

## ИНФИЦИРОВАНИЕ ВИРУСОМ СИНДРОМА ЖЕЛТОЙ ГОЛОВЫ ГЕНОТИПА 1

---

### 1. Предмет рассмотрения

Инфицирование вирусом синдрома желтой головы генотипа 1 означает инфицирование патогенным возбудителем, вирусом синдрома желтой головы генотипа 1 (YHV1) рода *Okavirus* и семейства *Roniviridae*.

### 2. Информация о болезни

#### 2.1. Факторы возбудителя

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

Вирус синдрома желтой головы генотипа 1 (YHV1) - один из восьми известных генотипов комплекса вирусов синдрома желтой головы и единственный известный возбудитель, вызывающий синдром желтой головы. YHV1 и другие генотипы в комплексе синдрома желтой головы официально классифицированы Международным комитетом по таксономии вирусов как единственный вид (ассоциированный с жабрами вирус) в роде *Okavirus*, семействе *Roniviridae*, отряде *Nidovirales* (Cowley с соавт., 2012). Вирус синдрома желтой головы генотипа 2 является общеизвестным ассоциированным с жабрами вирусом (GAV). Четыре других генотипа в данном комплексе (генотипы 3-6) обычно присутствуют у здоровых особей *Penaeus monodon* в Восточной Африке, Азии и Австралии и лишь в редких случаях или никогда не ассоциируются с болезнью (Walker с соавт., 2001; Wijegoonawardane с соавт., 2008a). Недавно были зарегистрированы два новых генотипа YHV-комплекса, один, обозначенный как YHV7, был выявлен у больных *P. monodon* в Австралии (Mohr с соавт., 2015) и восьмой генотип был обнаружен у *Penaeus chinensis*, в отношении которых подозревалось, что они больны острым гепатопанкреатическим некрозом (Liu с соавт., 2014). Имеются свидетельства о наличии генетической рекомбинации между генотипами (Wijegoonawardane с соавт., 2009).

YHV1 образует покрытые оболочкой палочкообразные частицы 40–50 нм × 150–180 нм (Chantanachookin с соавт., 1993; Wongteegasupaya с соавт., 1995). Оболочки усеяны выпуклыми пепломерами, выступающими примерно на 11 нм над поверхностью. Нуклеокапсиды представляют собой палочки (диаметром 20–30 нм) и имеют спиралевидную симметрию с периодичностью в 5-7 нм. Вирионы состоят из трех структурных белков (нуклеопротеин р20 и оболочечные гликопротеины гр64 и гр116) и ~26 т.н. генома в одноцепочечной РНК положительного смысла.

##### 2.1.2. Выживание вне хозяина

YHV1 остается жизнеспособным в аэрированной морской воде в течение 72 часов (Flegel с соавт., 1995b).

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

YHV1 можно инактивировать посредством нагревания при 60°C в течение 15 минут (Flegel с соавт., 1995b). Мало информации имеется о других методах инактивации, но вирус, по-видимому, чувствителен к обработке хлором, при 30 частях на миллион (0,03 мг мл<sup>-1</sup>) (Flegel с соавт., 1997).

### 2.1.4. Жизненный цикл

Отсутствуют сообщения о высокой множественности YHV1 заражений в культуре клеток. Инфицирование при множественности заражения в 0,001 в первичных культурах клеток лимфоидных органов показало, что максимальные титры вируса получают через 4 дня после инфицирования (Assavalapsakul с соавт., 2003). Клинические признаки YHV1 инфицирования появляются у *P. monodon* в течение 7–10 дней после подвергания воздействию. YHV1 реплицируется в цитоплазме инфицированных клеток, в которых в большом количестве присутствуют длинные филаментные пред-нуклеокапсиды, наблюдается баддинг вирионов в цитоплазматические везикулы в плотно упакованных паракристаллических структурах для выхода на цитоплазматическую мембрану (Chantanachookin с соавт., 1993).

## 2.2. Факторы хозяина

### 2.2.1. Восприимчивые виды-хозяева

Виды, которые удовлетворяют критериям включения в список, как восприимчивые к инфекции YHV1, в соответствии с Главой 1.5 *Ветеринарно-санитарного кодекса по водным животным (Водный кодекс)*, являются следующими: восточная голубая креветка (*Penaeus stylirostris*), травяная креветка (dagger blade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*)), гигантская тигровая креветка (*Penaeus monodon*), креветка jinga (*Metapenaeus affinis*) и белоногая креветка (*Penaeus vannamei*).

