

## ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ СИНДРОМА ТАУРА

---

### 1. Предмет рассмотрения

Инфекция вирусом синдрома Таура обозначает заражение патогенным возбудителем – вирусом синдрома Таура (TSV), род *Aparavirus*, семейство *Dicistroviridae*, отряд *Picornavirales*.

### 2. Описание болезни

#### 2.1. Факторы о возбудителе

##### 1.1.1. Этиологический агент, штаммы возбудителя

TSV описан в качестве причины болезни, общеизвестной как синдром Таура, *Vonami с соавт.* (Vonami с соавт., 1997) и *Mari с соавт.* (Mari с соавт., 1998; Mari с соавт., 2002). На основании секвенирования гена, кодирующего VP1, самого большого и предположительно преобладающего из трех основных структурных белков вируса, документально подтверждено не менее четырех генотипов (штаммов) TSV. На основании вариаций последовательностей VP1 эти генотипические последовательности следующие: 1) американская группа; 2) юго-восточно-азиатская группа; 3) белизская группа; и 4) венесуэльская группа (Chang с соавт., 2004; Erickson с соавт., 2002; Erickson с соавт., 2005; Nielsen с соавт., 2005; Tang & Lightner, 2005; Wertheim с соавт., 2009).

Не менее двух различных антигенных вариантов выявлено согласно их дифференциальной реактивности на моноклональное антитело MAb 1A1, выработанное против референтного изолята из Северной и Южной Америки (TSV USA-NI94 – GenBank AF277675) (Mari с соавт., 2002; Poulos с соавт., 1999): Тип А представляет те из них, которые реагируют на MAb 1A1 (в твердофазном иммуноферментном анализе [ИФА], вестерн-блоттинге и иммуногистохимическим анализе [ИНС] с инфицированными тканями), и те, которые не реагируют. Нереагирующие на MAb 1A1 были подразделены на Тип В (TSV 98 Sinaloa, Mexico) и Тип С (TSV 02 Belize) на основании видов хозяев и вирулентности. Все изоляты TSV из Северной и Южной Америки и большинство, если не все, юго-восточно-азиатские генотипы вступают в реакцию с MAb 1A1. Прямо противоположно, никто из группы белизского генотипа не реагирует на MAb 1A1 (Erickson с соавт., 2002; Erickson с соавт., 2005), так же как и изолят TSV, выделенный на фермах по разведению креветок в Венесуэле во время эпизоотии 2005 года.

Частицы TSV имеют 32 нм в диаметре, представляют собой безоболочечные двенадцатигранники и имеют плавучую плотность 1,338 г мл<sup>-1</sup> в CsCl. Геном TSV состоит из линейной, положительно-полярной одноцепочечной РНК длиной 10 205 нуклеотидов, за исключение поли-А хвоста на 3'-конце, и он содержит две большие

открытые рамки считывания (ORF). ORF 1 содержит мотивы неструктурных белков, таких как хеликаза, протеаза и РНК-зависимая РНК-полимераза. ORF 2 содержит последовательности структурных белков TSV, включая три основных капсидных белка VP1, VP2 и VP3 (55, 40, и 24 кДа, соответственно). Вирус реплицируется в цитоплазме клеток хозяина (Bonami с соавт., 1997; Mari с соавт., 1998; Mari с соавт., 2002; Robles-Sikisaka с соавт., 2001).

*Другие регистрируемые случаи синдрома Таура:* Синдром Таура в Эквадоре изначально связывали с контаминацией ферм по разведению креветок фунгицидами, что являлось предметом спора, который поддерживался судебным разбирательством в течение ~ 16 лет, до того как было научно подтверждена вирусная этиология болезни (Bonami с соавт., 1997; Hasson с соавт., 1995; Lightner, 2005). Таким образом, некоторые авторы опубликованных статей предлагают токсическую этиологию синдрома Таура (с соавт., 1997; Jimenez, 1992; Jimenez с соавт., 2000).

### **1.1.2. Выживаемость вне хозяина**

Информация отсутствует.

### **2.1.1. Устойчивость возбудителя (эффективные методы инактивации)**

Информация отсутствует.

### **2.1.2. Жизненный цикл**

Неприменимо.

## **2.2. Факторы о хозяевах**

### **2.2.1. Восприимчивые виды хозяев**

Виды, отвечающие критериям для перечисления в качестве восприимчивых к инфекции TSV согласно положениям Главы 1.5. *Кодекса по водным животным (Водный кодекс)*, включают следующие: толстоспинная креветка (*Metapenaeus ensis*), северная коричневая креветка (*Penaeus aztecus*), гигантская тигровая креветка (*P. monodon*), северная белая креветка (*P. setiferus*), голубая тигровая креветка (*P. stylirostris*) и белоногая креветка (*P. vannamei*).

### **2.2.2. Виды, в отношении которых недостаточно данных о восприимчивости**

Виды, в отношении которых недостаточно данных о восприимчивости к инфекции TSV согласно положениям Статьи 1.5. *Водного кодекса*, включают следующие: китайская белая креветка (*Penaeus chinensis*), гигантская пресноводная креветка (*Macrobrachium rosenbergii*), веслоногий рак (*Ergasilus manicatus*), и усконогие раки (*Chelonibia patula* и *Octolasmis muelleri*).

Кроме того, у следующих видов регистрировали положительные патоген-специфичные результаты полимеразной цепной реакции (ПЦР), но активной

инфекции не демонстрировали: северная розовая креветка (*Penaeus duorarum*), курума (*Penaeus japonicus*), южная белая креветка (*Penaeus schmitti*), гольф-киллифиш (*Fundulus grandis*), голубой краб (*Callinectes sapidus*), крабы (*Uca vocans* и *Sesarma mederi*), и мангровый краб (*Scylla serrata*).

### **2.2.3. Стадии восприимчивости хозяина**

Инфекция TSV документально описана на всех стадиях жизненного цикла (т.е. постличиночная стадия (ПЛ), молодь и взрослые особи) *P. vannamei* кроме икры, зигот и личинок (Lightner, 1996a).

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

Все постличиночные стадии *P. vannamei*, а также популяции других известных восприимчивых видов.

### **2.2.5. Органы-мишени и инфицированные ткани**

TSV инфицирует, а также, как продемонстрировано, реплицируется в кутикулярном эпителии (или гиподерме) основного экзоскелета, передней кишки, задней кишки, жабр и конечностей, и зачастую в соединительных тканях, гемопоэтических тканях, лимфоидных органах (ЛО) и антеннальной железе. В брюшных органах (эндодермальный эпителий слизистой гепатопанкреаса, средней кишки и слепого отростка средней кишки), а также в гладкой, сердечной и поперечно-полосатой мускулатуре и в вентральном нервном столбе, его ответвлениях и ганглиях обычно не проявляются гистологические признаки инфекции TSV, и они обычно отрицательны в ISH (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Hasson с соавт., 1997; Hasson с соавт., 1999a; Hasson с соавт., 1999b; Jimenez с соавт., 2000; Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a; Lightner & Redman, 1998b; Lightner с соавт., 1995; Srisuvan с соавт., 2005).

### **2.2.6. Персистентная инфекция**

Некоторые представители популяций *P. vannamei* или *P. stylirostris*, которые выживают после заражения TSV могут носить вирус в течение всей жизни (Hasson с соавт., 1999a; Hasson с соавт., 1999b) и, несмотря на то, что это документально не подтверждено, считается, что они передают вирус своему потомству посредством вертикальной передачи.

### **2.2.7. Векторы**

*Морские птицы:* Продемонстрировано, что TSV остается инфекционным до 48 часов (после поедания тушек инфицированной TSV креветки) в фекалиях, переносимых дикими или отловленными чайками (*Larus atricilla*) и курами (*Gallus gallus*, используемые в качестве лабораторного заменителя всех поедающих креветки птиц), что позволяет предположить, что вирус может сохранять инфекционность при прохождении через желудочно-кишечную систему всех видов птиц. Эти результаты подразумевают, что птицы являются важным вектором передачи вируса на инфицированных фермах и в регионах разведения (Garza с

соавт., 1997; Vanpatten с соавт., 2004).

