

**ИНФИЦИРОВАНИЕ ВИРУСОМ ИНФЕКЦИОННОГО
ГИПОДЕРМАЛЬНОГО И
ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА**

1. Предмет рассмотрения

Заражение инфекционным вирусом гиподермального и гематопоэтического некроза это инфицирование возбудителем вируса инфекционного гиподермального и гематопоэтического некроза (ИННВ) семейства *Parvoviridae*, род *Penstyldensovirus*.

Международный комитет по таксономии вирусов присвоил ИННВ видовое название *Decapod penstyldensovirus 1* (King с соавт., 2012).

2. Информация о болезни

2.1. Факторы агента

2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

ИННВ -наименьший из известных вирусов креветок-пенеид. Вирион представляет собой икосаэдр (20–22 нм) без оболочки плотностью 1,40 г / мл в CsCl, содержит линейную одноцепочечную ДНК (предполагаемый размер 3,9 т.п.н.) и имеет капсид с четырьмя полипептидами молекулярной массы 74, 47, 39 и 37,5 кДа (Bonami с соавт., 1990; Nunan с соавт., 2000; GenBank AF218266).

Были идентифицированы, по крайней мере, два различных генотипа ИННВ (Tang с соавт., 2003): тип 1 из Северной и Южной Америки и Восточной Азии (главным образом, Филиппин); тип 2 из Юго-Восточной Азии. Эти генотипы являются инфекционными для *P. vannamei* и *P. monodon*. Обнаружено, что две последовательности, гомологичные части генома ИННВ, встроены в геном креветок пенеид. Первоначально они были описаны как Тип 3А из Восточной Африки, Индии и Австралии и Тип 3В из западной части Индо-Тихоокеанского региона, включая Мадагаскар, Маврикий и Танзанию (Tang & Lightner, 2006; Tang с соавт., 2007). Ткани, содержащие ИННВ-гомологичные последовательности в геноме *P. monodon*, не являются инфекционными для восприимчивых видов хозяев *P. vannamei* и *P. monodon* (Lightner с соавт., 2009; Tang & Lightner, 2006; Tang с соавт., 2007).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Данные отсутствуют.

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

ИННВ является стабильным вирусом креветок; инфицированные ткани остаются инфекционными после многократных циклов замораживания-оттаивания и после хранения в 50% глицерине (Lightner, 1996a; Lightner с соавт., 1987; Lightner с соавт., 2009).

2.1.4. Жизненный цикл

Не применимо.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды, которые соответствуют критериям для включения в список восприимчивых к инфекции IHNV в соответствии с главой 1.5. *Кодекса здоровья водных животных (Водный кодекс)* включают: коричневые креветки (*Penaeus californiensis*), гигантские тигровые креветки (*Penaeus monodon*), северные белые креветки (*Penaeus setiferus*), голубые креветки (*Penaeus stylirostris*) и белоногие креветки (*Penaeus vannamei*).

2.2.2. Виды, в отношении которых полные данные о восприимчивости отсутствуют

Виды, для которых имеются неполные доказательства соответствия критериям для включения в список восприимчивых к инфекции IHNV в соответствии с главой 1.5. *Водного кодекса*, включают: северную коричневую креветку (*Penaeus aztecus*).

Кроме того, патоген-специфические положительные результаты полимеразной цепной реакции (ПЦР) были зарегистрированы у следующих организмов, но активной инфекции не было продемонстрировано: гигантская речная креветка (*Macrobrachium rosenbergii*), северная розовая креветка (*Penaeus duorarum*), тихоокеанская белая креветка (*Penaeus occidentalis*), японская креветка (*Penaeus japonicus*), зеленая тигровая креветка (*Penaeus semisulcatus*), *Hemigrapsus penicillatus*, аргентинская креветка (*Artemesia longinaruis*), краб-плавунец (*Callinectes arcuatus*), морской язык (Mazatlan sole, *Archirus mazatlanus*), желтоперый (*Gerres cinereus*), тилапия (*Oreochromis sp.*), тихоокеанская пикитинга (*Lile stolifera*), малый морской дракон (*Centropomus medius*).

2.2.3. Стадии восприимчивости у хозяев

Вирус IHNV был обнаружен на всех стадиях жизни (то есть икра, личинки, постличинки [PL], молодь и взрослые особи) *P. vannamei*. Было обнаружено, что, как правило, не происходит развитие и вылупление икринок от самок, инфицированных IHNV, с высокой вирусной нагрузкой. Те науплии, которые были получены из инфицированного маточного стада и которые вылупляются, имеют высокую превалентность инфекции IHNV (Motte с соавт., 2003).

2.2.4. Вероятность обнаружения видов и субпопуляции

Смотрите разделы 2.2.1 и 2.2.3

2.2.5. Целевые органы и инфицированная ткань

IHNV инфицирует и, как было продемонстрировано, реплицируется (используя гибридизацию *in situ* [ISH] со специфичными ДНК-зондами) в тканях эктодермального и мезодермального происхождения, отобранных от эмбриона. Таким образом, к основным органам-мишеням относятся: жабры, кутикулярный эпителий (или гиподерма), все соединительные ткани, кровеносные ткани,

лимфоидный орган, антеннальная железа и вентральный нервный тяж, его стволы и его ганглии. В органах кишечника (энтодерма, гепатопанкреас, эпителий слизистой оболочки средней кишки и средней кишки), а также в гладких, сердечных и поперечно-полосатых мышцах нет гистологических признаков инфекции ИHNV, и они обычно являются отрицательными по ISH (Lightner, 1993; Lightner, 1996a; Lightner, 2011; Lightner с соавт., 1992b).

2.2.6. Устойчивая инфекция

Некоторые представители популяций *P. stylirostris* и *P. vannamei*, которые выживают после эпизоотии ИHNV, могут быть носителями вируса всю жизнь и передавать вирус своему потомству и другим популяциям путем вертикальной и горизонтальной передачи (Bell & Lightner, 1984; Lightner, 1996a); Lightner, 1996b; Morales-Covarrubias & Chavez-Sanchez, 1999; Motte с соавт., 2003).

2.2.7. Векторы

Векторы неизвестны.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача ИHNV может быть горизонтальной или вертикальной. Горизонтальная передача осуществлялась посредством каннибализма или через контаминированную воду (Lightner, 1996a; Lightner и др., 1983a; Lightner и др., 1983b; Lightner и др., 1985), а вертикальная передача - через инфицированную икру (Motte с соавт., 2003).

2.3.2. Превалентность

В регионах, где вирус является энзоотическим в диких популяциях, превалентность вируса ИHNV была обнаружена в различных исследованиях в диапазоне от 0 до 100%. Некоторые сообщенные средние значения превалентности ИHNV в диких популяциях составляют: 26% и 46% у *P. stylirostris* в нижней и верхней частях Калифорнийского залива соответственно (Pantoja с соавт., 1999); 100% и 57%, соответственно, у взрослых женских и мужских особей *P. stylirostris* из среднего региона Калифорнийского залива (Morales-Covarrubias с соавт., 1999); 28% у дикого *P. vannamei*, собранного с тихоокеанского побережья Панамы (Nunap с соавт., 2001); и от 51 до 63% у *P. vannamei*, собранного на тихоокеанском побережье Эквадора, Колумбии и Панамы (Motte с соавт., 2003). Другие пенеиды, собранные во время некоторых из этих исследований и признанные положительными по ИHNV, включали коричневую креветку, *P. californiensis* и белую тихоокеанскую креветку *P. occidentalis*. В хозяйствах, где присутствует ИHNV, его превалентность может варьироваться от очень низкой до 100%, но типичной является высокая превалентность, приближающаяся к 100% (Chayaburakul с соавт., 2004; Lightner, 1988; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Lightner с соавт., 1992a; Lightner с соавт., 1983a; Martinez-Cordova, 1992).

