

ГЛАВА 2.2.6.

ИНФИЦИРОВАНИЕ НОДАВИРУСОМ *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* (БОЛЕЗНЬ БЕЛОГО ХВОСТА)

1. Предмет рассмотрения

Инфицирование нодавирусом *Macrobrachium rosenbergii* означает заражение патогенным возбудителем нодавирусом *Macrobrachium rosenbergii* (MrNV) (семейство *Nodaviridae*). Заболевание известно как болезнь белого хвоста (WTD).

2. Информация о болезни

2.1. Патогенные факторы

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Этиологическими агентами являются два вирусных возбудителя, а именно MrNV (основной) и мелкоразмерный вирус (XSV) (вирус-помощник) (Qi и др., 2003; Romestand & Bonami, 2003). MrNV играет важную роль при возникновении вспышек болезней, хотя роль XSV в патогенности остается неясной. Штаммы еще не известны. MrNV принадлежит к семейству *Nodaviridae* (Bonami и др., 2005; Кинг и др., 2012). Вирус XSV является первым секвенированным спутниковым вирусом у животных, а также здесь представлен первый отчет о взаимосвязи нодавируса и вируса-спутника. (Bonami и др., 2005).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Данные относительно выживания вируса вне хозяина неизвестны, однако вирусный инокулят, приготовленный из гомогената ткани и хранившийся при температуре – 20 °С, вызвал 100% смертность у постличинок *M. rosenbergii* при погружении в воду (Qian и др., 2003; Sahul Nameed и др., 2004a).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Данные о стабильности возбудителя не известны. Однако в процессе термической обработки при 65°C в течение 2 часов инфекционность MrNV и XSV разрушалась при проведении экспериментов по заражению (Qian и др., 2003).

2.1.4. Жизненный цикл

Данные отсутствуют.

2.2. Факторы, связанные с хозяином

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды, которые соответствуют критериям для включения в список восприимчивых к заражению MrNV в соответствии с главой 1.5. Кодекса здоровья водных животных

(Водный кодекс), включают: гигантскую речную креветку (*Macrobrachium rosenbergii*).

2.2.2. Виды с неполным доказательством восприимчивости

Виды, для которых имеются неполные доказательства соответствия критериям для включения в список восприимчивых к заражению MrNV в соответствии с главой 1.5. Водного кодекса, включают: гигантскую креветку (*Penaeus vannamei*).

Кроме того, у следующих видов сообщалось о патоген-специфических положительных результатах полимеразной цепной реакции (ПЦР) (но не об активной инфекции): розовая королевская креветка (*Penaeus japonicus*), индийская белая креветка (*Penaeus indicus*), тигровая креветка (*Penaeus monodon*), стрекоза (*Aeshna* sp.), гигантский водяной клоп (*Belostoma* sp.), жук (*Cybister* sp.), backswimmer (*Notonecta* sp.), волосатая речная креветка (*Macrobrachium rude*), муссонная речная креветка (*Macrobrachium malcolmsonii*), рассольные креветки (*Artemia* sp.) и красноклешневый раков (*Cherax quadricarinatus*).

2.2.3. Восприимчивые стадии хозяина

Личинки, постличинки и ранняя молодь восприимчивы, тогда как взрослые особи резистентны (Qian и др., 2003; Sahul Hameed и др., 2004a).

2.2.4. Видовая или субпопуляционная предрасположенность (вероятность обнаружения)

Смертность не наблюдалась ни у естественно, ни экспериментально (MrNV/XSV) зараженных подвзрослых и взрослых особей креветок. Экспериментальные исследования подтвердили вертикальную передачу от зараженного маточного стада к постличинкам (Sudhakaran и др. al., 2007a).

2.2.5. Целевые органы и инфицированные ткани

Проявления MrNV и XSV ограничиваются жаберной тканью, мышцей головы, сердцем, мышцей живота, яичниками, плеоподами и мышцами хвоста, но не гепатопанкреасом или глазными пятнами (Sahul Hameed и др., 2004a; Sri Widada и др., 2003). Плеоподы являются подходящим источником РНК при проведении неразрушающего скрининга на MrNV и XSV (Sahul Hameed и др., 2004a).

2.2.6. Персистентные инфекции

Результаты экспериментального заражения указывают на длительную персистирующую инфекцию у взрослых особей, а также на возможность передачи MrNV от маточного стада личинкам и постличинкам (Sahul Hameed и др., 2004a; Sudhakaran и др., 2007a).

2.2.7. Векторы

Неизвестно.

2.3. Паттерн болезни

Сообщалось о высоком уровне превалентности инфекции MrNV у выращенных в инкубаторе личинок и постличинок *M. rosenbergii*.

2.3.1. Механизмы передачи

Виды передачи: вертикальная (через яйцеклетку) и горизонтальная (водный путь) (Qian и др., 2003; Sahul Nameed и др., 2004a; Sudhakaran и др., 2007a).

2.3.2. Превалентность

Превалентность варьируется от 10% до 100% в инкубаториях, питомниках и выростных хозяйствах (Arcier и др., 1999; Qian и др., 2003; Sahul Nameed и др., 2004a; Sahul Nameed и др., 2004b).

2.3.3. Географическое распределение

Болезнь впервые была зарегистрирована во Французской Вест-Индии (Arcier и др., 1999), позже в Китае (Народная Республика) (Qian и др., 2003), Индии (Sahul Nameed и др., 2004b), Китайском Тайбэе (Wang и др., 2008), Таиланде (Yoganandhan и др., 2006) и Австралии (Owens и др., 2009).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Личинки, постличинки и молодь *M. rosenbergii* очень чувствительны к заражению MrNV, что часто приводит к высокой смертности на этих этапах жизненного цикла. Смертность может достигать максимума примерно через 5 или 6 дней после появления первых грубых признаков. Очень немногие постличинки с инфекцией MrNV выживают после вспышки в течение более 15 дней, и выжившие постличинки могут вырасти до размера, соответствующего калибру торговых стандартов, как и любые другие обычные постличинки. Взрослые особи устойчивы к заражению MrNV, но выступают в качестве переносчиков инфекции (Qian и др., 2003; Sahul Nameed и др., 2004a).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Мало что известно об экологических факторах. Однако вспышки инфекции MrNV могут быть вызваны быстрыми изменениями солености, температуры и pH воды (Arcier и др., 1999; Qian и др., 2003).