### 2.2.2. Виды, данные о восприимчивости которых являются неполными

Виды, данные о восприимчивости которых в соответствии с Главой 1.5. *Водного кодекса* являются неполными, включают: банановую креветку (*Penaeus merguensis*), креветку Carpenter (*Palaemon serrifer*), розовую королевскую креветку (*Penaeus japonicus*), северную коричневую креветку (*Penaeus aztecus*), северную розовую креветку (*Penaeus duorarum*), северную белую креветку (*Penaeus setiferus*), тихоокеанскую голубую креветку (*Palaemon styliferus*), австралийского красноклешневого рака (*Cherax quadricarinatus*), речную креветку Sunda (*Macrobrachium sintangense*) и желтую креветку (*Metapenaeus brevicornis*).

Кроме того, сообщалось о получении патоген-специфичных положительных результатах полимеразной цепной реакции при исследовании следующих видов, у которых активная инфекция не была выявлена: морской желудь (*Chelonibia patula*), голубой краб (*Callinectes sapidus*), циклопоидные веслоногие рачки (*Ergasilus manicatus*), морская утка (*Octolasmis muelleri*), большой фундулюс (*Fundulus grandis*) и очень мелкие креветки (*Acetes* sp.).

### **2.2.3. Восприимчивые стадии хозяина**

*Penaeus monodon* восприимчивы к YHV1 инфекции в возрасте старше PL15 (Khongpradit с соавт., 1995).

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

YHV1 инфекции обычно выявляют только, когда болезнь становится явно выраженной, в то же время у здоровых *P. monodon* данные инфекции обычно не наблюдаются, инфекции были выявлены в здоровой дикой популяции *P. stylirostris* (Castro-Longoria с соавт., 2008). Можно предположить, что во время вспышек в аквакультурных прудах, превалентность YHV1 инфекции – высокая. Естественные YHV1 инфекции были выявлены у *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus*, *M. ensis* и *P. styliiferus* (Cowley с соавт., 2002; Flegel с соавт., 1995a; Flegel с соавт., 1995b), но данных о превалентности в естественной среде очень мало.

### **2.2.5. Целевые органы и инфицируемые ткани**

YHV1 целенаправленно поражает ткани эктодермального и мезодермального происхождения, включая лимфоидные органы, гемоциты, гемопоэтическую ткань, жаберные лепестки и губчатую соединительную ткань подкожного слоя, кишечник, сжжковую железу, гонады, нервные пучки и ганглии (Chantanachookin с соавт., 1993; Lightner, 1996).

### **2.2.6. Персистентное инфицирование**

YHV1 был обнаружен с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) у клинически здоровых диких *P. stylirostris*, отобранных для проведения надзора в Калифорнийском заливе в 2003 г. (Castro-Longoria с соавт., 2008). Инфекционная природа обнаруженного YHV1 была подтверждена посредством экспериментальных заражений. Также имеются данные о том, что YHV1 может сохраняться у особей, выживших после экспериментального заражения (Longyant с соавт., 2005; Longyant с соавт., 2006).

### **2.2.7. Переносчики**

Известных переносчиков YHV1 нет.

## **2.3. Паттерн болезни**

### **2.3.1. Механизмы передачи**

YHV1 инфекция может передаваться горизонтально посредством инъекции, потребления внутрь инфицированной ткани, погружения в морскую воду, содержащую экстракты тканей, профильтрованные для удаления бактерий, или посредством совместного обитания не подвергавшихся никакому воздействию креветок с инфицированными креветками (Flegel с соавт., 1995b; Lightner, 1996). Также было произведено укоренение инфекции у креветок посредством инъекции экстрактов очень мелких креветок (*Acetes* sp.), собранных в инфицированных прудах (Flegel с соавт., 1995a). Динамика распространения YHV1 инфекции в

аквакультурных прудах не изучалась. Однако быстрое увеличение уровня совокупной смертности во время вспышек болезни позволяет предположить, что горизонтальная передача происходит очень эффективно.

### **2.3.2. Превалентность**

Превалентность инфекции, ассоциированной с вирусами синдрома желтой головы, у здоровых *P. monodon* (как было выявлено посредством исследования с помощью гнездовой ПЦР с обратной транскрипцией [ОТ-ПЦР]) может быть высокой (50–100%) в разводимых на ферме и диких популяциях в Австралии, Азии и Восточной Африке, а также у *P. vannamei*, разводимых на ферме в Мексике (Cowley с соавт., 2004; Sanchez-Barajas с соавт., 2009; Walker с соавт., 2001; Wijegoonawardane с соавт., 2008a). Превалентность отдельных генотипов варьирует в зависимости от географического происхождения креветок. Использование методов обнаружения, обладающих меньшей чувствительностью, чем гнездовая ПЦР (например, гистология, иммуноблоттинг, дот-блоттинг, гибридизация *in-situ*), скорее всего приведет к недооценке в большинстве случаев реальной превалентности инфекции в популяциях креветок.