2.3.3. Географическое распределение

ИHNHV, по-видимому, имеет всемирное распространение как у диких, так и у культивируемых креветок-пенеид (Brock & Lightner, 1990; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Owens с соавт., 1992). Несмотря на то, что сообщалось об инфицировании ИHNHV культивируемых *P. vannamei* и *P. stylirostris* в большинстве районов выращивания креветок в Западном полушарии и у диких пенеид по всему их ареалу вдоль тихоокеанского побережья Северной и Южной Америки (от Перу до северной Мексики), вирус не был зарегистрирован у диких креветок-пенеид на атлантическом побережье Северной и Южной Америки (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Brock & Main, 1994; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Lightner с соавт., 1992a; Lightner & Redman 1998a; Lightner & Redman, 1998b). Также сообщалось об инфицировании ИHNHV у культивируемых креветок-пенеид с островов Тихого океана, включая Гавайские острова, Французскую Полинезию, Гуам и Новую Каледонию. В Индо-Тихоокеанском регионе вирус был зарегистрирован среди культивируемых и диких креветок-пенеид в Восточной Азии, Юго-Восточной Азии и на Ближнем Востоке (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner, 1996a).

В Австралии была зарегистрирована последовательность вируса, подобного ИHN, (Krabsetsve с соавт., 2004; Owens с соавт., 1992), а о наличии инфекции ИHNHV у креветок, выращиваемых на ферме в Австралии, было сообщено в МЭБ в 2008 году. Как обсуждалось в разделе 2.1.1 были обнаружены ИHNHV-ассоциированные последовательности, встраиваемые в геном *P. monodon* из Восточной Африки, Австралии и западного Индо-Тихоокеанского региона (Tang & Lightner, 2006; Tang с соавт., 2007).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Последствия инфицирования вирусом ИHNHV варьируются среди видов и популяций креветок, где инфекции могут быть острыми или хроническими. Например, в не отобранных популяциях *P. stylirostris* инфицирование вирусом ИHNHV приводит к острому, обычно катастрофическому заболеванию со смертностью, приближающейся к 100%. Напротив, в популяциях *P. vannamei*, некоторых отобранных линиях *P. stylirostris* и некоторых популяциях *P. monodon*, инфицирование вирусом ИHNHV приводит к болезни со стертым, хроническим течением, RDS, при которой высокая смертность не характерна, но распространены подавление роста и деформация кутикулы (Kalagayan с соавт., 1991).

Инфицирование вирусом ИHNHV препятствует нормальному развитию икры, личинок и пост-личинок. При использовании маточного поголовья из диких или выращиваемых на фермах популяций, у которых болезнь является энзоотической, успешность вылупления личинок из икры снижается, так же, как и показатели выживаемости и культивирования личиночной и пост-личиночной стадий (Motte с соавт., 2003).

Популяции *P. stylirostris*, молодые, половозрелые и взрослые особи, демонстрируют устойчиво высокие показатели смертности. Популяции *P. vannamei* и, возможно, *P. monodon*, инфицированные ИHNHV, демонстрируют слабый и несоизмеримо сильный рост и деформации кутикулы, в особенности, искривленные рострумы и деформированные шестые брюшные сегменты.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Скорость репликации вируса IHNV при высоких температурах воды была значительно снижена в исследовании, в котором вирусная репликация сравнивалась у экспериментально инфицированной креветки *P. vannamei*, которую содержали при температуре 24 и 32°C. После подходящего периода инкубации креветки, выдерживаемые при 32 °C, имели вирусную нагрузку примерно на 102 ниже, чем креветки, выдерживаемые при 24°C (Montgomery-Brock с соавт., 2007).

2.4. Контроль и меры профилактики

2.4.1. Вакцинация

Пока не разработаны эффективные методы вакцинации против IHNV.

2.4.2. Химиотерапия

Не существует научно доказанных сведений относительно эффективного лечения с применением химиотерапии.

2.4.3. Иммуностимуляция

Не существует научно доказанных сведений относительно эффективного лечения с применением иммуностимуляции.

2.4.4. Племенное разведение для повышения резистентности

Были выведены популяции *P. stylirostris*, устойчивые к инфекции IHNV, и они успешно применялись на креветочных фермах (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Weppe, 1992; Zarain-Herzberg & Ascensio-Valle), 2001). Однако линии *P. stylirostris*, которые были выведены для устойчивости к инфекции IHNV (Tang с соавт., 2000), не обладают повышенной устойчивостью к другим заболеваниям, таким как вирус синдрома белого пятна (WSSV), поэтому их использование было ограничено. В некоторых случаях сообщалось о генетической основе восприимчивости к IHNV у *P. vannamei* (Alcivar-Warren с соавт., 1997).

2.4.5. Восполнение популяции резистентными видами

Использование устойчивого к болезням вида *P. stylirostris* было ограничено и недостаточно успешным (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; Weppe, 1992; Zarain-Herzberg & Ascensio-Valle, 2001). Относительная резистентность *P. vannamei* к заражению IHNV считается одним из основных факторов, которые привели к тому, что *P. vannamei* является основным видом креветок, выращиваемым в Западной полушарии и, начиная с 2004 года, во всем мире (Lightner, 2005; Lightner с соавт., 2009).

2.4.6. Блокирующие агенты

Нет данных относительно блокирующих агентов IHNV.

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Было продемонстрировано, что IHNV передается вертикально посредством трансовариальной передачи (Motte с соавт., 2003). Следовательно, в то время как дезинфекция икры и личинок является хорошей практикой содержания (Chen с

соавт., 1992) и рекомендуется благодаря ее потенциалу к снижению контаминации икры и личинок, полученных из них (и контаминации другими возбудителями болезней), метод является неэффективным для предотвращения трансвариальной передачи IHNV (Motte с соавт., 2003).

2.4.8. Общие практики содержания

Некоторые методы содержания креветок были успешными в предотвращении распространения IHNV. Среди них применение предварительного скрининга посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) в отношении дикой и выращенной в пруду популяции или вымеченной ею икры / науплий, а также выбраковка при наличии положительного результата на вирус (Fegan & Clifford, 2001; Motte с соавт., 2003), а также выведение популяций креветок *P. vannamei* и *P. stylirostris*, свободных от специфических патогенных организмов (SPF) (Lightner, 1996b; Lightner, 2005; Lotz и др., 1995; Pruder и др., 1995; Wyban, 1992). Последняя практика оказалась наиболее успешной практикой ведения хозяйства для профилактики и контроля IHNV (Jaenike с соавт., 1992; Lightner, 2005; Pruder с соавт., 1995).

3. Пробоотбор

3.1. Отбор отдельных образцов

В то время как инфекция вирусом IHNV может влиять на все стадии жизни, тяжесть заражения и, следовательно, вирусная нагрузка могут быть ниже пределов обнаружения в вымеченной икре и на личиночных стадиях, поэтому эти стадии жизни не подходят для выявления или подтверждения свободы от инфекции IHNV.

3.2. Консервирование образцов для представления

Обычные гистологические или молекулярные исследования и руководство по консервации образцов для предполагаемого метода исследования описаны в Главе 2.2.0.

3.3. Объединение образцов в пул

Влияние объединения в пул на диагностическую чувствительность не оценивалось, поэтому креветки большего размера должны обрабатываться и тестироваться индивидуально. Тем не менее, креветка на ранних жизненных этапах, особенно PL или образцы до 0,5 г, могут быть объединены в пул, чтобы получить достаточно материала для молекулярных исследований.

