

ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ, ВЫЗЫВАЮЩИМ БОЛЕЗНЬ БЕЛЫХ ПЯТЕН

1. Предмет рассмотрения

Заражение вирусом, вызывающим болезнь белых пятен означает заражение патогенным агентом вируса, вызывающего болезнь белых пятен (WSSV), рода *Whispovirus*, семейства *Nimaviridae*.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы агента

2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

WSSV был определен Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) как единственный представитель рода *Whispovirus* в семействе *Nimaviridae*. Вирионы WSSV имеют яйцевидную, эллипсоидную или палочкообразную форму, правильную симметричную форму и размеры 80–120 нм в диаметре и 250–380 нм в длину. На одном конце вириона может наблюдаться жгутоподобное расширение (придасток). Сегодня, несмотря на то, что были идентифицированы различные географические изоляты с генотипической изменчивостью, все они классифицируются как один вид (вирус, вызывающий болезнь белых пятен) в пределах рода *Whispovirus* (Lo с соавт., 2012).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Агент жизнеспособен в течение не менее 30 дней при 30°C в морской воде в лабораторных условиях (Motoyama с соавт., 1998); и в прудах в течение не менее 3–4 дней (Накано и др., 1998). Лабораторные модели водоемов с системой дренажа и без нее позволяют предположить, что вирус больше не является инфекционным после 21 дня высыхания на солнце или после 40 дней в затопленном осадке водоема (Satheesh Kumar с соавт., 2013).

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

Агент инактивируют через <120 минут при температуре 50°C и <1 минуты при температуре 60°C (Nakano с соавт., 1998). При лабораторных исследованиях, WSSV инактивировали при следующих условиях:

Нагрев: 55°C в течение 90 минут, 70°C в течение 5 минут (Chang с соавт., 1998); 50 °C в течение 60 минут; 60°C в течение 1 минуты; 70°C в течение 0,2 минут (Nakano et al, 1998)

Сушка: WSSV, адсорбированный на фильтровальной бумаге и оставленный для сушки, впоследствии инактивировали через 1 час при 30°C и через 3 часа при 26°C (Maeda с соавт., 1998; Nakano с соавт., 1998).

pH: pH 3 в течение 60 минут; pH 12 в течение 10 минут (Balasubramanian с соавт., 2006; Chang с соавт., 1998).

УФ-излучение: Общая доза 9.30×10^5 мкВп/см² (Chang с соавт., 1998).

Озон: Общая концентрация остаточных окислителей 0,5 мкг / мл в течение 10 минут (Chang с соавт., 1998).

Гипохлорит натрия: общая концентрация свободного хлора 100 ч / млн в течение 10 минут (Chang с соавт., 1998).

Хлорид бензалкония: 100 ч / млн в течение 10 минут (Balasubramanian с соавт., 2006).

Йодофор: Общая концентрация свободного йода 100 ч / млн в течение 10 минут (Chang с соавт., 1998).

Жизненный цикл

Исследования *in vitro* с использованием первичной культуры клеток и исследования *in vivo* с использованием постличинок (PL) показывают, что цикл репликации составляет приблизительно 20 часов при 25°C (Chang с соавт., 1996; Chen с соавт., 2011; Wang с соавт. 2000).

2.2. Факторы хозяина

Вирус может инфицировать широкий спектр водных ракообразных, особенно десятиногих ракообразных, включая креветок, крабов, раков и омаров, обитающих в морской, солоноватой и пресной воде (Maeda с соавт., 1998).

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Из всех видов, которые были исследованы на сегодняшний день, десятиногие ракообразные (отряд Decapoda) из источников с морской, солоноватой или пресной водой, как сообщается, не устойчивы к заражению WSSV (Flegel, 1997; Lightner, 1996; Lo & Kou, 1998).; Maeda с соавт., 1998; Stentiford с соавт., 2009).

2.2.2. Стадии восприимчивости хозяина

Все стадии жизни потенциально восприимчивы, от яиц до маточного стада (Lightner, 1996; Venegas с соавт., 1999). Генетический материал WSSV был обнаружен в репродуктивных органах (Lo с соавт., 1997), но восприимчивость гамет к инфекции WSSV не была определена окончательно.

2.2.3. Вероятность обнаружения видов и субпопуляций

Лучшими стадиями жизни ракообразных для обнаружения вируса WSSV являются поздние постличиночные стадии, молодь и взрослые особи. Вероятность обнаружения может быть увеличена при воздействии стрессовых условий (например, абляция глазного стебля, нерест, линька, изменения солености, температуры или pH, а также во время цветения планктона).

2.2.4. Целевые органы и инфицированная ткань

Основные ткани-мишени WSSV имеют эктодермальное и мезодермальное эмбриональное происхождение, особенно кутикулярный эпителий и подкожные соединительные ткани (Motoyama с соавт., 1994; Wu с соавт., 2013). Несмотря на

то, что WSSV инфицирует нижележащую соединительную ткань гепатопанкреаса и средней кишки ракообразных, клетки цилиндрического эпителия этих двух органов имеют энтодермальное происхождение и не инфицируются.

2.2.5. Устойчивая инфекция

Было продемонстрировано, что многие виды десятиногих субклинически инфицированы WSSV и считаются носителями (Lo & Kou, 1998).

2.2.6. Векторы

Вирус может передаваться напрямую от хозяина к хозяину без участия биологического вектора.

2.2.7. Известные или подозрительные дикие водные животные-носители

Известно, что дикие десятиногие ракообразные являются резервуарами инфекции WSSV, включая *Mysis sp.* (Huang с соавт., 1995), *Acetes sp.*, *Alpheus sp.*, *Callinassa sp.*, *Exopalaemon sp.*, *Helice sp.*, *Hemigrapsus sp.*, *Macrophthalmus sp.*, *Macrophthel sp.*, *Metaplex sp.*, *Orithyia sp.*, *Palaemonoidea sp.*, *Scylla sp.*, *Sesarma sp.*, *Stomatopoda sp.* (He & Zhou, 1996; Lei с соавт., 2002). Эти виды могут демонстрировать симптомы болезни при подходящих условиях окружающей среды. Тем не менее, ракообразные, не относящиеся к десятиногим, такие как веслоногие ракообразные (Huang с соавт., 1995), коловратки (Yan с соавт., 2004), *Balanus sp.* (Lei с соавт., 2002) и *Tachypleidie sp.* (He & Zhou, 1996) могут быть, по-видимому, здоровыми животными-носителями. Существуют неубедительные доказательства статуса носителя WSSV у *Artemia salina* (Chang с соавт., 2002). Другие морские моллюски, полихеты (Vijayan с соавт., 2005), а также водные членистоногие, не являющиеся ракообразными, такие как морские ракушки (Isopoda) и личинки насекомых *Euphydradae*, могут механически переносить вирус без признаков инфекции (Lo & Kou, 1998).

2.3. Клиническая картина болезни

Заражение вирусом WSSCV иногда вызывает клиническое течение болезни (Tsai с соавт., 1999), в зависимости от факторов, которые еще недостаточно изучены, но связаны с устойчивостью видов и триггерами окружающей среды. При соответствующей дозе инфекции, достаточной для обеспечения достаточного времени до смерти, у животных, восприимчивых к болезни наблюдается большое количество вирионов, циркулирующих в гемолимфе (Lo с соавт., 1997), но это также может происходить и у устойчивых видов, у которых смертность не регистрируется. Таким образом, высокие вирусные нагрузки сами по себе не вызывают болезни или смертности для всех восприимчивых видов.