*Водные насекомые:* гребляк (*Trichocorixa reticulata* [Corixidae], водное насекомое, которое питается тушками креветок в прудах, где разводят креветок) также описан в качестве механического вектора (Brock, 1997; Lightner, 1995, Lightner, 1996a, Lightner, 1996b).

## 2.3. Паттерн болезни

Инфекция TSV наиболее известна как болезнь *P. vannamei* в фазе выращивания, которая возникает в период с ~14 по 40 день содержания постличинок в выростных прудах или резервуарах. Таким образом, креветки, инфицированные TSV, - обычно небольшая молодь массой от ~0.05 г до <5 г. Более крупные креветки также могут быть поражены, особенно если они не подвергались воздействию вируса до момента подростой молодежи или взрослого состояния (Brock, 1997; Brock с соавт., 1995; Lightner, 1996a, Lightner, 1996b; Lotz, 1997b).

### 2.3.1. Механизмы передачи

Горизонтальные или вертикальные пути передачи. Доказана горизонтальная передача за счет каннибализма или с контаминированной водой (Brock, 1997; Hasson с соавт., 1995; Lightner, 1996a, Lightner, 1996b; White с соавт., 2002). Имеются серьезные основания подозревать вертикальную передачу, но она пока экспериментально не подтверждена.

### 2.3.2. Превалентность

В регионах, где вирус энзоотичен в разводимых на фермах популяциях, превалентность инфекции TSV, выявленная в ходе различных обследований, составляет от 0 до 100% (Brock, 1997; Jimenez с соавт., 2000; Laramore, 1997).

### 2.3.3. Географическое распространение

В настоящее время TSV широко распространен в регионах по разведению креветок в Северной и Южной Америке, Юго-Восточной Азии и на Среднем Востоке (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Brock, 1997; Chang с соавт., 2004; Hasson с соавт., 1999a; Lightner, 1996a, Lightner, 1996b; Lightner с соавт., 2012; Lotz с соавт., 2005; Nielsen с соавт., 2005; Tang & Lightner, 2005; Tu с соавт., 1999; Yu & Song, 2000; Wertheim с соавт., 2009).

*Северная и Южная Америка:* после того, как в 1992 году синдром Таура были признаны особой болезнью культивируемой *P. vannamei* в Эквадоре (Brock с соавт., 1995; Jimenez, 1992; Lightner с соавт., 1995), за счет транспортировки инфицированных постличинок и маточного стада TSV быстро распространился по многим регионам Северной и Южной Америки, где выращивают креветки (Brock, 1997; Brock с соавт., 1997; Hasson с соавт., 1999a; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Lightner с соавт., 2012). Инфекцию TSV регистрируют практически в любой стране Северной и Южной Америки и на Гавайях, где выращивают пенеидных креветок (Aguirre Guzman & Ascencio Valle, 2000; Brock, 1997; Lightner, 2011; Lightner с

соавт., 2012; Robles-Sikisaka с соавт., 2001). TSV энзоотичен в популяциях культивируемой креветки на Тихоокеанском побережье Северной и Южной Америки от Перу и до Мексики, и его иногда выявляют в некоторых диких популяциях *P. vannamei* в этом же регионе (Lightner & Redman, 1998a; Lightner с соавт., 1995). TSV также регистрируют в аквакультурных популяциях пенеидных креветок на побережье Атлантики, Карибского моря и Мексиканского залива в Северной и Южной Америке, также его регистрируют в популяциях дикой креветки в этих же регионах (Hasson с соавт., 1999a; Lightner, 1996a; Lightner, 2005; Lightner, 2011; Lightner с соавт., 2012).

*Азия и Средний Восток:* Инфекция TSV была занесена из Китайского Тайбэя в 1999 году с инфицированной импортной тихоокеанской белой креветкой, *P. vannamei*, поступившей из источников в Центральной и Южной Америке (Tu с соавт., 1999; Yu & Song, 2000). С момента данного первоначального заноса за счет перемещения маточных стад и постличинок вирус распространился в Китае, Малайзии и Индонезии, где он стал причиной крупномасштабных эпизоотий с высокими уровнями смертности в инфицированных популяциях *P. Vannamei*, где не проведена селекция на предмет резистентности (Chang с соавт., 2004; Nielsen с соавт., 2005; Tang & Lightner, 2005; Lightner, 2011). В течение 2010 и 2011 гг. инфекцию TSV связывали со значительной смертностью аквакультурной *P. indicus* в Саудовской Аравии (Wertheim с соавт., 2009). По результатам филогенетического анализа, основанного на последовательности вирусного капсидного белка 2 (также называемом VP1), TSV из Саудовской Аравии объединили в новую, отдельную группу (Tang с соавт., 2012; Wertheim с соавт., 2009).

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

Во время вспышек инфекции TSV на уровне фермы в не подвергавшихся селекции на предмет резистентности популяциях *P. Vannamei*, которая является основным видом хозяев TSV, типичный совокупный уровень смертности колеблется в пределах от 40 до >90% в выращиваемых популяциях постличинок, молоди и подросшей молоди. Существуют TSV-резистентные линии *P. vannamei*, которые демонстрируют уровень выживаемости до 100% при лабораторном контрольном заражении TSV всех четырех генотипов (Lightner с соавт., 2009; Moss с соавт., 2001).

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

Вспышки инфекции TSV наиболее часты при уровнях солености воды ниже 30 частей на триллион (Jimenez с соавт., 2000).

### **2.4. Контроль и профилактика**

#### **2.4.1. Вакцинация**

Эффективные вакцины против TSV отсутствуют.

#### **2.4.2. Химиотерапия**

Научно-подтвержденные сообщения об эффективности химиотерапии отсутствуют.

### **2.4.3. Стимуляция иммунитета**

Научно-подтвержденные данные об эффективных иммуностимулирующих обработках отсутствуют.

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

После того, как в 1992–1994 гг. синдром Таура появился в Эквадоре, были выявлены *P. stylirostris*, которые обладали резистентностью к инфекции TSV (гентопа 1, MAб 1A1 Типа А). Исходя из этого открытия и вследствие возникновения болезни в Мексике в 1994 г., где она вызвала снижение сборов *P. vannamei*, с 1995 года отобранные линии TSV-резистентных *P. stylirostris* стали доминантными креветками, выращиваемыми на фермах в западной Мексике. Однако в 1998–1999 гг. появился новый «штамм» TSV, и он вызвал массивные эпизоотии среди *P. stylirostris* (Тип В; Erickson с соавт., 2002; Fegan & Clifford, 2001; Lightner, 1999; Lightner, 2005; Zarain-Herzberg & Ascencio-Valle, 2001). За появлением этого нового «штамма» вскоре (в конце 1999 г.) последовал занос вируса синдрома белых пятен (WSSV) на фермы по разведению креветок в западной Мексике, к которому у *P. stylirostris* отсутствовала резистентность, что фактически привело к прекращению любой заинтересованности в культивировании *P. stylirostris* в Мексике.

Выращены TSV-резистентные одомашненные популяции *P. vannamei* и *P. stylirostris*. Некоторые одомашненные линии TSV-резистентных *P. vannamei* (которые также свободны от TSV) широко распространены в секторе промышленного выращивания креветки в Северной и Южной Америке и в Юго-Восточной Азии (Clifford, 1998; Moss с соавт., 2001; White с соавт., 2002). После появления инфекции TSV в Центральной Америке повышенная резистентность к TSV регистрировалась у постличинок промысловой дикой *P. Vannamei*, используемых для заселения ферм по разведению креветок в регионе (Laramore, 1997).

### **2.4.5. Замена на резистентные виды**

Выращены отобранные линии TSV-резистентных *P. vannamei*, которые есть в продаже (Clifford, 1998, Laramore, 1997, Moss с соавт., 2001, White с соавт., 2002).