3.4. Наиболее подходящие органы и ткани

IHNV поражает ткани эктодермального и мезодермального происхождения. Основными тканями-мишенями для IHNV являются клетки соединительной ткани, жабры, гемопоэтические узелки и гемоциты, вентральный нервный тяж и ганглии, эпителиальные клетки канальцев антенны и паренхимные клетки лимфоидных органов (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a). Следовательно, цельные креветки (например, личинки или PL) или образцы тканей, содержащие вышеупомянутые ткани-мишени, подходят для большинства испытаний с использованием молекулярных методов.

Гемолимфа или удаленные плеоподы могут быть собраны и использованы для тестирования (обычно для ПЦР или дот-блот-гибридизации со специфическими

зондами), когда необходимо тестирование с сохранением жизнеспособности ценного маточного поголовья (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a).

3.5. Неподходящие образцы/ткани

ИHNHV является системным вирусом, и он не размножается в кишечных тканях (например, гепатопанкреас, средняя кишка или ее слепая кишка). Следовательно, кишечные ткани являются неподходящими образцами для выявления ИHNHV (Lightner, 1996a; Lightner, 2011; Lightner & Redman, 1998a).

4. Диагностические методы

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Некоторые деформации кутикулы, в частности деформированный рострум, согнутый влево или вправо, который может наблюдаться у *P. vannamei* и *P. stylirostris* с RDS, являются патогномоничными для инфекции ИHNHV (см. Раздел 4.2.1.2). Однако этот клинический признак не всегда очевиден в популяциях креветок, хронически инфицированных ИHNHV. Так как *P. vannamei*, *P. stylirostris* и *P. monodon* могут быть инфицированы ИHNHV и не демонстрировать явных признаков инфекции (например, они могут демонстрировать заметно сниженные темпы роста или "рант" синдром), рекомендуется проведение молекулярных исследований, когда требуются доказательства свободы от инфекции ИHNHV.

4.1.2. Изменения в поведении

При острой форме болезни у *P. stylirostris* могут наблюдаться поведенческие изменения (см. Раздел 4.2.1.1), но при наличии RDS у пораженных креветок не регистрировались стабильные изменения поведения.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

4.2.1.1. Инфекция *Penaeus stylirostris* вирусом ИHNHV

Инфекция вирусом ИHNHV часто является острой и сопровождается очень высокой смертностью, встречающейся на ювенальной стадии жизни этого вида. Вертикально инфицированные личинки и ранние пост-личинки не заболевают, но у особей приблизительно 35-дневного или более старшего возраста могут наблюдаться макроскопические признаки заболевания, сопровождаемые массовой гибелью. У горизонтально инфицированной молодежи инкубационный период и тяжесть заболевания в некоторой степени зависят от размера и / или возраста, при этом молодежь всегда страдает в большей степени. Инфицированные взрослые особи редко проявляют признаки заболевания или смертности (Bell & Lightner, 1984; Bell & Lightner, 1987; Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Brock с соавт., 1983; Brock & Main, 1994; Lightner, 1988; Lightner, 1993; Lightner, 1996a; Lightner, 2011; Lightner с соавт., 1983a; Lightner с соавт., 1983b). Макроскопические признаки не являются специфическими, но у молодежи *P. stylirostris*, инфицированной ИHNHV в острой форме, наблюдается заметное

снижение потребления пищи, сопровождаемое изменениями поведения и внешнего вида. Наблюдалось, что креветки этого вида с острой инфекцией IHNV медленно поднимаются в резервуарах для разведения на поверхность воды, где они становятся неподвижными, а затем переворачиваются и медленно опускаются (брюхом вверх) на дно резервуара. Креветки, демонстрирующие такое поведение, могут повторять этот процесс в течение нескольких часов, пока они не станут слишком слабыми, чтобы продолжать, или пока они не будут атакованы и съедены своими более здоровыми собратьями. Представители *Penaeus stylirostris* на этой стадии инфекции часто имеют белые или ярко-красные пятна (которые отличаются по внешнему виду и расположению от белых пятен, которые иногда встречаются у креветок, инфицированных вирусом WSSV) в кутикулярном эпидермисе, особенно в месте соединения тыльных пластин брюшка, придавая такой креветке пестрый вид. Эта пятнистость позднее исчезает у умирающих особей *P. stylirostris*, поскольку такие особи становятся более голубоватыми. У *P. stylirostris* и *P. monodon* на конечной стадии инфекции вирусом IHNV умирающие особи креветок часто имеют отчетливо голубоватый цвет с нечеткой мускулатурой брюшной полости (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner с соавт., 1983a; Lightner с соавт., 1983b).

4.2.1.2. Инфицирование *Penaeus vannamei* вирусом IHNV

RDS, хроническая форма инфекции IHNV, встречается у *P. vannamei*. Тяжесть и распространенность RDS в инфицированных популяциях молодых или более взрослых особей *P. vannamei* может быть связана с инфекцией, которая возникла на личиночной или ранней пост-личиночной стадиях. RDS также был обнаружен в выращиваемых популяциях *P. stylirostris* и *P. monodon*. У молоди креветок с RDS могут наблюдаться изогнутый (изгиб на 45–90 ° влево или вправо) или иным образом деформированный рострум, деформированный шестой сегмент брюшной полости, морщинистые жгутики антенн, неровность кутикулы, пузырчатая болезнь ('bubble-heads') и другие деформации кутикулы. В популяции молоди креветок, инфицированных RDS, наблюдается неравномерный рост с широким распределением по размерам и большим количеством, вопреки ожиданиям, маленьких (с задержкой роста) креветок. Коэффициент вариаций (CV = стандартное отклонение, деленное на среднее значение для групп с разными размерами в популяции) для популяций с RDS обычно превышает 30% и может приближаться к 90%, тогда как популяции молодых *P. vannamei* и *P. Stylirostris*, свободные от инфекции IHNV (и, следовательно, свободные от RDS), обычно показывают CV 10-30% (Bray с соавт., 1994; Brock & Lightner, 1990; Brock с соавт., 1983; Brock & Main, 1994; Browdy с соавт., 1993; Carr с соавт., 1996; Lightner, 1996a; Primavera & Quinitio, 2000; Pruder с соавт., 1995).

4.2.2. Клиническая химия

Не применимо

4.2.3. Микроскопия патологических изменений

Острые инфекции у *P. stylirostris* могут быть легко диагностированы с использованием рутинного метода окрашивания срезов гематоксилином и эозином (H & E) (см. Раздел 4.2.6). Хроническую инфекцию IHNV и RDS диагностировать гораздо сложнее с помощью рутинных гистологических методов H & E. Для диагностики хронических инфекций рекомендуется использовать молекулярные

методы для выявления ИHNV (например, с помощью ПЦР или применения ДНК-зондов, специфичных для ИHNV, для дот-блот-гибридизации или in-situ гибридизации (ISH) гистологических срезов).

Гистологическая демонстрация явных внутриядерных телец включения Каудри, тип А, позволяет сделать предварительный диагноз инфекции ИHNV. Эти характерные для ИHNV тельца включения являются эозинофильными и часто окружены ореолами (с Н & Е-пятнами тканей, сохраненными с помощью фиксаторов, которые содержат уксусную кислоту, таких как АФА Дэвидсона и раствор Буина) (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996a), внутриядерные тельца включения в хроматин - окаймленные, гипертрофированные ядра клеток в тканях эктодермального (эпидермис, подкожный эпителий переднего и заднего кишечника, нервного тяжа и нервных ганглиев) и мезодермального происхождения (органы кроветворения, железа антенны, гонады, лимфоидный орган и соединительная ткань). Внутриядерные тельца включения, вызванные инфекцией ИHNV, можно легко спутать с развитием внутриядерных телец включения, вызванных инфекцией WSSV. Анализ ISH (см. Раздел 4.3.1.2.3 этой главы) таких разрезов с использованием специального ДНК-зонда для ИHNV обеспечивает точный диагноз инфекции ИHNV (Lightner, 1996a; Lightner, 2011; Lightner & Redman, 1998a).

