об инактивации ВР с помощью дезинфицирующих средств, низкого рН, тепла и ультрафиолетового излучения (Le Blanc & Overstreet, 1991).

2.4.8. Общая практика ведения хозяйства

2.4.8.1. Инкубатории

Для профилактики инфекций ВР и болезни был применен ряд методов. Предварительный скрининг маточного поголовья на ВР оказался довольно эффективным при обнаружении тяжело инфицированных носителей и позволил, таким образом, снизить передачу болезни от родителей потомству. Если говорить о нелетальных методах тестирования – то это осуществляется путем исследованием фекальных нитей под простым световым микроскопом (или с помощью полимеразной цепной реакции [ПЦР] для исследования фекальных нитей, при наличии соответствующего оборудования для проведения ПЦР). В качестве альтернативного метода, можно умертвить отработанное маточное поголовье после нереста и провести микроскопическое исследование препарата гепатопанкреаса (или с помощью ПЦР с использованием иссеченного гепатопанкреаса) для определения инфекционного статуса по ВР нерестующей особи. Поскольку ВР передается от взрослых особей к потомству путем контаминации фекалиями нерестовых яиц, профилактика инфекции в инкубаториях может быть достигнута с помощью дополнительных мер по устранению загрязнений фекалиями нерестовых яиц и личинок путем тщательной промывки науплий или яиц формалином, йодофорами и чистой морской водой (Chen et al, 1990). Рутинная дезинфекция нерестовых яиц от инфицированного или потенциально инфицированного маточного поголовья снизило частоту эпизоотий ВР в инкубаториях (Lightner & Redman, 1998).

2.4.8.2. Инкубатории и выростные пруды

Инфекции ВР остаются распространенными в прудах с глинистым дном в регионах Северной и Южной Америки, где вирус является энзоотическим (Bondad-Reantaso et al, 2001; Lightner, 1996), однако частоту и распространенность инфекций ВР можно снизить в обшитых инкубаториях и выростных прудах.

3. Отбор проб

3.1. Отбор индивидуальных образцов

Подходящие образцы для тестирования на инфекцию ВР с использованием молекулярных методов (например, ПЦР, гибридизация *in-situ* и т. д.) включают постличинки (ПЛ), молодь и взрослых особей, когда у них уже присутствуют кишечные ткани или органы. Несмотря на то что инфицирование может произойти на любой стадии жизни, тяжесть инфекции и, следовательно, вирусная нагрузка может быть ниже пределов обнаружения в вымеченной икре и на личиночной стадии, поэтому эти стадии жизни могут быть не самыми подходящими образцами для обнаружения ВР или подтверждения благополучия по ВР.

3.2. Сохранение образцов для представления

Для рутинной гистологии или молекулярных анализов, а также руководства по сохранению образцов для предполагаемого метода испытаний см. Главу 2.2.0.

3.3. Объединение проб в пулы

Образцы, отобранные для молекулярных тестов, можно объединить (не более пяти образцов на объединенную выборку молодки, подростки и взрослых особей). Однако, что касается яиц, личинок и постличинок (ПЛ) - для проведения диагностического испытания может потребоваться объединение большего количества образцов (например, ~150 или более яиц или личинок или 50-150 постличинок, в зависимости от их размера/возраста) для получения достаточного количества материала (экстрагированной нуклеиновой кислоты). См. также Главу 2.2.0.

3.4. Самые подходящие органы или ткани

ВР является кишечным вирусом и может быть обнаружен в гепатопанкреасе.

Когда требуется прибегнуть к нелетальному методу исследования (например, исследование ценного маточного поголовья), можно использовать образцы фекалий.

3.5. Неподходящие образцы / ткани

ВР - это кишечный вирус (т.е. гепатопанкреас, средняя кишка или ее пилорический придаток), который не реплицируется системно.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

См. Раздел 4.2 для описания макроскопических клинических признаков, наблюдаемых у креветок, инфицированных ВР.

4.1.1.1. Прямое микроскопическое исследование

4.1.1.1.1. Влажные препараты из свежей ткани

Диагностика инфекций ВР производится путем демонстрации одиночных или множественных тетраэдрических окклюзионных телец в ядрах эпителиальных клеток в препаратах гепатопанкреаса или средней кишки, исследованных с помощью фазово-контрастной или яркочерной микроскопии. Окклюзионные тельца имеют тетраэдрическую или пирамидальную трехмерную форму и варьируются по размеру от менее чем 0,1 мкм до почти 20 мкм от основания пирамиды до пика, с вертикальной длиной 8 мкм. В некоторых публикациях окклюзионные тельца ВР называются PIBs (полиэдрические тельца-включения) (Bondad-Reantaso et al, 2001; Brock & Main, 1994; Lightner, 1996).