### **2.4.6. Блокирующие агенты**

Резистентность к инфекции TSV регистрировали посредством экспрессии антисмысловой РНК белка оболочки TSV в зиготах *P. vannamei*. Трансгенная молодь, выращенная из защищенных таким образом зигот, продемонстрировала повышенную резистентность при контрольном заражении TSV перорально или внутримышечно (Lu & Sun, 2005). Аналогичные результаты были получены при инъекции последовательностей короткой случайной двуцепочечной интерферирующей РНК молоди *P. vannamei* (Robalino с соавт., 2004).

#### **2.4.7. Дезинфекция икры и личинок**

Несмотря на отсутствие опубликованных данных, подтверждающих данный путь передачи, существует вероятность вертикальной передачи TSV (трансовариальная передача). Дезинфекция икры и личинок (Chen с соавт., 1992) является надлежащей практикой содержания и рекомендуется в связи с ее потенциальной способностью снизить контаминацию отложенной икры и полученных из нее личинок TSV.

#### **2.4.8. Общие стратегии содержания**

Некоторые стратегии содержания и контроля болезни и управления ее течением успешно применяются для снижения риска заражения TSV, возникающего в ходе выращивания на ферме. Они включают применение ПЦР для предварительного скрининга выращенного в прудах маточного стада или вымеченной икры/науплий и отбраковку особей, продемонстрировавших положительные результаты тестов на вирус (Fegan & Clifford, 2001), опустошение целых регионов культивирования и введение свободных от TSV популяций (Dixon & Dorado, 1997), а также выведение популяций свободных от специфических патогенов (СПФ) креветок *P. vannamei* и *P. stylirostris* (Lightner, 1996b; Lightner, 2005; Lotz с соавт., 1995; Moss с соавт., 2001; Pruder в соавт., 1995; Wyban, 1992; в соавт., 2004). Признано, что применение последней технологии (СПФ-популяции) является одной из наиболее успешных стратегий содержания и контроля инфекции TSV.

### **3. Пробоотбор**

#### **3.1. Выбор индивидуальных образцов**

Образцы, подходящие для тестирования на инфекцию TSV, включают постличинки, молодь и взрослых особей. Поскольку TSV может инфицировать на всех жизненных этапах, тяжесть инфекции и, следовательно, вирусная нагрузка, могут быть ниже уровней выявления в вымеченной икре и на стадиях личинки, поэтому особи на этих этапах жизни не могут быть подходящими образцами для выявления TSV или подтверждения свободы от инфекции TSV.

#### **3.2. Консервирование образцов для отправки**

Стандартные гистологические методы или методы молекулярного анализа, а также руководство по консервированию образцов для запланированного метода тестирования см. в Главе 2.2.0.

#### **3.3. Объединение образцов в пулы**

Оценка влияния объединения в пулы на диагностическую чувствительность не проводилась, следовательно, крупных креветок следует обрабатывать и тестировать отдельно. Однако особей на начальных этапах жизни, особенно постличинки, или образцы весом до 0,5 г, можно объединять в пулы для получения достаточного количества материала для молекулярного исследования.

### **3.4. Лучшие органы или ткани**

TSV инфицирует ткани эктодермального и мезодермального происхождения. Основания целевая ткань при острой фазе инфекции TSV – кутикулярный эпителий. При хронической инфекции основной целевой тканью являются лимфоидные органы.

При необходимости проведения нелетального тестирования ценного маточного стада могут быть отобраны гемолимфа и плеоподы.

### **3.5. Образцы/ ткани, которые непригодны**

TSV является системным вирусом, и он не реплицируется в тканях брюшной полости (например, гепатопанкреас, средняя кишка или ее слепой отросток). Следовательно, ткани брюшной полости не подходят в качестве образцов для выявления инфекции TSV.

## **4. Методы диагностики**

### **4.1. Методы диагностики в полевых условиях**

#### **4.1.1. Клинические признаки**

По клиническим признакам может быть предположительно диагностирована только клиническая инфекция TSV в острой фазе. Описание макроскопических клинических признаков, демонстрируемых креветками с инфекцией TSV в острой фазе, см. в Разделе 4.2.

#### **4.1.2. Поведенческие изменения**

Поведенческие изменения проявляют только креветки с клинической инфекцией TSV в острой фазе. Обычно, тяжело пораженным креветкам как будто не хватает кислорода, и они перемещаются к краю или к поверхности пруда, где уровни растворенного кислорода выше. Такие креветки могут привлекать большое количество морской птицы. При вспышках многих болезней именно большое количество морской птицы, привлекаемой к умирающим креветкам, является первым показателем наличия вспышки серьезной болезни (которая зачастую является либо инфекцией TSV, либо вирусом синдрома белых пятен) для менеджера фермы.

### **4.2. Клинические методы**

#### **4.2.1. Макроскопические патологические признаки**

Инфекция TSV имеет три четкие фазы: острая, переходная и хроническая, которые макроскопически различимы (Hasson с соавт., 1999a; Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Lightner, 2011; Lightner с соавт., 1995). Макроскопические признаки, демонстрируемые молодью, подростой молодью и взрослыми креветками в переходной фазе инфекции TSV, уникальны и обеспечивают предположительный диагноз болезни.



*Острая фаза:* макроскопические признаки, демонстрируемые умирающей *P. vannamei* с инфекцией TSV в острой фазе, включают распространение красных хроматофоров, придающих пораженной креветке общую бледно-красную окраску и делающих хвостовой веер и плеоподы ярко красными: поэтому, когда болезнь впервые появилась в Эквадоре, одним из ее названий, данных фермерами, было болезнь «красного хвоста» (Lightner с соавт., 1995). У таких креветок при близком изучении кутикулярного эпителия тонких конечностей (например, кончики уроподов или плеоподов) через линзы с  $\times 10$  увеличением видны признаки очагового некроза эпителия. Креветки, демонстрирующие макроскопические признаки острой инфекции TSV, обычно имеют мягкий панцирь, пустой кишечник и зачастую находятся на поздней D-стадии линьки. Обычно, остро инфицированные креветки погибают во время линьки.

*Переходная фаза (фаза выздоровления):* несмотря на то, что макроскопические признаки, демонстрируемые креветками в переходной фазе, присутствуют только в течение нескольких дней, они могут обеспечить предположительный диагноз инфекции TSV. Во время переходной фазы (которая может происходить в то время, когда многие креветки в составе пораженной популяции все еще находятся в острой фазе, и высоки ежедневные уровни смертности), креветки в инфицированных прудах в количестве от небольшого до умеренного демонстрируют выборочные, многоочаговые, несимметричные меланизированные кутикулярные поражения. Эти меланизированные точки представляют собой скопления гемоцитов, указывающих на участки в кутикулярном эпителии, восстанавливающиеся от поражения TSV. У таких креветок могут наблюдаться или не наблюдаться мягкие кутикулы и распространение красных хроматофоров, и у них может быть нормальное поведение и аппетит (Brock, 1997; Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; Lightner, 2011).

*Хроническая фаза:* после успешной линьки креветки от переходной фазы перемещаются к хронической фазе инфекции TSV, при которой персистентно инфицированные креветки не демонстрируют явных признаков болезни (Brock, 1997; Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Lightner, 2011; Lightner с соавт., 1995). Однако *P. vannamei*, хронически инфицированные TSV, могут быть менее резистентными к нормальным стресс-факторам окружающей среды (например, внезапное снижение солености), чем неинфицированные креветки (Lotz с соавт., 1995).

#### **4.2.2. Клиническая химия**

Неприменимо.