2.4. Контроль и профилактика

Информация о контроле и профилактике заражения MrNV ограничена. Тем не менее, надлежащие профилактические меры, такие как скрининг маточных стад и постличинок, а также применение надлежащих практик управления могут помочь предотвратить заражение MrNV в системах выращивания креветок. Поскольку жизненный цикл *M. rosenbergii* завершается в контролируемых условиях, свободное от специфических патогенов (SPF) маточное стадо и постличинки могут быть получены путем скрининга с использованием чувствительных методов диагностики, таких как полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА) (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada и др., 2003; Yoganandhan и др., 2005).

2.4.1. Вакцинация

В настоящее время отсутствует.

2.4.2. Химиотерапия

О каких-либо известных химиотерапевтических средствах при заражении MrNV не сообщалось.

2.4.3. Иммуностимуляция

Отчеты относительно использования иммуностимуляторов при заражении MrNV отсутствуют.

2.4.4. Разведение резистентных популяций

Не сообщалось.

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

Сообщения о возникновении резистентных видов отсутствуют.

2.4.6. Блокирующие агенты

Не известно.

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Рекомендуются обычные процедуры для контроля вирусных болезней ракообразных. Например, применение формалина или йодофора помогает уничтожить вирус (Chen и др., 1992).

2.4.8. Общие аспекты практики разведения

В процессе экспериментального заражения была подтверждена возможность горизонтальной и вертикальной передачи MrNV в культуральные системы (Qian и др., 2003; Sahul Nameed и др., 2004a; Sudhakaran и др., 2007a). Соответствующие методы ведения хозяйства, такие как надлежащая дезинфекция резервуаров, воды и маточного стада, а также использование маточного поголовья, показавшего отрицательные результаты в ОТ-ПЦР в выростных прудах инкубаториев, могут быть использованы для предотвращения заражения MrNV в системах культивирования (Chen и др., 1992; Sri Widada и др., 2003; Sudhakaran и др., 2008a). Нет данных о том, что севооборот как с рисом, так и выращивание рыбы в поликультуре предотвращает заражение MrNV. Некоторые фермеры рассматривали либо смешанную культуру креветок (*P. monodon*) с *M. rosenbergii*, либо севооборот этих двух видов как жизнеспособную альтернативу для их существования и экономической жизнеспособности. Эта ситуация предполагает возможность передачи патологически значимых организмов от нативных к ненативным хозяевам, как это было отмечено Sudhakaran и др., 2006 и Рави и др., 2009 в своих исследованиях. Исходя из их результатов, представляется

целесообразным избегать смешивания культуры *M. rosenbergii* с *P. monodon* до принятия каких-либо профилактических мер в управлении инфекцией MrNV.

3. Отбор проб

3.1. Отбор индивидуальных образцов

На инфекцию MrNV указывает беловатое окрашивание мышц живота и хвоста (Arcier и др., 1999; Romestand & Bonami, 2003; Sahul Nameed и др., 2004b). Тем не менее, этот клинический признак не является специфическим для инфекции MrNV, и диагностика затруднена, особенно на ранних стадиях инфекции. Постличинки, пораженные инфекцией MrNV, имеют более молочную окраску и становятся непрозрачными. Обычно при появлении этого клинического признака наступает смерть; уровень смертности варьируется и достигает 95%. Наиболее пораженными тканями у умирающих постличинок/ранней молодежи являются поперечно-полосатые мышцы брюшка, головогруди и хвоста. Постличинки, мышцы которых имеют беловатый цвет, подходят для диагностических целей (Sahul Nameed и др., 2004a).

3.2. Сохранение образцов для последующего направления на исследования

Инфицированные личинки/постличинки с явными признаками беловатой мускулатуры в области брюшка отбирают в зоне вспышки болезни. Образцы промывают в стерильном физиологическом растворе, переносят в стерильные пробирки, транспортируют в лабораторию на сухом льду и хранят при -70°C до дальнейшего использования (Sahul Nameed и др., 2004b; Sri Widada и др., 2003; Yoganandhan и др., 2005). Замороженные образцы могут быть использованы для проведения реакции выделения и обнаружения вируса с помощью ОТ-ПЦР или ИФА (Romestand & Бонами, 2003). Образцы для обнаружения вируса методом ОТ-ПЦР можно транспортировать в лабораторию после фиксации в 70% этаноле (Sahul Nameed и др., 2004b; Sri Widada и др., 2003; Yoganandhan и др., 2005). Смотрите также Главу 2.2.0.

3.3. Объединение образцов в пулы

Оценка влияния объединения пробы на диагностическую чувствительность не проводилась, поэтому креветки бóльшего размера следует препарировать и исследовать отдельно. Однако образцы креветок, особенно на постличиночной стадии или особи весом менее 0,5 г, могут быть объединены для получения достаточного материала для молекулярных исследований. Крупные креветки необходимо препарировать по отдельности, так как влияние объединения на диагностическую чувствительность не оценивалось. См. также главу 2.2.0.

3.4. Наиболее подходящие для исследования органы или ткани

Предпочтительно использовать целое тело постличинки (Sahul Nameed и др., 2004b; Sri Widada и др., 2003; Yoganandhan и др., 2005). Все органы, кроме глазных стебельков и гепатопанкреаса, взрослой особи *M. rosenbergii* подходят для скрининга на вирус методом ОТ-ПЦР. Плеоподы (плавательные ноги) являются подходящим источником РНК при проведении неразрушающего скрининга на MrNV и XSV (Sahul Nameed и др., 2004a).