### **2.3.3. Географическое распространение**

YHV1 был зарегистрирован в Тайване, Индонезии, Малайзии, Филиппинах, Шри-Ланке, Таиланде и Вьетнаме (Walker с соавт., 2001). GAV и другие генотипы синдрома желтой головы были выявлены у здоровых *P. monodon* из Австралии, Тайваня, Индии, Индонезии, Малайзии, Мозамбика, Филиппин, Таиланда и Вьетнама (Wijegoonawardane с соавт., 2008a). YHV1 также был выявлен у *P. vannamei* в Мексике (Sanchez-Barajas с соавт., 2009).

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

У разводимых в прудах *P. monodon* болезнь, вызванная YHV1, может стать причиной почти 100% смертности в течение 3–5 дней после первого появления клинических признаков (Chantanachookin с соавт., 1993). Хотя экспериментальное подвергание *P. monodon* воздействию вирусов YHV1 или GAV может быстро привести к гибели, исследования методом биопробы, показали, что YHV1 является намного более вирулентным (примерно  $10^6$ -кратно по результатам анализа с целью определения 50% летальной дозы [LD<sub>50</sub>] в конечной точке) (Oanh с соавт., 2011). Генотипы 3, 4, 5 и 6 пока с болезнью не ассоциируются (Wijegoonawardane с соавт., 2008a).

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

Повышенные уровни вирусной инфекции, сопровождающиеся болезнью, могут снижаться при физиологическом стрессе, вызванном внезапными изменениями в уровне pH или уровнях растворенного кислорода или при воздействии других факторов окружающей среды (Flegel с соавт., 1997).

## **2.4. Контроль и профилактика**

### **2.4.1. Вакцинация**

Эффективные методы вакцинации не разработаны.

#### **2.4.2. Химиотерапия**

Эффективные коммерческие противовирусные препараты пока отсутствуют.

#### **2.4.3. Иммуностимуляция**

Научно-подтвержденные сообщения отсутствуют.

#### **2.4.4. Выведение резистентных особей**

Сообщений нет.

#### **2.4.5. Восполнение популяции резистентными особями**

Все морские креветки, используемые для коммерческого разведения, восприимчивы к YHV1.

#### **2.4.6. Блокирующие агенты**

Инъектирование креветок с помощью двухцепочечной РНК, гомологичной ORF 1a/1b областям гена YHV1 или GAV (таким образом, нацеленной на полногеномную вирусную РНК) может подавлять репликацию вируса и предотвращать гибель после экспериментального контрольного заражения. Противовирусное действие двухцепочечной РНК, по-видимому, использует путь РНК интерференции (RNAi) (Tirasophon с соавт., 2007).

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

Сообщения отсутствуют.

#### **2.4.8. Общие практики ведения хозяйства**

Для снижения риска болезни можно использовать свободные от специфических патогенных факторов (СПФ) или ПЦР-негативные маточные популяции или не контаминированную патогенами воду (биологически защищенная вода) и системы разведения с биологической защитой.

### **3. Отбор образцов**

#### **3.1. Выбор отдельных образцов**

Для проведения диагностики во время вспышки болезни, самым предпочтительным источником материала для исследования являются умирающие креветки, собираемые по краю прудов. Из тех же прудов следует также отбирать внешне здоровых креветок. Для проведения надзора с целью выявления присутствия инфекции в популяциях внешне здоровых креветок полезными для исследования могут быть ткани, отобранные на мизидной стадии развития креветки и далее (мизидная стадия, пост-личиночная [PL], ювенильная и взрослая стадии).

### **3.2. Сохранение образцов для представления для исследования**

Умиравшие креветки (или ткани, отобранные у умирающей креветки) должны быть подвергнуты быстрой заморозке в сухом льду или безводном спирте в месте их отбора и храниться замороженными в сухом льду, жидком азоте или морозильнике при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Замораживание при  $-20^{\circ}\text{C}$  или выше является неприемлемым.

Образцы тканей, предназначенные для ПЦР скрининга, должны сохраняться в 80–90% аналитическом/химически чистом (абсолютном) этаноле. Объем используемого этанола должен быть как минимум в десять раз больше объема ткани. Не рекомендуется использовать этанол более низкого качества (лабораторный или технический этанол).

