

ИНФЕКЦИЯ *HEPATOBACTER PENAЕI* (НЕКРОТИЗИРУЮЩИЙ ГЕПАТОПАНКРЕАТИТ)

1. Предмет рассмотрения

Инфекция *Hepatobacter penaei* означает инфекцию патогенным возбудителем Candidatus *Hepatobacter penaei*, облигатной внутриклеточной бактерией Класса α -Proteobacteria. Болезнь широко известна под названием «некротизирующий гепатопанкреатит».

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Hepatobacter penaei – это плеоморфная, грамотрицательная, внутрицитоплазматическая бактерия (Nunan с соавт., 2013). Она является представителем α Proteobacteria (Frelier с соавт., 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy с соавт., 1996а; Loy с соавт., 1996а). Преобладающая форма – палочковидный, подобный риккетсиям организм ($0,25 \times 0,9$ мкм), в то время как спиралевидная форма ($0,25 \times 2-3,5$ мкм) имеет восемь жгутиков (флагелл) на базальном полюсе (Frelier с соавт., 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy с соавт., 1996а; Loy с соавт., 1996b). Генетический анализ *H. penaei*, ассоциированной со вспышками в Северной и Южной Америке, дает основание предположить, что изоляты являются или идентичными, или очень близко родственными подвидами (Loy et al., 1996а; Loy с соавт., 1996b).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Данные отсутствуют.

2.1.3. Стабильность возбудителя

Ткани, инфицированные *Hepatobacter penaei*, остаются инфекционными после неоднократных циклов замораживания–оттаивания и после хранения в 50% глицерине. *Hepatobacter penaei*, подвергнутые замораживанию при температуре -20°C – -70°C и -80°C , как было продемонстрировано, сохраняли инфекционную активность при испытаниях по экспериментальной передаче с использованием *Penaeus vannamei* (Crabtree с соавт., 2006; Frelier с соавт., 1992).

2.1.4. Жизненный цикл

Не применимо.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды-хозяева

Виды, удовлетворяющие критериям для включения в список в качестве восприимчивых к инфекции *H. penaei* в соответствии с Главой 1.5. *Ветеринарно-санитарного кодекса*

по водным животным (Кодекса по водным животным), включают: белоногую креветку (*Penaeus vannamei*).

2.2.2. Виды, данные о восприимчивости которых являются неполными

Виды, в отношении которых имеются неполные данные, чтобы удовлетворять критериям для включения в список в качестве восприимчивых к инфекции *H. penaei* в соответствии с Главой 1.5. Кодекса по водным животным, включают: северную белую креветку (*Penaeus setiferus*), северную розовую креветку (*Penaeus duorarum*), голубую креветку (*Penaeus stylirostris*), банановую креветку (*Penaeus merguensis*), креветку «алоха» (*Penaeus marginatus*), северную коричневую креветку (*Penaeus aztecus*) и гигантскую тигровую креветку (*Penaeus monodon*).

Кроме того, сообщалось о патоген-специфических положительных результатах полимеразной цепной реакции (ПЦР) у следующего вида, однако активная инфекция продемонстрирована не была: американский омар (*Homarus americanus*).

2.2.3. Восприимчивые стадии развития хозяина

Инфекция *H. penaei* была продемонстрирована у молоди, взрослых особей и маточного поголовья.

2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций

Смотрите пункты 2.2.1 и 2.2.3.

2.2.5. Целевые органы и инфицируемая ткань

Целевой тканью является гепатопанкреас: инфекция *H. penaei* была зарегистрирована во всех видах клеток гепатопанкреаса.

2.2.6. Персистентная инфекция

Некоторые представители популяций *P. vannamei*, которые выживают после инфекции *H. penaei*, могут быть носителями этой внутриклеточной бактерии на протяжении всей жизни и передавать ее другим популяциям путем горизонтальной передачи (Aranguen с соавт., 2006; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2008; Morales-Covarrubias, 2010; Vincent & Lotz, 2005).

2.2.7. Переносчики

Векторы в случаях естественной инфекции неизвестны.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Горизонтальная передача *H. penaei* может происходить вследствие каннибализма или посредством контаминированной воды (Aranguen с соавт., 2006; Aranguen с соавт., 2010; Frelie с соавт., 1993; Gracia-Valenzuela с соавт., 2011; Morales-Covarrubias с соавт., 2012; Vincent с соавт., 2004). Высказывались также предположения относительно *Hepatobacter penaei*, которая выделяется с фекалиями в прудовую воду,

как источника контаминации (Aranguren с соавт., 2006; Briñez с соавт., 2003; Morales-Covarrubias с соавт., 2006).