4.2.4. Влажные препараты

Надежные методы микроскопических исследований патологических изменений не разработаны.

4.2.5. Смывы

Не применимо.

4.2.6. Зафиксированные срезы

4.2.6.1. Гистопатология

Для всех рутинных гистологических исследований креветок настоятельно рекомендуется использовать фиксатор Дэвидсона (содержащий 33% этилового спирта [95%], 22% формалина [приблизительно 37% формальдегида], 11,5% ледяной уксусной кислоты и 33,5% дистиллированной или водопроводной воды) (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996a). Для достижения наилучших результатов не следует использовать павшие креветки. Для фиксации и гистологического исследования нужно отбирать только живую, умирающую или поврежденную креветку. Отобранных креветок умерщвляют инъекцией фиксатора непосредственно в гепатопанкреас; кутикулу над цефалотораксом и брюшной полостью, расположенная сбоку от дорсальной срединной линии, вскрывают хирургическими ножницами с острыми концами для усиления проникновения в фиксатор (брюшную полость можно удалить и выбросить), целую креветку (или цефалоторакс без брюшной полости) погружают в фиксатор на 24 - 48 часов, а затем переносят в 70% этиловый спирт для хранения. После переноса в 70% этиловый спирт зафиксированные образцы можно транспортировать (по почте или курьером в диагностическую лабораторию), завернув в ткань или бумажное полотенце, пропитанное 70% этиловым спиртом и упаковав в герметичные пластиковые пакеты (см. Раздел 4.2.3).

4.2.6.2. Гибридизация *in-situ*

Смотри Раздел 4.3.1.2.3 ниже.

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Для рутинной диагностики ИHNV проведение электронной микроскопии не рекомендуется.

4.3. Методы обнаружения и идентификации агента

4.3.1. Прямые методы обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Смотри Раздел 4.2.4

4.3.1.1.2. Смывы

Смотри Раздел 4.2.5

4.3.1.1.3. Зафиксированные срезы

Смотри Раздел 4.2.6

4.3.1.2. Выделение и идентификация агента

4.3.1.2.1. Клеточная культура/искусственная среда

ИHNV не выращивали *in vitro*. Не существует линий клеток ракообразных (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a; Lightner & Redman, 1998b).

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигенов, основанные на антителах

Успешных методов разработано не было.

4.3.1.2.3. Методы молекулярных исследований

Прямые методы обнаружения с использованием ДНК-зондов, специфичных для ИHNV, доступны в формате дот-блоттинга и ISH. Были разработаны ПЦР-тесты для обнаружения ИHNV и ряд методов и коммерческих наборов для обнаружения ПЦР являются доступными.

4.3.1.2.3.1. ДНК-зонды для дот-блоттинга и ISH

Методы генного зондирования и ПЦР обеспечивают большую диагностическую специфичность и чувствительность, чем традиционные методы, которые используют классические гистологические подходы. Кроме того, эти методы имеют дополнительное преимущество в том, что они применимы к тестированию живого маточного поголовья креветки. Образец гемолимфы может быть отобран с использованием туберкулинового шприца, или придаток (например, плеопод), может быть подвергнут биопсии (Bell с

соавт., 1990) и использован в качестве образца для дот-блот-гибридизации.

4.3.1.2.3.2. Дот-блот-гибридизация для обнаружения IHHNV

Метод дот-блот гибридизации, описанный ниже, использует ДНК-зонд, меченный дигоксигендином-11-dUTP (DIG), для IHHNV и в целом следует методам, изложенным в Magi с соавт., 1993 и Lightner, 1996a. Формулы для необходимых реагентов приведены после протоколов.

- i) Готовят положительно заряженную нейлоновую мембрану: отрезают до размера, подходящего для образцов и контролей, и с использованием мягкого графитового карандаша, делают квадраты по 1 см для каждого образца. Включают положительный и отрицательный контроль на каждый фильтр. Выкладывают на лист фильтровальной бумаги (Whatman 3MM).
- ii) При необходимости образцы могут быть разведены в ТЕ-буфере (10 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА) плюс 50 мкг мл⁻¹ ДНК спермы лосося. Образцами для дот-блот гибридизации могут быть гемолимфа, ткани, гомогенизированные в буфере TN (20 мМ Трис-НСl, рН 7,4, 0,4 М NaCl), или экстрагированная ДНК в 10 мМ Трис / НСl.
- iii) Образцы варят в течение 5 минут и охлаждают на льду в течение 1-2 минут. Держат на льду, пока образцы не будут нанесены на мембрану.
- iv) Наносят 1–3 мкл каждого образца в соответствующее место на фильтрах. Дают высохнуть на воздухе, а затем закрепляют образцы на мембране, подвергнув термической обработке при 80 °С в течение 30 минут или с помощью УФ-сшивания с использованием трансиллюминатора ДНК в течение 3 минут.
- v) Мембраны извлекают из печи или трансиллюминатора и помещают в термосвариваемый пакет с 4 мл. раствора для предварительной гибридизации. на мембрану. Пакеты герметично закрывают и помещают в водяную баню (68 °С) на 0,5 –1 час.
- vi) DIG-меченный зонд кипятят в течение 3–5 минут, а затем держат на льду. Из пакетов удаляют раствор для предварительной гибридизации. Добавляют 2 мл свежего раствора для предварительной гибридизации в каждый пакет, а затем добавляют заранее определенное количество DIG-меченного зонда к каждому, хорошо перемешивая по мере его добавления. Пакеты герметично закрывают, помещают обратно в водяную баню с температурой 68 °С и инкубируют в течение 8–12 часов.
- vii) Мембраны тщательно промывают:

2 × SSC/0.1% SDS	2 ×	5 минут при комнатной температуре
0.1 × SSC/0.1% SDS	3 ×	15 минут при 68°C
Буфер I	1 ×	5 минут при комнатной температуре

- viii) Мембрану в пакетах с анти-DIG конъюгатом щелочной фосфатазы (Roche Diagnostics¹), разведенным 1/5000 в буфере I, инкубируют в течение 30–45 минут при комнатной температуре на платформе шейкера. Промыть мембрану с использованием:

Буфер I	2 ×	15 мин при комнатной температуре
Буфер III	1 ×	5 минут при комнатной температуре

- ix) Мембраны проявляют в пакетах, используя проявляющий раствор (нитросиний тетразолий хлорид [NBT] / X-фосфат в буфере III), приготовленный непосредственно перед использованием. Оставляют для вступления в реакцию в темноте при комнатной температуре на 1-2 часа. Реакцию останавливают с использованием буфера IV и мембрану высушивают на 3 мм фильтровальной бумаге.
- x) Результаты фотографируют (со временем цвет блекнет).
- xi) Сухие мембраны хранят в термосвариваемых пакетах.

4.3.1.2.3.3. Процедура гибридизации in-situ (ISH)

В приведенном ниже методе ISH использует DIG-меченный ДНК-зонд для ИHNV и в целом он следует методам, описанным в Magi с соавт., 1993 и Lightner, 1996a.

Ткань помещают в парафин и нарезают срезы толщиной 4–6 мкм. Срезы помещают на положительно заряженные предметные стекла микроскопа (не кладите желатин в воду, чтобы срезы плавали; просто используйте воду).