4.1.1.1.2. Влажные препараты фекальных нитей

Данный нелетальный метод можно использовать для проведения скрининга в отношении носителей ВР. Метод может быть применен в отношении молоди или более взрослых креветок и, пожалуй, является наиболее практичным нелетальным методом скрининга в отношении ценного маточного стада. Образцы фекалий для исследования можно получить, поместив креветку в аквариум, нерестовую емкость, или другую подходящую емкость на нескольких часов, пока на дне не будут видны фекальные нити. Фекальные нити лучше всего собирать, используя прозрачный пластиковый гидравлический шланг (воздушная магистраль, оснащенная пластиковой пипеткой в качестве наконечника, будет идеальным вариантом) и поместить в лабораторный сосуд, стакан или другую подходящую емкость. Из фекальных нитей можно сделать влажный препарат и исследовать его непосредственно на наличие окклюзионных телец. Окклюзионные тельца ВР визуально хорошо видны, преломления тетраэдров по высоте варьируются от просто отобразимого до почти 20 мкм (Bondad-Reantaso et al, 2001; Brock & Main, 1994; Lightner, 1996).

4.1.1.1.3. Собранные фекалии

Собранные фекалии также могут быть использованы в качестве образца для исследования на ВР с помощью ПЦР. ПЦР обеспечивает большую диагностическую чувствительность при хронических инфекциях, чем прямое микроскопическое исследование (Bondad-Reantaso et al, 2001, Lightner & Redman, 1998).

4.1.2. Изменение поведения

За исключением выраженной вялости у сильно пораженных постличинок, никаких поведенческих изменений у инфицированных хозяев зарегистрировано не было.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

У особей на стадии протозоа, мизидной и ранней постличиночной стадиях тяжелая

инфекция ВР может проявляться побелением средней кишки (по причине присутствия окклюзионных телец и клеточного дебриса в фекалиях). У молодых и взрослых особей отсутствуют макроскопические признаки, представляющие диагностическую ценность, как и у личинок, с менее тяжелой инфекцией.

4.2.2. Клиническая химия

Не применимо.

4.2.3. Микроскопические патологические изменения

См. Раздел 4.2.6

4.2.4. Срезы нефиксированной ткани

См. Раздел 4.1.1

4.2.5. Мазки

Не применимо.

4.2.6. Фиксированные срезы

4.2.6.1. Гистопатология

Чтобы провести окончательную диагностику инфекции ВР можно использовать гистологию. Поскольку 10% забуференный формалин и другие фиксаторы дают, в лучшем случае, посредственную фиксацию гепатопанкреаса креветки (основной целевой орган для ВР и других бакуловирусных инфекций пенеидной креветки), использование фиксатора Дэвидсона (содержащего 33% этилового спирта [95%], 20% формалина [около 37% формальдегида], 11,5% ледяной уксусной кислоты и 33,5% дистиллированной или водопроводной воды) крайне рекомендуется для всех рутинных гистологических исследований креветки (Bondad-Reantaso et al, 2001; Lightner & Redman, 1998). Чтобы увидеть патогномичные (для ВР) тетраэдрические окклюзионные тельца в гепатопанкреасе, эпителиальных клетках кишечника, или в просвете кишечника можно использовать такие рутинные гистологические красители, как гематоксилин Майер-Беннетт или Харриса и эозин (Н&Е) (Bonami et al, 1995; Bondad-Reantaso et al, 2001; Lightner, 1996). Как правило, инфицированные ВР клетки гепатопанкреаса (или иногда средней кишки) демонстрируют заметно гипертрофированные ядра с единичными, или чаще множественными эозинофильными окклюзионными тельцами, а также диминуцию хроматина и окаймление (Bondad-Reantaso et al, 2001; Lightner, 1996). Окклюзионные тельца могут окраситься в ярко-красный цвет при использовании красителя Н&Е, и сильно, но непостоянно при использовании красителя Грама. Например, окрашивание по Граму методом Брауна-Бренна, хоть и не является специфическим для окклюзионных телец бакуловируса, но имеет тенденцию к более интенсивному окрашиванию окклюзий (в красный или сиреневый цвет, в зависимости от толщины среза, времени обесцвечивания и т.д.) по сравнению с

окружающими тканями, что может помочь при доказательстве их присутствия при хронических инфекциях (Bondad-Reantaso et al, 2001; Brock & Lightner, 1990; Lightner, 1996).