2.3.1. Механизмы передачи

Инфекция вирусом WSSV может передаваться горизонтально путем потребления инфицированной ткани (например, каннибализм, хищничество и т. д.) и по водным путям. Передача WSSV может происходить от практически здоровых животных при отсутствии болезни. Мертвые и умирающие животные могут быть источником передачи болезни (Lo & Kou, 1998).

Достоверная вертикальная передача (внутри яйцеклетки) WSSV к потомству не была продемонстрирована.

2.3.2. Превалентность

Превалентность инфекции WSSV сильно варьирует: от <1% в инфицированных диких популяциях до 100% в популяциях, содержащихся в неволе (Lo & Kou, 1998).

2.3.3. Географическое распределение

Заражение вирусом WSSV было выявлено у ракообразных в Китае (Народная Республика), Японии, Корее (Республика), Юго-Восточной Азии, Южной Азии, на Индийском континенте, на Средиземном море (Stentiford & Lightner, 2011), в Среднем Востоке и Северной и Южной Америках. В этих регионах имеются зоны и компартменты, свободные от инфекции WSSV (Lo с соавт., 2012).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Все виды креветок-пенеидов очень чувствительны к заражению вирусом WSSV, что часто приводит к высокой смертности. Крабы, раки, пресноводные креветки, лангусты и омары подвержены заражению вирусом WSSV, но заболеваемость и смертность от инфекции сильно варьируют (Lo & Kou, 1998). Высокие уровни инфекции WSSV известны у некоторых десятиногих при отсутствии клинического заболевания.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Вспышки болезни могут быть вызваны стрессовыми факторами, такими как быстрые изменения солености. Температура воды оказывает сильное влияние на проявление болезни, при этом средние температуры воды от 18 до 30°C способствуют вспышкам вируса WSSV (Song с соавт., 1996; Vidal с соавт., 2001). В условиях экспериментального заражения WSSV-индуцированная смертность у креветок снижается при повышении температуры выше 32°C (Vidal с соавт., 2001).

2.4. Контроль и профилактика

Несмотря на то, что основной механизм остается неизвестным, лабораторные эксперименты показали, что у «привитых» креветок и раков лучшая выживаемость после заражения вирусом WSSV. Впервые было показано, что креветки *Penaeus japonicus*, которые выжили при естественных и экспериментальных заражениях вирусом WSSV, продемонстрировали устойчивость к последующему заражению вирусом WSSV (Venegas с соавт., 2000). Более поздние исследования показали, что внутримышечная инъекция инактивированных вирионов WSSV или рекомбинантного структурного белка (VP28) обеспечивала креветкам некоторую защиту от экспериментальной инфекции вирусом WSSV. Кроме того, креветки, которым скармливали пищевые гранулы, покрытые инактивированными бактериями, сверхэкспрессирующими VP28, показали лучшую выживаемость после заражения вирусом WSSV (Witteveldt с соавт., 2004). Однако, несмотря на то, что эти результаты казались многообещающими, защита была эффективной только тогда, когда креветки были инфицированы низкой дозой вируса WSSV. Кроме того, эффект обычно длился всего несколько дней, а в случае раков - около 20 дней. Другим потенциальным средством защиты креветок от заражения вирусом WSSV является использование РНК-интерференции (РНКи). Ген-специфические двухцепочечные (дц) РНК вируса WSSV продуцировали сильную активность против WSSV, защищая креветок от инфекции

WSSV, но то же исследование показало, что длинная двухцепочечная РНК индуцировала как зависимые от последовательности, так и независимые антивирусные ответы у креветок (Robalino с соавт. al., 2005). Более недавнее исследование показало, что даже пероральное введение бактериально экспрессированной VP28 дцРНК может защитить креветку от инфекции WSSV (Sarathi с соавт., 2008). Тем не менее, хотя технология дцРНК продолжает изучаться, данных о полевых испытаниях вакцинации или подходе, основанном на РНКи, до сих пор нет.

2.4.1. Вакцинация

Эффективные методы вакцинации против инфекции вирусом WSSV не разработаны.

2.4.2. Химиотерапия

Опубликованные или валидированные методы отсутствуют.

2.4.3. Стимуляция иммунитета

Имеется несколько сообщений о том, что бета-глюкан, витамин С, экстракты водорослей (Several reports have shown that beta-glucan, vitamin C, seaweed extracts (фукоидан) и другие стимуляторы иммунитета могут повысить устойчивость к инфекции WSSV (Chang с соавт., 2003; Chotigeat с соавт., 2004).

2.4.4. Разведение устойчивых видов

Имеется сообщения об успехах в разведении *P. vannamei* с целью повышения устойчивости к инфекции вирусом WSSV has been reported (Cuéllar-Anjel et al., 2012; Huang с соавт., 2012).

2.4.5. Восполнение поголовья устойчивыми видами

Не применимо к инфекции вирусом WSSV.

2.4.6. Блокирующие агенты

В настоящее время нет эффективных блокирующих агентов, которые можно рекомендовать. гVP28 оказывает влияние, но его пока нельзя использовать в качестве практического блокирующего агента.

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

В отношении передачи через икру дезинфекция икры, вероятно, будет эффективной (Lo & Kou, 1998), но это еще не подтверждено в официальных научных исследованиях.

2.4.8. Общие практики содержания

Для борьбы с инфекцией WSSV был успешно использован ряд методов выращивания, таких как отказ от посадки в холодное время года, использование маточного поголовья, свободного от специфической патогенной микрофлоры (SPF) или демонстрирующего отрицательные результаты в полимеразной цепной

реакции (ПЦР), использование биологически безопасной воды и системы разведения (Withyachumnarnkul, 1999) и поликультуры креветок и рыб (He с соавт., неопубликованные данные).

3. Отбор образцов

3.1. Выбор индивидуальных образцов

Образцы умирающих креветок или креветок, у которых наблюдаются клинические признаки (см. Раздел 4.1.1) или которые демонстрируют поведенческие изменения (раздел 4.1.2), должны быть отобраны на исследования с целью обнаружения вируса WSSV.

3.2. Консервирование образцов для представления

Смотрите Главу 2.2.0 для рекомендаций по консервированию образцов для предполагаемого метода исследования.

3.3. Объединение образцов в пул

Влияние объединения в пул на диагностическую чувствительность не оценивалось, поэтому исследование особей на более поздних стадиях жизненного цикла должно осуществляться отдельно. Однако может потребоваться объединение в пул особей на ранних жизни, например, постличинки, для получения достаточного материала для экстракции нуклеиновой кислоты и проведения молекулярных исследований.

3.4. Наиболее подходящие органы и ткани

Анализ тканевого тропизма как из экспериментально инфицированных креветок, так и из отловленных в дикой природе самок показывает, что ткани, происходящие из эктодермы и мезодермы, особенно кутикулярный эпителий и подкожные соединительные ткани, а также другие ткани-мишени (например, антеннальная железа, кроветворный орган и т. д.), являются основными тканями-мишенями для заражения вирусом WSSV. Образцы плеоподов, жабр, гемолимфы, живота или брюшной мышцы рекомендуются для исследований (Lo с соавт., 1997).

