

## **ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ ИНФЕКЦИОННОГО МИОНЕКРОЗА**

---

### **1. Предмет рассмотрения**

Инфекция вирусом инфекционного мионекроза означает инфекцию патогенным возбудителем вируса инфекционного мионекроза (ВИМН), имеющим схожесть с членами семейства Totiviridae.

### **2. Информация о болезни**

#### **2.1 Факторы возбудителя**

##### **2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя**

Филогенетический анализ кодирующей последовательности гена РНК-зависимой РНК полимеразы (RdRp) указывает на то, что ВИМН наиболее близкородственен вирусу *Giardia lamblia*, члену семейства Totiviridae ([Fauquet с соавт., 2005](#); [Lightner, 2011](#); [Nibert, 2007](#); [Poulos с соавт., 2006](#)).

Частицы ВИМН имеют икосаэдральную форму 40 нм в диаметре с плавучей плотностью 1,366 г мл<sup>-1</sup> в хлориде цезия. Геном состоит из одной молекулы двуцепочечной (дц)РНК размером 8226–8230 п.о. ([Loy с соавт., 2015](#); [Naim с соавт., 2015](#)). Определение последовательности вирусного генома обнаружило две неперекрывающиеся открытые рамки считывания (ОРС). Первая ОРС (ОРС1, нт 470–5596) кодирует предполагаемый РНК-связывающий белок и капсидный белок. Кодирующий регион РНК-связывающего белка расположен в первой половине ОРС1 и содержит дцРНК-связывающий мотив в первых 60 аминокислотах. Вторая половина ОРС1 кодирует капсидный белок, что было установлено определением аминокислотной последовательности с молекулярной массой 106 кДа. Вторая ОРС (ОРС2, нт 5884–8133) кодирует предполагаемый RdRp ([Poulos с соавт., 2006](#)).

Последовательности полных геномов типов ВИМН происхождения из Бразилии и Индонезии были определены и было обнаружено, что они на 99,6% идентичны на нуклеотидном уровне ([Poulos с соавт., 2006](#); [Senapin с соавт., 2007](#)). 99,6% идентичность последовательностей полного генома (и разрозненные данные о завозе популяций *P. vannamei* из Бразилии) указывают на то, что болезнь была завезена из Бразилии в Индонезию в 2006 г.

##### **2.1.2 Выживание вне хозяина**

Доступна только разрозненная информация. ВИМН является, очевидно, более сложным в плане инактивации с помощью типичных процедур дезинфекции прудов (напр. просушивание на солнце, хлорирование и т.д.), по сравнению с другими вирусами пенеидных креветок, как например вирус синдрома белых пятен (WSSV), вирус желтой головы генотипа 1 (YHV1), вирус синдрома Таура (TSV) и инфекционный гиподермальный и гематопозитический вирус (IHNV). Существует подозрение о наличии резервуарных хозяев, но никаких задокументированных фактов нет.

##### **2.1.3 Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)**

Данных нет.

#### **2.1.4. Жизненный цикл**

Не применимо.

### **2.2. Факторы хозяина**

#### **2.2.1. Восприимчивые виды хозяев (общепринятые названия и названия на латыни).**

Виды, которые отвечают критериям к внесению в список, как восприимчивые к инфекции ВИМН в соответствии с Главой 1.5 Кодекса здоровья водных животных (Водного кодекса), включают: коричневую тигровую креветку (*Penaeus esculentus*), банановую креветку (*P. merguensis*) и белоногую креветку (*P. vannamei*).

#### **2.2.2. Виды с недостаточной доказанностью восприимчивости**

Виды, в отношении которых не существует достаточно доказательства выполнения критериев внесения в список видов, восприимчивых к ВИМН на основании положений Главы 1.5. *Водного кодекса*, включают: гигантскую тигровую креветку (*Penaeus monodon*) и голубую креветку (*Penaeus stylirostris*).

К тому же, патоген-специфичные положительные результаты ПЦР были получены от следующих организмов, но активной инфекции продемонстрировано не было: южная коричневая креветка (*Penaeus subtilis*).

#### **2.2.3. Восприимчивые этапы жизни хозяина**

Молодые и подвзрослые особи *P. vannamei*, выращенные в морской, солоноватой и низкосолёной воде, по-видимому, являются наиболее подверженными тяжелой инфекции ВИМН ([Lightner, 2011](#); [Lightner с соавт., 2004](#); [Nunes с соавт., 2004](#); [Poulos с соавт., 2006](#)).

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

Нет данных.