4.2.6.2. Автофлюоресценция с окрашиванием флоксином

Другой способ обнаружения окклюзионных телец ВР основан на флуоресценции окрашенных флоксином окклюзионных телец. Можно добавить водный флоксин (0,001%) в тканевые препараты для изготовления влажных препаратов гепатопанкреаса или фекалий для непосредственного исследования. Гистологические срезы, окрашенные рутинным красителем Н&Е, содержащим 0,005% флоксин, также пригодны для этой процедуры. Окклюзии ВР во влажных препаратах раздавленной ткани, в фекалиях или в гистологических срезах, флуоресцируют ярко-желто-зеленым цветом на бледно-зеленом фоне при эпи-флуоресценции (пороговый фильтр 0-515 Нм и возбуждающий светофильтр 490 Нм). Другие объекты в тканях и окклюзионные тельца бакуловируса насекомых не флуоресцируют при данном методе, следовательно, метод может обеспечить быструю и специфическую диагностику (Bondad-Reantaso et al, 2001; Lightner, 1996).

4.2.6.3. Гибридизация *in-situ*

См. Раздел 4.3.1.2.3 ниже.

4.2.7. Электронная микроскопия / цитопатология

Инфекцию ВР можно подтвердить путем демонстрации вируса (или патогномичных окклюзионных телец) в срезах или путем демонстрации вируса в полуочищенном вирусном препарате, полученном из гепатопанкреаса (Couch, 1974; Couch, 1991; Johnson & Lightner, 1988).

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого 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 4.1.2

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы См.
Раздел 4.1.2

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток / искусственные среды

На сегодняшний день зарегистрированы.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

Методы на основе антител: разработаны и описаны поликлональные антитела для выявления ВР (Lightner, 1996), но ни одно из них не доступно для рутинной диагностики инфекций ВР.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.23.1. Гибридизация *in-situ*

Метод гибридизации *in-situ* с использованием DIG-меченого ДНК-зонда для ВР в целом следует методам, изложенным в Poulos et al, 1994 и Lightner, 1996 и приведен ниже.

- i) Встроить зафиксированную в растворе Дэвидсона ткань в парафин и приготовить срезы толщиной 4 мкм (или тоньше). Поместить срезы на положительно заряженные предметные стекла микроскопа. Не использовать желатин в воде для плавающих срезов; использовать только дистиллированную или деионизированную воду.
- ii) Нагреть предметные стекла в течение 30-45 минут при температуре 60°C. Регидрировать ткани следующим образом:

Ксилол (или подходящий заменитель)	3 ×	по 5 минут каждое
Абсолютный алкоголь	2 ×	1 минута каждое
95% спирт	2 ×	10 погружений каждое
80% спирт	2 ×	10 погружений каждое
50% спирт	1 ×	10 погружений каждое
Дистиллированная вода	6 ×	10 погружений каждое (не дайте предметным стеклам высохнуть)
- iii) Пипетировать по 500 мкл 100 г мл⁻¹ протеиназы К, свежее приготовленной в буфере TNE, инкубировать в течение 15 минут при 37°C.
- iv) Промыть предметные стекла в холодном 0,4% формальдегиде в течение 5 минут
- v) Промыть предметные стекла в 2 × SSC в течение 5 минут при комнатной температуре
- vi) Предварительно гибридизировать предметные стекла с использованием 500 мкл гибридизационного буфера и инкубировать в течение 30 минут при температуре 42°C в гибридизационной камере.
- vii) Разбавить DIG- меченый специфический зонд в гибридизационном буфере до соответствующей концентрации и кипятить в течение 10 минут. Остановить реакцию путем помещения на лед на 5 минут.
- viii) Пипетировать 500 мкл зонда на предметное стекло. Поместить на термостат при температуре 85°C на 6-7 минут. Остановить реакцию путем помещения на лед на 5 минут. Инкубировать в течение ночи при температуре

42°C в камере гибридизации.

ix) Промыть предметные стекла следующим образом

2 × SSC 2 × 15 минут при комнатной температуре

1 × SSC 2 × 5 минут при температуре 42°C

0,5 × SSC 2 × 15 минут при температуре 42°C

Буфер I 1 × 15 минут при комнатной температуре

x) Пипетировать 500 мкл буфера II (блокирующий буфер). Инкубировать при 37°C в течение 30 минут.

xi) Пипетировать 250 мкл анти-DIG-AP антитела (разбавить 1 мкл в 1 мл буфера II). Инкубировать при 37°C в течение 30 минут.

xii) Промыть предметные стекла следующим образом:

Буфер I 2 × 10 минут при комнатной температуре

Буфер II 1 × 5 минут при комнатной температуре

xiii) Смешать 4,5 мкл NBT (нитросиний тетразолий) и 3,5 мкл X-фосфата (бром хлор индолил фосфат) для каждого 1 мл буфера III, содержащего 1% поливиниловый спирт. Пипетировать по 500 мкл на каждое предметное стекло и инкубировать в течение 1-3 часов в темноте при комнатной температуре во влажной камере.

xiv) Остановить цветную реакцию в буфере IV в течение 5 минут при комнатной температуре.

xv) Провести контр-окрашивание и дегидратацию предметных стекол следующим образом:

Дистиллированная вода 1 × 10 погружений

0 5% Коричневый Бисмарк 1 × 2-5 минут

95% спирт 3 × 10 погружений каждое

Абсолютный алкоголь 3 × 10 погружений каждое

Ксилол (или подходящий заменитель) 4 × 10 погружений каждое

xvi) Закрепить с помощью пермаунта и покровного стекла. Проверить на наличие клеточно-ассоциированного фиолетового/черного осадка.