#### **4.2.3. Микроскопические патологические признаки (для хозяев-пинеидных)**

Синдром Таура в острой и хронической фазе можно диагностировать посредством гистологических методов (Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a). Индуцированные TSV патогномические патологии уникальны при инфекции в острой фазе (Brock с соавт., 1995; Lightner, 1996a; Lightner, 2011). При хронической инфекции TSV единственным поражением, обычно демонстрируемым инфицированными

креветками, является увеличенные лимфоидных органов с множественными сфероидными образованиями в лимфоидных органах (ЛОС) (Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 2011), которые невозможно отличить от ЛОС, вызываемыми хроническими инфекциями другими РНК-вирусами (Lightner, 1996a). Если в ходе стандартной гистологии наблюдаются ЛОС и подозревается хроническая инфекция TSV, для подтверждения инфекции TSV рекомендуется использовать молекулярный тест (ИГХ с TSV-специфичными зондами или ПЦР с обратной транскрипцией [ОТ] ПЦР [см. Раздел 4.3.1.2.7]).

#### **4.2.3.1. Острая фаза инфекции вирусом синдрома Таура**

Диагностика синдрома Таура в острой фазе болезни зависит от гистологической демонстрации (в препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином [H&E]) многоочаговых зон некроза в кутикулярном эпителии по всей поверхности тела, конечностей, жабр, задней кишки и передней кишки (пищевод, передняя и задняя камеры желудка). Клетки субкутикулярных соединительных тканей и волокна прилегающих поперечных мышц, располагающихся у основания пораженного кутикулярного эпителия, поражаются редко. В некоторых тяжелых случаях инфекции TSV в острой фазе также разрушается тубулярный эпителий антеннальной железы. В многоочаговых кутикулярных поражениях хорошо выражены видимые очаги пораженных клеток, в которых наблюдаются повышенная эозинофилия цитоплазмы и пикноз или кариорексис ядра. При инфекции TSV в острой фазе в таких поражениях зачастую изобилуют цитоплазматические остатки некротических клеток, которые обычно присутствуют в виде сферических телец (диаметром 1–20 мкм), окрашивание которых варьирует от эозинофильного до бледно-базофильного. Эти структуры, наряду с пикнозом и кариорексисом ядра, придают поражениям при синдроме Таура в острой фазе характерный «присыпанный перцем» или «изрешеченный дробью» внешний вид, который считается патогномическим для синдрома Таура, когда отсутствует сопутствующий некроз клеток паренхимы трубочек лимфоидных органов. Отсутствие некроза лимфоидных органов при инфекциях TSV в острой фазе отличает синдром Таура от инфекции вирусом желтой головы генотипа 1 в острой фазе, при котором в кутикулярном эпителии и жабрах могут возникать особенности некроза, аналогичные индуцируемым TSV (Lightner, 1996a).

В тканях, инфицированных TSV, пикноз или кариорексис ядра дает положительную (ДНК) реакцию Фельгена, что отличает их от менее базофильных или эозинофильных цитоплазматических включений, которые не содержат ДНК. Отсутствие гемоцитного инфильтрата или других признаков значительного воспалительного ответа хозяина отличает острую фазу инфекции TSV от переходной фазы болезни (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Brock, 1997; Brock с соавт., 1995; Brock с соавт., 1997; Erickson с соавт., 2002; Erickson с соавт., 2005; Hasson с соавт., 1995; Hasson с соавт., 1999a; Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; Lightner с соавт., 1995).

#### **4.2.3.2. Переходная фаза (фаза восстановления) инфекции вирусом синдрома Таура**

В ходе переходной фазы инфекции TSV количество и тяжесть типичных для острой фазы кутикулярных поражений снижаются и замещаются заметной инфильтрацией и скоплением гемоцитов в областях некроза. Массы гемоцитов могут становиться меланизированными, из-за чего появляются неровные черные пятна, характеризующие переходную фазу болезни. На Н&Е срезах такие поражения могут демонстрировать эрозию кутикулы, поверхностную колонизацию и инвазию пораженной кутикулы, а также воздействие *Vibrio spp.* на поверхностные гемоциты (Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; 2011). Срезы лимфоидных органов во время переходной фазы инфекции TSV могут выглядеть нормальными при окрашивании Н&Е. Однако при анализе срезов лимфоидных органов на TSV посредством ИГХ со специфичными кДНК-зондами (или посредством ИГХ с МАт 1А1 к TSV типа А, генотипа 1) видны большие количества TSV, аккумулирующегося в более периферических клетках паренхимы трубочек лимфоидных органов (Hasson с соавт., 1999b; Srisuvan с соавт., 2005).

#### **4.2.3.3. Хроническая фаза инфекции вирусом синдрома Таура**

Креветки в хронической фазе инфекции TSV не демонстрируют макроскопических признаков инфекции, и единственным гистологическим признаком инфекции является присутствие многочисленных явных ЛОС, которые могут ассоциироваться с парными лимфоидными органами или могут отсоединяться от них и становиться эктопическими тельцами ЛОС, которые располагаются в ограниченных пространствах гемоцели (т.е. в сердце, жабрах, в субкутикулярных соединительных тканях и т.д.). такие ЛОС – это сферические скопления клеток лимфоидных органов и гемоцитов, и их можно отличить от нормальных тканей лимфоидных органов по их сферическому виду и отсутствию центрального сосуда, который является типичным для нормальных трубочек лимфоидных органов. При анализе посредством ИГХ с кДНК-зондом на TSV (или с МАт 1А1 посредством ИГХ) некоторые клетки ЛОС демонстрируют положительную реакцию на вирус, в то время как другие целевые клетки не реагируют (Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; 2011).

#### **4.2.4. Влажные препараты**

Для демонстрации (и проведения предварительной диагностики инфекции TSV в острой фазе) очаговых поражений в кутикулярных эпителиальных клетках при острой фазе инфекции TSV можно использовать прямую микроскопию простых неокрашенных влажных препаратов из иссеченных кусочков жабр, кончиков конечностей и т.д., проведенную посредством фазо-контрастного микроскопа или микроскопа с пониженным уровнем освещенности. Препараты, представляющие инфекцию TSV в острой фазе, будут содержать многочисленные сферические структуры (см. гистопатологические методы в Разделе 4.2.3 выше), которые являются пикнозом или кариорексисом ядра и цитоплазматическими остатками некротических клеток.

#### **4.2.5. Мазки**

Неприменимо.

#### **4.2.6. Фиксированные срезы**

См. Раздел 4.2.3

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

В настоящее время в диагностических целях не применяется.

### **4.3. Методы выявления и идентификации возбудителя**

#### **4.3.1. Методы прямой детекции**

##### **4.3.1.1. Методы микроскопического анализа**

###### *4.3.1.1.1. Влажные 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. Раздел 4.2.3

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

###### *4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственная среда*

TSV не выращивают *in vitro*, т.к. линий клеток ракообразных не существует (Lightner, 1996а; Pantoja с соавт., 2004). Несмотря на то, что в одной публикации ошибочно сообщалось о том, что TSV инфицирует линии клеток человека и обезьяны (Audelo del Valle с соавт., 2003), две другие лаборатории, которые повторили данное исследование, выявили, что TSV не инфицирует и не реплицируется в линиях клеток приматов или человека, которые чувствительны к пикорнавирусам человека (Luo с соавт., 2004; Pantoja с соавт., 2004).

###### *4.3.1.2.2. Методы выявления антигена на основе антител*

Для анализа образцов гемолимфы, гомогенатов ткани или тканевых срезов креветок, фиксированных раствором Дэвидсона, можно использовать МАт для выявления TSV (Erickson с соавт., 2002; Erickson с соавт., 2005; Poulos с соавт., 1999). МАт TSV 1А1 можно использовать для дифференциации некоторых вариантов или «штаммов» TSV от других штаммов (Erickson с соавт., 2002; Erickson с соавт., 2005).