#### **2.2.5. Органы-мишени и инфицируемая ткань**

Основные ткани-мишени для ВИМН включают поперечнополосатые мышцы (скелетные и менее часто сердечные), соединительные ткани, гематоциты и паренхимные клетки лимфоидных органов ([Lightner, 2011](#); [Lightner с соавт., 2004](#); [Poulos с соавт., 2006](#); [Tang с соавт., 2005](#)).

#### **2.2.6. Персистентная инфекция**

Некоторые члены популяций *P. vannamei*, которые выживают после перенесенных инфекций или эпизоотий ВИМН, могут переносить вирус.

#### **2.2.7 Векторы**

Определенные данные по векторам отсутствуют. Однако, по причине безоболочечной структуры частицы, скорее всего, ВИМН, как и вирус синдрома Таура, будет сохранять инфекционность в кишечнике и фекалиях морских птиц, которые питаются мертвыми или

умирающими креветками на фермах, где протекает инфекция ВИМН, и будет распространяться между и внутри ферм с фекалиями или неперевавленными креветками, содержащимися в отрыжке птиц ([Vanpatten c соавт., 2004](#)).

### **2.3. Паттерн болезни**

У молодых или взрослых *P. vannamei* в регионах, где инфекция ВИМН является энзоотичной, вспышки инфекции ВИМН связанные с резким повышением смертности, могут возникать после стрессогенных событий, как например вылов сетью, кормление, внезапные изменения в солености или температуре воды и т.д. Креветки на острой стадии болезни ВИМН будут демонстрировать от очаговых до обширных белых некротических областей в поперечнополосатых (скелетных) мышцах, особенно в дистальных брюшных сегментах и в веере хвоста, которые становятся некротическими и краснеют у некоторых креветок. Креветки с тяжелыми поражениями начинают погибать, и смертность может быть высокой после «стрессовой» ситуации и продолжается в течение нескольких дней ([Lightner, 2011](#); [Lightner c соавт., 2004](#); [Nunes c соавт., 2004](#); [Poulos c соавт., 2006](#)). Кормовой коэффициент (КК) пораженных популяций может повышаться от обычного показателя на ~ 1,5 до 4,0 или выше ([Andrade c соавт., 2007](#)).

#### **2.3.1. Механизмы передачи**

Было продемонстрировано, что ВИМН передается горизонтально при каннибализме ([Lightner, 2011](#); [Poulos c соавт., 2006](#)). Возможно, существует передача через воду. Несмотря на то, что подозревается возможность вертикальной передачи на основании бессистемных данных, неизвестно, происходит ли она посредством трансвариального механизма или через контаминацию поверхности вновь отложенной икры.

#### **2.3.2. Превалентность**

В регионах, где ВИМН является энзоотичным в выращиваемых популяциях *P. vannamei*, его превалентность может достигнуть 100% ([Andrade c соавт., 2007](#); [Nunes c соавт., 2004](#)).

#### **2.3.3. Географическое распределение**

Сообщалось о том, что инфекция ВИМН была зарегистрирована в северо-восточной Бразилии ([Andrade c соавт., 2007](#); [Lightner c соавт., 2004](#); [Nunes c соавт., 2004](#); [Poulos c соавт., 2006](#)) и в Индонезии ([Naim c соавт., 2014](#)).

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

Смертность, вызванная ВИМН, может варьировать в диапазоне от 40 до 70% у выращиваемых *P. vannamei*.

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

Температура и соленость воды, скорее всего, являются факторами, предрасполагающими к вспышкам болезни, но никаких экспериментальных данных не существует ([Nunes c соавт., 2004](#)).

### **2.4. Контроль и профилактика**

#### **2.4.1. Вакцинация**

Эффективных вакцин против инфекции ВИМН не существует.

#### **2.4.2. Фармакотерапия**

Нет сообщений об эффективных терапевтических средствах против ВИМН.

#### **2.4.3. Иммуностимуляция**

Нет данных.

#### **2.4.4. Разведение резистентных популяций**

Существуют отдельные сообщения о некоторых селекционных линиях *P. vannamei*, с более высокой выживаемостью и производственными показателями на фермах, где инфекция ВИМН является энзоотичной. В течение 20-дневного лабораторного исследования в контролируемых условиях, в котором креветок заражали ВИМН, было обнаружено, что некоторые одомашненные линии *P. vannamei* выживали лучше, чем другие линии ([White-Noble с соавт., 2010](#)).