ПРИМЕЧАНИЕ

- Данный протокол может быть выполнен в инкубаторе, предназначенном для гибридизации *in-situ*, или можно использовать пищевой дегидратор в качестве источника тепла для инкубационной камеры *in-situ*. Предметные стекла можно поместить в коробки для пипеток, с водой на дне, закрыть их и поместить в дегидратор. Важно контролировать температуру и влажность.
- Стадия гибридизации (viii) может быть выполнена с использованием покровного стекла для уменьшения испарения. При использовании покровного стекла объем зонда может быть уменьшен до 250 мкл.
- Стадия нагрева при 85°C необходима для денатурации двухцепочечного ДНК-гена. Если реакции не развиваются, то наиболее вероятной причиной является недостаточное нагревание для денатурации генома.
- Протеиназа К необходима для устранения белка, связанного с нуклеиновой кислотой, и увеличения связывания зонда с нуклеиновой кислотой.
- Формулы буферов, используемых в этой процедуре, приведены в разделе Реагенты (ниже).

43.1.23.1.1. Реагенты и буферы для метода гибридизации *in situ*

i) 10 × Tris/NaCl / EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) (TNE) буфер

0,5 Трис основание	60,57 г
100 ммоль NaCl	5,84 г
1 ммоль EDTA-2H ₂ O	3,72 г
DD H ₂ O	900 мл

Отрегулировать pH до 7,4 с концентрированным или 5 М HCl. QS до 1 л. Автоклавировать. Хранить при температуре 4°C. Чтобы приготовить 1 × TNE - разбавить 100 мл 10 × запаса в 900 мл DD H₂O. Профильтровать раствор 1 × через фильтр (0,45 мкм).

ii) Лизоцим, 100 мкг мл⁻¹ (готовят непосредственно перед использованием)

1 × TNE	10 мл
Лизоцим	1 мг

iii) Протеиназа К, 100 мкг мл⁻¹ (готовят непосредственно перед использованием)

1 × TNE	10 мл
---------	-------

Протеиназа К

100 мкл исходного раствора протеиназы К (10 мг мл⁻¹)

Исходный раствор протеиназы К: добавить 100 мг протеиназы К к 10 мл DDH₂O . Распределить 100 мкл по пробиркам и хранить при температуре -20°C. Приготовить рабочую концентрацию (100 мкг мл⁻¹) непосредственно перед использованием.

iv) 0,4% формальдегид

37% формальдегид	5,4 мл
DD H ₂ O	500 мл

Хранить при температуре 4°C. Можно повторно использовать пять раз или хранить в течение 3 месяцев перед тем, как выбросить.

v) Гибридизационный буфер (конечный объем 50 мл)

4 × SSC	10 мл 20 × SSC
50% формамид	25 мл 100% формамида
1 × раствор Денхарта	2,5 мл 20 × раствора Денхарта
0,5 мг ⁻¹ ДНК спермы лосося	2,5 мл 10 мг мл ⁻¹ раствора
5% декстран сульфат	10 мл 25% декстран сульфата

Хранить при температуре 4°C.

vi) 20 × SSC буфер

3 M NaCl	175,32 г
0 3 M Na цитрат-2H ₂ O	88,23 г
DD H ₂ O	QS до 1000 мл

Отрегулировать pH до 7,0. Автоклавировать. Хранить при температуре 4°C. Чтобы приготовить 2 × SSC, необходимо разбавить 100 мл 20 × SSC в 900 мл DD H₂O. Чтобы приготовить 1 × SSC необходимо разбавить 50 мл 20 × SSC в 950 мл DD H₂O. Чтобы приготовить 0,5 × SSC необходимо разбавить 50 мл 20 × SSC в 1950 мл DD H₂O. Профильтровать растворы с помощью фильтра (0,45 мкм). Хранить при 4°C.

vii) 20 × раствор Денхардта

BSA (фракция V)	0,4 г бычьего сывороточного альбумина
Фиколл 400	0,4 г Фиколла
PVP 360	0,4 г поливинилпиролидина
DD H ₂ O	100 мл

Профильтровать через 0,45 мкм фильтр. Хранить при температуре 4°C.