Для скрининга с сохранением жизнеспособности ценного маточного поголовья с помощью ПЦР подходят гемолимфа или плеоподы. Пожалуйста, см. Раздел 4.3.1.2.4.1 для получения подробной информации о процедуре отбора образцов. (Lo с соавт., 1997).

3.5. Неподходящие образцы/ткани

Несмотря на то, что WSSV инфицирует нижнюю соединительную ткань в гепатопанкреасе и средней кишке креветок, столбчатые эпителиальные клетки этих двух органов имеют эндодермальное эмбриональное происхождение (Lo с соавт., 1997), и они не подходят для обнаружения. Фасетчатый глаз может содержать ингибитор ПЦР (Lo с соавт., 1997), и поэтому он не подходит для диагностики на основе ПЦР.

4. Методы диагностики

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Белые пятна внутри внешнего скелета являются наиболее часто наблюдаемым клиническим признаком. У большинства креветок эти пятна варьируются от едва видимых до 3 мм в диаметре, и они иногда объединяются в более крупные пятна. Однако следует отметить, что факторы стресса окружающей среды, такие как высокая щелочность или бактериальные заболевания, также могут вызывать белые пятна на панцире креветок, и что у умирающих креветок при заражении WSSV может наблюдаться небольшое количество белых пятен, или могут не наблюдаться вообще. Следовательно, появление белых пятен не является достоверным диагностическим признаком заражения WSSV. В заболевших популяциях наблюдается высокая степень изменения цвета с преобладанием красноватых или розоватых обесцвеченных креветок.

Инфекции вирусом WSSV могут быть субклиническими или проявляться как клиническое заболевание. Креветки-пенеиды в аквакультуре обычно демонстрируют клинические признаки, связанные с высокой заболеваемостью и смертностью. Некоторые животные могут умереть без каких-либо клинических признаков. Виды, не относящиеся к пенеидам (например, краб, лобстер) обычно имеют субклинические инфекции в естественных условиях.

4.1.2. Поведенческие изменения

У пораженных животных могут наблюдаться летаргия, сниженное потребление корма или отказ от него, и ненормальное поведение при плавании - медленное плавание, плавание на боку, плавание у поверхности воды и кучкование вокруг краев отсеков для выращивания (Corbel с соавт., 2001; Sahul Nameed с соавт., 1998; Sahul Nameed с соавт., 2001). В течение нескольких дней после появления поведенческих признаков можно ожидать очень высокий уровень смертности в популяции креветок.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

В дополнение к клиническим и поведенческим признакам в разделе 4.1.1 и 4.1.2 выше, у клинически пораженной пенеидной креветки отмечена следующая макропатология: неплотное прилегание панциря с кутикулярным эпителием внизу (Sánchez-Paz, 2010), поэтому панцирь может легко удалить (Zhan с соавт., 1998); пустой желудочно-кишечный тракт вследствие анорексии (Escobedo-Bonilla с соавт., 2008); задержка свертывания гемолимфы (Heidarieh с соавт., 2013); чрезмерное обрастание жабр (Wu с соавт., 2013) и внешний скелет.

4.2.2. Клиническая химия

Гемолимфа, извлеченная из креветок, инфицированных вирусом WSSV- всегда демонстрирует отсроченную (или иногда полностью отсутствующую) реакцию свертывания.

4.2.3. Микроскопия патологических изменений

4.2.3.1. Влажные препараты

Демонстрация гипертрофированных ядер в давленных препаратах жабр и / или кутикулярного эпителия, которые могут быть окрашены или не окрашены.

4.2.3.1.1. Т-Е окрашивание

Окрашивающий раствор Т-Е может быть приготовлен из 0,6% трипанового синего, 0,2% эозина Y, 0,5% NaCl, 0,5% фенола и 20% глицерина (Huang & Yu, 1995) и использоваться следующим образом:

- i) Кусочек пораженной ткани (например, кусочек жабры или эпителия желудка без кутикулы) помещают на предметное стекло и измельчают скальпелем.
- ii) Добавляют 1–2 капли окрашивающего раствора Т-Е в измельченную ткань, перемешивают и оставляют для окрашивания на 3–5 минут.
- iii) Покровное стекло помещают на испачканную салфетку и накрывают несколькими кусочками впитывающей бумаги. Используют большой палец, чтобы раздавить измельченную ткань для получения одного слоя клеток.

Если образец был отобран от сильно инфицированной креветки, то гипертрофированные ядра и внутриядерные эозинофильные или вакуумоподобные тела включения легко заметить под световым микроскопом 400-1000 ×.

4.2.3.2. Мазки

Демонстрация агрегатов вирионов WSSV в неокрашенных мазках гемолимфы методом темнопольной микроскопии.

ПРИМЕЧАНИЕ. Это самый простой из микроскопических методов, который рекомендуется людям с ограниченным опытом диагностики инфекции, вызванной WSSV. Агрегаты выглядят как небольшие отражающие пятна диаметром 0,5 мкм (Motoyama с соавт., 1995).

4.2.3.3. Зафиксированные срезы

Гистологические изменения, обычно отмечаемые у восприимчивых видов, включают в себя: гипертрофированные ядра с маргинизированным материалом хроматина в инфицированных вирусом клетках; окрашенные эозинофильные или бледно-базофильные (окрашивание гематоксилином и эозином) внутриядерные вирусные включения в гипертрофированных ядрах и мультифокальный некроз, ассоциированный с пикнотическими и кариоректическими ядрами в пораженных тканях эктодермального и мезодермального происхождения. Инфицирование вирусом инфекционного иподермального и гематопозитического некроза, другим ДНК-вирусом, приводит к сходным включениям, которые необходимо отличать от включений WSSV.

4.2.3.4. Гибридизация *in-situ*

Использование WSSV-специфических ДНК-зондов с гистологическими срезами для демонстрации присутствия нуклеиновой кислоты WSSV в инфицированных клетках.

4.2.3.5. Иммуногистохимия

Использование WSSV-специфических антител с гистологическими срезами или влажными препаратами для демонстрации присутствия антигена WSSV в инфицированных клетках.

4.2.4. Электронная микроскопия/цитопатология

Демонстрация вируса в срезах тканей или в полуочищенных отрицательно окрашенных вирусных препаратах (например, из гемолимфы). См. Раздел 2.1.1 для морфологии вирионов.

4.3. Методы обнаружения и идентификации агента

4.3.1. Прямые методы обнаружения

Данные отсутствуют.

4.3.1.1. Микроскопические методы.

Смотрите Раздел 4.2.3 выше.

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Смотрите Раздел 4.2.3.1 выше.

4.3.1.1.2. Смывы

Смотрите Раздел 4.2.3.2 выше

4.3.1.1.3. Зафиксированные срезы.

Смотрите Раздел 4.2.3.3 выше.

4.3.1.2. Выделение и идентификация агента

4.3.1.2.1. Метод биопробы

Если доступны SPF-креветки, следующий метод биопробы, основанный на Nunan с соавт., 1998 и Durand с соавт., 2000, подходит для диагностики WSSV.

- i) Для биопробы плеоподов удаляют от креветок, предположительно инфицированных WSSV, и гомогенизируют в буфере TN (0,02 М Трис / HCl, 0,4 М NaCl, pH 7,4).
- ii) После центрифугирования при 1000 g в течение 10 минут разбавляют надосадочную жидкость 1/10 2% NaCl и отфильтровывают (фильтр 0,2 мкм).
- iii) Вводят 0,2 мл инокулята в дорсо-латеральную часть четвертого брюшного сегмента индикаторной креветки (например, SPF *Penaeus vannamei* на

ювенильной стадии), вводя между тергальными пластинами в мышцу третьего брюшного сегмента.