2.3.2. Превалентность

Зарегистрированные значения превалентности *H. penaei* в диких популяциях находятся в диапазоне от 5,6 до 15% у *P. duorarum* и от 5 до 17% у *P. aztecus*, отобранных в зонах Carrizal и Carbonera, Лагуна Мадре в Тамаулипас, Мексика (Aguirre-Guzman с соавт., 2010). Lightner & Redman, 1994 сообщали о превалентности 0,77% у культивируемых *P. vannamei* и 0,43% у культивируемых *P. stylirostris* из региона Тумбес, Перу.

Зарегистрированные значения превалентности *H. penaei* на фермах по выращиванию креветок находятся в диапазоне от 0,6% до 1,3% у *P. vannamei* с ферм по выращиванию креветок, расположенных в Белизе, Бразилии, Гватемале, Гондурасе, Мексике, Никарагуа и Венесуэле (Morales-Covarrubias с соавт., 2011).

2.3.3. Географическое распространение

Hepatobacter penaei, по всей видимости, распространена в западном полушарии среди как диких, так и культивируемых пенеидных креветок (Aguirre-Guzman с соавт., 2010; Del Río-Rodríguez с соавт., 2006). В западном полушарии *H. penaei* обычно встречается у культивируемых пенеидных креветок на территории Белиза, Бразилии, Колумбии, Коста-Рики, Эквадора, Эль-Сальвадора, Гватемалы, Гондураса, Мексики, Никарагуа, Панамы, Перу, Соединенных Штатов Америки и Венесуэлы (Frelief с соавт., 1992; Ibarra-Gómez с соавт., 2007; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias et al., 2011).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

У *P. vannamei* инфекция *H. penaei* приводит, как правило, к болезни, имеющей катастрофические последствия, с уровнем смертности, приближающимся к 100%.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Распространенность инфекции *H. penaei* на фермах может возрасти при продолжительных периодах высоких температур (>29°C) и высокой солености (20–38 ppt – частей на триллион) (Morales-Covarrubias, 2008). В Мексике была обнаружена *H. penaei* при невысоких значениях превалентности (<7%) на фермах по выращиванию креветок в такие месяцы, как апрель, май, июль и август. Однако, в такие месяцы, как сентябрь и октябрь, когда в дневное время температурные показатели высокие, а в ночное время низкие, наблюдаются высокие уровни превалентности и смертности (>20%) (Morales-Covarrubias, 2010).

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Профилактика

- а) Раннее обнаружение (начальная стадия) клинической инфекции *H. penaei* имеет важное значение для успешного лечения, поскольку каннибализм может привести к усилению и передаче болезни.

- b) Голодание креветок и каннибализм в отношении инфицированных креветок, а также благоприятные условия для размножения *H. penaei* являются важными факторами распространения *H. penaei* среди *P. vannamei*.
- c) Использование гидратированной извести ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) для обработки дна прудов при проведении подготовки прудов к заселению поголовья может способствовать снижению инфекции *H. penaei*.
- d) Меры профилактики могут включать рыхление граблями, вспашку и удаление осадочных отложений со дна пруда, продолжительное просушивание (путем подвергания воздействию солнечного света) прудов и водораспределительных каналов на протяжении нескольких недель, дезинфекция орудий лова и другого оборудования фермы с использованием гипохлорита кальция и масштабное известкование.
- e) Использование свободного от специфических патогенов (СПФ) маточного поголовья является эффективной профилактической мерой.

2.4.2. Контроль

Применение антибиотиков – окситетрациклина и флорфеникола – в лечебных кормах каждые 8 часов в течение 10 дней является, по всей вероятности, наиболее подходящим способом лечения, существующим на настоящий момент, в особенности, если инфекцию *H. penaei* обнаруживают на начальной стадии (Frelier с соавт., 1995; Morales-Covarrubias с соавт., 2012).

2.4.3. Вакцинация

Научно подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.4. Химиотерапия

Научно подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.5. Иммуностимуляция

Научно подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.6. Выведение резистентных особей

Научно подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.7. Пополнение поголовья резистентными видами

Научно подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.8. Блокирующие агенты

Научно подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.9. Дезинфекция икринок и личинок

Дезинфекция икринок и личинок представляет собой надлежащую практику ухода и содержания (Lee & O'Byrne, 2003) и рекомендуется ввиду ее потенциала в плане

снижения контаминации выметанных икринок и личинок *H. penaei* (и контаминации другими возбудителями болезней).

2.4.10. Общие практики ведения хозяйства

Превалентность и степень тяжести инфекции *H. penaei* могут возрастать при выращивании креветок в условиях относительной скученности или в стрессовых условиях. Некоторые практики ведения хозяйства успешно применялись для предотвращения инфекции *H. penaei*. Среди них было применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) для предварительного скрининга дикого или выращиваемого в прудах маточного поголовья.