viii) 25% декстран сульфат	
Декстран сульфат	25 г
DD H ₂ O	QS до 100 мл

Нагревать на слабом огне, перемешивая, до полного растворения. Хранить в замороженном виде.

ix) ДНК спермы лосося (10 мг мл⁻¹)

ДНК спермы лосося	0,25 г
DD H ₂ O	25 мл

Медленно добавить ДНК в воду в мензурке с мешалкой. Нагреть и перемешать так, чтобы растворить ДНК, постепенно добавляя еще, пока вся ДНК не растворится. Автоклавировать. Распределить в стерильные пробирки. Хранить при температуре -20°C.

x) 10 × буфер I

1 М Трис-основание	121,1 г
1,5 М NaCl	87,7 г
DD H ₂ O	QS до 1000 мл

Отрегулировать pH до 7,5 с HCl. Автоклавировать. Хранить при температуре 4°C.

Чтобы приготовить 1 × буфер I, необходимо разбавить 100 мл 10 × исходного раствора в 900 мл DD H₂O.

Профильтровать через 0,45 мкм фильтр. Хранить при температуре 4°C.

xi) Буфер II (блокирующий буфер и буфер разбавления Ab)

Genius реагент 11	0,5 г
Буфер I	100 мл

Нагревать на слабом огне, перемешивая в течение 30 минут до растворения. Раствор станет мутным, но с без твердых частиц. Хранить при температуре 4°C до 2 недель.

xii) Буфер III

100 ммоль Трис-основание	12,11 г
100 ммоль NaCl	0,58 г
DD H ₂ O	QS до 1000 мл

Отрегулировать pH до 9,5 с добавлением HCl. Затем добавить:

50 ммоль MgCl ₂ 6H ₂ O	16,10 г
--	---------

Профильтровать через 0,45 мкм фильтр. Хранить при температуре 4°C.

xiii) 10% поливиниловый спирт (ПВС)

Поливиниловый спирт (30,000-70,000 молекулярный вес)	10 г
DD H ₂ O	100 мл

Размешать ПВС и нагреть, если необходимо, чтобы добавить в раствор. Распределить по 10 мл / пробирка. Хранить при температуре -20°C.

xiv) Проявляющий раствор

Смешать 90 мл буфера III с 10 мл 10% ПВС и хранить при температуре 4°C. Непосредственно перед использованием, для каждого 1 мл буфера III с ПВС добавить:

Соли нитросинего тетразолия	4,5 мкл NBT (75 мг мл ⁻¹ в 70% диметилформамиде)
-----------------------------	---

5-бром-4-хлор-3-индоилфосфат, соль толуидина	3,5 мкл X-фосфата (50 мг мл ⁻¹ в диметилформамиде)
--	---

xv) 10 × буфер IV

10 ммоль Tris-основание	1,21 г
1 ммоль EDTA. 2H ₂ O	3,7 г
DD H ₂ O	QS до 1000 мл

Отрегулировать pH до 8,0 с помощью 5 N HCl. Автоклавировать. Хранить при температуре 4°C.

Чтобы приготовить 1 × буфер IV, разбавить 100 мл 10 × исходного раствора в 900 мл DD H₂O.

Профильтровать через фильтр (0,45 мкм). Хранить при температуре 4°C.

xvi) 0,5% Коричневый Бисмарк Y

Коричневый Бисмарк Y	2,5 г
DD H ₂ O	500 мл

Растворить краситель в воде. Профильтровать через фильтр Whatman No 1. Хранить при комнатной температуре.

4.3.1.23.2. Методы полимеразной цепной реакции

Протокол, описанный здесь, модифицирован Wang et al, 1996.

4.3.1.23.2.1. Подходящие образцы

Подходящие образцы - иссеченные гепатопанкреасы, цельные личинки или постличинки (объединенные), или фекалии. Образцы могут быть свежими, замороженными, законсервированными в 90% этаноле или других средах, предназначенных для консервации образцов для амплификации ДНК.

Было обнаружено, что вещества в гепатопанкреасе и фекалиях креветок ингибируют ДНК-полимеразу, используемую в ПЦР. Таким образом, необходимо провести экстракцию ДНК для последующего проведения ПЦР для обнаружения ВР.