#### **2.4.5. Восстановление популяции резистентными особями**

Несмотря на то, что нет опубликованных данных, полагается, что некоторые креветочные фермы в Индонезии заселяли популяциями *P. monodon* и *P. stylirostris*, так как данные предварительного исследования указывали на то, что некоторые виды более резистентны к ВИМН, чем *P. vannamei* ([Tang с соавт., 2005](#)).

#### **2.4.6. Блокирующие агенты**

Нет данных.

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

Наряду с тем, что считается, что ВИМН передается вертикально, не существует научных данных, подтверждающих этот путь передачи. Дезинфекция икринок и личинок ([Chen с соавт., 1992](#)) является надлежащей практикой содержания, рекомендуемой в целях снижения способности к передаче ряда болезней пенидных креветок от самок, откладывающих икру яйцам и личинкам; данная практика может сократить контаминацию ВИМН отложенной икры и личинок, появляющихся из них.

#### **2.4.8. Общие практики содержания**

Некоторые практики содержания успешно применяются с целью профилактики инфекции ВИМН и развития клинической болезни на креветочных фермах. Главной среди них является применение полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для скрининга маточного стада, выращенного в пруду, и/или икры от этого стада/науплий и отсеивания особей с положительными результатами в ПЦР ([Andrade с соавт., 2007](#)). Опустошение и повторное заселение пораженных ферм или целых регионов выращивания популяциями *P. vannamei*, свободными от ВИМН, и создание популяций креветок *P. vannamei*, свободных от патогенных факторов (СПФ) и наиболее подходящих для местных условий выращивания, доказало, что является наиболее успешной практикой содержания для профилактики и контроля других вирусных болезней креветок, которая должна

применяться с целью контроля и профилактики инфекции ВИМН ([Lee & O'Bryen, 2003](#); [Lightner, 2005](#); [Lightner с соавт., 2009](#); [Moss & Moss, 2009](#)).

### **3. Отбор проб**

#### **3.1. Отбор индивидуальных образцов**

Образцы, подходящие для исследования на инфекцию ВИМН с помощью молекулярных методов (напр. ОТ-ПЦР, гнездовая ОТ-ПЦР количественная ОТ-ПЦР и т.д.), включают постличинки, молодых, подвзрослых и взрослых особей. Несмотря на то, что ВИМН может поражать креветок на всех жизненных стадиях, тяжесть инфекции и соответственно вирусная нагрузка могут быть ниже пределов выявления в отложенной икре и на личиночной стадии, поэтому эти жизненные стадии могут не подойти для выявления ВИМН или сертификации свободы от инфекции ВИМН.

#### **3.2. Сохранение проб для последующего направления на исследования**

В отношении рутинной гистологии или молекулярных исследований и руководства по сохранению проб для определенных исследований, см. Главу 2.2.0.

#### **3.3. Объединение проб в пулы**

Влияние объединения проб в пулы на диагностическую чувствительность не была оценена, поэтому более крупные креветки должны быть обработаны и исследованы индивидуально. Однако, жизненные стадии небольшого размера, особенно постличинки или образцы весом менее 0,5 г, могут быть объединены в пул для получения достаточного количества материала в целях молекулярного исследования.

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

ВИМН поражает ткани мезодермального происхождения. Основными тканями-мишенями в острой фазе инфекции ВИМН являются поперечнополосатые мышцы (скелетные и менее часто сердечная мышца), соединительные ткани, гемоциты и паренхимные клетки трубочки лимфоидного органа. При хронических инфекциях лимфоидный орган может быть основной тканью-мишенью.

Можно отбирать и использовать гемолимфу или плеоподы, когда необходимо провести исследование на ценном маточном поголовье, не прибегая к умерщвлению.

#### **3.5. Неподходящие пробы/ткани**

ВИМН реплицируется систематически, но не реплицируется в кишечных тканях (напр. гепатопанкреас, средняя кишка или ее слепой вырост). Следовательно, кишечные ткани не являются подходящими пробами для выявления инфекции ВИМН.

### **4. Диагностические методы**

#### **4.1. Полевые диагностические методы**

##### **4.1.1 Клинические признаки**

Пораженные креветки имеют очевидно белые хвосты. Такие тяжело инфицированные креветки могут употреблять корм до наступления стресса и могут иметь полный кишечник.

Тяжело пораженные креветки начинают погибать, и смертность может моментально повыситься и быть высокой в течение нескольких дней. Клинические признаки могут проявиться внезапно после пережитых стрессов (напр. вылов сетью, кормление или внезапные изменения в температуре или солености воды).