3.5. Не подходящие для исследования образцы/ткани

Глазные стебельки и гепатопанкреас взрослых особей креветок не подходят (Sahul Nameed и др., 2004a; Sri Widada и др., 2003).

4. Диагностические методы

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Инфицированные постличинки становятся непрозрачными и приобретают беловатую окраску, особенно в области брюшка. Помутнение появляется в первую очередь во втором или третьем сегменте брюшной полости и постепенно распространяется как спереди, так и сзади. В тяжелых случаях может произойти дегенерация тельсона и уропода. Смертность может достигать максимума примерно через 5 дней после появления первых явных признаков.

4.1.2. Изменения в поведении

Креветки на постличиночной стадии высоко восприимчивы к инфекции MrNV, и смертность достигает максимума примерно через 5 дней после появления беловатой окраски. Плавающий в резервуарах экзувий (сброшенный при линьке покров) имеет нездоровый вид и напоминает «слядяные хлопья» (Arcier и др., 1999). У инфицированных постличинок развивается анорексия и ухудшается способность плавания (Sahul Nameed и др., 2004a).

4.2. Клинические методы

4.2.1. Грубая патология

Для инфекции MrNV и XSV характерно потемнение мышц брюшной полости. Однако этот клинический признак не является патогномоничным.

4.2.2. Микроскопическая патология

Наиболее пораженной тканью у инфицированной постличинки является поперечно-полосатая мышца головогруди, брюшной полости и хвоста. Гистологические особенности включают в себя наличие острого ценкеровского некроза (описан Ценкером) поперечно-полосатых мышц, характеризующегося выраженной гиалиновой дегенерацией, некрозом и мышечным лизисом. Наблюдаются также умеренный отек и аномальные свободные участки среди пораженных мышечных клеток, а также наличие больших овальных или неправильной формы базофильных цитоплазматических телец-включений

в инфицированных мышцах (Arcier и др., 1999; Hsieh и др., 2006). Патогномичные овальные или неправильной формы базофильные цитоплазматические тельца-включения выявляют в тканях-мишенях с помощью гистологического исследования (Arcier и др., 1999; Се и др., 2006).

Присутствие MrNV в инфицированных клетках может быть выявлено в гистологических срезах с использованием DIG-меченого *in situ* гибридизационного ДНК-зонда, специфичного для MrNV. (Sri Widada и др., 2003).

4.2.3. Влажные препараты

Отсутствуют в настоящее время.

4.2.4. Мазки

Отсутствуют в настоящее время.

4.2.5. Электронная микроскопия / цитопатология

При использовании просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) инфицированные клетки выглядят некротическими с дезорганизованной цитоплазмой. ПЭМ-исследования показали, что в цитоплазме соединительных клеток и мышечных клеток присутствуют два типа непокрытых парасферических вирусных частиц разных размеров. Для MrNV характерны крупные вирусные частицы диаметром 26–27 нм, имеющие пять-шесть сторон. Меньшие вирусные частицы, схожие по структуре (от пяти до шести сторон), но диаметром 14–16 нм, характерны для XSV (Qian и др., 2003).

4.3. Методы выявления и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

Для обнаружения MrNV / XSV доступны методы диагностики на основе генома и антител (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada и др., 2003; Yoganandhan и др., 2005).

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Отсутствуют в настоящее время.

4.3.1.1.2. Мазки

Отсутствуют в настоящее время.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

См. раздел 4.2.2

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. *Культура клеток / искусственные среды*

MrNV/XSV может легко репродуцировать в клеточной линии комара *Aedes albopictus* C6/36 (Sudhakaran и др., 2007b), и эту клеточную линию можно легко культивировать в среде Лейбовица L-15, содержащей 100 международных единиц мл⁻¹ пенициллина, 100 мкг мл⁻¹ стрептомицина и 2,5 мкг мл⁻¹ фунгизона с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки при температуре 28°C. (Sudhakaran и др., 2007b). Было обнаружено, что клеточная линия C6/36 подходит для размножения этих вирусов, и репликация вируса была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР, окрашивания акридиновым оранжевым, тестов на инфекционность и электронной микроскопии. Специфический цитопатический эффект не наблюдался в клеточных линиях, инфицированных MrNV, но наблюдались множественные вакуолизации. Другие клеточные линии, а именно клеточная линия из ткани рыб ССН-1, частично поддерживали размножение этих вирусов (Hernandez-Herrera и др., 2007).

4.3.1.2.2. *Методы обнаружения антигенов на основе антител*

Основанные на антителах методы диагностики для MrNV включают ИФА, описанный Romestand & Bonami (Ravi и др., 2009) или сэндвич с тройным антителом (TAS) ELISA на основе моноклонального антитела (Qian и др., 2006).

4.3.1.2.2.1. *Протокол ИФА (Romestand & Bonami, 2003)*

- i) Инфицированные или здоровые образцы постличинок гомогенизируют в 0,5 мл фосфатно-буферного раствора (ФБР) и центрифугируют при 10 000 g в течение 15 минут. Супернатант собирают и хранят при температуре - 20 ° C для диагностических целей.
- ii) На ИФА планшеты наносят по 50 мкл образца супернатанта на лунку и инкубируют в течение ночи при температуре 4°C.
- iii) Блокируют 250 мкл 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФБР в течение 1 часа при температуре 37°C.
- iv) Добавляют 50 мкл антител класса G к вирусу MrNV (IgG анти-MrNV) с 1% БСА и инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре.
- v) Добавляют 50 мкл анти-мышинного IgG, конъюгированного с пероксидазой, в концентрации 0,4 мкг/мл и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.
- vi) Добавляют 50 мкл ортофенилендиамин хромогена в концентрации 0,4 мг/мл⁻¹ в субстратном буфере (лимонная кислота 0,1 М, ацетат натрия 0,1 М, pH 5,4, H₂O₂ в конечной концентрации 0,33%).
- vii) Реакцию останавливают через 15 минут, добавляя 25 мкл H₂SO₄ в каждую лунку.
- viii) С помощью ИФА планшет-ридера измеряют ОП (оптическую плотность) при 492 нм.