Образцы ткани для гистологии следует отбирать у свежих креветок и помещать для сохранения в фиксирующий раствор Дэвидсона (Davidson's fixative). В качестве полезной альтернативы можно использовать раствор формалина (10%) в морской воде. Объем используемого фиксирующего раствора должен быть как минимум в десять раз больше объема ткани.

Ткани для проведения электронной микроскопии следует отбирать у живых креветок.

См. Главу 2.2.0., где изложено руководство по способам сохранения образцов для предполагаемых методов тестирования.

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

Для обнаружения YHV1 инфекции в больших популяциях креветок, допустимо объединять образцы тканей в пулы в целях проведения скрининга или надзора за партиями креветок на мизидной или пост-личиночной стадиях развития из инкубаторного садка или за партиями креветок на ювенильной стадии развития в пруду. Общее количество креветок, от которых следует отобрать образцы, как для одного пула, так и для нескольких более мелких пулов, определяется исходя из ожидаемой превалентности инфекции и требуемых доверительных интервалов обнаружения. Обычно, в популяциях, насчитывающих более 100 000 креветок, при превалентности инфекции выше 5%, для обнаружения YHV1 с 95% доверительным уровнем необходимо будет протестировать 60 особей в пулах соответствующих размеров. Однако при очень низких нагрузках YHV1 у инфицированных креветок или при использовании тестов с меньшей чувствительностью, чем у двухэтапной ОТ-ПЦР или ОТ-ПЦР в реальном времени, точное определение может быть поставлено под угрозу. См. также Главу 2.2.0.

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

У умирающих креветок, в отношении которых имеется подозрение об их инфицировании YHV1, наиболее подходящими тканями для отбора в качестве образца являются лимфоидные органы и жабры. Для проведения скрининга или надзора за ювенильными или взрослыми креветками, которые внешне являются здоровыми, предпочтительными является лимфоидный орган. Для прижизненного отбора образцов можно использовать жабры и гемолимфу.

### **3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования**

Не установлены.

## **4. Диагностические методы**

### **4.1. Методы полевой диагностики**

#### **4.1.1. Клинические признаки**

Креветки, начиная с пост-личиночной стадии развития и далее, могут быть инфицированы YHV1 экспериментально. У разводимых креветок инфицирование может приводить к массовой гибели, которая обычно происходит на стадиях, предшествующих поздним ювенильным стадиям. У умирающих креветок может наблюдаться общая внешняя бледность и пожелтение головогрудного отдела, вызванное пожелтением находящегося внутри гепатопанкреаса, который может быть необычно мягким по сравнению с коричневым гепатопанкреасом здоровой креветки. Во многих случаях в течение нескольких дней после первого появления креветок с макроскопическими признаками YHD1 вся популяция креветок в пруду утрачивается (Chantanachookin с соавт., 1993). Однако эти признаки болезни не являются особыми отличительными признаками и при отсутствии других более патогномичных макроскопических признаков не являются достоверными, даже для предварительного диагностирования YHV1.

#### **4.1.2. Изменения в поведении**

Может наблюдаться чрезвычайно высокая активность питания с последующим резким прекращением питания в течение 2-4 дней после появления макроскопических клинических признаков болезни и гибель. Умирающие креветки могут скапливаться у края прудов возле поверхности (Chantanachookin с соавт., 1993).

### **4.2. Клинические методы**

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

См. Раздел 4.1

#### **4.2.2. Клиническая химия**

Не описана.

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

Зафиксировать ткани головогруды умирающей креветки, в отношении которой имеется подозрение, что она поражена YHV1, в фиксирующем растворе Дэвидсона, подготовить срезы тканей и окрасить их гематоксилином Майера и эозином (H&E), используя стандартные гистологические процедуры (Lightner, 1996). Исследовать ткани эктодермального и мезодермального происхождения методом световой микроскопии на наличие умеренных до больших количеств глубоко базофильных, равномерно окрашенных, сферических цитоплазматических

включений, примерно 2 мкм в диаметре или меньше (Chantanachookin с соавт., 1993). Очень информативными являются ткани лимфоидного органа, выстилки желудка и жабр.