#### **4.1.2 Изменения в поведении**

Только креветки на острой фазе болезни демонстрируют изменения в поведении. Обычно, тяжело пораженные креветки становятся вялыми во время или вскоре после наступления стрессогенного события, такого как вылов сетью, кормление или внезапные изменения в температуре воды или резкое снижение солености воды, и т.д.).

### **4.2. Клинические методы**

#### **4.2.1. Макроскопическая патология**

Креветки в острой фазе болезни демонстрируют от очаговых до обширных белых некротических областей в поперечнополосатых (скелетных) мышцах, особенно в дистальных брюшных сегментах и в веере хвоста, которые становятся некротическими и краснеют у некоторых креветок. Проведение простого иссечения на парных лимфоидных органах обнаружит их гипертрофию (в 3-4 раза больше обычного размера) ([Lightner с соавт., 2004](#); [Poulos с соавт., 2006](#)).

#### **4.2.2 Клиническая химия**

Не применимо.

#### **4.2.3. Микроскопическая патология**

Инфекцию ВИМН в острой и хронической фазе можно предположительно диагностировать с помощью гистологии ([Bell & Lightner, 1988](#); [Lightner, 2011](#); [Lightner с соавт., 2004](#); [Poulos с соавт., 2006](#)). Однако поражения в поперечнополосатых мышцах и лимфоидных органах не являются патогномоничными для инфекции ВИМН. Болезнь белого хвоста пенеидных креветок, вызываемая нодавиром *P. vannamei* (PvNV), может имитировать инфекцию ВИМН ([Tang с соавт., 2007](#)). Поэтому информация о диагностике из других источников (напр. история, макроскопические признаки, заболеваемость, смертность или результаты ОТ-ПЦР) могут быть необходимы для подтверждения диагноза инфекцией ВИМН.

С помощью гистологии при использовании обычных, окрашенных гематоксилин-эозином (H&E) парафиновых срезов ([Bell & Lightner, 1988](#)), срезы ткани от креветок на острой стадии инфекции ВИМН, демонстрируют мионекроз с характерным коагулятивным некрозом поперечнополосатых (скелетных) мышечных волокон, часто с выраженной отечностью в пораженных мышечных волокнах. Некоторые креветки могут демонстрировать смесь острых и более старых поражений. У таких креветок пораженные мышечные волокна, по-видимому, прогрессируют от коагулятивного некроза до колликвационного некроза, который сопровождается умеренной инфильтрацией и скоплением гемоцитов. При более глубоких поражениях, гемоциты и воспаленные мышечные волокна заменяются рыхлой матрицей фиброцитов и соединительными мышечными волокнами, которые перемежаются с гемоцитами и очагами (предположительно) регенерирующих мышечных волокон ([Lightner et al., 2004](#); [Poulos с соавт., 2006](#)).

Значительная гипертрофия лимфоидных органов, вызванная скоплением сфероидов лимфоидных органов - часто встречающееся поражение у креветок в острой или

хронической фазе инфекции ВИМН. Часто, многие эктопические сфероиды лимфоидных органов обнаруживаются в других тканях, в отдалении от основного тела лимфоидных органов. Обычное расположение эктопических сфероидов лимфоидных органов включают гомоцель в жабрах, сердце, вблизи от усиковых канальцев железы, и брюшного нервного ствола ([Lightner с соавт., 2004](#); [Poulos с соавт., 2006](#)).

#### **4.2.4. Влажные анатомические препараты**

Окрашенные или неокрашенные сдавленные препараты ткани пораженной скелетной мышцы или лимфоидного органа могут демонстрировать аномалии. Препараты ткани скелетной мышцы, при изучении с использованием фазово-контрастной или световой микроскопии, могут демонстрировать утрату нормальной исчерченности. Фрагментация мышечных волокон также может быть очевидной. Препараты лимфоидных органов могут демонстрировать значительное скопление сферических масс клеток (сфероиды лимфоидных органов) между обычными канальцами лимфоидных органов.

#### **4.2.5 Мазки**

Не применимо.

#### **4.2.6. Фиксированные срезы**

См. Раздел [4.2.1](#)

#### **4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология**

Не применимо для диагностических целей.

### **4.3. Обнаружение возбудителя и методы идентификации**

#### **4.3.1. Методы прямого обнаружения**

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

###### *4.3.1.1.1. Влажные анатомические препараты*

См. Раздел [4.2.4](#)

###### *4.3.1.1.2. Мазки*

См. Раздел [4.2.5](#)

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

См. Разделы [4.2.3](#) и [4.2.6](#)

##### **4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя**

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

До настоящего момента данных нет.