Предметные стекла помещают на подставку для предметных стекол, например, Tissue-Тек. Предметные стекла нагревают в духовке в течение 45 минут при 60°C. В центре окрашивания ткань регидратируют следующим образом:

Ксилол (или подходящий заменитель)	3 ×	5 минут каждый
Абсолютный спирт	2 ×	1 мин. кадлый
95% спирт	2 ×	10 погружений каждый
80% спирт	2 ×	10 погружений каждый
50% спирт	1 ×	10 погружений
Дистиллированная вода	6 промываний (стекла не должны высыхать)	

- i) Предметные стекла промывают в течение 5 минут в ФБР (или трис / NaCl / ЭДТА [TNE] буфере). Подготавливают свежую протеиназу К, 100 мкг мл⁻¹ в ФБР (или TNE). Стекла помещают во влажную камеру, пипеткой наносят 500 мкл раствора протеиназы К и инкубируют в течение 10–15 минут при 37 °C. Жидкость сливают на бумагу для блоттинга.

¹ Ссылка на конкретные коммерческие продукты в качестве примеров не означает то, что они одобрены МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, указанным в данном руководстве по водным животным.

- ii) Предметные стекла возвращают на поставку для предметных стекол. Срезы фиксируют в 0,4% холодном формальдегиде в течение 5 минут при комнатной температуре.
- iii) Предметные стекла инкубируют в $2 \times \text{SSC}$ в течение 5 минут при комнатной температуре.
- iv) При горизонтальном положении предметных стекол добавляют 0,5–1 мл буфера для предварительной гибридизации и инкубируют во влажной камере в течение 15–30 минут при 37°C .
- v) DIG-меченный зонд кипятят в течение 3–5 минут и охлаждают на льду; в течение непродолжительного времени вращают в холоде и держат на льду. Зонд разводят до 25 нг мл^{-1} в растворе для предварительной гибридизации и покрывают ткань 250 мкл раствора. Предметные стекла инкубируют в течение 2–4 часов при 42°C или в течение ночи при 37°C во влажной камере.
- vi) Предметные стекла помещают на подставку. Предметные стекла промывают следующим образом:

$2 \times \text{SSC}$	$2 \times$	5–30 минут при 37°C
$1 \times \text{SSC}$	$2 \times$	5 минут при 37°C
$0.5 \times \text{SSC}$	$2 \times$	5 минут при 37°C

- vii) Предметные стекла промывают в течение 1–3 минут в буфере I при комнатной температуре. Предметные стекла помещают во влажную камеру и блокируют Буфером II 0,5 мл на стекло. Инкубируют в течение 15 минут при 37°C .
- viii) Разводят анти-DIG AP конъюгатом в соотношении 1/1000 в буфере II. Ткань покрывают 500 мкл разведенного конъюгата и инкубируют во влажной камере в течение 30 минут при 37°C .
- ix) Предметные стекла помещают на подставку для предметных стекол. Промывают в буфере I дважды в течение 5–10 минут, каждый раз при комнатной температуре. Промывают один раз с использованием буфера III в течение 1–2 минут.
- x) Готовят проявляющий раствор, сначала добавив 4.5 мкл NBT на 1 мл буфера III. Хорошо перемешивают. Затем добавляют 3,5 мкл X-фосфата на мл раствора и хорошо перемешивают. Наносят пипеткой по 500 мкл на предметное стекло и инкубируют во влажной камере в темноте в течение 2–3 часов при комнатной температуре.
- xi) Реакцию останавливают, вернув предметные стекла в подставку для предметных стекол и промыв их в буфере IV в течение 15 минут при комнатной температуре.
- xii) Производят контрастное окрашивание предметных стекол погружением на 5 минут в 0,5% водный раствор Бисмарк коричневого Y.
- xiii) Предметные стекла дегидратрируют в центре окрашивания следующим образом:

95% спирт	$3 \times$	10 погружений
-----------	------------	---------------

Абсолютный спирт	3 ×	каждый 10 погружений
Ксилол (или подходящий заменитель)	4 ×	каждый 10 погружений

Предметные стекла не должны высыхать – оставить их в последнем контейнере для Ксилола (или подходящего заменителя) пока они не будут готовы для использования покрывных стекол.

- xiv) Накрывают покрывными стеклами и гистологической средой (Permount).
- xv) Предметные стекла изучают под светлым полем на предмет темно-синего или черного осадка, который отмечает участки, где присутствует ДНК IHHNV. Патодиагностические внутриядерные включения Каудри типа А хорошо отмечены зондом. Также часто мечение наблюдается на ядрах клеток-хозяев без явных включений, цитоплазматических включений и накопления свободного вируса в тканевых пространствах и гемолимфе.

4.3.1.2.3.3.1. Формулы реактивов для метода ISH

- i) 10 × Трис/NaCl/ЭДТА (TNE) буфер

Трис база 60.57 г.

NaCl 5.84 г.

ЭДТА 3.72 г.

H₂O 900 мл (qs до 1 литра)

pH до 7,4 с помощью концентрированной HCl или HCl (5 M). Чтобы приготовить 1 × TNE, разводят 100 мл 10 × TNE в 900 мл H₂O.

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

ФБР 10 мл 1 × ФБР

Протеиназа К 1 мг

- ii) Буфер для предварительной гибридизации (50 мл конечного объема)

4 × SSC 10 мл 20 × SSC

50% формамид 25 мл 100% формамида

1 × Раствор Денхардта 2.5 мл 20 × Раствор Денхардта

5% сульфат декстрана 10 мл 25% сульфат декстрана

Нагревают до 60°C.

Кипятят 2,5 мл 10 мг / мл⁻¹ ДНК спермы лосося и добавляют в буфер до конечной концентрации 0,5 мг / мл ДНК спермы лосося.

iii) 10 × буфер I

1 М Трис/НСl	121.1 г Трис база
1.5 М NaCl	87.7 г NaCl
H ₂ O	1000 мл (qs)

pH до 7,5 с помощью HCl. Автоклавируют. Чтобы приготовить 1 × буфер I, разводят 100 мл × 10 исходного материала в 900 мл H₂O.

iv) Буфер II (блокирующий буфер)

Блокирующий реактив 0.25 г. Блокирующий реактив (Roche Diagnostics)

Буфер I 50 мл 1 × Буфер I

v) Буфер III

100 ммоль/л Трис/НСl	1.21 г. Трис база
100 ммоль/л NaCl	0.58 г. NaCl
DD H ₂ O (дистиллят двойной перегонки)	100 мл (qs)

pH до 9.5 с использованием HCl. Затем добавляют:

50 ммоль/л MgCl₂ 1.02 г. MgCl₂.6H₂O

vi) Проявляющий раствор

Смешивают 90 мл буфера III с 10 мл 10% PVA. Хранят при температуре 4 °C. Непосредственно перед использованием на каждый 1 мл буфера III с PVA добавляют:

4.5 мкл NBT	75 мг NBT мл ⁻¹ в 70% диметилформамиде
3.5 мкл X-фосфата толуидиновая соль,	5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат,

vii) Буфер IV

10 ммоль/л /Трис/НСl	1.21 г Трис база
1 ммоль/л ЭДТА	0.37 г ЭДТА.2H ₂ O (динатриевая соль)

H₂O 1000 мл

pH до 8.0 с использованием HCl.

viii) 0.5% Бисмарк коричневый Y

Бисмарк коричневый Y 2.5 г

H₂O 500 мл

Краситель растворяют в воде. Фильтруют через фильтр Whatman № 1; хранят при комнатной температуре.