ПРИМЕЧАНИЕ: между каждым из вышеописанных этапов необходимо дважды промывать ФБР.

4.3.1.2.2.2. *Протокол TAS-ELISA (Qian и др., 2006)*

- i) ИФА планшеты сенсibiliзируют кроличьими поликлональными антителами к MrNV, инкубируют в течение 2 часов при температуре 37 °С и перед использованием хранят при 4 °С.
- ii) Блокируют 250 мкл 1% БСА в ФБР в течение 1 часа при температуре 37 °С.
- iii) Гомогенизируют инфицированные или здоровые образцы постличинок в 0,5 мл ФБР и центрифугируют при 10000 g в течение 15 минут. Супернатант собирают и хранят при -20 °С для диагностических целей.
- iv) Добавляют 100 мкл образца в каждую лунку и инкубируют в течение ночи при 4 °С.
- v) Добавляют 50 мкл моноклонального антитела к MrNV к 1% БСА, и инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре.
- vi) Добавляют 50 мкл анти-мышинного IgG, конъюгированного с пероксидазой, в концентрации 0,4 мкг/мл и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.
- vii) Добавляют 50 мкл ортофенилендиамин хромогена в концентрации 0,4 мг/мл⁻¹ в субстратном буфере (лимонная кислота 0,1 М, ацетат натрия 0,1 М, рН 5,4, H₂O₂ в конечной концентрации 0,33%).
- viii) Реакцию останавливают через 15 минут путем добавления 25 мкл H₂SO₄ в каждую лунку.
- ix) С помощью ИФА планшет-ридера измеряют ОП (оптическую плотность) при 492 нм.

ПРИМЕЧАНИЕ: между каждым из вышеописанных этапов необходимо дважды промывать ФБР.

4.3.1.2.3. *Молекулярные техники*

4.3.1.2.3.1. *Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)*

Во всех случаях рекомендуется протокол ОТ-ПЦР для обнаружения MrNV / XSV, разработанный Sri Widada и др., 2003, Sahul Хамид и др., 2004 и Sahul Nameed и др., 2004b. MrNV и XSV могут быть обнаружены с помощью ОТ-ПЦР отдельно с использованием определенного набора праймеров, или эти два вируса могут быть обнаружены одновременно с использованием одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР (Yoganandhan и др., 2005). Гнездовая ОТ-ПЦР (ОТ-гПЦР) также доступна и рекомендуется для скрининга маточного стада и племенного поголовья. (Sudhakaran и др., 2007a).

Экстракция общей РНК

- i) Отбирают 50 мг постличинок или 100 мг фрагмента органа (жаберная ткань, мышцы живота, хвостовая мышца или плеоподы) от взрослых креветок и гомогенизируют в 300 мкл буфера TN (20 мМ Трис/НСl, 0,4 М NaCl, рН 7,4).
 - ii) Гомогенат центрифугируют при 12000 g в течение 15 минут при
-

комнатной температуре и собирают супернатант.

- iii) Берут 150 мкл супернатанта и добавляют 1 мл Гризола. Тщательно перемешивают и инкубируют в течение 5 минут при комнатной температуре.
- iv) Через 5 минут к образцу добавляют 200 мкл хлороформа, хорошо перемешивают и центрифугируют при 12 000 g в течение 15 минут при комнатной температуре.
- v) Собирают водную фазу, переносят в свежую пробирку и осаждают РНК, смешивая с 500 мкл изопропанола.
- vi) Инкубируют образец в течение 10 минут при комнатной температуре и центрифугируют при 12000 g в течение 10 минут при 4 °С.
- vii) Растворяют осадок РНК в 50 мкл ТЕ-буфера (10 mM Трис/HCl, 1 mM ЭДТА [этилендиаминтетрауксусная кислота], pH 7,5) после промывания 75% этиловым спиртом.
- viii) Проводят количественное определение РНК путем измерения оптической плотности при 260 нм с использованием УФ-спектрофотометра и проверку чистоты путем измерения соотношения $OP_{260 \text{ нм}} / OP_{280 \text{ нм}}$

Протокол проведения ОТ-ПЦР

Для обнаружения MrNV и XSV описаны три метода ОТ-ПЦР. Первый протокол представляет собой одностадийную ОТ-ПЦР, адаптированную Sri Widada и др., 2003 и Sahul Hameed и др., 2004b, и этот метод может быть использован для подтверждения MrNV и XSV у креветок на постличиночной стадии, отобранных во время предполагаемых вспышек WTD. Второй протокол является чувствительным протоколом ОТ-гПЦР, описанным Sudhakaran и др., 2007a. Этот тест может быть использован для скрининга на вирусы здоровых постличинок, молоди и маточного стада. Третий протокол представляет собой мультиплексную процедуру ОТ-ПЦР, который был адаптирован у Yoganandhan и др., 2005. Он может использоваться для одновременного обнаружения MrNV и XSV при вспышках болезней или для скрининга племенного и маточного стада. Во всех описанных здесь протоколах используется коммерческий тест-набор ОТ-ПЦР, позволяющий осуществлять обратную транскрипцию и амплификацию в одной реакционной пробирке.

Протокол 1: ОТ-ПЦР для специфического выявления MrNV или XSV у зараженных постличинок или молоди креветок (Sahul Хамид и др., 2004b; Sri Widada и др., 2003; Sudhakaran и др., 2008b):

Следующие контроли должны быть включены в каждый анализ ОТ-ПЦР на MrNV или XSV: а) известный MrNV/XSV-отрицательный образец ткани; б) известный MrNV/XSV-положительный образец (ткань или очищенный вирус); и в) контроль «без матрицы».