4.3.1.23.2.2. Выделение ДНК

Наборы для выделения ДНК удобны и коммерчески доступны. В противном случае подходящая процедура извлечения ДНК заключается в следующем:

- i) Образец фекалий или гепатопанкреаса добавляют в пищеварительный буфер (~1:10 соотношение образца к буферу в ≤ 400 мкл буфера), содержащий 50 ммоль KCl, 10 ммоль Tris/HCl, pH 8,3; 0,1 мг мл⁻¹ желатин, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween 20 и 80 мкг мл⁻¹ протеиназы К, измельчают и диспергируют деревянной зубочисткой или наконечником пипетки.
- ii) После диспергирования образца в пищеварительном буфере нагревать до 60°C в течение 1 часа, а затем до 95°C в течение 10 минут.
- iii) Центрифугировать при 12000 g в течение 2 минут, перелить надосадочную жидкость в новую пробирку и хранить на льду.
- iv) Удалить 50 мкл переваренного образца и разбавить 150 мкл разбавляющего буфера (10 ммоль Tris / HCl, pH 8,0, 0,1 ммоль EDTA) и экстрагировать с помощью 200 мкл фенола / изоамилового спирта / хлороформа (PIC) (25/1/24).
- v) После перемешивания образца на вортексе в течение 5 секунд оставить пробирку на 5 минут, а затем центрифугировать при 12 000 g в течение 2 минут.
- vi) Удалить 160 мкл водной (верхней) фазы и перенести в новую микроцентрифужную пробирку.
- vii) При необходимости этап экстракции можно повторить.
- viii) ДНК осадить добавлением 20 мкг гликогена (1 мкл из 20 мг мл⁻¹ исходного раствора), 65 мкл 7,5 М ацетата аммония и 390 мкл этанола, хранить при -20°C в течение >1 часа, а затем гранулировать ДНК центрифугированием при 12 000 g в течение 5 минут.

- ix) Ополоснуть гранулы ДНК 200 мкл 70% - ного этанола для удаления остаточного ацетата аммония, высушить, а затем растворить гранулу ДНК в 30 мкл разбавляющего буфера или дистиллированной воды перед добавлением образца (матрицы) в реакционную смесь ПЦР и началом ПЦР.

4.3.1.2.3.23. Метод ПЦР (Wang et al, 1996)

4.3.1.2.3.23.1. Праймеры

Сообщается о трех прямых и трех обратных праймера, выбранных из сегмента ~1430 пар оснований (п.о.) гена полиэдрина ВР (Wang et al, 1996).

Последовательности данных праймеров

Праймер	Последовательность	Температура
ВРА	5' - GAT-CTG-CAA-GAG-GAC-AAA-CC-3'	61°C
ВРВ	5' - ATC-GCT-AAG-CTC-TGG-CAT-CC-3'	64°C

Праймер	Последовательность	Температура
VPD	5'-TGT-TCT-CAG-CCA-ATA-CAT-CG-3'	62°C
VPF	5'-TAC-ATC-TTG-GAT-GCC-TCT-GC-3'	63°C
VPB	5'-TAC-CCT-GCA-TTC-CTT-GTC-GC-3'	68°C
VPG	5'-ATC-CTG-TTT-CCA-AGC-TCT-GC-3'	64°C

Комбинации этих праймеров амплифицируют сегменты из матричной ДНК ВР: ВРА/VPF-196 п.о., ВРА/VPB - 560 п.о., ВРА/VPG - 933 п.о., VPD/VPB - 207 п.о., VPD/VPG - 580 п.о., и VPE/VPG -221 п.о.

4.3.1.2.3.23.2. Процедура

Следующая процедура ПЦР была адаптирована Wang et al, 1996.

- i) Для ПЦР на ВР, ДНК в каждом экстрагированном образце денатурируют нагреванием на кипящей водяной бане в течение 3 минут с последующим быстрым охлаждением в ледяной воде.
- ii) Добавляют 25 мкл реакционной смеси, содержащей 5 ммоль каждого праймера, 1.5 ммоль MgCl₂, и 0,5-1 единицу ДНК-полимеразы.
- iii) После нагревания реакционной смеси в течение 3 минут при 95°C проводят 30 циклов ПЦР (стадия плавления ДНК при 94°C, стадия отжига праймера при 60°C и стадия удлинения при 72°C) с последующей стадией удлинения в течение 5 минут при 72°C
- iv) Полученные продукты ПЦР могут быть сопоставлены с молекулярными стандартами с помощью электрофореза в 2% агарозном геле или проанализированы с помощью специфического ДНК-зонда для фрагмента после блоттинга по Саузерну.
- v) В каждый ПЦР-анализ на ВР 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 разработан определенный набор праймеров) и контроль "без матрицы".

4.3.1.23.2.4. Альтернативный метод ПЦР

Альтернативный метод, используемый референтной лабораторией МЭБ в Университете Аризоны (неопубликованный)

Используйте тип образца и методы извлечения, как описано выше

4.3.1.23.2.4.1. Праймеры

Одна пара прямого и обратного праймеров (6581F/6582R), отобранная из Клона IR36 (названного В1.23 в Vonami et al, 1995 и депонированного в GenBank с регистрационным номером DQ496179), производит ампликон в 644 п.о. Последовательности для этих праймеров

Праймер	Последовательность
6581	5'-TGT-AGC-AGC-AGA-GAA-GAG-3'
6582	5'-CAC-TAA-GCC-TAT-CTC-CAG-3'

4.3.1.23.2.4.2. Процедура

Реакционная смесь для ПЦР:

Таблица 4.1.