4.3.1.2.3.4. Полимеразная цепная реакция для обнаружения IHNV

Несколько одноступенчатых методов ПЦР (Krabsetsve с соавт., 2004; Nunan с соавт., 2000; Shike с соавт., 2000; Tang с соавт., 2000; Tang с соавт., 2003) и ряд коммерческих ПЦР наборов доступны для обнаружения IHNV. Вложенные методы также доступны из коммерческих источников.

Существует несколько географических вариантов вируса IHNV, некоторые из которых можно обнаружить не всеми доступными методами. Два набора праймеров, 392F/R и 389F/R, являются наиболее подходящими для обнаружения всех известных генетических вариантов вируса IHNV (Tang с соавт., 2000; Tang с соавт., 2007). Тем не менее, эти тесты также выявляют связанные с вирусом IHNV последовательности, называемые типами 3А и 3В, которые вставляются в геном некоторых популяций *P. monodon* из западной части Индийского Тихого океана, Восточной Африки, Австралии и Индии (Tang & Lightner, 2006; Tang и др., 2007; Saksmerpromе и др., 2011). Были разработаны ПЦР-праймеры, которые могут обнаруживать последовательность вируса IHNV, но не вступают в реакцию с последовательностями, ассоциированными с вирусом IHNV, присутствующими в популяциях *P. monodon* из Африки, Австралии (Tang с соавт., 2007) или Таиланда (Saksmerpromе с соавт., 2011). Набор праймеров 309F/R амплифицирует только сегмент из вируса IHNV типов 1 и 2 (инфекционные формы вируса IHNV), но не типов 3А и 3В, которые не являются инфекционными и входят в геном *P. monodon* (Tang & Lightner, 2006; Tang с соавт., 2007). Набор праймеров MG831F/R вступает в реакцию только с типами 3А и 3В, которые не являются инфекционными и входят в геном *P. monodon* (Tang с соавт., 2007). Следовательно, настоятельно рекомендуется подтверждение неожиданных положительных или отрицательных результатов ПЦР на вирус IHNV с использованием второго набора праймеров или использование другого диагностического метода (то есть гистологии, биопробы, ISH).

Таблица 4.1. Наборы праймеров, рекомендованные для одноэтапной ПЦР для обнаружения вируса IHNV

Праймер	Продукт	Последовательность	G+C% / темп.	ГенБанк & ссылки
389F	389 п.н.	5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'	50%/72°C	AF218266
389R		5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'	45%/71°C	(Tang с соавт., 2007)

				2000)
77012F	356 п.н.	5'-ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA-3'	50%/68°C	AF218266
77353R		5'-TCG-TAC-TGG-CTG-TTC-ATC-3'	55%/63°C	(Nunan с соавт., 2000)
392F	392 п.н.	5'-GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA-3'	50%/68°C	AF218266
392R		5'-ATC-CGG-AGG- ₃ AAT-CTG-ATG-TG-	50%/71°C	(Tang с соавт., 2000); (Tang с соавт., 2007)
309F	309 п.н.	5'-TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A-3'	36%/68°C	AF218266
309R		5'-TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A-3'	40%/69°C	(Tang с соавт., 2007)
MG831F	831 п.н.	5'-TTG-GGG-ATG-CAG-CAA-TAT-CT-3'	45%/58°C	DQ228358
MG831R		5'-GTC-CAT-CCA-CTG-ATC-GGA-CT-3'	55%/62°C	(Tang с соавт., 2007)

ПРИМЕЧАНИЕ: описанные выше праймеры 389F/R и 392F/R относятся к области генома вируса ИHNНV, кодирующей неструктурной белок. Праймеры 77012F/ 77353R получены из области между областями генома, кодирующими неструктурные и капсидные белки. В случае неоднозначности результатов при использовании набора универсальных праймеров 389F/R рекомендуется использовать праймеры из другой области генома для подтверждающего тестирования. В этом случае это будет означать использование праймеров 77012F/77353R или наборов праймеров 392F/R и последующее определение последовательности ПЦР-ампликонов для подтверждения.

4.3.1.2.3.5. *Общепринятый метод ПЦР для обнаружения ИHNНV*

Метод ПЦР для обнаружения вируса ИHNНV, описанный ниже, в целом соответствует методам, описанным Tang с соавт., 2007 и Nunan с соавт., 2000. Однако недавние незначительные модификации, включая источники реактивов и использование автоматического инструмента для экстракции ДНК, являются приемлемыми. Модификации включают метод экстракции ДНК, выбор праймеров (Таблица 4.1) и объем реакции. Эти несколько измененные методы были валидированы в соответствии с главой 1.1.2 Принципы и методы валидации диагностических тестов на инфекционные болезни и не влияют на диагностические характеристики анализа.

- i) В качестве матрицы используют ДНК, экстрагированную из тканей или гемолимфы, которая была консервирована в 95% этаноле и затем высушена. Контроль, состоящий из тканей или гемолимфы от известных отрицательных животных, должен быть включен во время стадии экстрагирования ДНК. ДНК может быть извлечена различными способами. Другие наборы для экстракции ДНК включают мини-набор QIAamp DNA (Qiagen), наборы нуклеиновых кислот MagMax™ (Life Technologies), набор для очистки ДНК LEV Maxwell® 16 Cell (Promega) или DNazol (Life Technologies). Спектрофотометрические способы определения конечной ДНК будут указывать на чистоту ДНК и

количество всей ДНК, выделенной из образца. Используют 1–5 мкл экстрагированной ДНК в качестве матрицы для 25 мкл объема реакционной смеси.

- ii) Следующие контроли должны быть включены в каждый ПЦР-анализ на ИHNV: а) ДНК из известного отрицательного образца ткани; б) ДНК из известного положительного образца (из ткани или гемолимфы или из плазмидного клона, который содержит фрагмент, который амплифицируется конкретным набором праймеров); и с) контроль «без матрицы».
- iii) В качестве праймеров используют праймеры 389F и 389R, которые извлекают полосу размером 389 п.н. из материала, инфицированного ИHNV, или праймеры 77012F и 77353R, которые извлекают полосу размером 356 п.н. из материала, инфицированного ИHNV. Праймеры готовят при 10 мкМ в дистиллированной воде.
- iv) Если используются PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare), профиль ПЦР включает 3–5-минутный этап при 95°C для денатурации ДНК с последующим 35 циклами при 95°C в течение 30 секунд, 60°C в течение 30 секунд и 72°C в течение 30 секунд, и окончательное удлинение при 72 °C в течение 5 минут.
- v) Готовят «мастер-микс», состоящий из воды и праймеров.
- vi) Для реакционной смеси объемом 25 мкл добавляют 24 мкл "мастер-микса" в каждую пробирку и затем добавляют 1 мкл матрицы ДНК для тестирования.
- vii) Быстро вращают на центрифуге / вортексе каждую пробирку, чтобы осадить всю жидкость. Пробирки помещают в термоциклер и запускают программу ПЦР
- viii) После проведения ПЦР 6–10 мкл образца помещают в 1,5% агарозный гель (содержащий 0,5 мкг/мл⁻¹ бромистого этидия для окрашивания ДНК). Ищут полосу 389 п.н. (при использовании праймеров 389F и 389R) или полосу 356 п.н. (при использовании праймеров 77012F и 77353R). Полосы не всегда видны, так как для того, чтобы увидеть ДНК в геле, необходимо чтобы ДНК составляла, по крайней мере, 10 нг/мкл⁻¹. Прямое секвенирование амплифицированных продуктов может быть выполнено посредством гель-экстракции полосы ПЦР с правильным размером и праймера (ов) для секвенирования, используемого (ых) для амплификации, чтобы подтвердить присутствие ИHNV.