#### 4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе антител

К капсидному белку ВИМН вырабатывались моноклональные антитела ([Kunanopparat с соавт., 2011](#)). Вырабатывались три моноклональных тела, и при применении в комбинации, они обеспечивали более высокую чувствительность, чем одно моноклональное тело, используемое по отдельности. Однако чувствительность была приблизительно в десять раз ниже, чем чувствительность одноступенчатого ОТ-ПЦР анализа при использовании одной и той же пробы.

#### 4.3.1.2.3. Молекулярные методы

Опубликованные методики касаются молекулярного выявления ВИМН с помощью гибридизации *in-situ*, гнездовой ОТ-ПЦР и количественной ОТ-ПЦР в реальном времени ([Andrade с соавт., 2007](#); [Poulos с соавт., 2006](#); [Tang с соавт., 2005](#)). Тест-система с использованием гнездовой ОТ-ПЦР для выявления вируса доступна в продаже. Все ПЦР анализы доказали свою специфичность к ВИМН.

Так как чувствительность гнездовой ПЦР и ПЦР в реальном времени более высокая, чем у любого другого диагностического метода на данный момент, достигающая предел выявления в 10 копий вирусного генома, эти анализы являются золотым стандартом для выявления ВИМН ([Andrade с соавт., 2007](#); [Poulos с соавт., 2006](#)).

##### 4.3.1.2.3.1. ДНК зонд для выявления ВИМН с помощью гибридизации *in-situ*

кДНК библиотека была выработана на основе очищенного ВИМН (см. Раздел 4.3.1.2.3.2.1.). ДНК зонд для гибридизации *in-situ*, специфичный к ВИМН, подготовлен из клона IMNV-317 с помощью ПЦР мечения дигоксигенином-11-dUTP (DIG). ПЦР праймеры, используемые для амплификации 993 п.о. зонда - IMNV993F (5'-AAC-ACA-AAA-TCT-GCC-AGC-AA-3') и IMNV993R (5'-CCC-AAC-CAC-CCA-AAT-TCA-TA-3').

После проведения ПЦР, DIG-меченый ДНК зонд, осаждают в спирте, ресуспендируют в воде и хранят при  $t -20^{\circ}\text{C}$  до использования. Процедура гибридизации *in-situ* для выявления ВИМН описана [Tang с соавт., 2005](#).

##### 4.3.1.2.3.2. ОТ-ПЦР для выявления ВИМН

Метод гнездовой ОТ-ПЦР был разработан для выявления ВИМН с применением двух наборов ПЦР праймеров, которые продуцируют 328 п.о. одноступенчатый ампликон и 139 п.о. двухступенчатый ампликон. Одноступенчатая ПЦР может выявлять лишь 100 РНК копий ВИМН, а двухступенчатая ПЦР может выявлять порядка 10 копий РНК ВИМН ([Poulos & Lightner, 2006](#)).

Вирусную РНК можно выделить с помощью любого тест-набора для выявления РНК, доступного в продаже. Объем требуемой ткани будет зависеть от выбранного набора (напр. Тест-набор Qiagen для экстрагирования РНК, тест-набор Promega и Roche для очистки РНК рекомендуют использовать 25 - 50 мг ткани). В зависимости от используемого тест-набора, объем элюирования у Roche и Qiagen и набор для извлечения РНК с малым объемом элюирования составляет 100 мкл. Набор для извлечения РНК с высоким объемом элюирования Promega составляет 500 мкл. Экстрагированную РНК следует хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$  перед исследованием, однако, долгосрочное хранение РНК требует поддержание температуры в  $-70^{\circ}\text{C}$ .

После извлечения РНК, метод описан в Разделе 4.3.1.2.3.2.1. ниже.



#### 4.3.1.2.3.2.1. РНК матрицы

Замороженная или фиксированная в спирте ткань (плеоподы, головогрудь, мышцы). Гемолимфа (менее чувствительна, чем другие используемые ткани).