Реагент	Реакционная смесь 25	25 мкл гранул для	Конечная концен-
dH ₂ O	16,5 мкл	23,0 мкл	-
10 × буфер	2,5 мкл	-	1 ×
dNTP's	0,5 мкл каждого	-	200 ммоль каждого
Праймер А	0,5 мкл	0,5 мкл	0,31 ммоль
Праймер В	0,5 мкл	0,5 мкл	0,31 ммоль

Таблица 4.1.

Реагент	25 pi reaction mix	25 мкл гранул для	Конечная концен-
MgCl ₂	1,5 мкл	-	1,5 ммоль
Энзим	0,5 мкл	-	2,5 ед
Матрица	1,0 мкл	1,0 мкл	-

1 PuReTaq™ Ready-To-Go PCR beads™, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK

Параметры циклов ПЦР:

Праймеры	Смесь / Гранулы	Время	Темп. °С	Кол-во циклов
6581/6582	Смесь / Гранулы ¹	5 минут	95	1
		30 секунд	95	35
		30 секунд	60	
		1 минута	72	
		7 минут	72	1

4.3.1.2.4. Очистка агента

Отсутствует.

4.3.2. Серологические методы

Не применимо.

5. Оценка испытаний по целевому назначению

Методы, доступные в настоящее время для осуществления надзора, обнаружения и диагностики ВР, перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, применимости и диагности-

ческой специфичности и чувствительности, b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью, c = метод имеет применение в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение, и d = метод в настоящее время не рекомендуется и/или недоступен для этой цели. Данные оценки несколько субъективны, поскольку пригодность включает в себя такие аспекты как надежность, чувствительность, специфичность и применимость. Несмотря на то, что не все тесты из категории a или b прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Тетраэдрический бакуловир (Baculovirus renaeidae) надзор, обнаружение и методы диагностики

Метод	Целевой надзор				Предполагаемый диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	ПЛ	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	c	d	d	d	d	d
Биопроба	d	d	d	d	c	c
Прямая СМ	b	b	c	c	a	a
Гистопатология	b	b	c	c	a	a
Просвечивающая ЭМ	d	d	d	d	d	a
Анализы на основе антигенов	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
Последовательность	d	d	d	d	d	a

ПЛ = постличинка, СМ = световой микроскопии, ЭМ = электронная микроскопия, ПЦР = полимеразная цепная реакция

6. Тест(ы), рекомендованный для целевого надзора, чтобы заявить о свободе от инфекции тетраэдрическим бакуловиром (*Baculovirus penaeid*)

Два года истории отрицательных результатов тестов на ВР с помощью:

- ПЦР, выполняемой на образцах соответствующего типа и размера выборки, и/или
- влажных образцах и / или гистологические результаты, при которых в образцах соответствующего типа и размера не наблюдаются тетраэдрические окклюзионные тельца.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение подозрения на болезнь

Для личинок (особенно протозоа, мизиса и ранних стадий ПЛ) - смертность, при этом у личинок наблюдается побеление средней кишки. Для молоди - плохой рост в популяциях с предшествующей историей инфекции ВР.

7.2. Определение подтвержденного случая

Любая комбинация, по крайней мере, двух из следующих трех методов (с положительными результатами):

- Демонстрация с помощью микроскопа тетраэдрических окклюзионных телец во влажных препаратах целых личинок или иссеченных гепатопанкреасов. Что касается более взрослых постличинок, молоди и взрослых особей - тетраэдрические окклюзионные тельца видны во влажных препаратах и/или в гистологических срезах гепатопанкреаса или фекалий.
- Положительный гистологический сигнал гибридизации *in-situ* на поражения, характерные для ВР (то есть гипертрофированные ядра с патогномичными тетраэдрическими окклюзионными тельцами или без них).
- Положительные результаты ПЦР на ВР.