#### 4.3.1.2.3. Метод биопробы

Подтверждение инфекции TSV может быть проведено посредством метода биопробы животных с подозрением TSV с использованием СПФ-молоди *P. vannamei* в качестве индикатора вируса (Brock с соавт., 1997; Garza с соавт., 1997; Hasson с соавт., 1999b; Hasson с соавт., 1995; Lightner, 1996a; Lotz, 1997b; Overstreet с соавт., 1997). Можно использовать протоколы перорального или инъекционного введения. Метод перорального введения относительно прост для применения и применяется посредством скармливания измельченных тушек креветок с подозрением СПФ-молоди *P. vannamei* в небольших резервуарах (White с соавт., 2002). Необходимо использовать резервуар с отрицательным контролем в виде индикаторных креветок, которые получают только СПФ-ткани (без TSV) и обычные корма для креветок. При использовании для биопробы на TSV протокола скармливания тушек (перорально) TSV-положительные индикаторные креветки (по макроскопическим признакам и результатам гистопатологических исследований) обычно видны уже через 3-4 дня после первого воздействия, а значительная смертность наблюдается к 3-8 дню после первого воздействия. Отрицательные контрольные креветки должны оставаться отрицательными (в течение не менее 10-15 дней) по показателям макроскопических и гистологических признаков синдрома Таура и атипичной смертности (Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; White с соавт., 2002).

При использовании инъекционного протокола биопробы на TSV можно тестировать различные типы образцов. Целые креветки используются, если они были отобраны во время вспышки инфекции TSV. Только головы следует использовать, если креветки демонстрируют макроскопические поражения переходной фазы (многоочаговые меланизированные пятна на кутикуле), или при отсутствии клинических признаков инфекции (хроническая фаза), т.к. вирус, если он присутствует, будет концентрироваться в лимфоидных органах (Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a). Для проведения нелетального тестирования маточного стада можно отбирать образцы гемолимфы и использовать для введения индикаторным креветкам посредством внутримышечной инъекции (Lightner, 1996a).

Для проведения биопробы на TSV с использованием внутримышечной инъекции:

Следует учесть, что в течение выполнения всего протокола ткани и полученный из них гомогенат следует держать охлажденными посредством хранения их на льду.

- i) Подготовить смесь в пропорции 1:2 или 1:3 голов или целых креветок с подозрением на инфекцию TSV и TN буфера (20 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 0,4 М NaCl) или стерильного 2% солевого раствора, приготовленного с дистиллированной водой.
- ii) Гомогенизировать смесь с использованием гомогенизатора или блендера. Не позволять смеси нагреваться за счет чрезмерной гомогенизации или измельчения.

- iii) Очистить гомогенат посредством центрифугирования при 3000 g в течение 10 минут. Декантировать и оставить надосадочную жидкость.
- iv) Центрифугировать надосадочную жидкость при 27 000 g в течение 20–30 минут при температуре 4°C. Декантировать и оставить надосадочную жидкость.
- v) Развести надосадочную жидкость, полученную на этапе iv, стерильным 2% солевым раствором в соотношении от 1/10 до 1/100. Теперь данный раствор можно использовать в качестве инокулята, инъецируемого контрольным креветкам (или для стерилизации фильтрацией как описано на этапе vi).
- vi) Фильтровать разведенную надосадочную жидкость, полученную на этапе v, используя стерильный шприц (размер зависит от итогового объема разведенного супернатанта) и стерильный шприцевой фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Фильтрат следует собрать в стерильную тестовую пробирку или мензурку. Раствор можно хранить в замороженном виде при температуре –20°C (или при –80°C в случае долгосрочного хранения) или сразу же использовать для инъекции индикаторным креветкам.
- vii) Индикаторные креветки должны происходить из популяций, восприимчивых к инфекции СПФ- *P. vannamei* (например, «популяция Кона») (Moss с соавт., 2001), которые имеются в продаже у ряда поставщиков в Северной и Южной Америке, но не из отобранных линий креветок, которые известны как популяции, резистентные в инфекции TSV.
- viii) Инъецировать 0,01 мл на грамм массы тела с использованием 1 мл туберкулинового шприца. Инъекцию индикаторным креветкам проводят внутримышечно в третий сегмент хвоста. Если исследуемые креветки погибают в течение минут после инъекции, инокулят содержит чрезмерное количество белкового материала, и его следует дополнительно разбавить, прежде чем проводить инъекции другим индикаторным креветкам. Внезапная смерть после инъекции рассматривается как «белковый шок» и возникает в результате системного свертывания гемолимфы креветок в ответ на инокулят (Lightner, 1996a, White с соавт., 2002).
- ix) Образцы гемолимфы можно развести (1/10 или 1/20 в TN буфере), стерилизовать фильтрацией (если необходимо) и инъецировать индикаторным креветкам без дополнительной подготовки.
- x) Если в инокуляте присутствовал TSV, гибель индикаторных креветок должна наступить в течение 24–48 часов после инъекции. При низких дозах вируса для установления смертельной инфекции может потребоваться более длительный период, и креветок следует наблюдать в течение не менее 10-15 дней после инъекции.
- xi) Наличие (или отсутствие) TSV у индикаторных креветок следует подтверждать посредством гистологических анализов (и/или ИГХ с генетическим зондом, если есть) умирающих креветок, фиксированных раствором Дэвидсона. При необходимости дополнительного подтверждения помимо демонстрации патогномических поражений TSV можно провести ОТ-ПЦР с секвенированием полученного ампликона.

#### 4.3.1.2.4. Метод биопробы с использованием сигнальных креветок

В качестве вариации метода биопробы можно использовать систему «сигнальных креветок». Например, TSV-восприимчивые популяции небольшой молодежи СПФ-*P. vannamei* можно содержать в садках в резервуарах или в одной системе водоснабжения с другими креветками с неизвестным статусом инфекции TSV для биопробы на предмет наличия инфекционных возбудителей, таких как TSV.

#### 4.3.1.2.5. Метод дотиммуоблоттинга

- i) Для проведения дотиммуоблоттинга 1 мкл исследуемого антигена (очищенный вирус, гемолимфа инфицированных креветок или гемолимфа СПФ-креветок) каплями наносят на поверхность аналитических планшетов МА-НА-N45 (Millipore)<sup>1</sup>.
- ii) После высушивания на воздухе в течение 1 часа при комнатной температуре лунки блокируют 20 мкл буфера, содержащего фосфатно-буферный раствор и 0,05% Tween 20 (ФБРТ), смешанного с 10% нормальной козьей сыворотки (Life Technologies) и 2% казеина Хаммерштайна (Amersham Life Sciences).
- iii) Все лунки трижды промывают ФБРТ и затем проводят реакцию с 100 мкл первичного антитела (МАт или мышинные поликлональные антитела) в течение 30 минут при комнатной температуре.
- iv) Меченые щелочной фосфатазой козы анти-мышинные IgG, специфичные к цепи  $\gamma$ , вторичное антитело (Zymed), разведенные 1/1000 в ФБРТ плюс 10% нормальной козьей сыворотки, используют для детекции (30 минут при комнатной температуре).
- v) После трехкратной промывки с ФБРТ, однократной ФБР и однократной дистиллированной водой реакцию визуализируют по ее развитию в течение 15 минут при комнатной температуре с использованием нитросинего тетразолия и бром-хлор-индолил сульфата (Roche Diagnostics) в 100 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl буфера, содержащего 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5.
- vi) Реакции останавливают дистиллированной водой.
- vii) Реакции градуируют, используя шкалу от 0 до +4, где наиболее интенсивная реакция эквивалентна реакции, полученной с использованием МАт против референтного контроля, состоящего из полуочищенного TSV. Отрицательная реакция – это реакция, при которой в лунке на визуализируются окрашенные пятна.

#### 4.3.1.2.6. Другие методы на основе антител

МАт 1A1 против TSV можно использовать для других форматов тестов на основе антител (например, непрямой иммунофлуоресцентный анализ [IFAT] или иммуногистохимические [ИГХ] тесты с мазками ткани, замороженными срезами или депарафинизированными зафиксированными тканями). МАт 1A1 применим

---

<sup>1</sup> Указание конкретных коммерческих продуктов в качестве примера не означает их утверждение МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, указываемым в данном *Руководстве по водным животным*.