Реакционная смесь ОТ-ПЦР (применяемые биосистемы rTth энзим и 5 × EZ буфер #N808-0178):

Реагент	25 мкл реакция	Конечная концентрация
DD H <sub>2</sub> O	6.5 мкл	–
5 × EZ буфер	5.0 мкл	1 ×
dNTP микс (10мМ каждый)	3.0 мкл	300 мкМ каждого
Праймер F (100 ng мкл <sup>-1</sup> )	1.0 мкл	0.62 мкМ
Праймер R (100 ng мкл <sup>-1</sup> )	1.0 мкл	0.62 мкМ
Mn(Oac) <sub>2</sub> (25 мМ)	2.5 мкл	2.5 мМ
rTth энзим (2.5 Ед мкл <sup>-1</sup> )	1.0 мкл	0.1 U мкл <sup>-1</sup>
Матрица <sup>a</sup>	1–5 мкл	1–50 нг тотальная РНК

а. Матрицу следует кипятить в течение 3 минут и охладить на льду непосредственно перед добавлением в реакционную смесь.

Условия термоциклирования ОТ-ПЦР:

ПЦР праймеры	Температура (°C)	Время	Кол-во циклов	Длина ампликона
4587F / 4914R	60, 95	30 минут, 2 минут	1	328 п.о.
	95, 60	45 секунд, 45 секунд	39	
	60	7 минут	1	

Гнездовая ПЦР (Amersham Biosciences pure Taq Ready-To-Go Beads #27-9558-01):

Реагент	25 мкл реакция	Конечная концентрация
DD H <sub>2</sub> O	22.5 мкл	–
Праймер NF (100 нг мкл <sup>-1</sup> )	1.0 мкл	0.465 мкМ
Праймер NR (100 нг мкл <sup>-1</sup> )	1.0 мкл	0.465 мкМ
Матрица <sup>a</sup>	0.5 мкл	–

а. Матрица для гнездовой реакции является продуктом реакции первого этапа.

Условия термоциклирования гнездовой ПЦР:

ПЦР праймеры	Температура (°C)	Время	Кол-во циклов	Длина ампликона
4725NF / 4863NR	95	2 минуты	1	139 п.о.
	95, 65, 72	30 секунд, 30 секунд, 30 секунд	39	
	72	2 минуты	1	

Последовательности праймеров:

Праймеры	Последовательность (5' по 3')	Длина ампликона	Литература
4587F	CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA	328 п.о.	<a href="#">Poulos &amp; Lightner, 2006</a>
4914R	ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT		
4725NF	GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA	139 п.о.	
4863NR	AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G		

#### 4.3.1.2.3.3. Количественная (в реальном времени) ОТ-ПЦР для выявления ВИМН

Метод количественной (в реальном времени) ОТ-ПЦР был разработан для выявления и количественного определения ВИМН в тканях креветок. Метод может обнаруживать всего лишь 10 РНК копий ВИМН на мкл тотальной РНК ([Andrade с соавт., 2007](#)). Опубликованный метод описан ниже.

Применялись программное обеспечение Primer Express (Applied Biosystems) с целью проектирования ПЦР праймеров, а также зонд TaqMan, нацеленный на регион OPC1 генома ВИМН (справочный номер в GenBank AY570982 ([Andrade с соавт., 2007](#); [Poulos с соавт., 2006](#)). Праймеры IMNV412F (5'-GGA-CCT-ATC-ATA-CAT-AGC-GTT-GCA-3') и IMNV545R (5'-AAC-CCA-TAT-CTA-TTG-TCG-CTG-GAT-3') амплифицируют 134 п.о. ДНК. Зонд TaqMan, IMNVp1 (5'-6FAM-CCA-CCT-TTA-CTT-TCA-ATA-CTA-CAT-CAT-CCC-CGG-TAMRA-3'), который соответствует нуклеотидам 467-500, мечен флуоресцентными красителями 5-карбоксихлорофлуоресцеином (FAM) на своем 5'-конце и N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксихлорофлуоресцеином (TAMRA) на своем 3'-конце. Фрагмент генома ВИМН амплифицируют с помощью ПЦР тест-системы StepOnePlus и TaqMan Fast virus 1-Step Master Mix (Life Technologies). До проведения ОТ-ПЦР, экстрагированную РНК кипятят при 95–100°C в течение 3 минут с целью денатурации дцРНК и сразу же охлаждают на льду. Реакционная смесь содержит 1 мкл пробы РНК, TaqMan мастер-микса (2×), 300 нМ каждого праймера IMNV412F и IMNV545R, 200 нМ IMNVp1TaqMan зонда в 10–20 мкл конечного объема. Используемые условия термоциклирования количественной ОТ-ПЦР следующие: 50°C в течение 3 минут, 95°C в течение 20 секунд с последующими 40 циклами 95°C в течение 3 секунд и 60°C в течение 30 секунд. В конце реакции измеряют интенсивность флуоресценции, порог устанавливают выше базовой линии. Пробы со значением Ct ниже 40 циклов, считаются положительными. Необходимо включить «безматричный» контроль в каждом прогоне реакции. Цель этого действия исключить присутствие контаминантов флуоресценции в реакционной смеси. Положительный контроль должен также быть включен, и это может быть РНК, экстрагированная из ткани, инфицированной ВИМН, или in-vitro транскрибированная РНК ВИМН, содержащая целевую последовательность (см. ниже).