- iv) Умиравших креветок обследуют с применением макроскопических методов или с использованием методов, описанных выше. Если через 3–5 дней после инокуляции все еще нет умирающих креветок и все результаты теста отрицательные, то можно с уверенностью сделать вывод, что результаты биопробы отрицательные.

4.3.1.2.2. Культура клеток/искусственная среда

WSSV может быть выделен из первичных культур лимфоидных клеток или клеток яичников. Тем не менее, НЕ рекомендуется использовать клеточную культуру в качестве обычного метода выделения из-за: 1) высокого риска контаминации, и из-за того, что 2) состав среды варьируется в зависимости от типа ткани, вида хозяина и экспериментальной цели; то есть на сегодняшний день не существует стандартных или признанных сред, которые можно было бы рекомендовать. Поскольку первичную культуру клеток так сложно получить и поддерживать для целей выделения вируса, метод биопробы должен быть основным средством размножения вируса.

4.3.1.2.3. Методы обнаружения антигена на основе антител

Как поликлональные, так и моноклональные антитела, полученные против вируса или рекомбинантного вирусного структурного белка, использовались в различных иммунологических анализах, включая вестерн-блоттинг, иммунодоттинг, непрямую реакцию иммунофлуоресценции (РНИФ), иммуногистохимию (ИНС) или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления WSSV (Huang с соавт., 1995; Poulos с соавт., 2001; Sithigorngul с соавт., 2006; Yoganandhan с соавт., 2004). Методы, основанные на антителах, могут быть быстрыми, удобными и применимыми для использования в полевых условиях, но, поскольку они имеют примерно ту же чувствительность, что и одноэтапная ПЦР, их рекомендуется использовать только для подтверждения острой инфекции WSSV.

4.3.1.2.4. Методы молекулярных исследований

4.3.1.2.4.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Протокол ПЦР, описанный здесь, заимствован у Lo с соавт., 1996a и Lo с соавт., 1996b, и использует методы отбора проб Lo с соавт., 1997. Он рекомендуется для всех ситуаций, когда требуется заражение с диагнозом WSSV. Положительный результат на первом этапе этого стандартного протокола подразумевает серьезное заражение WSSV, тогда как, когда положительный результат получается только на втором этапе амплификации, указывается латентная инфекция или инфекция в состоянии носительства. Также были разработаны альтернативные ПЦР-анализы (например, Nunan & Lightner, 2011), но перед их использованием их следует сначала сравнить с протоколом, описанным здесь.

Коммерческие наборы для ПЦР доступны для обнаружения WSSV и являются приемлемыми, если они были валидированы как пригодные для этой цели. Пожалуйста, обратитесь к Списку МЭБ чтобы получить информацию о

наборах, которые были сертифицированы МЭБ (<http://www.oie.int/en/scientific-expertise/registration-of-diagnostic-kits/background-information/>).

Экстракция ДНК

- i) Отбирают 100–200 мг креветочной ткани (от плеоподов живых особей креветки от ювенольного до переходного периода, пост-личинки L1 и выше [PL11 выше] с удаленными головами или целые PL10 или используют 100 мкл гемолимфы) в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку с 600 мкл раствора для лизиса (100 мМ NaCl, 10 мМ Трис / HCl, pH 8, 25 мМ ЭДТА [этилендиаминтетрауксусная кислота], 0,5% SLS [N-лаурилсаркозинат натрия] или 2% SDS [додецилсульфат натрия] и 0,5 мг мл⁻¹ протеиназы К добавляют непосредственно перед использованием). Для неразрушающего скрининга плеоподы могут быть удалены раскаленным пинцетом. Для этой процедуры животное должно быть завернуто во влажное полотенце, чтобы оставался открытым только орган, подлежащий удалению.
- ii) Используя одноразовую палочку, тщательно гомогенизируют ткань в пробирке.
- iii) После гомогенизирования инкубируют при температуре 65°C в течение 1 часа.
- iv) Добавляют 5 М NaCl до получения конечной концентрации 0,7 М. Затем медленно добавляют 1/10 объема раствора N-цетил N, N, N-триметиламмоний бромид (СТАВ/ЦТАБ) / NaCl (10% ЦТАБ в 0,7 М NaCl) и тщательно перемешивают.

ПРИМЕЧАНИЕ. В дополнение к методу экстракции ЦТАБ, описанному здесь, коммерческие наборы для экстракции часто используются во время обычной деятельности по надзору.

- v) Инкубируют при 65 °C в течение 10 минут, а затем при комнатной температуре добавляют равный объем хлороформа / изоамилового спирта (24/1) и осторожно перемешивают. Центрифугируют при 13000 g в течение 5 минут, а затем переносят водный раствор (верхний слой) в свежую 1,5 мл пробирку и добавляют равный объем фенола.
- vi) Последний верхний слой переносят в новую пробирку, осторожно смешивают с двумя объемами хлороформа / изоамилового спирта (24/1) и центрифугируют при 13000 g в течение 5 минут.
- vii) Верхний слой переносят в новую пробирку и осаждают ДНК, добавляя два объема 95% или абсолютного этилового спирта с последующим выдерживанием при -20°C в течение 30 минут или при -80°C в течение 15 минут.
- viii) Центрифугируют при 13000 g в течение 30 минут и удаляют этиловый спирт. Промывают осажденную ДНК 70% этиловым спиртом, высушивают и ресуспендируют в 100 мкл стерилизованной дважды дистиллированной воды при 65°C в течение 15 минут
- ix) 1 мкл данного раствора ДНК используют для одной ПЦР.

Примечание: следующие процедуры "вложенной" ПЦР хорошо разработаны и обеспечивают надежные результаты диагностики при указанных условиях. Однако следует позаботиться о том, чтобы образцы

ДНК были приготовлены из рекомендованных органов и чтобы точно соблюдался температурный режим, требуемый для проведения ПЦР (особенно для отжига, рекомендуемая температура составляет 55 ° С). Чтобы предотвратить возможность ложноположительных результатов, важно придерживаться указанных процедур, особенно когда они используются для тестирования новых хозяев-кандидатов, таких как *Cherax quadricarinatus* (Claydon с соавт., 2004), а также *Procambarus clarkii* (Луизианский рак) и *Procambarus zonangulus* (белый речной рак). Для диагностированных случаев заражения WSSV у нового хозяина или в ранее свободной зоне следует использовать секвенирование ДНК для подтверждения положительных результатов.

Первый этап ПЦР

- i) Добавляют 1 мкл матричного раствора ДНК (содержащего около 0,1–0,3 мкг ДНК) в пробирку для ПЦР, содержащую 100 мкл реакционной смеси (10 мМ Трис / HCl, pH 8,8, 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,1% Тритон X- 100, 200 мкМ каждого dNTP, 100 пмоль каждого праймера, 2 единицы термостабильной ДНК-полимеразы).
- ii) Последовательности внешнего праймера: 146F1, 5'-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCTAG-3' и 146R1, 5'-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3'.
- iii) Профиль ПЦР - один цикл при 94 ° С в течение 4 минут, 55° С в течение 1 минуты и 72°С в течение 2 минут, после чего следует 39 циклов при 94 ° С в течение 1 минуты, 55°С в течение 1 минуты и 72 ° С в течение 2 минут и окончательное 5-минутное удлинение при 72°С. WSSV-специфичный ампликон этой реакции составляет 1447 п.н. Чувствительность составляет примерно 20000 копий плазмидной матрицы.