#### **4.2.4. Влажные препараты**

Произвести фиксацию целой креветки или жаберных волокон с помощью фиксирующего раствора Дэвидсона (Lightner, 1996). После фиксации тщательно промыть некоторые жаберные волокна водопроводной водой для удаления фиксирующего раствора и окрасить гематоксилином и эозином (H&E) (Lightner, 1996). После окрашивания и дегидратации, когда ткани находятся в ксилене, поместить жаберное волокно на предметное стекло микроскопа в капле ксилена и с помощью пары тонких иглолок (полезно использовать стереомикроскоп) оторвать несколько вторичных волокон. Заменить основное волокно в ксилене, в котором оно может храниться неопределенно долгий срок в герметично закрытом флаконе в качестве перманентного референтного материала. Следует соблюдая осторожность и не допуская высыхания ксилена, расправить вторичные волокна и удалить любые крупные фрагменты или частицы, которые будут приводить к ненужному утолщению залитого в среду препарата. Добавить каплю жидкости для заливки, разместить сверху покровное стекло и слегка надавить для максимально возможного уплощения залитого в среду препарата. Данную процедуру можно также использовать для тонких слоев тканей выстилки. Исследовать под световым микроскопом, используя  $\times 40$  линзы объектива. В образцах, отобранных от пораженных YHV1 креветок, будут наблюдаться средние-до больших количества глубоко базофильных, равномерно окрашенных, сферических цитоплазматических включений (примерно 2 мкм в диаметре или меньше) (Flegel с соавт., 1997). Выявленные свидетельства наличия такой патологии следует использовать для подтверждения результатов исследования мазков гемолимфы (см. ниже) при предварительной диагностике YHV1. Как и в случае зафиксированных тканей и жаберных волокон, зафиксированных в ксилене, эти предметные стекла с цельным залитым в среду препаратом можно сохранять в качестве материала для постоянного учета.

Если требуется быстро получить результаты, этап фиксации можно сократить всего лишь до 2 часов, заменив уксусную кислоту, являющуюся компонентом фиксирующего раствора Дэвидсона, на 50% разведение концентрированной HCl. Для хорошей фиксации, данный фиксирующий раствор следует хранить не более нескольких дней до его использования. После этапа фиксации тщательно промыть для удаления фиксирующего раствора и проверить, чтобы уровень pH вернулся к почти нейтральному уровню перед окрашиванием. Не следует проводить фиксацию в течение более длительных периодов и при температуре выше 25°C, поскольку это может привести к чрезмерному повреждению ткани и затруднить или сделать невозможной идентификацию специфичной патологии.

#### **4.2.5. Электронная микроскопия/цитопатология**

Для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ), наиболее подходящими тканями от креветки, в отношении которой подозревается, что она инфицирована YHV1, являются лимфоидный орган и жабры. Для скрининга и надзора за внешне здоровыми креветками наиболее подходящей тканью является лимфоидный орган. Оглушить живую креветку посредством погружения в ледяную воду до её



обездвиживания или убить посредством инъекции фиксирующего раствора. Быстро рассеять и отобрать маленькие порции целевой ткани (не более чем несколько мм в диаметре) и зафиксировать в 6 % глутаральдегиде, объем которого должен как минимум в 10 раз превышать объем ткани, выдержать при 4°C и забуферить раствором какодилата натрия ( $\text{Na}[\text{CH}_3]_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (8,6 г какодилата натрия, 10 г NaCl, дистиллированная вода до доведения объема до 100 мл, откорректированный уровень pH до 7 с помощью 0,2 N HCl) или раствором фосфата (0,6 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 1,5 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1 г NaCl; 0,5 г сахарозы; дистиллированная вода до доведения объема до 100 мл, откорректированный с помощью 0,2 N HCl уровень pH = 7). Произвести фиксацию в течение не менее 24 часов перед последующей подготовкой. Для длительного хранения в фиксирующем растворе при 4°C, снизить концентрацию глутаральдегида до 0,5–1,0%. Последующая подготовка включает пост-фиксацию с помощью 1% четырёхоксида осмия, дегидратацию, заливку препарата, изготовление срезов и окрашивание ацетатом уранила и лимоннокислым свинцом в соответствии с реагентами и методами стандартной трансмиссионной электронной микроскопии (TEM) (Lightner, 1996).

В цитоплазме клеток, инфицированных YHV1, наблюдаются как предшественники нуклеокапсидов, так и вирионы с полной оболочкой. Предшественники нуклеокапсидов представляют собой длинные волокна примерно 15 нм в диаметре, которые могут заметно варьировать по длине (80–450 нм) и иногда могут быть плотно упакованы в паракристаллические структуры. Вирионы представляют собой палочковидные покрытые оболочкой частицы (40–50 нм × 150–180 нм) с закругленными концами и выпуклыми выступами (8–11 нм) над поверхностью. В клеточной цитоплазме вирионы локализованы или плотно упакованы во внутриклеточные везикулы. Может наблюдаться баддинг вирионов у цитоплазматической мембраны и в интерстициальных пространствах. Вирионы и нуклеокапсиды GAV невозможно отличить от HV1 при исследовании трансмиссионной электронной микроскопией (TEM).