4.3.1.2.3.6. Метод ПЦР в реальном времени (кПЦР) для обнаружения ИHNV

Для обнаружения ИHNV были разработаны методы кПЦР. Эти методы обеспечивают необычайную чувствительность, которая позволяет обнаружить единственную копию целевой последовательности из генома ИHNV (Dhar с соавт., 2001; Tang & Lightner, 2001). Метод кПЦР с использованием набора TaqMan, описанный ниже, для обнаружения ИHNV, в общем вытекает из метода, используемого Tang & Lightner, 2001.

- i) ПЦР праймеры и зонд TaqMan выбирают из области геномной

последовательности IHNV (GenBank AF218266), которая кодирует неструктурный белок. Праймеры и зонд TaqMan разработаны с помощью программного обеспечения Primer Express (Life Technologies). Последовательности прямых (IHNV1608F) и обратных (IHNV1688R) праймеров: 5'-TAC-TCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A-3' и 5'-GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA -3' соответственно. Зонд TaqMan (5'-ACC-AGA-CAT-AGA-GCT-ACA-ATC-CTC-GCC-TAT-TTG-3') синтезирован и помечен флуоресцентными красителями 5-Карбокси-флуоресцеин (FAM) на 5' конце и N, N, N', N'-тетраметил-6-карбокситетраметил-амино (TAMRA) на 3' конце.

- ii) Подготовка матрицы ДНК: экстракция матрицы ДНК такая же, как описано выше.
- iii) Реакционная смесь кПЦР содержит: TaqMan Fast virus 1-step Master Mix (Life Technologies или коммерчески доступные эквивалентные реагенты), 0,3 мкМ каждого праймера, 0,15 мкМ зонда TaqMan, 5–50 нг ДНК и воду в объеме реакции 20 мкл. Для достижения оптимальных результатов реакцию смесь следует встряхивать и хорошо перемешивать.
- iv) Амплификацию проводят с использованием системы StepOnePlus PCR System (Life Technologies или эквивалентных систем ПЦР). Профиль цикла: начальная денатурация 20 секунд при 95°C, затем 40 циклов денатурации при 95°C в течение 1 секунды и отжиг/удлинение при 60°C в течение 20 секунд.
- v) В конце реакции измеряют интенсивность флуоресценции. Будет установлен порог выше базовой линии, при котором прибор начинает обнаруживать увеличение сигнала, ассоциированное с экспоненциальным накоплением продукта ПЦР. Значение точки разделения C_t устанавливается путем анализа нескольких независимых исследований отрицательного и положительного контролей. Образцы со значением C_t ниже 40 пороговых циклов считаются положительными.
- vi) Необходимо включить контроль «без матрицы» в каждую реакцию. Это исключает присутствие флуоресцирующих контаминантов в реакционной смеси. Положительный контроль также должен быть включен, и он может представлять собой плазмиду, содержащую целевую последовательность, или очищенные вирионы, или ДНК, экстрагированную из ткани, инфицированной IHNV.

4.3.1.2.3.6.1. Секвенирование

Секвенирование: продукты ПЦР могут быть непосредственно секвенированы или клонированы и секвенированы, когда необходимо подтвердить инфекцию IHNV, идентифицировать ложноположительные результаты или неспецифическую амплификацию или отличить амплифицированные продукты от инфекционной формы вируса и продемонстрировать наличие инсерции не-инфекционного генома IHNV в ДНК хозяина (Tang & Lightner, 2006).

При помощи ПЦР IHNV был обнаружен у *P. monodon* из Юго-Восточной Азии. Некоторые из этих ПЦР праймеров IHNV также реагировали на IHNV - ассоциированные последовательности в популяциях *P. monodon* в Африке, Австралии и Таиланде (Saksmerprom et al., 2011; Tang &

Lightner, 2006). Чтобы отличить ИHNV-ассоциированные последовательности от фактического вируса, были разработаны ПЦР-анализы с использованием праймеров, которые обнаруживают ИHNV и не вступают в реакцию с ИHNV-ассоциированными последовательностями, наблюдающимися в популяциях *P. monodon* из Африки или Австралии (Tang с соавт., 2007), или Таиланда (например, Saksmerpromе с соавт., 2011).

Коммерческие ПЦР-наборы доступны для обнаружения ИHNV и могут быть приемлемыми, при условии, что они были валидированы, как пригодные для этой цели. Процедура валидации МЭБ описана в главе 1.1.2 Принципы и методы валидации диагностических тестов для инфекционных болезней.

4.3.2. Методы серологических исследований

Креветки являются беспозвоночными животными и не продуцируют антитела. Поэтому серологические методы выявления инфекции ИHNV отсутствуют

5. Рейтинг исследований по цели использования

Методы, доступные в настоящее время для наблюдения, выявления и диагностики инфекции ИHNV, перечислены в таблице 5.1. Обозначения, используемые в таблице, означают: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы серьезно ограничивают его применение; и d = метод в настоящее время не рекомендуется и / или недоступен для этой цели. Это несколько субъективно, поскольку пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и полезности. Хотя не все тесты, перечисленные как категории а или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинное использование и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы наблюдения, обнаружения и диагностики

Метод	Наблюдение				Предварительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	Пост-личинки	Молодь	Взрослые особи		
По макроскопическим признакам	d	d	d	d	d	d
Биопроба	d	d	d	d	c	c
Прямая оптическая микроскопия (LM) (влажный препарат)	d	d	d	d	d	d
Гистопатология	d	d	c	c	a	b

Просвечивающая электронная микроскопия (EM)	d	d	d	d	c	c
Анализы на основе антител	d	d	d	c	d	d
<i>In-situ</i> гибридизация	d	c	c	b	a	a
Дот-блот гибридизация	d	d	c	c	a	a
ПЦР, кПЦР	a	a	a	a	a	a
Последовательность	d	d	d	d	d	a

PLs = пост-личинки; LM = оптическая микроскопия; EM = электронная микроскопия; кПЦР = полимеразная цепная реакция в реальном времени.

6. Исследование, рекомендованные для целевого надзора для провозглашения свободы от инфекции вирусом инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза

Как указано в таблице 5.1., ПЦР или ПЦР в режиме реального времени являются рекомендованными методами для целевого надзора по причинам доступности, практичности, а также специфичности и чувствительности диагностики.

При исследовании эпизодов высокой смертности в рамках целевой программы эпиднадзора подходящим методом является демонстрация патогномичных индуцированных вирусом ИHNНV поражений эпителий кутикулы с помощью гистологии (с подтверждением или без подтверждения ISH с помощью ИHNНV-специфических ДНК-зондов) (таблица 5.1.).

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение подозрительного случая

Имеется подозрение относительно инфекции вирусом ИHNНV, если выполнен, по крайней мере, один из следующих критериев:

i) Клинические признаки, характерные для инфекции вирусом ИHNНV

или

ii) Гистопатологические исследования, указывающие на инфицирование вирусом

или

iii) Положительный результат ПЦР.

7.2. Определение подтвержденного случая

Инфицирование вирусом ИHNНV считается подтвержденным, если выполнены два из

следующих критериев:

- i) Положительный результат при гибридизации *in-situ*
- ii) Положительный результат ПЦР (всегда генотип-специфический)
- iii) Анализ последовательности для подтверждения последовательности нуклеиновой кислоты IHNV.

Два метода должны быть нацелены на разные области генома.

8. Библиография

ALCIVAR-WARREN A., OVERSTREET R.M., DHAR A.K., ASTROFSKY K., CARR W.H., SWEENEY J. & LOTZ J.M.