3. Отбор образцов

3.1. Выбор отдельных образцов

Подходящими образцами для тестирования на наличие инфекции *H. penaei* являются следующие стадии развития (постличинки [PL], молодь и взрослые особи).

3.2. Сохранение образцов для предоставления на исследование

Смотрите информацию о рутинных гистологических или молекулярных исследованиях, а также руководящие указания относительно сохранения образцов для предполагаемого метода тестирования в Главе 2.2.0.

3.3. Объединение образцов в пул

Влияние объединения в пул на диагностическую чувствительность не оценивалось, поэтому более крупных креветок следует подготавливать и тестировать по отдельности. Тем не менее, образцы, в особенности PL или образцы весом до 0,5 г включительно, можно объединять в пулы для получения достаточного количества материала для молекулярного тестирования.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Hepatobacter penaei в наибольшей степени инфицирует кишечную ткань. Основной целевой тканью для *H. penaei* является гепатопанкреас. Можно произвести сбор фекалий и использовать их для тестирования (обычно методом ПЦР или дот-блот гибридизации со специфическими зондами), когда необходимо провести нелетальное тестирование ценного маточного поголовья (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Bradley-Dunlop с соавт., 2004; Briñez с соавт., 2003; Frelie с соавт., 1993; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias с соавт., 2012).

3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

Hepatobacter penaei не реплицируется в средней кишке, слепых отростках, клетках соединительной ткани, жабрах, гематопозитических узелках и гемоцитах, вентральном нервном стволе и ганглиях, эпителиальных клетках канальцев сязжковой (антеннальной) железы и паренхимальных клетках лимфоидных органов.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Широкий ряд макроскопических признаков может быть использован как указание на возможное присутствие инфекции *H. repaei*. К ним относятся: вялость, снижение потребления пищи, атрофированный гепатопанкреас, анорексия и пустой кишечник, заметное сокращение роста и неудовлетворительное соотношение длины и веса («тонкие хвосты»); мягкие панцири и вялое тело; черные или потемневшие жабры; сильное обрастание организмами-эпibiонтами/комменсалами; бактериальная болезнь панциря, включая язвенные поражения кутикулы или эрозию меланизированных придатков; и расширенные хроматофоры, что приводит к появлению темных краев у уродов и плеопод. Ни один из этих признаков не является патогномичным.

4.1.2. Изменения в поведении

При острой форме болезни *P. vannamei* могут демонстрировать изменения в поведении, включая вялость и сниженную активность питания.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Инфекция *H. repaei* нередко вызывает острую форму болезни с очень высоким уровнем смертности у ранней молодежи, взрослых особей и маточного поголовья. У инфицированных горизонтальным путем ранней молодежи, взрослых особей и маточного поголовья инкубационный период и степень тяжести болезни в некоторой степени зависят от размера и/или возраста. Макроскопические признаки не являются специфическими, однако при острой инфекции *H. repaei* наблюдается заметное сокращение потребления пищи с последующими изменениями в поведении и внешнем виде (смотрите Пункт 4.1.1).

4.2.2. Клиническая химия

Не применимо.

4.2.3. Микроскопическая патология

Острую и хроническую инфекции *H. repaei* у *P. vannamei* можно без труда диагностировать, используя рутинные гистологические методы с окрашиванием гематоксилином и эозином (H&E) (смотрите Пункт 4.2.6).

4.2.3.1. Начальная стадия инфекции *H. repaei*

На начальной стадии инфекцию *H. repaei* сложно диагностировать при помощи рутинных гистологических методов с использованием H&E. Для диагностики инфекции на начальной стадии рекомендуется использовать молекулярные методы для обнаружения *H. repaei* (например, при помощи ПЦР или путем применения *H. repaei*-специфических ДНК-зондов для тестов методом дот-блот гибридизации или гибридизации *in-situ* [ISH] на гистологических срезах).

4.2.3.2. Острая стадия инфекции *H. penaei*

Острая инфекция *H. penaei* характеризуется атрофированным гепатопанкреасом с умеренной атрофией эпителия канальцев, наличием бактериальных клеток и инфильтрации гемоцитами, затрагивающей один или несколько канальцев (мультифокальная инкапсуляция). Гипертрофированные клетки, отдельные эпителиальные клетки, по-видимому, отделившиеся от соседних клеток, подвергаются некрозу и отслаиванию в просвет канальцев, и липидное содержание эпителиальных клеток канальцев варьирует.