Второй этап («вложенной») ПЦР

Данный второй этап необходим для обнаружения WSSV у креветок на стадии носительства.

- i) Добавляют 10 мкл продукта первого этапа ПЦР к 90 мкл ПЦР-смеси с таким же составом, как указано выше, за исключением того, что он содержит вторую (внутреннюю) пару праймеров: 146F2 (5'-GTA-ACT-GCC-CCT) - TCC-ATC-TCC-A-3 ') и 146R2 (5'-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3').
- ii) Используют тот же протокол амплификации ПЦР, что и выше. WSSV-специфичный ампликон данной реакции составляет 941 п.н. Общая чувствительность обоих этапов составляет приблизительно 20 копий плазмидной матрицы WSSV.
- iii) Для визуализации, проводят электрофорез 10 мкл продуктов реакции ПЦР на 1% агарозных гелях, содержащих бромид этидия в концентрации 0,5 мкг мл⁻¹.
- iv) Специфичные для десятиногих ракообразных праймеры (143F 5'-TGC-CTT-ATC-AGCTNT-CGA-TTG-TAG-3 'и 145R 5'-TTC-AGN-TTT-GCA-ACC-ATA-CTT-CCC-3', позволяющие получить ампликон длиной 848 п.н; N представляет G, A, T или C) должны использоваться в контрольных реакциях для подтверждения качества экстрагированной ДНК и целостности реакции ПЦР. У креветок-пенеидов *P. aztecus* продукт ПЦР, генерируемый этой парой специфических для десятиногих ракообразных

праймеров, соответствует нуклеотидной последовательности 352–1200 рРНК 18s. Последовательность десятиногих ракообразных 18s РНК высоко консервативна и производит продукт ПЦР одинакового размера почти у всех десятиногих ракообразных. Положительный контроль (матрица ДНК WSSV) и отрицательный контроль (без матрицы ДНК и матрицы креветок) должны быть включены в каждый анализ.

4.3.1.2.4.2. ДНК секвенирование продуктов ПЦР

Ампликон из двухэтапной "вложенной" диагностической ПЦР должен быть секвенирован. Протоколы клонирования и секвенирования, описанные здесь, заимствованы у Claydon с соавт., 2004.

- i) Иссекают фрагменты ДНК, отобранные для дальнейшего анализа, из агарозных гелей и очищают их с помощью любого из имеющихся в продаже ПЦР наборов для очистки.
- ii) Слабые ампликоны могут быть клонированы в векторные плазмиды перед секвенированием, если это необходимо. Для секвенирования ДНК усиливают и очищают рекомбинантную плазмиду.
- iii) Для секвенирования ампликона используют подходящие праймеры.
- iv) Последовательности, полученные с использованием доступных баз данных, и инструмента поиска локального выравнивания (BLAST) сравнивают для определения приблизительной филогенетической принадлежности.

4.3.1.2.4.3. ПЦР в реальном времени (по технологии TaqMan)

Протокол, описанный здесь, заимствован у Durand & Lightner, 2002. Этот метод обнаружения очень специфичен для WSSV, чрезвычайно чувствителен (четыре копии) и имеет широкий динамический диапазон (логарифмов).

Конструирование вектора положительного контроля и стандартной кривой

Фрагмент ДНК размером 69 п.н., амплифицированный прямыми и обратным праймерами (указан ниже), клонируют в pGEM-T easy или других подходящих векторах, а затем подтверждают секвенированием. Плазмидную ДНК очищают с помощью любых коммерческих наборов для экстракции плазмид, а концентрацию определяют с использованием спектрофотометра или других методов. Число копий гена определяют в соответствии с молярной массой, полученной из плазмидной ДНК, содержащей вставку длиной 69 п.н. Затем плазмидные ДНК серийно разбавляют в 10 раз, чтобы получить стандартные кривые в диапазоне от 10¹ до 10⁷ копий.

Экстракция ДНК

Экстракцию ДНК следует выполнять в соответствии с описанным выше протоколом для ПЦР (4.3.1.2.4.1) или используя коммерческий набор. Концентрация очищенной ДНК может быть определена спектрофотометром или другими методами.

ПЦР в реальном времени

Анализ TaqMan проводят с использованием TaqMan Universal PCR Master Mix, который содержит ДНК-полимеразу AmpliTaq Gold, AmpErase UNG, dNTP с dUTP и оптимизированные компоненты буфера (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Последовательности праймеров: WSS1011F: 5'-TGG-TCC-CGT-CCT-CAT-CTC-AG-3', WSS1079R: 5'-GCT-GCC-TTG-CCG-GAA-ATT-A-3', зонд Taqman: 5'-AGC-CAT-GAA-GAA-TГК-ВКТ-СТО-TC-CAC-A-3'.

- i) Добавляют образец 10-50 нг ДНК, чтобы создать 25 мкл реакционной смеси, содержащей 0,3 мкМ каждого праймера и 0,15 мкМ зонда TaqMan.
- ii) Профиль ПЦР представляет собой один цикл при 50°C в течение 2 минут для урацил-N-гликозилазы AmpErase (UNG) и 95°C в течение 10 минут для активации AmpliTaq с последующими 40 циклами при 95°C в течение 15 секунд и 60°C в течение 1 минуты.
- iii) Чтобы определить количество копий WSSV в экстрагированных образцах ДНК, образцы подвергают реакции ПЦР вместе с серийно разведенным стандартом плазмидной ДНК. После реакции программное обеспечение, прилагаемое к системе ПЦР, автоматически определяет значение Ct для каждого образца ПЦР. На основе значений Ct программа рассчитывает стандартную кривую для стандартного разведения и определяет количество копий WSSV для образцов ДНК путем экстраполяции значений из стандартной кривой.

4.3.1.2.4.4. Метод гибридизации *in-situ* (ISH)

Протокол, описанный здесь, основан на протоколе, разработанном Nunan & Lightner, 1997.

- i) Переболевшую креветку фиксируют в фиксаторе Davidson's AFA на 24–48 часов.
- ii) Ткани помещают в парафин и разрезают на срезы размером 5 мкм. Срезы помещают на положительно заряженные предметные стекла.
- iii) Предметное стекло нагревают при температуре 65°C в течение 30 минут.
- iv) Депарафинизируют, регидратируют и затем обрабатывают в течение 2–30 минут (в зависимости от типа ткани) с использованием 100 мкг/мл протеиназы К в буфере Tris / NaCl / EDTA (TNE) при 37°C.
- v) Предметные стекла вторично фиксируют путем охлаждения в предварительно охлажденном 0,4% формальдегиде в течение 5 минут при 4°C и промывают в 2 × стандартном солевом растворе цитрата (SSC; 1 × SSC = 150 мМ NaCl, 15 мМ тринатрийцитрат, pH 7,0) при комнатной температуре.
- vi) Предметные стекла предварительно гибридизируют с использованием раствора для предварительной гибридизации (50% формамид, 0,2% фикоилл 400, 0,2% поливинилпирролидон, 0,2% бычий сывороточный альбумин, 5 × SSC, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ Трис / HCl, pH 8) в течение 30 минут при 42°C.
- vii) Затем выполняют гибридизацию с WSSV-специфичным ПЦР ампликоном длиной 1447 п.н. (см. Выше раздел 4.3.1.2.4.1 «Реакция ПЦР на первом этапе»), который был помечен дигоксигенином. Рекомендуется пометить зонд путем включения DIG-dNTP методом ПЦР. Оптимальную концентрацию следует определять путем тестирования и корректировки до получения высокого специфического сигнала на низком фоне.