в формате ИГХ с использованием тканевых срезов, фиксированных раствором Дэвидсона AFA (Erickson с соавт., 2002; Erickson с соавт., 2005).

Непредвиденные результаты, полученные в ходе тестов на основе МАт, рекомендуется интерпретировать в контексте клинических признаков, истории болезни и совместно с результатами других тестов (например, результаты ОТ-ПЦР или результаты гистологии или гибридизации *in situ* (ISH) с TSV-специфичным ДНК-зондом – см. соответствующие разделы в данной главе).

#### *4.3.1.2.7. Молекулярные методы*

Разработаны тесты ISH и ОТ-ПЦР для детекции TSV, и наборы для проведения ОТ-ПЦР на TSV имеются в продаже. Метод дот-блоттинга для детекции TSV отсутствует.

##### *4.3.1.2.7.1. ДНК-зонды для приложений ISH с нерадиокативными кДНК-зондами*

Нереактивные DIG-меченные кДНК-зонды для детекции TSV могут быть получены в лаборатории. Метод ISH обеспечивает более высокую диагностическую чувствительность, чем более традиционные методы для выявления и диагностики TSV, использующие классические гистологические методы (Hasson с соавт., 1999a; Lightner, 1996a; Lightner, 1999; Lightner & Redman, 1998b; Mari с соавт., 1998). ISH стандартных гистологических срезов, полученных в острой и переходной фазе из поражений в кутикулярном эпителии, других тканей или из ЛОС, образовавшихся в переходной или хронической фазе, с использованием DIG-меченного кДНК-зонда к TSV обеспечивает дифференциальный диагноз инфекции TSV (Hasson с соавт., 1999a; Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b). Патогномонические TSV-положительные поражения в ходе реакции с кДНК-зондами демонстрируют четкие синие или сине-черные области в цитоплазме пораженных клеток. В реакцию с зондом не вступают области ядра с выраженным кариорексисом и ядра с пикнозом, которые обуславливают «изрешеченный дробью» внешний вид патогномонических поражений при синдроме Таура (Lightner, 1996a; Mari с соавт., 1998). (см. Описание метода ISH см. в Главе 2.2.4 Заражение инфекционным вирусом гиподермального и гематопозитического некроза и описание процедуры использования фиксирующего раствора Дэвидсона AFA см. в Главе 2.2.0 Раздел 7.1.6.3.).

При использовании тканей, фиксированных раствором Дэвидсона, могут возникать ложноотрицательные результаты ISH в том случае, если зафиксированные ткани оставляют в фиксирующем растворе на срок более 24-48 часов. Низкий уровень pH фиксирующего раствора Дэвидсона вызывает кислотный гидролиз генома TSV с одноцепочечными РНК, что приводит к ложноотрицательным результатам. Такого гидролиза можно избежать, если использовать нейтральные фиксаторы, включая «РНК-безвредные» фиксаторы, разработанные для креветок, или при правильном использовании фиксатора Дэвидсона (избегая превышения 24-часового периода фиксации) (Hasson с соавт., 1997; Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998b).



#### 4.3.1.2.7.2. Метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ)

Образцы ткани (гемолимфа, плеоподы, целые небольшие креветки и т.д.) можно анализировать на TSV посредством ОТ-ПЦР. Праймеры, указанные как 9992F и 9195R, амплифицируют последовательность длиной 231 пара оснований (п.о.) генома TSV (Nunan с соавт., 1998). Амплифицированный фрагмент – это часть консервативной последовательности, расположенной в межгенной области и ORF 2 TSV. Праймер 9992F расположен у 3'-конца межгенной области, 9195R расположен на ORF 2 в VP2 (= CP1) (Magi с соавт., 2002; Nunan с соавт., 1998). Разработана новая пара праймеров TSV (7171F и 7511R), и доказано, что она обладает повышенной чувствительностью для детекции TSV (Navarro с соавт., 2009). Эти замещающие праймеры названы 9992F/9195R, и они расположены в ORF 2.

Праймер	Продукт	Последовательность	G+C%	Температура
9992F	231 п.о.	5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3'	55%	69°C
9195R		5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'	50%	63°C
7171F	341 п.о.	5'-CGA-CAG-TTG-GAC-ATC-TAG-TG-3'	50%	
7511R		5'-GAG-CTT-CAG-ACT-GCA-ACT-TC-3'	50%	

Метод ОТ-ПЦР, описанный ниже для выявления TSV, в целом отвечает методу, использованному Nunan с соавт., 1998.

- i) *Подготовка матрицы РНК:* РНК можно экстрагировать из свежих, замороженных или законсервированных в этаноле тканей. Экстракцию РНК следует проводить с использованием коммерческих наборов для экстракции РНК, например набор High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Penzberg, Германия), следуя инструкциям производителя для получения качественных матриц РНК.
- ii) ОТ-ПЦР проводится в растворе, используя в качестве матрицы 10 мкл общей РНК, экстрагированной из гемолимфы, замороженных тканей креветок, ткани, фиксированной в этаноле (концентрация РНК = 1–100 нг мл<sup>-1</sup>).
- iii) В каждый анализ ОТ-ПЦР на TSV следует включить следующие контроли:
  - a) известный TSV-отрицательный образец ткани;
  - b) известный TSV-положительный образец (ткань или очищенный вирус);
  - и c) «нематричный» контроль.
- iv) Для проведения всех реакций амплификации, описанных здесь, использовали ПЦР-набор GeneAmp® EZ rTth RNA PCR kit (Applied Bioscience, Foster City, CA). Для данного анализа можно использовать и адаптировать альтернативные наборы.
- v) Оптимизированные условия для ОТ-ПЦР (итоговая концентрация в 50 мкл

общего объема) для детекции TSV в образцах ткани креветок следующие: праймеры (0,62 мкМ каждого), dNTPs (300 мкМ каждого), ДНК-полимераза rTth (2,5 ед 50 мкл<sup>-1</sup>), ацетат марганца (2,5 мМ), в 5 × EZ буфера (25 мМ бицина, 57,5 мМ ацетата калия, 40% [в/о] глицерина, рН 8,2).

- vi) Если у термоциклера отсутствует нагревательная крышка, на поверхность 50 мкл реакционных смесей вносят легкое минеральное масло (50 мкл) во избежание конденсации или испарения во время термоциклирования.
- vii) Матрицу РНК и все реагенты объединяют и оставляют для проведения обратной транскрипции при температуре 60°C в течение 30 минут, и затем при температуре 94°C в течение 2 минут.

Примечание: Описанные здесь условия реакции оптимизировали с использованием автоматического термоциклера Thermal Cycler GeneAmp 980 (Applied Biosystems). Условия следует оптимизировать для каждого термоциклера, используя известные положительные контроли.

- viii) По завершении обратной транскрипции образцы амплифицируют в течение 40 циклов при следующих условиях: денатурация при температуре 94°C в течение 45 секунд, затем отжиг/удлинение при температуре 60°C в течение 45 секунд. За финальным этапом удлинения в течение 7 минут при температуре 60°C следует последний цикл, и процесс завершается термической обработкой при 4°C.
- ix) После окончания ОТ-ПЦР растворы амплифицированной кДНК извлекают из-под минерального масла и помещают в 0,5 мл микроцентрифужные пробирки.
- x) Затем 10 мкл образца амплифицированного продукта добавляют в лунку с 2,0% агарозным гелем, окрашивают этидия бромидом (0,5 г мл<sup>-1</sup>) и проводят электрофорез в 0,5 × ТВЕ (Tris, борная кислота, Этилендиаминтетрауксусная кислота [ЭДТА]).
- xi) ДНК-лестницу 1 т.п.о (Invitrogen, Carlsbad, CA) используют в качестве маркера.
- xii) Описание используемого здесь состава реагентов и буферов см. в Главе 2.2.4. Инфекция вирусом инфекционного некроза гемопоэтической ткани.