С целью синтеза РНК стандарта для количественной ОТ-ПЦР в реальном времени, ПЦР праймеры IMNV218F и IMNV682R (5'-GCT-GGA-CTG-TAT-TGG-TTG-AG-3' и 5'-AAC-CAA-GTT-CTT-CTT-CTC-CAG-TT-3', соответственно) используются для амплификации 464 п.о. ДНК продукта из генома ВИМН. ПЦР продукт, очищенный с использованием набора для очистки QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) клонировали в рGEM-T Easy Vector. Рекомбинантный плазмид, рIMNV-1, с подтвержденным содержанием 464 п.о. инсерции с помощью секвенирования, был преобразован к линейному виду с помощью переваривания с использованием PstI, и применялся в качестве матрицы для in-vitro транскрипции РНК при использовании T7 РНК полимеразы и ассоциированных реагентов (Promega). РНК синтезировали при 37°C в течение 2 часов в 50 мкл реакции, содержащей 1 мкг ДНК, с последующим перевариванием Дназы I при 37°C в течение 30 минут для удаления ДНК.

Длина и целостность синтетической ссРНК подтверждается электрофорезом в 1,5% агарозном геле, содержащем бромид этидия. РНК очищают с помощью набора для очистки Qiaquick PCR Purification kit, количественно определяют спектофотометром, и хранят при – 70°C.

#### 4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

Несмотря на то, что ВИМН был выделен из инфицированной ткани креветки с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (Poulos с соавт., 2006), такой метод не рекомендуется для диагностических целей.

#### 4.3.2. Серологические методы

Не применимы, так как креветки являются беспозвоночными, которые не продуцируют специфичных антител, которые могли бы использоваться для демонстрации инфекции с помощью или до подвешивания воздействию ВИМН.

### 5. Ранжирование диагностических тестов на основании цели использования

Методы, доступные на данный момент для целевого надзора, выявления и диагностики ВИМН перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице, указывают: a = метод является рекомендуемым методом по причине доступности, практичности, диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод может применяться в некоторых ситуациях, но затраты, точность или другие факторы значительно ограничивают диапазон его применения; и d = метод на настоящий момент не рекомендуется для проведения в этих целях. Эти данные неким образом субъективны, так как пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и практичности. Несмотря на то, что все тесты, перечисленные как категория a или b, прошли формальные процедуры стандартизации и валидации, их рутинная природа и тот факт, что они широко использовались без получения сомнительных результатов, делает их пригодными.

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

Метод	Целевой надзор				Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	ПЛ	Молодь	Взрослые		
Макроскопические признаки	d	d	c	c	c	d
Биопроба	d	d	c	c	c	c
Световая микроскопия (влажные препараты)	d	d	d	d	c	c
Гистопатология	d	d	b	b	a	c
Трансм. электронная микроскопия	d	d	d	d	d	d
Иммунологические анализы	d	d	d	d	c	c
ДНК зонды (гибридизация in-situ)	d	d	b	b	a	a
Гнездовая ОТ-ПЦР или ОТ-ПЦР в реальном времени	a	a	a	a	a	a

Секвенирование	d	d	d	d	a	a
----------------	---	---	---	---	---	---

ПЛ = постличинки; ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

## 6. Тесты, рекомендуемые для целевого надзора с целью объявления свободы от инфекции вирусом инфекционного мионекроза

Как указано в Таблице 5.1., гнездовая ОТ-ПЦР (Раздел 4.3.1.2.3.) является рекомендуемым методом для целевого надзора по причине доступности, целесообразности, а также диагностической специфичности и чувствительности.

При расследовании случаев смертности в результате острого воздействия вируса, что являлось частью программы целевого надзора, обнаружение при проведении гистологии характерных поражений, вызванных ВИМН, в поперечнополосатых мышцах и сильной гипертрофии лимфоидных органов, вызванных формированием сфероидов лимфоидных органов (с наличием подтверждения гибридизации in-situ с использованием ВИМН-специфичных ДНК зондов или без него), является подходящим методом (Таблица 5.1.). Возникновение значительной смертности отличает инфекцию ВИМН от болезни белого хвоста пенеидных креветок, вызываемой PwNV, при которой макроскопические признаки и гистопатология походят на инфекцию ВИМН ([Tang с соавт., 2007](#)).