4.2.3.3. Переходная стадия инфекции *H. penaei*

Переходная стадия инфекции *H. penaei* характеризуется гемоцитным воспалением межкапиллярцевых промежутков в качестве реакции на некроз, цитолиз и отслаивание эпителиальных клеток канальцев гепатопанкреаса. Эпителий канальцев гепатопанкреаса заметно атрофирован, что приводит к образованию больших отежных (наполненных жидкостью или «водянистых») участков в гепатопанкреасе. Эпителиальные клетки канальцев в месте мультифокальной инкапсуляции, как правило, атрофированы и редуцированы из простых столбчатых до кубовидных в плане морфологии. Они содержат небольшое количество или вообще не содержат накопленных липидных вакуолей, заметно сократившееся количество или вообще не содержат секреторных вакуолей и массы бактерий. На данной стадии наблюдались гемоцитные узелки при наличии масс бактерий в центре узелка.

4.2.3.4. Хроническая стадия инфекции *H. penaei*

При хронической стадии инфекции *H. penaei* происходит снижение обилия и степени тяжести поражений капиллярцев, мультифокальной инкапсуляции и отежных участков, и они сменяются инфильтрацией и аккумулярованием гемоцитов в местах некрозов. Имеются участки с фиброзами, немногочисленные меланизированные и некротизированные капиллярцы, и присутствует очень малое количество гипертрофированных клеток с массами бактерий в цитоплазме и небольшое количество гемоцитных узелков.

4.2.4. Влажные препараты

Исследование ткани гепатопанкреаса (НР) методом давленных влажных препаратов в основном проводится для обнаружения предполагаемой инфекции *H. penaei*. Гепатопанкреас может быть атрофирован и обладать какими-либо из следующих характеристик: мягкий и водянистый; наполненная жидкостью центральная часть; побледневший цвет с черными полосками (меланизированные капиллярцы); бледная центральная часть вместо нормальной оранжевой окраски. Для анализа влажных препаратов креветки должны находиться в межлиночной стадии и не быть подвергнутыми обработке, которая могла бы привести к изменению капиллярцев. Данный метод использует деформацию или атрофию капиллярцев, главным образом, апикальной области в качестве указания на наличие ранних стадий инфекции *H. penaei*.

Инфекция *H. penaei* имеет четыре стадии (полуколичественная шкала):

Начальная стадия: присутствие в небольших количествах деформации капилляров (1–5 полей⁻¹ организм⁻¹) и отделения клеток.

Острая стадия: инфильтрация гемоцитами, увеличение количества деформированных капилляров (6–10 полей⁻¹ организм⁻¹), наличие инкапсуляции на различных участках образца, что представляет собой атрофированные капилляры, окруженные многочисленными слоями гемоцитов.

Переходная стадия: инфильтрация гемоцитами, увеличение количества деформированных капилляров (11–15 полей⁻¹ организм⁻¹), меланизированные капилляры, некротизированные капилляры и высокий уровень инкапсуляции на различных участках образца.

Хроническая стадия: участки с фиброзами, немногочисленные меланизированные и некротизированные капилляры и присутствие очень небольшого количества гипертрофированных клеток.

4.2.5. Мазки

Не применимо.

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

В настоящее время неприменимы для диагностических целей.

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

Смотрите пункт 4.2.4.

4.3.1.1.2. Мазки

Не применимо.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

Смотрите пункт 4.2.3.

4.3.1.1.4. Метод биопробы

Подтверждение инфекции *H. peanaei* можно осуществить методом биопробы на подозрительных животных с использованием СПФ-молоди *P. vannamei*, которая служит в качестве индикатора внутриклеточных бактерий (Cock с соавт., 2009; Johnson, 1990; Lee & O’Byrne, 2003; Lightner, 2005). Можно использовать процедуры перорального заражения. Пероральный способ относительно прост в исполнении и осуществляется путем скармливания измельченного гепатопанкреаса подозрительных креветок СПФ-молоди *P. vannamei* в небольших резервуарах. Требуется использовать в качестве негативного контроля резервуар с

индикаторными креветками, которые получают только обычный корм. При использовании процедуры скармливания гепатопанкреаса (*per os*) для проведения биопробы на наличие *H. penaei*, *H. penaei*-положительные индикаторные креветки (по макроскопическим признакам и гистопатологии), как правило, выявляются в пределах 3–4 дней с момента первоначального подвергания воздействию, а значительное количество случаев гибели происходит к 3–8 дню после первоначального подвергания воздействию. Креветки, выступающие в качестве отрицательных контролей, должны оставаться отрицательными (в течение, по меньшей мере, 10–15 дней) в том, что касается макроскопических и гистологических признаков инфекции *H. penaei* и необычной смертности.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные среды

Hepatobacter penaei не выращивали *in vitro*. Линий клеток ракообразных не существует (Morales-Covarrubias et al., 2010; Vincent & Lotz, 2007).