#### 4.3.1.2.7.3. Метод ПЦР в реальном времени для выявления TSV

Для выявления TSV разработаны методы ОТ-ПЦР в реальном времени. Эти методы имеют преимущества по параметрам скорости, специфичности и чувствительности. Чувствительность ОТ-ПЦР в реальном времени составляет ~100 копий целевых последовательностей генома TSV (Dhar с соавт., 2002; Tang с соавт., 2004).

Описанный ниже метод ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием зонда TaqMan в целом соответствует методу, описанному Tang с соавт. (Tang с соавт., 2004).

- i) ПЦР-праймеры и зонд TaqMan отбирают из области ORF1 геномной

последовательности TSV (GenBank AF277675), которая кодирует неструктурные белки. Праймеры и зонд TaqMan разрабатывали в программе Primer Express (Life Technologies). Последовательности прямого праймера (TSV1004F) и обратного праймера (TSV1075R) следующие: 5'-TTG-GGC-ACC-AAA-CGA-CAT-T-3' и 5'-GGG-AGC-TTA-AAC-TGG-ACA-CAC-TGT-3'), соответственно. Зонд TaqMan, TSV-P1 (5'-CAG-CAC-TGA-CGC-ACA-ATA-TTC-GAG-CAT-C-3'), который соответствует области от нуклеотида 1024 до нуклеотида 1051, синтезировали и метили флуоресцентными красителями: 5-карбоксихлорофлуоресцеином (FAM) на 5'-конце и N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксихлорофлуоресцеином (TAMRA) на 3'-конце.

- ii) *Подготовка РНК-матрицы*: процедура экстракции и очистки РНК-матрицы из гемолимфы или тканей креветок та же, что описана в разделе для традиционной ОТ-ПЦР.
- iii) В каждый цикл реакции следует включить «контроль без матрицы». Это необходимо для исключения присутствия контаминантов в реакционной смеси. Также следует включить положительный контроль. Это может быть транскрибированная *in-vitro* РНК, содержащая целевую последовательность, очищенные вирионы или РНК, экстрагированную из ткани, инфицированной TSV.
- iv) Реакционная смесь для ОТ-ПЦР в реальном времени содержит: мастер-микс TaqMan Fast virus 1-Step Master Mix (Life Technologies), 0,3 мкМ каждого праймера, 0,1 мкМ зонда TaqMan, 5–50 нг РНК и воду в объеме реакционной смеси, составляющем 10 мкл.
- v) Приложение можно выполнять с использованием ПЦР-системы StepOnePlus (Life Technologies или эквивалентные системы для ПЦР в реальном времени). Циклическая обработка состоит из обратной транскрипции при температуре 50°C в течение 30 минут, начальной денатурации при температуре 95°C в течение 20 секунд с последующими 40 циклами денатурации при температуре 95°C в течение 3 секунд и отжига/ удлинения при температуре 60°C в течение 30 секунд.
- vi) По окончании реакции анализируют показатели флуоресценции в реальном времени. Пороговое значение устанавливают на уровне выше базовой линии. Образцы определяют как отрицательные при отсутствии показателя Ct (пороговый цикл) после 40 циклов. Образцы с показателем Ct ниже 40 циклов считаются положительными.

#### 4.3.1.2.7.4. Секвенирование

Продукты ОТ-ПЦР можно при необходимости секвенировать для подтверждения инфекции TSV или идентификации ложноположительной или неспецифической амплификации (Mari с соавт., 2002; Nielsen с соавт., 2005; Srisuvan с соавт., 2005; Tang & Lightner, 2005; Wertheim с соавт., 2009).

#### 4.3.1.2.8. Очистка возбудителя

Разработаны методы выделения и очистки TSV (Bonami с соавт., 1997, Hasson с

соавт., 1995, Mari с соавт., 2002, Poulos с соавт., 1999), но они не рекомендованы для стандартной диагностики синдрома Таура.

#### 4.3.2. Серологические методы

Не применяются, т.к. креветки – это беспозвоночные животные, которые не продуцируют специфические антитела, которые могут быть использованы для демонстрации инфекции во время или после воздействия TSV.

### 5. Оценка тестов по цели применения

Имеющиеся в настоящее время методы надзора, выявления и диагностики инфекции TSV перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, использованные в Таблице, означают: a = метод рекомендован по причине доступности, практичности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы значительно ограничивают его применение; и d = в настоящее время метод не рекомендуется и/или недоступен для этой цели. Это, в некоторой мере, субъективно, т.к. пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и практичности. Несмотря на то, что не все тесты, перечисленные в категории a или b, прошли официальные процедуры стандартизации и валидации, их рутинная суть и факт их широкого применения без сомнительных результатов делают их приемлемыми.

*Таблица 5.1. Методы надзора, выявления и диагностики*

Метод	Надзор				Предварительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	PL	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические поражения	d	d	c	c	b	c
Биопроба	d	d	d	d	c	b
Прямая световая микроскопия (влажный препарат)	d	d	c	c	c	d
Гистопатология	d	b	b	c	a	a
Трансмиссивная электронная микроскопия	d	d	d	d	c	c
Анализы на основе антител	d	d	c	c	b	b
ДНК-зонды <i>in situ</i>	d	c	b	b	a	a
ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР в реальном времени	a	a	a	a	a	a
Секвенирование	d	d	d	d	d	a

PL = постличинки; ОТ-ПЦР = полимерзная цепная реакция с обратной транскрипцией.

## **6. Тест(ы), рекомендованные для целевого надзора в целях признания благополучия по инфекции вирусом синдрома Таура**

Согласно Таблице 5.1., ОТ-ПЦР (Раздел 4.3.1.2.7.2) или ОТ-ПЦР в реальном времени (Раздел 4.3.1.2.7.3) являются рекомендованными методами для целевого надзора по причине их доступности, практичности и диагностической специфичности и чувствительности.

При расследовании эпизодов смертности в составе целевого надзора подходит метод демонстрации патогномонических TSV-индуцированных поражений в кутикулярном эпителии посредством гистологии (с подтверждением посредством ИГХ с TSV-специфичными ДНК-зондами или без подтверждения) (Таблица 5.1.).

## **7. Критерии подтверждающей диагностики**

### **7.1. Определение случая подозрения**

Инфекцию TSV подозревают, если выполнен по крайней мере один из следующих критериев:

- i) результаты гистопатологии указывают на инфекцию TSV или
- ii) положительный результат ОТ-ПЦР или ОТ-ПЦР в реальном времени.

### **7.2. Определение подтвержденного случая**

Инфекция TSV считается подтвержденной, если выполнен один или более из следующих критериев:

- i) результаты гистопатологии указывают на инфекцию TSV
- ii) положительный результат ИГХ в целевых тканях
- iii) ОТ-ПЦР (с последующим секвенированием) или ОТ-ПЦР в реальном времени с положительными результатами по TSV.

## **8. Библиография**

AGUIRRE GUZMAN G. & ASCENCIO VALLE F. (2000). Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Res. Dev. Microbiol.*, **4**, 333–348.

AUDELO DEL VALLE J., CLEMENT-MELLADO O., MAGANA-HERNANDEZ A., FLISSER A., MONTIEL-AGUIRRE F.

& BRISENO-GARCIA B. (2003). Infection of cultured human and monkey cell lines with extract of penaeid shrimp infected with Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**, 265–266.