У здоровых *P. monodon*, хронически инфицированных YHV1 или GAV, обычно наблюдаются сфероиды лимфоидного органа, часто болезнь сопровождается некрозом лимфоидного органа (Spann с соавт., 1997). Однако образование сфероидов и структурная дегенерация ткани лимфоидного органа могут быть также следствием инфицирования другими вирусами креветок (Lightner, 1996).

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

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

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

###### *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/искусственные срезы

Хотя имеются методы культивирования в первичных клетках креветки, данные методы не рекомендуется использовать в качестве рутинного диагностического метода для выделения и идентификации YHV1, ввиду высокого риска контаминации адвентициальными возбудителями. В настоящее время пока еще отсутствуют перевиваемые клеточные линии, пригодные для культивирования YHV1.

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

Опубликованы реагенты и процедуры для обнаружения белков YHV1 с помощью антител (Loh с соавт., 1998; Lu с соавт., 1994). Вирионы, очищенные от гемолимфы экспериментально инфицированных креветок, были использованы для получения антисыворотки на новозеландских белых кроликах. Из данной антисыворотки производили очищение иммуноглобулина (IgG) с помощью белок-G-связанных колонок и удаляли перекрестно реагирующие нормальные антигены креветки посредством адсорбции на высушенной ацетоном размолотой мышечной ткани и гемолимфы креветки. Для обнаружения белков YHV1 методом вестерн-блоттинга разводят 0,1 мл гемолимфы, отобранной от живой креветки в объеме, равном объему цитратного буфера и либо проводят немедленное исследование, либо хранят при  $-80^{\circ}\text{C}$  до использования. Центрифугируют 200 мкл образца при 8000 g в течение 5 минут, а затем осаждают вирионы из осветленного супернатанта посредством ультрацентрифугирования при 140 000 g в течение 5 минут. Ресуспандируют осадок в 100 мкл 2 × загрузочного буфера (2,5 мл 0,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 4 мл 10% додецилсульфата натрия [SDS]; 2 мл глицерина; 1 мкл  $\beta$ -меркаптоэтанола; 0,5 мл деионизированной дистиллированной воды) и нагревают при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 5 минут. Вносят 10 мкл образца и осуществляют электрофорез при 200 В. Переносят гель для блоттинга на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,1 мм в буфере для блоттинга (3,03 г Tris-основы; 14,4 г глицина; 200 мл метанола на один литр) при 100 В в течение 1 часа. Промывают мембрану с помощью забуференного фосфатом физиологического раствора (ФБР, pH 7,4), блокируют в 5% обезжиренном молоке (в ФБР) в течение одного часа, и промывают ФБР в течение 5 минут. Промачивают мембрану 1/1000 разведением анти-YHV1 антитела (IgG) в течение одного часа, промывают три раза с помощью ФБР в течение 5 минут, а затем промачивают в течение одного часа в 1/2500 разведении конъюгата козьего антикроличьего IgG – пероксидазы хрена. Промывают мембрану три раза с помощью ФБР в течение 5 минут, а затем замачивают в субстрате пероксидазы хрена 3,3',5,5'-тетраметилбензидине до проявления окрашивания в сине-фиолетовый цвет. Производят остановку реакции посредством замачивания мембраны в дистиллированной воде. Все этапы инкубации следует проводить при  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . В качестве положительного контроля используют очищенный вирусный препарат, который применяется для идентификации позиций 116 кДа, 64 кДа и 20 кДа структурных белков YHV1. Чувствительность

вестерн-блоттинга для обнаружения YHV1 составляет примерно 0,4 нг YHV1 белка (около  $10^6$  вирионов).

#### 4.3.1.2.3. Молекулярные методы

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

Описаны три процедуры ОТ-ПЦР. Первая представляет собой одноэтапную ОТ-ПЦР, адаптированную из Wongteerasupaya с соавт., 1997, которую можно использовать для обнаружения YHV1 у пораженных креветок. При использовании данной процедуры будет производиться обнаружение YHV1, но не GAV или любого из других трех установленных в настоящее время генотипов. Вторая процедура представляет собой более чувствительную мультиплексную гнездовую ОТ-ПЦР, адаптированную из Cowley с соавт., 2004. Она может быть использована для дифференциации YHV1 и GAV у больных креветок или скрининга с целью выявления здоровых носителей. Обнаружение YHV7 производилось на первой стадии или этапе мультиплексной гнездовой ОТ-ПЦР (первичная ОТ-ПЦР) (Mohr с соавт., 2015). И ОТ-ПЦР, и гнездовая ПЦР (вторая стадия или этап) выявляли новый генотип YHV из Китая (Китайская Народная Республика) (Liu с соавт., 2014). Данный тест можно приобрести в соответствующем модифицированном виде (YHV/GAV IQ2000, GeneReach Biotechnology Corp., Chinese Taipei). Однако данный набор в настоящее время не включен в список, как прошедший официальную процедуру МЭБ по валидации и сертификации коммерческих тестов (список сертифицированных тест-наборов и производителей размещен на вебсайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/registration-of-diagnostic-kits/background-information/>).