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе использования антител

Существуют иммуногистохимические (ИГХ) тесты с использованием моноклональных антител (МАТ, MAbs) к *H. penaei* в соответствии с методами, описанными у Bradley-Dunlop с соавт., 2004, для обнаружения *H. penaei*.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

Были разработаны ISH- и ПЦР-тесты для обнаружения *H. penaei*, и ПЦР-наборы являются коммерчески доступными (Loy & Frelie, 1996; Loy с соавт., 1996b). Генетические зонды и ПЦР-методы обеспечивают более высокую диагностическую чувствительность, чем классические гистологические подходы к диагностике инфекции *H. penaei*. Более того, данные методы имеют дополнительное преимущество – возможность применения для нелетального тестирования ценного маточного поголовья креветок.

4.3.1.2.3.1. ДНК-зонды для применения в исследованиях методом ISH с нерадиоактивными кДНК-зондами

Метод ISH, описанный Loy & Frelie, 1996 и Lightner, 1996, обеспечивает более высокую диагностическую чувствительность, чем более традиционные методы обнаружения и диагностики *H. penaei*, которые задействуют классические гистологические методы (Johnson, 1990; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias с соавт., 2012). Исследование методом ISH рутинных гистологических срезов поражений гепатопанкреаса, ассоциированных с острой, переходной и хронической стадиями, с использованием специфических меченных дигоксигенином (DIG) кДНК-зондов для *H. penaei* обеспечивает точную диагностику инфекции бактерией некротизирующего гепатопанкреатита (NHPB) (Lightner, 1996; Loy & Frelie, 1996; Morales-Covarrubias с соавт., 2006). Патогномоничные *H. penaei*-положительные поражения демонстрируют выраженные участки синего – исине-черного цвета

в цитоплазме пораженных клеток при реакции с кДНК-зондами. (Подробную информацию о методе ISH смотрите в Главе 2.2.2 Инфекция вирусом инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза, а подробную информацию о применении фиксатора АФА Дэвидсона – в Главе 2.2.0 Пункт В.5.3.ii).

4.3.1.2.3.2. Метод ПЦР

Исследование гепатопанкреаса и фекалий на наличие *H. penaei* можно провести с использованием ОТ-ПЦР. Праймеры, обозначенные как NHPF2: 5'-CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAGT-3' и NHPR2: 5'-GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C-3', амплифицируют фрагмент длиной 379 пар-оснований (п.о.), соответствующий 16S рРНК *H. penaei*. Метод ПЦР, кратко описанный ниже, в целом соответствует методу, описанному у Aranguren с соавт., 2010.

- i) *Получение ДНК-матрицы:* ДНК можно экстрагировать из 25–50 мг нефиксированного, замороженного или сохраненного с применением этилового спирта гепатопанкреаса. Экстракцию ДНК следует проводить с использованием коммерчески доступных наборов для экстракции ДНК из тканей, следуя процедурам изготовителя для получения качественных ДНК-матриц. Другие наборы для экстракции ДНК включают QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), MagMax™ Nucleic Acid kits (Life Technologies) или Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega)¹.
- ii) При проведении исследования методом ПЦР следует предусмотреть следующие контроли: а) известный *H. penaei*-отрицательный образец ткани; б) известный *H. penaei*-положительный образец (гепатопанкреас); и с) «безматричный» контроль.
- iii) Набор бус PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Bead (RTG beads, GE Healthcare) используется для всех описываемых здесь реакций амплификации.
- iv) Оптимизированные условия проведения ПЦР (5–50 нг ДНК) (конечные концентрации в общем объеме 25 мкл) для обнаружения *H. penaei* в образцах гепатопанкреаса креветок следующие: праймеры (по 0,2 мкМ каждого), дезоксирибонуклеозид трифосфаты (дНТФ, dNTP) (по 200 мкМ каждого), Taq-полимераза (0,1 Ед. мкл⁻¹), хлорид марганца (1,5 мМ) в 10 мМ Трис-НСl, рН 9,0, 50 мМ КСl.
- v) Если у термоциклера нет нагреваемой крышки, тогда легкое минеральное масло (50 мкл) наслаивается поверх 50 мкл реакционной смеси для предотвращения конденсации или испарения во время термоциклирования.
- vi) Параметры проведения циклов: этап 1: 95°C в течение 5 минут, 1 цикл; этап 2: 95°C в течение 30 секунд, 60°C в течение 30 секунд и 72°C в течение 30 секунд, 35 циклов; этап 3: 60°C в течение 1 минуты, 72°C в

¹ Ссылка на конкретные коммерческие продукты в качестве примеров не подразумевает их одобрения со стороны МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, упоминаемым в настоящем *Руководстве по водным животным*.