- viii) Для гибридизации кипятят зонд в течение 10 минут и немедленно помещают на лед. Разводят зонд до 30–50 нг/мл в растворе для предварительной гибридизации и наносят 500 мкл на каждое предметное стекло.
- ix) Предметное стекло помещают на нагревательную пластину с температурой 85–95°C на 6–10 минут (убедитесь, что точка кипения не достигнута), предметное стекло охлаждают на льду в течение 5 минут, а затем переносят во влажную камеру на 16–20 часов при 42°C.
- x) После гибридизации предметные стекла промывают дважды по 15 минут, каждый раз $2 \times SSC$ при комнатной температуре, дважды по 5 минут $1 \times SSC$ при 37°C и дважды в течение 5 минут $0,5 \times SSC$ при 37°C.
- xi) Для определения гибридизации предметные стекла промывают буфером малеиновой кислоты (100 мМ малеиновой кислоты, 150 мМ NaCl, pH 7,5) в течение 5 минут при комнатной температуре.
- xii) Предметные стекла блокируют блокирующим раствором (2% нормальной козьей сыворотки и 0,3% Triton X-100 в буфере малеиновой кислоты) в течение 30 минут при 37°C.
- xiii) Добавляют 250 мкл раствора антитела, конъюгированного с щелочной фосфатазой (AP) против DIG (1 мкл / мл-1 фрагмент анти-DIG / AP-Fab в буфере малеиновой кислоты, содержащем 1% нормальной козьей сыворотки и 0,3% Triton X-100) на каждое предметное стекло и инкубируют при 37°C в течение 30 минут.
- xiv) Предметные стекла дважды промывают буфером малеиновой кислоты в течение 10 минут каждое и один раз буфером для детекции (100 мМ Трис/HCl, 100 мМ NaCl, pH 9,5) при комнатной температуре.
- xv) Добавляют 500 мкл проявочного раствора (приготовьте непосредственно перед использованием, добавив 45 мкл раствора соли NBT [75 мг/мл в 70% диметилформамиде], 35 мкл 5-бром-4-хлор-3-индоилфосфата, толуидиновой соли [X -фосфат] [50 м /мл в диметилформамиде] и 1 мл 10% PVA в 9 мл буфера для детекции) на каждое предметное стекло и инкубируют в темноте во влажной камере в течение 1–3 часов.
- xvi) Реакцию останавливают, промывая предметные стекла в буфере TE (10 мМ Tris / HCl, 1 мМ EDTA, pH 8,0) в течение 15 минут при комнатной температуре. Предметные стекла промывают в дистиллированной воде десять раз, окрашивают в 0,5% водном растворе Bismarck Brown Y примерно в течение 5 минут, а затем промывают водой. Препарат заключают с использованием водной среды для заключения для немедленного наблюдения или предметные стекла дегидратируют и фиксируют с использованием среды для заключения для длительного хранения.
- xvii) Предметные стекла закрепляют покровными стеклами и исследуют их с помощью светлопольного микроскопа. Положительная гибридизация проявляется в виде осадка от темно-синего до черного цвета на фоне контрастного окрашивания от желтого до коричневого.

4.3.1.2.4.5. *Изотермическая амплификация с формированием петель (ИАФП)*

Описанный здесь протокол заимствован у Копо с соавт., 2004. Метод ИАФП

является чувствительным и быстрым, и он амплифицирует целевые нуклеиновые кислоты в изотермических условиях, поэтому не требует сложного оборудования для термоциклирования.

Экстракция ДНК

Экстракцию ДНК можно проводить в соответствии с описанным выше протоколом для ПЦР (4.3.1.2.4.1) или другими подходящими методами или с помощью коммерческих наборов.

Реакция ИАФП

- i) ДНК добавляют в пробирку, чтобы получить 25 мкл реакционной смеси (20 мМ Трис / HCl, pH 8,8, 10 мМ KCl, 8 мМ MgSO₄, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% Твин 20, 0,8 М бетаин, 1,4 мМ каждого dNTP, 40 пмоль праймеров WSSV-FIP и -BIP, 5 пмоль праймеров WSSV-F3 и -B3).
- ii) Последовательности праймеров - WSSV-FIP: 5'-GGG-TCG-TCG-AAT-GTT-GCC-CAT-TTT-GCC-TAC- GCA-CCA-ATC-TGT-G-3', WSSV-BIP: 5'-AAA-GGA-CAA-TCC-CTC-TCC-TGC-GTT-TTA-GAA- CGG-AAG-AAA-CTG-CC-TT-3', WSSV-F3:ACG-GAC-GGA-GGA-CCC-AAA-TCG-A-3', WSSV-B3: 5'-GCC-TCT-GCA-ACA-TCC-TTT-CC-3'.
- iii) Смесь нагревают при 50°C в течение 5 минут и при 95°C в течение 5 минут, затем охлаждают на льду и добавляют 1 мкл (8 ед.) Bst ДНК-полимеразы .
- iv) Смесь инкубируют при 65 ° С в течение 60 минут, а затем реакцию останавливают при 80 ° С в течение 10 минут.
- v) Для визуализации, проводят электрофорез 2 мкл продуктов реакции ИАФП на 2% агарозных гелях, содержащих бромид этидия в концентрации 0,5 мкг/мл. В результате реакции получают продукты ИАФП, специфичные для WSSV, с множеством полос различного размера от примерно 200 пар оснований на загрузочную лунку.

Надежные коммерческие наборы ИАФП могут быть альтернативой для диагностики WSSV.

4.3.1.2.5. Очистка агента

Вирион WSSV может быть очищен на льду, как описано ранее, с небольшими модификациями (Хіе с соавт., 2005). Если коротко, то собирают пять или шесть умирающих раков или креветок (по 20-25 г каждый) через 3 дня –1 неделю после заражения. Гомогенизируют все ткани, за исключением гепатопанкреаса, в течение 2 минут с использованием механического гомогенизатора в 1200 мл буфера TNE (50 мМ Трис / HCl, 400 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, pH 8,5), содержащего ингибиторы протеаз (1 мМ фенилметилсульфонилфторид, 1 мМ бензамидин и 1 мМ Na₂S₂O₅). Центрифугируют при 3500 g в течение 5 минут. Сохраняют супернатант и повторно гомогенизируют осадок в 1 200 мл буфера TNE. Отфильтровывают объединенный в пул супернатант через нейлоновую сетку (400 mesh) и центрифугируют при 30 000 g в течение 30 минут. Удаляют супернатант и осторожно промывают верхний рыхлый слой (розовый) осадка с помощью пипетки Пастера. Ресуспенсируют нижний компактный слой (серый) в 10 мл буфера TM (50 мМ Трис / HCl, 10 мМ MgCl₂, pH 7,5). Объединяют

неочищенную суспензию вируса и центрифугируют при 3000 g в течение 5 минут. Снова центрифугируют супернатант при 30 000 g в течение 20 минут. Удаляют супернатант и розовый рыхлый слой и ресуспендируют белый осадок в 1,2 мл буфера ТМ, содержащего 0,1% NaN₃. Переносят в пробирку Эппендорфа объемом 1,5 мл. Центрифугируют суспензию три-пять раз при 650 g в течение 5 минут каждый раз для удаления розовых примесей. Наконец, суспензию чистого вируса, подобную молоку, оставляют на хранение при температуре 4 °С до использования.