(1997). Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and *Baculovirus penaei*: possible relationship with growth status and metabolic gene expression. *J. Invertebr. Pathol.*, **70**, 190–197.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1984). IHNV virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**, 185–194.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1987). IHNV Disease of *Penaeus stylirostris*: Effects of Shrimp Size on Disease Expression. *J. Fish Dis.*, **10**, 165–170.

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

BELL T.A., LIGHTNER D.V. & BROCK J.A. (1990). A biopsy procedure for the non-destructive determination of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) infection in *Penaeus vannamei*. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**, 151–153.

BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M. & LIGHTNER D.V. (1990). Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2657–2664.

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.

BRAY W.A., LAWRENCE A.L. & LEUNG-TRUJILLO J.R. (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. *Aquaculture*, **122**, 133–146.

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.

BROCK J.A., LIGHTNER D.V. & BELL T.A. (1983). A review of four virus (BP, MBV, BMN,

and IHNV) diseases of penaeid shrimp with particular reference to clinical significance, diagnosis and control in shrimp aquaculture. Proceedings of the 71st International Council for the Exploration of the Sea, C.M. 1983/Gen:10/1–18.

BROCK J.A. & MAIN K. (1994). A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. The Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA, 241 pp.

BROWDY C.L., HOLLOWAY J.D., KING C.O., STOKES A.D., HOPKINS J.S. & SANDIFER P.A. (1993). IHNV virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. *J. Crustacean Biol.*, **13**, 87–94.

CARR W.H., SWEENEY J.N., NUNAN L., LIGHTNER D.V., HIRSCH H.H. & REDDINGTON J.J. (1996). The use of an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, **147**, 1–8.

CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANPIPAT P., SRIURAIATANA S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). 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. The Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In: Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress. Jory D.E., ed., Panama City, Panama, 1–11.

DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2001). Detection and quantification of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and White spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2835–2845.

FEGAN D.F. & CLIFFORD H.C. III. (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001. Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 168–198.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2006). State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 500. FAO, Rome, Italy, 134 pp.

JAENIKE F., GREGG K. & HAMPER L. (1992). Shrimp production in Texas using specific pathogen-free stocks. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA, 295–302.

KALAGAYAN G., GODIN D., KANNA R., HAGINO G., SWEENEY J., WYBAN J. & BROCK

J. (1991). IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquaculture Soc.*, **22**, 235–243.

KING A.M.Q., ADAMS M.J., CARSTENS E.B. & LEFKOWITZ E.J. (2012). Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

KRABSETSVE K., CULLEN B.R. & OWENS L. (2004). Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 153–158.

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. (1993). Diseases of penaeid shrimp. *In: CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture*. McVey J.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

LIGHTNER D.V. (1996a). 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. (1996b). Epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **15**, 579–601.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. (2011). Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. *In: Diseases in Asian Aquaculture VII*, Bondad-Reantaso M.G., Jones J.B., Corsin F. & Aoki T., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, 121–134.

LIGHTNER D.V., BELL T.A., REDMAN R.M. & PEREZ L.A. (1992a). A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. *ICES Marine Science Symposia*, **194**, 97–105.

LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., WILLIAMS R.R. & REDMAN R.M. (1987). Glycerol tolerance of IHHN virus of penaeid shrimp. *J. World Aquaculture Soc.*, **18**, 196–197.

LIGHTNER D.V., POULOS B.T., BRUCE L., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.R. (1992b). New developments in penaeid virology: application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. *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, 233–253.

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

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998b). Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathology*, **33**, 165–180.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific Pathogen-Free (SPF) Shrimp Stocks in Shrimp Farming Facilities as a Novel Method for Disease Control in Crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*. Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, 384–424.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BELL T.A. (1983a). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **42**, 62–70.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., BELL T.A. & BROCK J.A. (1983b). Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J. World Mariculture Soc.*, **14**, 212–225.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., WILLIAMS R.R., MOHNEY L.L., CLERX J.P.M., BELL T.A. & BROCK J.A. (1985). Recent advances in penaeid virus disease investigations. *J. World Mariculture Soc.*, **16**, 267–274.

LOTZ J.M., BROWDY C.L., CARR W.H., FRELIER P.F. & LIGHTNER D.V. (1995). USMSFP suggested procedures and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed. *In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 66–75.

MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1993). Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.*, **74**, 2637–2643.

MARTINEZ-CORDOVA L.R. (1992). Cultured blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in Northwestern Mexico. *Prog. Fish Cult.*, **54**, 265–266.

MONTGOMERY-BROCK D., TACON A.G.J., POULOS B. & LIGHTNER D.V. (2007). Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture*, **265**, 41–48.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. & CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Histopathological studies on wild broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* in the Platanitos area, adjacent to San Blas, Nayarit, Mexico. *J. World Aquaculture Soc.*, **30**, 192–200.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., NUNAN L.M., LIGHTNER D.V., MOTA-URBINA J.C., GARZA-AGUIRRE M.C. & CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Prevalence of IHHNV in wild broodstock of *Penaeus stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 296–301.

MOTTE E., YUGCHA E., LUZARDO J., CASTRO F., LECLERCQ G., RODRÍGUEZ J., MIRANDA P., BORJA O., SERRANO J., TERREROS M., MONTALVO K., NARVÁEZ A., TENORIO N., CEDEÑO V., MIALHE E. & BOULO V. (2003). Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **219**, 57–70.

NUNAN L.M., ARCE S.M., STAHA R.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Prevalence of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and White spot syndrome virus (WSSV)

in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J. World Aquaculture Soc.*, **32**, 330–334.

NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2000). Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, **2**, 319–328.

OWENS L., ANDERSON I.G., KENWAY M., TROTT L. & BENZIE J.A.H. (1992). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 219–228.

PANTOJA C.R., LIGHTNER D.V. & HOLTSCHMIT H.K. (1999). Prevalence and geographic distribution of IHHN parvovirus in wild penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 23–34.

PRIMAVERA J.H. & QUINTIO E.T. (2000). Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Crustacean Biol.*, **20**, 796–802.

PRUDER G.D., BROWN C.L., SWEENEY J.N. & CARR W.H. (1995). High health shrimp systems: seed supply - theory and practice. *In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95, San Diego, California, 1–4 February 1995.* Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 40–52.

SAKSMERPROME V., JITRAKORN S., CHAYABURAKUL K., LAIPHROM S., BOONSUA K. & FLEGEL T.W. (2011). Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus Res.*, **160**, 180–190.

SHIKE H., DHAR A.K., BURNS J.C., SHIMIZU C., JOUSSET F.X., KLIMPEL K.R. & BERGOIN M. (2000). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses. *Virology*, **277**, 167–177.

TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., PANTOJA C.R. & LIGHTNER D.V. (2000). Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, **190**, 203–210.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 79–85.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2006). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res.*, **118**, 185–191.

TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2007). A PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related

sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **74**, 165–170.

TANG K.F.J., POULOS B.T., WANG J., REDMAN R.M., SHIH H.H. & LIGHTNER D.V. (2003). Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 91–99.

WEPPE M. (1992). Demonstration de altas cuidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACOP SPR 43) resistente al virus IHHN. Proceeding of the Ecuadorian Aquaculture Congress. CENAIM, Guayaquil, Ecuador, 229–232.

WYBAN J.A. (1992). Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*. Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 257–268.

ZARAIN-HERZBERG M. & ASCENSIO-VALLE F. (2001). Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*, **193**, 1–9.

*
* *

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по вирусу инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза (см. 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/>).

Пожалуйста, свяжитесь с Референтной лабораторией МЭБ для получения дополнительной информации о вирусе инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 1995 г. КАК ИНФЕКЦИОННЫЙ ГИПОДЕРМАЛЬНЫЙ И ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИЙ НЕКРОЗ; ПОСЛЕДНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2018 г.