течение 2 минут, 1 цикл; 4°C, «бесконечное» время выдержки.

Примечание: Следует проводить оптимизацию условий для каждого термоциклера с использованием известных положительных контролей.

4.3.1.2.3.3. Метод ПЦР в реальном времени

Методы ПЦР в реальном времени для обнаружения *H. pepaei* обладают такими преимуществами, как быстрота, специфичность и чувствительность. Чувствительность ПЦР в реальном времени составляет ~100 копий целевой последовательности из генома *H. pepaei* (Aranguren с соавт., 2010; Vincent & Lotz, 2005).

Метод ПЦР в реальном времени с использованием реагентов TaqMan, описанный ниже применительно к *H. pepaei*, в целом следует методу, использованному у Aranguren с соавт., 2010.

- i) Были подобраны праймеры для ПЦР и зонд TaqMan на основе гена 16s рРНК *H. pepaei* (GenBank U65509) (Loy & Frelief, 1996). Праймеры и зонд TaqMan были сконструированы при помощи программного обеспечения Primer Express software version 2.0 (Applied Biosystems). Последовательности прямого (NHP1300F) и обратного (NHP1366R) праймеров следующие: 5'-CGT-TCA-CGG-GCC-TTG-TACAC-3' и 5'-GCT-CAT-CGC-CTT-AAA-GAA-AAG-ATA-A-3', соответственно. TaqMan зонд NHP: 5'-CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA-3', который соответствует региону из нуклеотидов 1321–1340, синтезирован и помечен флуоресцирующими красителями 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и N,N,N,N-тетраметил-6-карбоксихлорофлуоресцеин (TAMRA) на 3'-конце.
- ii) *Получение ДНК-матрицы*: осуществление экстракции из гепатопанкреаса и очистки ДНК-матрицы – такое же, как описано в разделе, касающемся традиционной ПЦР в реальном времени.
- iii) *Реакционная смесь для ПЦР в реальном времени содержит*: TaqMan One-step real-time PCR SuperMix (Quanta, Biosciences), по 0,3 мкМ каждого праймера, 0,1 мкМ зонда TaqMan, 5–50 нг ДНК и воду в объеме реакционной смеси 25 мкл. Для получения оптимальных результатов реакционную смесь следует встряхнуть на вортексе и тщательно перемешать.
- iv) Амплификация осуществляется при помощи мастерциклера Realplex 2.0 (Eppendorf). Проведение циклов включает в себя начальную денатурацию при 95°C в течение 3 минут, за которой следуют 40 циклов денатурации при 95°C в течение 15 секунд и отжиг/элонгация при 60°C в течение 1 минуты. После каждого цикла проводят измерение уровней флуоресценции.
- v) Необходимо предусмотреть «безматричный контроль» при каждом прогоне реакции. Это делается для того, чтобы исключить присутствие

контаминантов флуоресценции в реакционной смеси, а также для того, чтобы исключить контаминацию реагентов специфической мишенью исследования. Следует также предусмотреть положительный контроль, и это может быть плазмидная ДНК, содержащая целевую последовательность, очищенные бактерии или ДНК, экстрагированная из инфицированного *H. penaei* гепатопанкреаса.

4.3.1.2.3.4. Секвенирование

Продукты ПЦР могут быть клонированы и секвенированы или непосредственно секвенированы, когда необходимо подтвердить инфекцию *H. penaei* или идентифицировать ложноположительные результаты или неспецифическую амплификацию (Aranguren с соавт., 2010; Bustin et al., 2009; Vincent & Lotz, 2005).

4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

Существуют методы для выделения и очистки *H. penaei* (Aranguren с соавт., 2010; Nunan с соавт., 2013; Vincent с соавт., 2004; Vincent & Lotz, 2005). *Hepatobacter penaei* невозможно культивировать, используя традиционные бактериологические методы, таким образом, поддержание инфекции *H. penaei* должно осуществляться путем непрерывного подвергания неинфицированного поголовья *P.vannamei* воздействию со стороны популяции, где имеет место эпидемия *H. penaei*.