Для ОТ-ПЦР используется коммерческий набор ОТ-ПЦР. Реакцию проводят в 50 мкл буфера ОТ-ПЦР, содержащего 20 пмоль каждого праймера,

специфичного для матрицы MrNV или XSV, и матрица РНК (10–100 нг), с использованием следующих циклов: ОТ при 52°C в течение 30 минут; денатурация при 95°C в течение 2 минут с последующими 30 циклами денатурации при 94°C в течение 40 секунд, отжигом при 55°C в течение 40 секунд и элонгацией при 68°C в течение 1 минуты, заканчивающимся дополнительной стадией элонгации в течение 10 минут при 68°C. Продукты ОТ-ПЦР анализируют с помощью электрофореза на 1% агарозном геле, окрашенном бромидом этидия и подходящим лестничным маркером ДНК, и обнаруживают с использованием ультрафиолетового трансиллюминатора.

На положительный результат реакции указывает продукт длиной 425 п.о. в случае MrNV и продукт длиной 546 п.о. в случае XSV. Чувствительность анализа составляет приблизительно 2,5 fg от общей РНК.

Последовательности ПЦР-праймеров для MrNV (температура отжига

55 °С; размер продукта 425 п.о.):

Вперед: 5'-GCG-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG-3'

Реверс: 5'-AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG-3'

Последовательности ПЦР-праймеров для XSV (температура отжига

55 ° С; размер продукта 546 п.о.):

Вперед: 5'-CGC-GGA-TCC-GAT-GAA-TAA-GCG-CAT-TAA-TAA-3 '

Реверс:5'-CCG-GAA-TTC-BKT-TAC-TGT-TCG-ГАГ-TCC-CAA-3'

Протокол 2: Гнездовая ОТ-ПЦР для обнаружения MrNV и XSV(Sudhakaran и др., 2007а)

Метод гнездовой ОТ-ПЦР является более чувствительным и подходящим для проведения скрининга племенного и маточного стада.(Sudhakaran и др., 2007а).

При проведении гнездовой ОТ-ПЦР, первый этап ОТ-ПЦР, как описано в протоколе 1, должен выполняться с использованием внешних праймеров, а гнездовая ПЦР должна выполняться с использованием продукта ОТ-ПЦР в качестве матрицы. Для проведения гнездовой ОТ-ПЦР, добавьте 2 мл продукта ОТ-ПЦР в пробирку для ПЦР, содержащую 20 мкл реакционной смеси (10 mM Трис / HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% Тритон X-100, 200 мкМ каждого dNTP, 20 пмоль каждого внутреннего праймера, 1,25 ед. термостабильной ДНК-полимеразы). Протокол ОТ-гПЦР для обоих вирусов предполагает начальную температуру 95°C в течение 10 минут, затем 30 циклов: в течение 1 минуты при 94°C, 1 минуты при 55°C и 1 минуты при 72°C с окончательной экстензией при 72°C в течение 5 минут. Анализируют продукты гнездовой ОТ-ПЦР с помощью электрофореза на 1% агарозном геле, окрашивают бромидом этидия и подходящим лестничным маркером ДНК и обнаруживают с использованием ультрафиолетового трансиллюминатора.

Если вирусная нагрузка достаточно высока, 425 п.о.-продукт будет амплифицирован для MrNV и 546 п.о.-продукт будет амплифицирован для XSV на первом этапе ПЦР. На этапе гПЦР продукт длиной 205 п.о. указывает на обнаружение MrNV, а продукт длиной 236 п.о. указывает на обнаружение XSV. Чувствительность обнаружения ОТ-гПЦР в ~ 1000 раз выше, чем в одностадийной ОТ-ПЦР.

Последовательность внешних праймеров для MrNV и XSV приведена в протоколе 1, а последовательность внутренних праймеров приведена ниже:
Последовательность внутренних праймеров для MrNV (температура отжига 55 ° C; размер продукта 205 п.о.):
Вперед: 5'-GAT-GAC-CCC-AAC-GTT-ATC-CT-3 '
Реверс: 5'-GTG-TAG-TCA-CTT-GCA-AGA-GG-3'

Последовательность внутренних праймеров для XSV (температура отжига 55°C; размер продукта 236 п.о.):
Вперед: 5'-ACA-TTG-GCG-GTT-GGG-TCA-TA-3 '
Реверс: 5'-GTG-CCT-GTT-GCT-GAA-ATA-CC-3'

Протокол 3: мультиплексный анализ ОТ-ПЦР для одновременного обнаружения MrNV и XSV (Yoganandhan и др., 2005):

Чтобы избежать необходимости проведения двух отдельных реакций ОТ-ПЦР, может быть выполнен модифицированный метод одновременного обнаружения MrNV и XSV методом однопробирочной одноэтапной мультиплексной ОТ-ПЦР. Реакцию проводят в 50 мл буфера для ОТ-ПЦР, содержащего 20 пмоль каждого праймера, специфичного для MrNV и XSV, и матрицы РНК (10–100 нг), используя следующие циклы: ОТ при 52 °C в течение 30 минут; денатурация при 95°C в течение 2 минут с последующими 30 циклами денатурации при 94°C в течение 40 секунд, отжигом при 55°C в течение 40 секунд и экстензией при 68°C в течение 1 минуты, заканчивающимся дополнительной стадией экстензии в течение 10 минут при 68°C. Анализируют продукты ОТ-ПЦР с помощью электрофореза на 1% агарозном геле, окрашивают бромидом этидия и соответствующим лестничным маркером ДНК и обнаруживают с использованием ультрафиолетового трансиллюминатора.

Если в образце присутствуют MrNV и XSV, то будут амплифицированы продукт длиной 681 п.о. для MrNV и продукт длиной 500 п.о. для XSV. Наличие как 681 п.о., так и 500 п.о.-продуктов указывает на присутствие MrNV и XSV. Чувствительность определения мультиплексной ОТ-ПЦР составляет приблизительно 25 фг общей РНК.