Третья процедура – чувствительная мультиплексная гнездовая ОТ-ПЦР, описанная Wijegoonawardane с соавт., 2008b. Данный тест можно использовать для скрининга креветок на наличие любого из семи генотипов вирусов комплекса болезни желтой головы, но он не дифференцирует генотипы. Определение генотипа можно произвести посредством анализа ОТ-ПЦР продукта методом нуклеотидного секвенирования. Неизвестно, будет ли данный анализ обнаруживать генотип YHV, выделенный недавно в Китае (Китайская Народная Республика).

##### 4.3.1.2.3.1.1. Подготовка образцов

У ювенильных и взрослых креветок для получения полной РНК можно использовать ткани лимфоидного органа и жабр а также гемолимфу. Предпочтительно использовать свежие ткани. Также для получения полной РНК подходят ткани лимфоидного органа и жабр, законсервированные в 80–95% этаноле аналитической чистоты или хранящиеся замороженными при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Разорвать на более мелкие кусочки 10-20 г тканей лимфоидного органа или жабр или использовать 50 мкл гемолимфы в 500 мкл Trizol<sup>TM</sup> 1 реагента и произвести экстракцию полной РНК в соответствии с руководством по указанному продукту. Ресуспендировать РНК в 25 мкл воды, обработанной DEPC (диэтил-пирокарбонад), нагревать при  $55^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут, охладить на льду и сразу же использовать или хранить при  $-70^{\circ}\text{C}$ , пока не понадобится. Выход РНК будет варьировать в зависимости от типа и свежести

тканей, качества использованного консерванта и продолжительности периода времени в течение которого ткань подвергалась консервации. Однако, можно ожидать, что количество полученной РНК из свежих тканей будет варьировать от 0,2 до 2,0 мкг мкл<sup>-1</sup> и около половины данных количеств при получении РНК из законсервированных в спирту тканей. Ткани можно также гомогенизировать посредством толчения вместе с бусами и экстрагировать с помощью имеющихся в продаже наборов (например, QIAmp Viral RNA Mini Kit) (Mohr с соавт., 2015).

Из емкости для выращивания креветок на пост-личиночной стадии или емкости для выращивания креветок на протяжении всего их жизненного цикла, содержащей примерно 100,000 креветок на пост-личиночной стадии (PL) или более, отбирают образец примерно в 1000 PL в каждой из 5 различных точек. Образцы объединяют в пул в резервуаре, осторожно перемешивают воду в круговую, а затем отбирают образцы живых PL, которые собираются в центре резервуара. Количество PL, предназначенных для объединения в пул и тестирования, определяются исходя из предполагаемой или имеющейся превалентности инфекции. Гомогенизировать образцы тканей в соответствующем объеме Trizol<sup>TM</sup> реагента и экстрагировать РНК в соответствии с руководством по указанному продукту. В соответствии со стандартной процедурой Trizol<sup>TM</sup> экстракции подходящими являются массы тканей равные 25–30 × PL5, 15 × PL10 и 5 × PL15, при использовании которых получают полную РНК высокого качества свободную от контаминации белками.

Для каждого набора РНК образцов, подлежащего тестированию, в качестве отрицательных и положительных контролей следует включать DEPC-обработанную воду и экстракты, в отношении которых известно, что они содержат РНК YHV1 или РНК GAV (как целесообразно для указанного теста), соответственно.

#### *4.3.1.2.3.1.2. Процедура 1: ОТ-ПЦР для специфического обнаружения YHV1 у больных креветок*

В основу данной процедуры, используемой в Референтной лаборатории МЭБ, положен метод Mohr с соавт., 2015, и она является следующей: Матрицу (2 мкл) добавляют в 23 мкл реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл 2× реакционной смеси, 1 мкл Superscript III RT/Platinum Taq смеси (Invitrogen), 180 нМ каждого праймера и воду молекулярной чистоты. После одного цикла при 50°C в течение 30 минут и 94°C в течение 2 минут, ПЦР амплификация включает 40 циклов при 94°C в течение 30 секунд, 58°C в течение 45 секунд, 68°C в течение 45 секунд, с последующим при 68°C в течение 7 минут. Вместе с подходящей ДНК-лестницей, вносят 20 мкл аликвоту ПЦР в 1,5% агарозный/ТАЕ (Tris-ацетат-ЭДТК [этилен диамин тетрауксусная кислота]) гель, содержащий SYBR-safe (краситель), и после электрофореза производят выявление 135 п.н ДНК полосы, ожидаемой для YHV, с помощью трансиллюминатора с голубым светом.