4.3.2. Серологические методы

Не применимы, поскольку креветки являются беспозвоночными животными, у которых не вырабатываются специфические антитела, которые можно было бы использовать для демонстрации инфекции или предшествовавшего подвергания воздействию *H. penaei*.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для целевого надзора и диагностики инфекции *H. penaei* перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, использованные в Таблице, означают: a = данный метод является методом, рекомендованным по причинам доступности, целесообразности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = данный метод применяется в некоторых ситуациях, однако затраты, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение; и d = данный метод в настоящее время не рекомендуется для данной цели. Данные обозначения в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает в себя такие аспекты, как достоверность, чувствительность, специфичность и целесообразность. Хотя не все из тестов, перечисленных как относящиеся к категории a или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются, не давая при этом вызывающих сомнение результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	PL	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	d	d	d	d	d
Биопроба	d	d	d	d	c	d
Прямая СМ (влажный препарат)	d	d	d	d	d	d
Гистопатология	d	d	c	c	a	c
<i>In-situ</i> с использованием ДНК-зондов	a	a	a	a	a	a
Трансмиссионная ЭМ	d	d	d	d	c	c
Методы анализа, основанные на использовании антител	d	d	c	c	c	c
ПЦР в реальном времени	a	a	a	a	a	a
ПЦР	a	a	a	a	a	a
Секвенирование	d	d	d	d	d	a

PL = постличинки; СМ = световая микроскопия; ЭМ = электронная микроскопия; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора для объявления свободы от инфекции *H. renaei*

Как показано в Таблице 5.1., ПЦР в реальном времени (Пункт 4.3.1.2.3.2) является методом, рекомендуемым для целевого надзора по причине его доступности, целесообразности и диагностической специфичности и чувствительности. При расследовании случаев смертности, ассоциированной с острой стадией, в рамках программы целевого надзора демонстрация патогномичных *H. renaei*-индуцированных поражений в гепатопанкреасе посредством гистологии (с подтверждением или без подтверждения при помощи ISH с использованием *H. renaei*-специфических ДНК-зондов) является подходящим методом (Таблица 5.1.).

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Инфекцию *H. penaei* подозревают, если удовлетворен, по меньшей мере, один из следующих критериев:

- i) гистопатология, сообразная с инфекцией *H. penaei*
или
- ii) положительные результаты ISH на целевых тканях
или
- iii) положительный результат, полученный посредством ПЦР или ПЦР в реальном времени.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Инфекция *H. penaei* считается подтвержденной в случае, если удовлетворены два или более из следующих критериев:

- i) гистопатология, сообразная с инфекцией *H. penaei*
- ii) положительные результаты ISH на целевых тканях
- iii) ПЦР (с последующим секвенированием), или ПЦР в реальном времени с положительными результатами на наличие инфекции *H. penaei*.

8. Библиография

AGUIRRE-GUZMAN G., SANCHEZ-MARTINEZ J.G., PÉREZ-CASTAÑEDA R. & ORTA-RODRIGUEZ R. (2010). Detection of necrotizing hepatopancreatitis (nhp) in wild shrimp from Laguna Madre, Mexico by a multiplex polymerase chain reaction. *Thai J. Vet. Med.*, **40**, 337–341.

ARANGUREN L.F., BRIÑEZ B., ARAGON L., PLATZ C., CARABALLO X., SUAREZ A. & SALAZAR M. (2006). Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female broodstock: effect on reproductive parameters nauplii and larvae quality. *Aquaculture*, **258**, 337–343.

ARANGUREN L.F., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2010). Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*, **307**, 187–192.

BONDAD-REANTASCO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Chapter 10: Necrotizing hepatopancreatitis. In: *Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases*. FAO Fisheries Technical Paper No. 402. Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 207 pp.

BRADLEY-DUNLOP D.J., PANTOJA C. & LIGHTNER D.V. (2004). Development of monoclonal antibodies for detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 233–240.

BRIÑEZ B., ARANGUREN F. & SALAZAR M. (2003). Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 69–72.