8. Справочные материалы

BONAMI J R , BRUCE L D , POULOS B T , MARI J & LIGHTNER D V (1995) Partial characterisation and cloning of the genome of PvSNPV (= BP-type virus) pathogenic for *Penaeus vannamei* *Dis Aquat Org* , 23, 59-66

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 JA & 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

BROCK JA & MAIN K (1994) A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei* Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 242 pp

BROCK J A , NAKAGAWA L K , VAN CAMPEN H , HAYASHI T & TERUYA S (1986) A record of *Baculovirus penaei* from *Penaeus marginatus* Randall in Hawaii *J Fish Dis* , 9, 353-355

BRUCE LD, LIGHTNER DV, REDMAN RM & STUCK KC (1994) Application of traditional and molecular detection methods to experimental studies on the development of *Baculovirus penaei* (BP) infections in larval *Penaeus vannamei* *J Aquat Anim Health*, 6, 355-359

BRUCE LD, REDMAN RM, LIGHTNER DV & BONAMI JR (1993) Application of gene probes to detect a penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using *in situ* hybridization *Dis Aquat Org* , 17, 215-221

BUENO SLS, NASCIMENTO R M & NASCIMENTO I (1990) *Baculovirus penaei* infection in *Penaeus subtilis* A new host and a new geographic range of the disease *J World Aquaculture Soc*, 21, 235-237

CHEN S N, CHANG PS & 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

COUCH JA (1974) An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp ultrastructure, prevalence, and enhancement *J Invertebr Pathol*, 24, 311-331

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

DURAND S, LIGHTNER DV & BONAMI JR (1998) Differentiation of BP-type baculovirus strains using *in situ* hybridization *Dis Aquat Org*, 32, 237-239

FAUQUET CM, MAYO MA, MANILOFF J, DESSELBERGER U & BALL LA (2005) Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Elsevier Academic Press, Oxford, UK and San Diego, California, USA, 1259 pp

HAMMER HS, STUCK KC & OVERSTREET RM (1998) Infectivity and pathogenicity of *Baculovirus penaei* (BP) in cultured larval and postlarval Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, related to the stage of viral development *J Invertebr Pathol*, 72, 38-43

JOHNSON PT & LIGHTNER DV (1988) Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans gut-infecting species *Dis Aquat Org*, 5, 123-141

- LE BLANC B D & OVERSTREET R M (1990) Prevalence of *Baculovirus penaei* in experimentally infected white shrimp (*Penaeus vannamei*) relative to age *Aquaculture*, 87, 237-242
- LE BLANC BD & OVERSTREET R M (1991) Effect of dessication, pH, heat and ultraviolet irradiation on viability of *Baculovirus penaei* *J Invertebr Pathol*, 57, 277-286
- LE BLANC B D, OVERSTREET RM & LOTZ J M (1991) Relative susceptibility of *Penaeus aztecus* to *Baculovirus penaei* *J World Aquaculture Soc*, 22, 173-177
- LIGHTNER DV (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 (1999) The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies *J Applied Aquaculture*, 9, 27-52
- LIGHTNER DV & REDMAN R M (1998) Shrimp diseases and current diagnostic methods *Aquaculture*, 164, 201220
- LIGHTNER D V, REDMAN R M & ALMADA RUIZ E A (1989) *Baculovirus penaei* in *Penaeus stylirostris* (Crustacea Decapoda) cultured in Mexico unique cytopathology and new geographic record *J Invertebr Pathol*, 53, 137-139
- MACHADO CR, BUENO DES SL & MENCK CFM (1995) Cloning shrimp *Baculovirus penaei* DNA and hybridization comparison with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *Rev Brasil Genet (Brazil J Genetics)*, 18, 1-6
- OVERSTREET RM (1994) BP (*Baculovirus penaei*) in penaeid shrimps USMSFP 10th Anniversary Review *GCRL Special Publication*, 1, 97-106
- OVERSTREET R M, STUCK KC, KROL RA & HAWKINS WE (1988) Experimental infections with *Baculovirus penaei* in the white shrimp *Penaeus vannamei* as a bioassay *J World Aquaculture Soc*, 19, 175-187
- POULOS B T, MARI J, BONAMI J R, REDMAN RM & 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
- STUCK KC & OVERSTREET R M (1994) Effect of *Baculovirus penaei* on growth and survival of experimentally infected postlarvae of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* *J Invertebr Pathol*, 64, 18-25
- STUCK K C, STUCK L M, OVERSTREET R M & WANG S Y (1996) Relationship between BP (*Baculovirus penaei*) and energy reserves in larval and postlarval Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* *Dis Aquat Org*, 24, 191-198
- STUCK KC & WANG S Y (1996) Establishment and persistence of *Baculovirus penaei* infections in cultured Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* *J Invertebr Pathol*, 68, 59-64

SUMMERS M.D. (1977). Characterization of Shrimp Baculovirus. U.S. Environmental Protection Agency Report, EPA-600/3-77-130. US E.P.A., Gulf Breeze, Florida, USA, 35 pp.

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 настоящее время не существует референтной лаборатории МЭБ по Тетраэдрическому бакуловирусу (*Baculovirus penaei*)
(см. таблицу в конце настоящего *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ:

<http://www.oie.int/en/scientific-Experience/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).