Последовательности праймеров для ПЦР для MrNV (температура отжига 55 °C; размер продукта 681 п.о.):
Вперед: 5'-GAT-ACA-GAT-CCA-CTA-GAT-GAC-C-3 '
Реверс: 5'-GAC-GAT-AGC-TCT-GAT-AAT-CC-3 '

Последовательности праймеров для ПЦР для XSV (температура отжига 55 ° C; размер продукта 500 п.о.):
Вперед: 5'-GGA-GAA-CCA-TGA-GAT-CAC-G-3 '
Реверс: 5'-CTG-CTC-ATT-ACT-GTT-CGG-AGT-C-3 '

Протокол 4: количественный анализ ОТ-ПЦР

Количественный анализ ОТ-ПЦР (ОТ-кПЦР) может быть выполнен для количественной оценки MrNV/XSV в инфицированных образцах с использованием зеленого красителя SYBR на основе метода, описанного

Hernandez-Herrera и др., 2007 и Чжан и др., 2006,

- i) Общую РНК экстрагируют из образцов в соответствии с процедурой, указанной выше.
- ii) Образцы РНК инкубируют при 37°C в течение 1 часа в смеси для ОТ (150 нг общей РНК, 8 мкл⁻¹ mM-MLV [вирус мышинного лейкоза Молони] ОТ в буфере, 20 нг мкл⁻¹ гексапримеров и 0,2 mM dNTP) для получения общей кДНК и количественного определения кДНК путем измерения поглощения при 260 нм.
- iii) Выполняют ОТ-кПЦР с использованием смеси для к-ПЦР (1 мкл кДНК [10 нг], 6 мкл стерильной воды, 0,5 мкл каждого праймера, специфичного для MrNV и XSV [концентрация 25 мкМ] и 2 мкл реакционной смеси, содержащей Fast Start Taq полимеразу, смесь для dNTP, краситель SYBR зеленый, 10 mM MgCl₂ и 1 мкл раствора красителя).
- iv) Программа ПЦР состоит из начальной активации Taq-полимеразы в течение 10 минут при 95°C, затем 40 циклов по 15 секунд при 95°C, 5 секунд при 60°C и 10 секунд при 72°C. Температура плавления будет измеряться при понижении температуры до 70°C в течение 30 секунд и постепенного нагревания до 95°C в течение 10 минут. Реакции отрицательного контроля должны содержать воду вместо матрицы кДНК в каждом цикле, чтобы гарантировать отсутствие вирусов.
- v) Количество копий вирусной кДНК в образце определяют с использованием анализатора Light Cycler.
Последовательности праймеров для ПЦР для MrNV (температура отжига 60 ° C; размер продукта 211 п.о.):
Вперед: 5'-AGG-ATC-CAC-TAA-GAA-CGT-GG-3 '
Реверс: 5'-CAC-GGT-CAC-AAT-CCT-TGC-G-3 '

Последовательности праймеров для ПЦР для XSV (температура отжига 58 ° C; размер продукта 68 п.о.):
Вперед: 5'-AGC-CAC-ACT-CTC-GCA-TCT-GA-3 '
Реверс: 5'-CTC-CAG-CAA-AGT-GCG-ATA-CG-3 '

4.3.1.2.3.2. Метод гибридизации *in-situ* (Sri Widada и др., 2003; Zsica и др., 2004)

- i) Инфицированные постличинки фиксируют в нейтрально-буферном модифицированном фиксаторе Дэвидсона без уксусной кислоты (РНК-соответствующий фиксатор) (Hasson и др., 1997).
 - ii) Заливают ткани в парафин в соответствии со стандартными процедурами (Bell & Lightner, 1988) и нарезают срезы толщиной 7 мкм. Срезы помещают на положительно заряженные предметные стекла микроскопа.
 - iii) Слайды высушивают в печи при 60°C. Удаляют парафин и регидратируют путем проведения серий превращения этанола в воду.
 - iv) Срезы инкубируют дважды в течение 5 минут с Трис/НСl, обработанным диэтилпиноксикарбонатом (DEPC) (0,2 М, рН 7,4), и затем в течение 10 минут с трис/НСl, обработанным DEPC, содержащим 100 мМ глицина.
 - v) Срезы обрабатывают в течение 5 минут при 37°C с помощью ТЕ-буфера (10 мМ Трис/НСl, 5 мМ ЭДТА, рН 8,0), содержащего 10 мкг мл⁻¹ РНКаз-
-

свободной протеиназы К.

- vi) Срезы постфиксируют DEPC-обработанным ФБР, содержащим 4% формальдегида, в течение 5 минут.
- vii) Срезы ацетируют в течение 10 минут 0,1 М триэтаноламиновым (ТЭА) буфером, pH 8, содержащим 0,25% (об. / об.) уксусного ангидрида.
- viii) После дегидратации инкубируют предметные стекла при 42°C в течение 16 часов во влажной камере с гибридизационным буфером, содержащим 40% деионизированного формамида, 10% декстрансульфата, 1 × раствор Денхарта, 4 × SSC (стандартный солевой цитрат), 10 мМ дитиотреитола (ДТТ), 1 мг мл⁻¹ дрожжевой tРНК, 1 мг мл⁻¹ денатурированной и расщепленной ДНК спермы лосося и 40 нг мл⁻¹ денатурированной дигоксигенин-меченой ДНК-зонда, специфичной для MгNV.
- ix) Слайды промывают при 37 ° С в течение 10 минут с 1 × SSC, в течение 10 минут с 0,5 × SSC и в течение 5 минут дважды с буфером III (100 мМ Трис/НСl [pH 7,5], 150 мМ NaCl).
- x) Инкубируют в течение 20 минут в буфере IV (буфер III, 1% нормальная сыворотка козы) при комнатной температуре.
- xi) Слайды инкубируют в течение 1 часа во влажной камере с буфером III, содержащим 1% нормальной сыворотки козы и 0,1% овечьей анти-DIG щелочной фосфатазы.
- xii) Слайды последовательно промывают три раза буфером III в течение 10 минут и дважды буфером V в течение 5 минут (100 мМ Трис/НСl [pH 9,5], 100 мМ NaCl, 50 мМ MgCl₂).
- xiii) Реакцию продолжают, инкубируя слайды в буфере V, содержащем NBT и BCIP, в темной и влажной камере в течение минимум 2 часов или в течение ночи. Реакцию останавливают, инкубируя слайды в буфере III 2× в течение 15 минут.
- xiv) Слайды сенсibiliзируют 1% -ным коричневым бисмарком, закрепляют покровным стеклом и осматривают с помощью светлопольного микроскопа.
- xv) Положительная гибридизация проявляется в виде темно-синего или черного осадка на фоне желтого до коричневого оттенка.