Серологические методы

Не разработаны.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Методы, доступные в настоящее время для целевого надзора и диагностики инфекции WSSV, перечислены в таблице 5.1. Обозначения, используемые в таблице: a = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности, диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод может применяться в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы серьезно ограничивают его применение; и d = метод в настоящее время не рекомендуется для этой цели. Это несколько субъективно, поскольку пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и полезности. Хотя не все тесты, перечисленные в категории А или В, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их стандартный характер и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	Пост личинки	Молодь	Взрослые особи		
Исследование микроскопических признаков	d	d	c	c	c	d
Метод биопробы	d	d	d	d	c	b
Влажные препараты и мазки	d	d	c	c	c	d

Table 5.1. Methods for targeted surveillance and diagnosis

Метод	Целевой надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	Постличинки	Молодь	Взрослые особи		
Гистопатология	d	c	c	c	a	c
Просвечивающая электронная микроскопия (EM)	d	d	d	d	d	a
Анализы на основе антител	d	d	c	c	a	b
ДНК зонды <i>In-situ</i>	d	d	c	c	a	a
ПЦР в реальном времени	c	b	a	a	a	a
Традиционная ПЦР	d	c	b	b	b	a
Изотермическая амплификация с формированием петель (LAMP)	d	d	a	a	a	a
Последовательность	d	d	d	d	d	a

PLs = постличинки; LM = световая микроскопия; EM = электронная микроскопия; PCR/ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Исследования, рекомендованные для целевого надзора с целью провозглашения свободы от болезни белых пятен

ПЦР в реальном времени - это рекомендуемый тест для целевого надзора, для провозглашения свободы от инфекции вирусом, вызывающим болезнь белых пятен.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение подозрительного случая

Подозрение на WSSV возникает, если удовлетворен хотя бы один из следующих критериев:

- i) Макроскопические признаки, характерные для инфекции WSSV;
- ii) Гистопатологические изменения, характерные для инфекции with WSSV;
- iii) Положительные результаты традиционной ПЦР;
- iv) Положительные результаты ПЦР в реальном времени;
- v) Положительные результаты LAMP.

7.2. Определение подтвержденного случая

Заражение WSSV считается подтвержденным, если выполняется один или несколько из следующих критериев:

- i) Гистопатологические признаки соответствует WSSV и результаты гибридизации *in situ* положительные;
- ii) Положительные результаты традиционной ПЦР и традиционной ПЦР, нацеленной на другую область генома WSSV, с анализом последовательности, соответствующим WSSV;
- iii) Положительные результаты ПЦР в реальном времени и традиционной ПЦР, нацеленной на другую область генома WSSV, с анализом последовательности, соответствующим WSSV;
- iv) Положительные результаты LAMP и традиционной ПЦР, нацеленной на другую область генома WSSV, с анализом последовательности, соответствующим WSSV.

8. Библиография

BALASUBRAMANIAN G., SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., SARATHI M. & SAHUL HAMEED A.S. (2006).

Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. *J. Fish Dis.*, **29**, 569–572.

CHANG C.-F., SU M.-S., CHEN H.-Y. & LIAO I.C. (2003). Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, **15**, 297–310.

CHANG P.S., CHEN H.C. & WANG Y.C. (1998). Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by *in situ* hybridization. *Aquaculture*, **164**, 233–242.

CHANG P.S., LO C.F., WANG Y.C. & KOU G.H. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 131–139.

CHANG Y.S., LO C.F., PENG S.E., LIU K.F., WANG C.H. & KOU G.H. (2002). White spot syndrome virus (WSSV)

PCR-positive *Artemia* cysts yield PCR-negative nauplii that fail to transmit WSSV when fed to shrimp postlarvae. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 1–10.

CHEN I.T., AOKI T., HUANG Y.T., HIRONO I., CHEN T.C., HUANG J.Y., CHANG G.D., LO C.F. & WANG H.C. (2011).

White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J. Virol.*, **85**, 12919–12928.

CHOTIGEAT W., TONGSUPA S., SUPAMATAYA K. & PHONGDARA A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, **233**, 23–30.

CLAYDON K., CULLEN B. & OWENS L. (2004). OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in

Cherax quadricarinatus. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 265–268.

CORBEL V., ZUPRIZAL Z., SHI C., HUANG, SUMARTONO, ARCIER J.-M. & BONAMI J.-R. (2001). Experimental

infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *J. Fish Dis.*, **24**, 377–382.

CUÉLLAR-ANJEL J., WHITE-NOBLE B., SCHOFIELD P., CHAMORRO R. & LIGHTNER D.V. (2012). Report of significant WSSV-r esistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a Panamanian breeding program. *Aquaculture*, **368–369**, 36–39.

DURAND S.V. & LIGHTNER D.V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Dis.*, **25**, 381–389.

DURAND S.V., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 128–135.

ESCOBEDO-BONILLA C.M., ALDAY-SANZ V., WILLE M., SORGELOOS P., PENSAERT M.B. & NAUWYNCK H.J. (2008). A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *J. Fish Dis.*, **31**, 1–18.

FLEGEL T.W. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 433–442.

HE J. & ZHOU H. (1996). Infection route and host species of white spot syndrome baculovirus. *Acta Sci. Natur. Univ. Sunyatseni*, **38**, 65–69.

HEIDARIEH M., SOLTANI M., MOTAMEDI SEDEH F. & SHEIKHZADEH N. (2013). Low water temperature retards white spot syndrome virus replication in *Astacus leptodactylus* Crayfish. *Acta Sci. Vet.*, **41**, 1–6.

HUANG J. & YU J. (1995). A new staining method for on-site observation of viral inclusion bodies of penaeid shrimp. *Mar. Fish. Res. (Chinese J.)*, **16**, 31–39.

HUANG J., YU J., WANG X.-H., SONG X.-L., MA C.-S., ZHAO F.-Z. & YANG C.-H. (1995). Survey on the pathogen and route of transmission of baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis in shrimp by ELISA of monoclonal antibody. *Mar. Fish. Res. (Chinese J.)*, **16**, 40–50.

HUANG Y., YIN Z., WENG S., HE J. & LI S. (2012). Selective breeding and preliminary commercial performance of *Penaeus vannamei* for resistance to white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, **364–365**, 111–117.

KONO T., SAVAN R., SAKAI M. & ITAMI T. (2004). Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, **115**, 59–65.

LEI Z.-W., HUANG J., SHI C.-Y., ZHANG L.-J. & YU K.-K. (2002). Investigation into the hosts of white spot syndrome virus (WSSV). *Oceanol. Limnol. Sin.*, **33**, 250–258.

LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

LO C.F., AOKI T., BONAMI J.R., FLEGEL T.W., LEU J.H., LIGHTNER D.V., STENTIFORD G., SÖDERHÄLL K., WALKER P.W., WANG H.C., XUN X., YANG F. & VLAK J.M. (2012). *Nimaviridae*. In: *Virus*

Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA, 229–234.

LO C.F., HO C.H., CHEN C.H., LIU K.F., CHIU Y.L., YEH P.Y., PENG S.E., HSU H.C., LIU H.C., CHANG C.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 53–72.

LO C.F., HO C.H., PENG S.E., CHEN C.H., HSU H.C., CHIU Y.L., CHANG C.F., LIU K.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1996b). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crab and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 215–225.

LO C.F. & KOU G.H. (1998). Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathol.*, **33**, 365–371.

LO C.F., LEU J.H., HO C.H., CHEN C.H., PENG S.E., CHEN Y.T., CHOU C.M., YEH P.Y., HUANG C.J., CHOU H.Y., WANG C.H. & KOU G.H. (1996a). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.

MAEDA M., ITAMI T., MIZUKI E., TANAKA R., YOSHIZU Y., DOI K., YASUNAGA-AOKI C., TAKAHASHI Y. & KAWARABATA T. (2000). Red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*): an alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus. *Acta Virol.*, **44**, 371–374.

MAEDA M., KASORNCHANDRA J., ITAMI T., SUZUKI N., HENNIG O., KONDO M., ALBALADEJO J.D. & TAKAHASHI Y. (1998). Effect of Various Treatments on White Spot Syndrome Virus (WSSV) from *Penaeus japonicus* (Japan) and *P. monodon* (Thailand). *Fish Pathol.*, **33**, 381–387.

MOMOYAMA K., HIRAOKA M., INOUE K., KIMURA T. & NAKANO H. (1995). Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 263–269.

MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H., KOUBE H., INOUE K. & OSEKO N. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Histopathological study. *Fish Pathol.*, **29**, 141–148.

MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H. & SAMESHIMA M. (1998). Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. *Fish Pathol.*, **33**, 95–96.

NAKANO H., HIRAOKA M., SAMESHIMA M., KIMURA T. & MOMOYAMA K. (1998). Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viraemia (PAV), by chemical and physical treatments. *Fish Pathol.*, **33**, 65–71.

NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (1997). Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **63**, 193–201.

NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2011). Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **171**, 318–321.

NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, **160**, 19–30.

POULOS B.T., PANTOJA C.R., BRADLEY-DUNLOP D., AGUILAR J. & LIGHTNER D.V. (2001). Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 13–23.

ROBALINO J., BARTLETT T., SHEPARD E., PRIOR S., JARAMILLO G., SCURA E., CHAPMAN R.W., GROSS P.S., BROWDY C.L. & WARR G.W. (2005). Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response. *J. Virol.*, **79**, 13561–13571.

SAHUL HAMEED A.S., ANILKUMAR M., STEPHEN RAJ M.L. & JAYARAMAN K. (1998). Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture*, **160**, 31–45.

SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SATHISH S., RASHEED M., MURUGAN V. & JAYARAMAN K. (2001). White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture*, **201**, 179–186.

SÁNCHEZ-PAZ A. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet. Res.*, **41**, 43.

SARATHI M., SIMON M.C., VENKATESAN C. & HAMEED A.S. (2008). Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *J. Mar. Biotechnol.*, **10**, 242–249.

SATHEESH KUMAR S., ANANDA BHARATHI R., RAJAN J.J.S., ALAVANDI S.V., POORNIMA M., BALASUBRAMANIAN C.P. & PONNIAH A.G. (2013). Viability of white spot syndrome virus (WSSV) in sediment during sun-drying (drainable pond) and under non-drainable pond conditions indicated by infectivity to shrimp. *Aquaculture*, **402–403**, 242–249.

SITHIGORNGUL W., RUKPRATANPORN S., PECHARABURANIN N., LONGYANT S., CHAIVISUTHANGKURA P. & SITHIGORNGUL P. (2006). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 101–106.

SONG X., HUANG J., WANG C., YU J., CHEN B. & YANG C. (1996). Artificial infection of

brood shrimp of *Penaeus chinensis* with hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus. *J. Fish. China*, **20**, 374–378.

STENTIFORD G.D., BONAMI J.R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura Syndrome, yellow head disease and white spot disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, **291**, 1–17.

STENTIFORD G.D. & LIGHTNER D.V. (2011). Cases of white spot disease (WSD) in European shrimp farms. *Aquaculture*, **319**, 302–306.

TSAI M.F., KOU G.H., LIU H.C., LIU K.F., CHANG C.F., PENG S.E., HSU H.C., WANG C.H. & LO C.F. (1999).

Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks.

Dis. Aquat. Org., **38**, 107–114.

VENEGAS C.A., NONAKA L., MUSHIAKE K., NISHIZAWA T. & MUROG K. (2000). Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 83–89.

VENEGAS C.A., NONAKA L., MUSHIAKE K., SHIMIZU K., NISHIZAWA T. & MUROGA K. (1999). Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. *Fish Pathol.*, **34**, 19–23.

VIDAL O.M., GRANJA C.B., ARANGUREN F., BROCK J.A. & SALAZAR M. (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquac. Soc.*, **32**, 364–372.

VIJAYAN K.K., STALIN RAJ V., BALASUBRAMANIAN C.P., ALAVANDI S.V., THILLAI SEK HAR V. & SANTIAGO T.C. (2005). Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 107–111.

WANG C.H., YANG H.N., TANG C.Y., LU C.H., KOU G.H. & LO C.F. (2000). Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 91–104.

WITHYACHUMNARNKUL B. (1999). Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 21–27.

WITTEVELDT J., CIFUENTES C.C., VLAK J.M. & VAN HULTEN M.C. (2004). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J. Virol.*, **78**, 2057–2061.

WU W., WU B., YE T., HUANG H., DAI C., YUAN J. & WANG W. (2013). TCTP is a critical factor in shrimp immune response to virus infection. *PloS One*, **8**, e74460.

WANG C.H., YANG H.N., TANG C.Y., LU C.H., KOU G.H. & LO C.F. (2000). Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 91–104.

XIE X., LI H., XU L. & YANG F. (2005). A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. *Virus Res.*, **108**, 63–67.

YAN D.C., DONG S.L., HUANG J., YU X.M., FENG M.Y. & LIU X.Y. (2004). White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis. Aquat. Org.*, **59**, 69–73.

YOGANANDHAN K., SYED MUSTHAQ S., NARAYANAN R.B. & SAHUL HAMEED A.S. (2004). Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. *J. Fish Dis.*, **27**, 517–522.

ZHAN W.B., WANG Y.H., FRYER J.L., YU K.K., FUKUDA H. & MENG Q.X. (1998). White Spot Syndrome Virus Infection of Cultured Shrimp in China. *J. Aquat. Anim. Health*, **10**, 405–410.

*

* *

NB: Существуют референтные лаборатории МЭБ по инфекции вирусом, вызывающим болезнь белых пятен.

(см. Таблицу в конце настоящего 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 Референтными лабораториями МЭБ для получения дополнительной информации об инфекции вирусом, вызывающим болезнь белых пятен.

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 1997 ГОДУ КАК БОЛЕЗНЬ БЕЛЫХ ПЯТЕН; НАИБОЛЕЕ ПОСЛЕДНИЕ ОБНОВЛЕНИЯ, ПРИНЯТЫ В 2018 ГОДУ.