## 7. Подтверждающие диагностические критерии

### 7.1. Определение случая подозрения

Инфекцию ВИМН подозревают, если, по крайней мере, существует одно соответствие следующим критериям:

- i. Клинические признаки, сопоставимые с ВИМН;  
или
- ii. Гистопатология, сопоставимая с инфекцией ВИМН;  
или
- iii. Положительный результат в гнездовой ОТ- ПЦР или ОТ-ПЦР в реальном времени

### 7.2. Определение подтвержденного случая

Инфекция ВИМН считается подтвержденной, если существует соответствие двум или более критериям:

- i. Гистопатология, сопоставимая с инфекцией ВИМН
- ii. Положительный результат в гибридизации in-situ на целевых тканях
- iii. Положительные результаты на ВИМН в одноступенчатой или гнездовой ОТ-ПЦР (с последующим секвенированием) или в ОТ-ПЦР в реальном времени.

## 8. Список литературы

ANDRADE T.P.D., SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2007). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*, 264, 9–15.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World

Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.

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. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Totiviridae. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Francisco, California, USA, 571–580.

KUNANOPPARAT A., CHAIVISUTHANGKURA P., SENAPIN S., LONGYANT S., RUKPRATANPORN S., FLEGEL T.W. & SITHIGORNGUL P. (2011). Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. *J. Virol. Methods*, 171, 141–148.

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. (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). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J. Invertebr. Pathol.*, 106, 110–130.

LIGHTNER D.V., PANTOJA C.R., POULOS B.T., TANG K.J.F., REDMAN R.M., PASOS-DE-ANDRADE T. & BONAMI J.R. (2004). Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, 7, 85.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific Pathogen-Free 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.

LOY D.S., LIU S., MOGLER M.A., LOY D.J., BLITVICH B.J. & BARTHOLOMAY L.C. (2015). Characterization of newly revealed sequences in the infectious myonecrosis virus genome in *Litopenaeus vannamei*. *J. Gen. Virol.*, 96, 1821–1829.

MOSS S.M. & MOSS D.R. (2009). Chapter 17. Selective breeding of penaeid shrimp. In: Shellfish Safety and Quality. Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, 425–452.

NAIM S., BROWN J.K. & NIBERT M.L. (2014). Genetic diversification of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus between Indonesia and Brazil. *Virus Res.*, 189, 99–105.

NAIM S., TANG K.F.J., YANG M., LIGHTNER D.V. & NIBERT M.L. (2015). Extended genome sequences of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strains from Brazil and Indonesia. *Arch. Virol.*, 160, 1579–1583.

NIBERT M.L. (2007). '2A-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. *J. Gen. Virol.*, 88, 1315–1318.

NUNES A.J.P., CUNHA-MARTINS P. & VASCONSELOS-GESTEIRA T.C. (2004). Carcinicultura ameaçada. *Rev. Panoram. Aquic.*, 83, 37–51 (in Portuguese).

POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2006). Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Dis. Aquat. Org.*, 73, 69–72.

POULOS B.T., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *J. Gen. Virol.*, 87, 987–996.

SENAPIN S., PHEWSAIYA K., BRIGGS M. & FLEGEL T.W. (2007). Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, 266, 32–38.

TANG K.F.J., PANTOJA C.R., POULOS B.T., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2005). In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Dis. Aquat. Org.*, 63, 261–265.

TANG K.F.J., PANTOJA C.R., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2007). Development of in situ hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, 75, 183–190.

TAUKHID & NUR'AINI Y.L. (2009). Infectious myonecrosis virus (IMNV) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Indonesia. *Isr. J. Aquacult.*, 61, 255–266.

VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, 241, 31–46.

WHITE-NOBLE B.L., LIGHTNER D.V., TANG K.F.J. & REDMAN R.M. (2010). Lab challenge for selection of IMNV-resistant white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, July/August, 71–73.

\*

\* \*

**NB:** Существуют Референтные лаборатории МЭБ по инфекции вирусом инфекционного мионекроза (см. Таблицу в конце этого Водного Руководства или веб-сайт МЭБ, где приведен актуальный список:

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

**NB:** ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2009 Г.; ПОСЛЕДНЯЯ РЕДАКЦИЯ ОТ 2017 Г.