4.3.1.2.3.3. Петлевая изотермическая амплификация (Haridas и др., 2010; Pillai и др., 2006; Puthawibool и др., 2010)

Haridas и др., 2010, а также Pillai и др., 2006 применили петлевую изотермическую амплификацию (LAMP) для быстрой диагностики MгNV и XSV у пресноводной креветки. Набор из четырех праймеров (двух внешних и двух внутренних) был отдельно разработан для обнаружения MгNV и XSV. Кроме того, для ускорения реакции LAMP была использована пара петлевых праймеров, специфичных для MгNV и XSV.

- i) Экстрагирование суммарной РНК из образцов было проведено в соответствии с процедурой, указанной выше.
 - ii) В реакционной смеси проводят реакцию RT-LAMP (2 мкМ каждого из внутренних праймеров FIP и BIP, 0,2 мкМ каждого из внешних праймеров
-

F3 и В3, 1400 мкМ смеси dNTP, 0,6 М бетаина, 6 мМ MgSO₄, 8 ед. Bst ДНК-полимеразы вместе с 1 × поставляемым буфером, 0,125 ед. РТазы AMV и указанное количество матрицы РНК в конечном объеме 25 мкл) при температуре 55, 60, 63 и 65°C для каждого с последующей инактивацией путем нагревания при 80°C в течение 2 минут для прекращения реакции. Неинфицированные образцы и реакционная смесь без матрицы служат отрицательным контролем.

- iii) Проводят анализ продуктов LAMP с помощью электрофореза на 2% агарозном геле, окрашивание бромидом этидия и подходящим лестничным маркером ДНК и осуществляют детекцию с использованием ультрафиолетового трансиллюминатора.
- iv) Амплификацию ДНК можно обнаружить без использования электрофореза в агарозе, добавив 1,0 мкл 10% разбавленного зеленого SYBR к реакционной смеси и наблюдая за изменением цвета.

4.3.1.2.3.4. Секвенирование

Для подтверждения предполагаемых новых хозяев MrNV/XSV фрагмент ДНК, амплифицированный из ПЦР, должен быть секвенирован в соответствии со стандартными протоколами. (Sambrook и Russell, 2001).

4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

MrNV и XSV могут быть очищены в соответствии с протоколом, описанным Wonam и др., 2005. Подробная процедура очистки вируса приведена ниже:

- i) Отбирают достаточное количество зараженных постличинок и гомогенизируют в ФБР (рН 7,4), измельчая ткани блендером.
- ii) Центрифугируют при 10 000 g в течение 25 минут при температуре 4 ° С. Супернатант собирают и снова центрифугируют при 160000 g в течение 4 часов при температуре 4 °С.
- iii) Суспендируют осадок в ФБР и экстрагируют два или три раза с фреоном (1,1,2-трихлор-2,2,1-трифторэтан).
- iv) Собирают водный слой и центрифугируют при 160 000 g в течение 4 часов при температуре 4 ° С.
- v) Суспендируют осадок в буфере TN и разделяют два вируса 15–30% (вес/объем в ФБР) градиентом сахарозы с последующим градиентом CsCl.
- vi) Оценивают уровень очистки вирусов с помощью ПЭМ, используя сетки с коллоидно-углеродным покрытием, отрицательно окрашенные 2% ФВК (фосфорновольфрамовой кислоты), рН 7,0.

4.3.2. Серологические методы

Не разработаны.

5. Рейтинг тестов по назначению

Методы, доступные в настоящее время для целевого наблюдения и диагностики инфекции MrNV, перечислены в таблице 5.1. Обозначения, используемые в таблице, указывают на

следующее: a = метод является рекомендуемым методом в силу доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с надлежащей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод имеет применение в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы серьезно ограничивают его применение; и d = метод в настоящее время не рекомендуется для этой цели. Обозначения несколько субъективны, так как параметр соответствия включает вопросы надежности, чувствительности, специфичности и полезности. Поскольку не все тесты, перечисленные как категории a или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы целевого надзора и диагностики MrNV

Метод	Целевой надзор				Предполагаемый диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	Постличинки	Молодь	Взрослые особи		
Явные признаки	d	c	c	d	c	d
Биоанализ	d	c	d	d	c	c
Прямой СМ	d	c	c	d	c	c
Гистопатология	d	c	c	c	b	b
Трансмиссия ЭМ	d	d	d	d	d	a
Анализы на основе антител	d	c	d	d	b	b
<i>In-situ</i> ДНК-зонды	c	b	b	c	a	a
ОТ-ПЦР в реальном времени, ОТ-ПЦР	a	a	a	a	a	a
Секвенирования	d	d	d	a	d	a

PLs = постличинки; СМ = световая микроскопия; ЭМ = электронная микроскопия; ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

- 6. Тест (ы), рекомендуемые для целевого надзора, с целью объявления свободы от инфекции нодавирусом *Macrobrachium rosenbergii* (болезнь белого хвоста).**

Методом целевого надзора с целью объявления свободы от MrNV является гнездовая ОТ-ПЦР.

- 7. Подтверждающие диагностические критерии**

7.1. Определение случая подозрения

Наличие инфекции MrNV подозревают, если соответствие хотя бы одному из следующих критериев:

- i) клинические признаки соответствуют инфекции MrNV или
- ii) гистопатология соответствует инфекции MrNV или
- iii) положительный результат при ОТ-ПЦР или
- iv) положительный результат ОТ-ПЦР в реальном времени.