- BUSTIN S.A., BENES V., GARSON J.A., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M.W., SHIPLEY G.L., VANDESOMPELE J. & WITTEW C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55**, 611–622.
- COCK J., GITTERLE T., SALAZAR M. & RYE M. (2009). Breeding for disease resistance of penaeid shrimps. *Aquaculture*, **286**, 1–11.
- CRABTREE B.G., ERDMAN M.M., HARRIS D.L. & HARRIS I.T. (2006). Preservation of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) by freezing tissue collected from experimentally infected *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **70**, 175–179.
- DEL RÍO-RODRÍGUEZ R.E., SOTO-RODRÍGUEZ S., LARA-FLORES M., CU-ESCAMILLA A.D. & GOMEZ-SOLANO M.I. (2006). A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a shrimp farm in Campeche, Mexico: A first case report. *Aquaculture*, **255**, 606–609.
- FRELIER P.F., LOY J.K. & KRUPPENBACH B. (1993). Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 44–48.
- FRELIER P.F., LOY J.K., VARNER P., THOMPSON J.A., LAWRENCE A.L. & BRAY W.A. (1995). Management procedures for the treatment of necrotizing hepatopancreatitis in farmed shrimp. *In: Swimming Through Troubled Waters. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society '95, San Diego, CA, USA, 240 pp.
- FRELIER P.F., SIS R.F., BELL T.A. & LEWIS D.H. (1992). Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Vet. Pathol.*, **29**, 269–277.
- GRACIA-VALENZUELA M.H., LUZ ANGELICA ÁVILA-VILLA L.A., GLORIA YEPIZ-PLASCENCIA G., HERNÁNDEZ-LÓPEZ J., MENDOZA-CANO F., GARCÍA-SANCHEZ G. & GOLLAS-GALVÁN T. (2011). Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at –20°C for use in forced-feeding infection of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, **311**, 105–109.
- IBARRA-GÁMEZ J.C., GALAVÍZ-SILVA L. & MOLINA-GARZA Z.J. (2007). Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico. *Ciencias Marinas*, **33**, 1–9.
- JOHNSON S.K. (1990). Handbook of Shrimp Diseases. Texas A&M Sea Grant College Program, Galveston, TX, USA.
- LEE C.S. & O'BRYEN P.J. (2003). Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 293 pp.
- 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. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquacult. Soc.*, **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1994). An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. *Aquaculture*, **122**, 9–18.
- LOY J.K., DEWHIRST F.E., WEBER W., FRELIER P.F., GARBAR T.L., TASCA S.I. & TEMPLETON J.W. (1996a). Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3439–3445.
- LOY J.K. & FRELIER P.F. (1996). Specific, non radioactive detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by *in situ* hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 324–331.
- LOY J.K., FRELIER P.F., VARNER P. & TEMPLETON J.W. (1996b). Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 117–122.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2008). Capítulo 3: Enfermedades bacterianas. *En: Patología e Inmunología de Camarones* Editores Vielka Morales y Jorge Cuellar-Angel. Programa CYTED Red II-D vannamei, Panamá, Rep. De Panamá, 120–134.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2010). Enfermedades del camarón. Detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas, SA de CV., Av. Río Churubusco 385, Col. Pedro María Anaya, México, D.F. Segunda edición. ISBN: ISBN 978-607-17-0436-8, 1–180.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., LOZANO-OLVERA R.Y. & HERNÁNDEZ-SILVA A.J. (2010). Necrotizing hepatopancreatitis in cultured shrimp caused by extracellular and intracellular bacteria. *Tilapia & Camarones*, **5**, 33–39.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., RUIZ-LUNA A., MOURA-LEMUS A.P., SOLÍS MONTIEL V.T. & CONROY G. (2011). Prevalence of diseases in cultured white shrimp (*penaeus vannamei*) in eight regions of Latin America. *Rev. Científica, FCV-LUZ*, **2**, 434–446.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., OSUNA-DUARTE A.G., GARCIA-GASCA A., LIGHTNER D.V. & MOTA-URBINA J.C. (2006). Prevalence of necrotizing hepatopancreatitis in female broodstock of *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 19–25.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., TLAHUEL-VARGAS L., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ I.E., LOZANO-OLVERA R. & PALACIOS-ARRIAGA J.M. (2012). Necrotising hepatobacterium (NHPB) infection in *Penaeus vannamei* with florfenicol and oxytetracycline: a comparative experimental study. *Rev. Científica, FCV-LUZ*, **22**, 72–80.
- NUNAN L.M., PANTOJA C.R., GOMEZ-JIMENEZ S. & LIGHTNER D.V. (2013). ‘Candidatus *Hepatobacter penaei*,’ an intracellular pathogenic enteric bacterium in the hepatopancreas of the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 1407–1409.
- NUNAN M.L., PANTOJA C. & LIGHTNER D.V. (2008). Improvement of a PCR method for the detection of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **80**, 69–73.

VINCENT A.G., BRELAND V.M. & LOTZ J.M. (2004). Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with necrotizing hepatopancreatitis (NHP) bacterium by *per os* exposure. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 227–233.

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2005). Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP-bacterium using real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 163–169.

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2007). Effect of salinity on transmission of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) to Kona stock *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 265–268.

*

* *

NB: На момент публикации (2017 год) еще не было Референтной лаборатории МЭБ по инфекции *Hepatobacter penaei* (некротизирующему гепатопанкреатиту) (смотрите Таблицу в конце данного *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ:

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

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2012 ГОДУ; САМЫЕ ПОСЛЕДНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2017 ГОДУ.