BONAMI J.R., HASSON K.W., MARI J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1997). Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *J. Gen. Virol.*, **78**, 313–319.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (EDS)

- (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. Rome, FAO, 240 pp.
- BROCK J.A. (1997). Special topic review: Taura syndrome, a disease important to shrimp farms in the Americas. *World J. Microbiol & Technol.*, **13**, 415–418.
- BROCK J.A., GOSE R., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1995). An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. 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, 84–94.
- BROCK J.A., GOSE R.B., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1997). Recent developments and an overview of Taura Syndrome of farmed shrimp in the Americas. In: Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 275–283.
- CHANG Y.S., PENG S.E., YU H.T., LIU F.C., WANG C.H., LO C.F. & KOU G.H. (2004). Genetic and phenotypic variations of isolates of shrimp Taura syndrome virus found in *Penaeus monodon* and *Metapenaeus ensis* in Taiwan. *J. Gen. Virol.*, **85**, 2963–2968.
- 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.
- CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In: Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress, D.E. Jory, ed., Panama City, Panama, 1–11.
- DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2002). Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry. *J. Virol. Methods*, **104**, 69–82.
- DIXON H. & DORADO J. (1997). Managing Taura syndrome in Belize: a case study. *Aquaculture Magazine*, **May/June**, 30–42.
- ERICKSON H.S., POULOS B.T., TANG K.F.J., BRADLEY-DUNLOP D. & LIGHTNER D.V. (2005). Taura syndrome virus from Belize represents a unique variant. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 91–98.
- ERICKSON H.S., ZARAIN-HERZBERG M. & LIGHTNER D.V. (2002). Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostic methods: diagnostic implications in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 1–10.
- 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. World Aquaculture Society, Baton Rouge,

Louisiana, USA, 168–198.

GARZA J.R., HASSON K.W., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (1997). Demonstration of infectious taura syndrome virus in the feces of sea gulls collected during an epizootic in Texas. *J. Aquat. Anim. Health*, **9**, 156–159.

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.

HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MARI J., BONAMI J.R., POULOS B.T., MOHNEY L.L., REDMAN R.M. & BROCK J.R. (1999a). The geographic distribution of Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas: determination by histology and *in situ* hybridization using TSV-specific cDNA probes. *Aquaculture*, **171**, 13–26.

HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T. & WHITE B.M. (1999b). Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 81–93.

HASSON K.W., LIGHTNER D.V., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L., BROCK J.A. & BONAMI J.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 115–126.

INTRIAGO P., JIMENEZ R., MACHUCA M., BARNIOL R., KRAUSS E. & SALVADOR X. (1997). Experiments on toxicosis as the cause of Taura Syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) in Ecuador. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*. Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 365–379.

JIMENEZ R. (1992). Síndrome de Taura (Resumen). *In: Acuicultura del Ecuador*. Cámara Nacional de Acuicultura, Guayaquil, Ecuador, 1–16.

JIMENEZ R., BARNIOL R., DE BARNIOL L. & MACHUCA M. (2000). Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 91–99.

KING A., ADAMS M., CARSTENS E. & LEFKOWITZ E.J. (2011). Virus Taxonomy, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, Academic Press, London, UK, 797–801.

LARAMORE C.R. (1997). Shrimp culture in Honduras following the Taura syndrome virus. *In: Proceedings of the 4<sup>th</sup> Symposium on Aquaculture in Central America: Focusing on Shrimp and Tilapia, Tegucigalpa, Honduras*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1–7.

LIGHTNER D.V. (1995). Taura syndrome: an economically important viral disease impacting

the shrimp farming industries of the Americas including the United States. *In: Proceedings of the 99th Annual Meeting US Animal Health Association, Reno, Nevada, USA, 36–52.*

LIGHTNER D.V. (ED.) (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, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. sci. tech. Office int. Epiz.*, **15**, 579–601.

LIGHTNER D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquaculture*, **9**, 27–52.

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. & REDMAN R.M. (1998a). Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.*, **33**, 165–180.

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

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.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., HASSON K.W. & PANTOJA C.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 53–59.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.

LOTZ J.M. (1997a). Disease control and pathogen status assurance in an SPF-based shrimp aquaculture industry, with particular reference to the United States. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 243–254.

LOTZ J.M. (1997b). Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 45–51.

LOTZ J.M., ANTON L.S. & SOTO M.A. (2005). Effect of chronic Taura syndrome virus infection on salinity tolerance of *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 75–78.



- 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.
- LOTZ J.M., FLOWERS A.M. & BRELAND V. (2003). A model of Taura syndrome virus (TSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **83**, 168–176.
- LU Y. & SUN P.S. (2005). Viral resistance in shrimp that express an antisense Taura syndrome virus coat protein gene. *Antiviral Res.*, **67**, 141–146.
- LUO P., HU C.Q., REN C.H. & SUN Z.F. (2004). Taura syndrome virus and mammalian cell lines. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2260–2261.
- MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1998). Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 11–17.
- MARI J., POULOS B.T., LIGHTNER D.V. & BONAMI J.R. (2002). Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses. *J. Gen. Virol.*, **83**, 915–926.
- MOSS S.M., ARCE S., ARGUE B.J., OTOSHI C.A., CALDERON F.R.O. & TACON A.G.J. (2001). *In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001*, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1–19.
- NAVARRO S.A., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2009). An improved Taura syndrome virus (TSV) RT-PCR using newly designed primers. *Aquaculture*, **293**, 290–292.
- NIELSEN L., SANG-OUM W., CHEEVADHANARAK S. & FLEGEL T.W. (2005). Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. *Dis Aquat. Org.*, **63**, 101–106.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 87–91.
- OVERSTREET R.M., LIGHTNER D.V., HASSON K.W., MCILWAIN S. & LOTZ J. (1997). Susceptibility to TSV of some penaeid shrimp native to the Gulf of Mexico and southeast Atlantic Ocean. *J. Invertebr. Pathol.*, **69**, 165–176.
- PANTOJA C.R., NAVARRO S.A., NARANJO J., LIGHTNER D.V. & GERBA C.P. (2004). Nonsusceptibility of primate cells to Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2106–2112.

POULOS B.T., KIBLER R., BRADLEY-DUNLOP D., MOHNEY L.L. & LIGHTNER D.V. (1999). Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 99–106.

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*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 40–52.

ROBALINO J., BROWDY C.L., PRIOR S., METZ A., PARNELL P., GROSS P. & WARR G. (2004). Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J. Virol.*, **78**, 10442–10448.

ROBLES-SIKISAKA R., GARCIA D.K., KLIMPEL K.R. & DHAR A.K. (2001). Nucleotide sequence of 3'-end of the genome of Taura syndrome virus of shrimp suggests that it is related to insect picornaviruses. *Arch. Virol.*, **146**, 941–952.

SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Experimental infection of *Penaeus monodon* with Taura syndrome virus (TSV). *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 1–8.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Phylogenetic analysis of Taura syndrome virus isolates collected between 1993 and 2004 and virulence comparison between two isolates representing different genetic variants. *Virus Research*, **112**, 69–76.

TANG K.F.J., NAVARRO S.A., PANTOJA C.R., ARANGUREN F.L. & LIGHTNER D.V. (2012). New genotypes of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) from the Kingdom of Saudi Arabia. *Dis. Aquat. Org.*, **99**, 179–185.

TANG K.F.J., WANG J. & LIGHTNER D.V. (2004). Quantitation of Taura syndrome virus by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. *J. Virol. Methods*, **115**, 109–114.

TU C., HUANG H.T., CHUANG S.H., HSU J.P., KUO S.T., LI N.J., HUS T.L., LI M.C. & LIN S.Y. (1999). Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 159–161.

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.

WERTHEIM J.O., TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2009). A quick fuse and the emergence of Taura syndrome virus. *Virology*, **390**, 324–329.

WHITE B.L., SCHOFIELD P.J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2002). A laboratory challenge method for estimating Taura Syndrome virus resistance in selected lines of Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, **33**, 341–348.

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.

WYBAN J., WHITE B. & LIGHTNER D.V. (2004). TSV Challenges Advance Selective Breeding in Pacific White Shrimp.

*Global Aquaculture Advocate*, **7**, 40–41.

YU C.I. & SONG Y.L. (2000). Outbreaks of Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Fish Pathol.*, **35**, 21–24.

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

\*

\* \*

**NB:** Существует Референтная лаборатория МЭБ по вирусу синдрома Таура (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 об инфекции вирусом синдрома Таура

**NB:** ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2000 ГОДУ; ПОСЛЕДНИЕ ОБНОВЛЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2017 ГОДУ.