7.2. Определение подтвержденного случая

Заражение MrNV считается подтвержденным, если выполнены два или более из следующих критериев:

- i) гистопатологические признаки соответствуют инфекции MrNV
- ii) положительный результат в реакции in-situ гибридизации (ISH) на тканях-мишенях
- iii) ОТ-ПЦР (с последующим секвенированием).
- iv) ОТ-ПЦР в реальном времени.

8. Список литературы

ARCIER J.-M., HERMAN F., LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.R. (1999). A viral disease

associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 177–181.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1–114.

BONAMI J.R., SHI Z., QIAN D. & SRI WIDADA J. (2005). White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. *J. Fish Dis.*, **28**, 23–31.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of monodon baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

HARIDAS D.V., PILLAI D., MANOJKUMAR B., NAIR C.M. & SHERIEF P.M. (2010). Optimisation of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus in *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Virol. Methods*, **167**, 61–67.

HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA friendly fixative for

the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.

HERNANDEZ-HERRERA R.I., CHAPPE-BONNICHON V., ROCH P., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2007). Partial susceptibility of the SSN-1 fish cell line to a crustacean virus: a defective replication study. *J. Fish Dis.*, **30**, 673–679.

HSIEH C.Y., WU Z.B., TUNG M.C., TU C., LO S.P., CHANG T.C., CHANG C.D., CHEN S.C., HSIEH Y.C. & TSAI S.S. (2006). *In situ* hybridization and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **29**, 665–671.

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. Academic Press, San Diego, USA, p.1327.

OWENS L., LA FAUCE K., JUNTUNEN K., HAYAKIJKOSOL O. & ZENG C. (2009). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus disease (white tail disease) in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 175–180.

PILLAI D., BONAMI J.R. & SRI WIDADA J. (2006). Rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus (*XSV*), the pathogenic agents of white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), by loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **29**, 275–283.

PUTHAWIBOOL T., SENAPIN S., FLEGEL T.W. & KIATPATHOMCHAI W. (2010). Rapid and sensitive detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawns by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Molecular Cellular Probes*, **24**, 244–249.

QIAN D., LIU W., JIANXIANG W. & YU L. (2006). Preparation of monoclonal antibody against *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus and application of TAS-ELISA for virus diagnosis in post-larvae hatcheries in east China during 2000–2004. *Aquaculture*, **261**, 1144–1150.

QIAN D., SHI Z., ZHANG S., CAO Z., LIU W., LI L., XIE Y., CAMBOURNAC I. & BONAMI J.R. (2003). Extra small virus-like particles (*XSV*) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Fish Dis.*, **26**, 521–527.

RAVI M., NAZEER BASHA A., SARATHI M., ROSA IDALIA H.H., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2009). Studies on the occurrence of white tail disease (WTD) caused by *MrNV* and *XSV* in hatchery-reared post-larvae of *Penaeus indicus* and *P. monodon*. *Aquaculture*, **292**, 117–120.

RAVI M., NAZEER BASHA A., TAJU G., RAM KUMAR R. & SAHUL HAMEED A.S. (2010). Clearance of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus (*XSV*) and immunological changes in experimentally injected *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol.*, **28**, 428–433.

- ROMESTAND B. & BONAMI J.R. (2003). A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of *MrNV* in the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *J. Fish Dis.*, **26**, 71–75.
- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004a). Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and its associated small virus (*XSV*). *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 191–196.
- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004b). Studies on the occurrence of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *M. rosenbergii* in India by RT-PCR detection. *Aquaculture*, **238**, 127–133.
- SAMBROOK J. & RUSSELL D.W. (2001). Chapter 12 DNA Sequencing. *In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Editions*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, USA, 1–120.
- SRI WIDADA J., DURAND S., CAMBOURNAC I., QIAN D., SHI Z., DEJONGHE E., RICHARD V. & BONAMI J.R. (2003). Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. *J. Fish Dis.*, **26**, 583–590.
- SUDHAKARAN R., HARIBABU P., RAJESH KUMAR S., SARATHI M., ISHAQ AHMED V.P., SARATH BABU V., VENKATESAN C. & SAHUL HAMEED A.S. (2008a). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus (*XSV*). *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 141–145.
- SUDHAKARAN R., ISHAQ AHMED V.P., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2007a). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus (*XSV*) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *J. Fish Dis.*, **30**, 27–35.
- SUDHAKARAN R., PARAMESWARAN V. & SAHUL HAMEED A.S. (2007b). *In vitro* replication of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus (*XSV*) in C6/36 mosquito cell line. *J. Virol. Methods*, **146**, 112–118.
- SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., GOPAL C. & SAHUL HAMEED A.S. (2006). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus (*XSV*) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*, **257**, 136–141.
- SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., RAJESH KUMAR S., SARATHI M. & SAHUL HAMEED A.S. (2008b). Cloning and sequencing of capsid protein of Indian isolate of extra small virus from *Macrobrachium rosenbergii*. *Virus Res.*, **131**, 283–287.
-

WANG C.S., CHANG J.S., WEN C.M., SHIH H.H. & CHEN S.N. (2008). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in *M. rosenbergii* (de Man) with white tail disease cultured in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **31**, 415–422.

YOGANANDHAN K., LEARTVIBHAS M., SRIWONGPUK S. & LIMSUWAN C. (2006). White tail disease of the giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand. *Dis. Aquatic. Org.*, **69**, 255–258.

YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2005). Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. *J. Fish Dis.*, **28**, 65–69.

ZHANG H., WANG J., YUAN J., LI L., ZHANG J., BONAMI J.R. & SHI Z. (2006). Quantitative relationship of two viruses (*MrNV* and *XSV*) in white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 11–17.

ZSIKLA V., BAUMANN M. & CATHOMAS G. (2004). Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *J. Clin. Pathol.*, **57**, 654–656.

*

**

NB: В настоящее время референтная лаборатория МЭБ по инфекции нодавирусом *Macrobrachium rosenbergii* (болезнь белого хвоста) отсутствует (см. Таблицу в конце данного *Руководства по водным болезням* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2009 ГОДУ; ПОСЛЕДНИЕ ОБНОВЛЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2017 ГОДУ.