---

<sup>1</sup> Указание конкретных коммерческих продуктов в качестве примеров не подразумевает их одобрения со стороны МЭБ. Это касается всех коммерческих продуктов, упоминаемых в данном *Руководстве по водным животным*.

Чувствительность данной ПЦР составляет примерно 0,01 пг очищенной РНК YHV1 (примерно  $10^3$  геномов).

Последовательности ПЦР праймеров:

10F: 5'-CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG-3'

144R: 5'-AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT-3'

*4.3.1.2.3.1.3. Процедура 2: гнездовая ОТ-ПЦР для дифференциального обнаружения YHV1 и GAV у здоровых и больных креветок*

В основу данной процедуры, используемой в Референтной лаборатории МЭБ, положен метод Mohr с соавт., 2015, и она является следующей: Для первичной ПЦР, 2 мкл матрицы добавляют в 23 мкл реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл 2× реакционной смеси, 1 мкл Superscript III RT/Platinum Taq смеси (Invitrogen), 180 нМ каждого GY1 и GY4 праймера и воды молекулярной чистоты. После одного цикла при 50°C в течение 30 минут и 94°C в течение 2 минут ПЦР амплификация включает 35 циклов при 95°C в течение 30 секунд, 66°C в течение 30 секунд и 68°C в течение 45 секунд с последующим конечным удлинением при 68°C в течение 7 минут. Для второго этапа – гнездовой ПЦР, готовят 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл ПЦР продукта первого этапа, 12,5 мкл HotStarTaq мастер микса (Qiagen), 360 нМ каждого праймера: GY2, Y3 и G6, воду молекулярной чистоты. ПЦР амплификация включает один цикл при 95°C в течение 15 минут с последующими 35 циклами при 95°C в течение 30 секунд, при 66°C в течение 30 секунд, и при 72°C в течение 45 секунд, с последующей конечной элонгацией при 72°C в течение 7 минут. Вместе с подходящей ДНК-лестницей, вносят 20 мкл аликвоту ПЦР в 1,5% агарозный/ТАЕ (Tris-ацетат-ЭДТК) гель, содержащий SYBR-safe (краситель), и после электрофореза производят выявление ампликонов с помощью трансиллюминатора с голубым светом.

Если вирусная нагрузка достаточно высокая, 794 п.н. ДНК будет амплифицирована либо из GAV, либо из YHV1 на первом ПЦР этапе. На втором ПЦР этапе, 277 п.н. продукт является индикатором обнаружения YHV, а 406 п.н. продукт является индикатором обнаружения GAV. Присутствие обоих 406 п.н. и 277 п.н. продуктов указывает на заражение двумя вирусами, GAV и YHV1. Чувствительность обнаружения ПЦР второго этапа ~ в 1000 раз выше, чем у ПЦР первого этапа, и РНК GAV или YHV1 можно обнаружить до предела в 10 фг полной РНК лимфоидного органа. Гнездовую ПЦР можно проводить как два отдельных анализа, специфичных для YHV1 или GAV, не включая либо G6, либо Y3 праймер, соответственно. Праймер содержит участок ошибочного спаривания оснований для GAV, но является специфичным для YHV1. Для GAV, седьмое основание слева (Т) заменяется на С, таким образом, чтобы последовательность праймера для GAV была: 5'-CAT-CTG-CCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3', в соответствии с данным о последовательности для генома GAV (номера доступа в базе данных: NC\_010306.1 и AF227196.2).

Последовательности ОТ-ПЦР праймеров, универсальных для GAV и YHV (GY) или специфичных для GAV (G) или YHV (Y) являются следующими:

GY1:	5'-GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG-3'
GY2:	5'-CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3'
GY4:	5'-GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG-3'
GY5:	5'-GAG-CTG-GAA-TTC-AGT-GAG-AGA-ACA-3'
Y3:	5'-ACG-CTC-TGT-GAC-AAG-CAT-GAA-GTT-3'
G6:	5'-GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT-3'

**NB:** В связи с сообщениями о проблемах со специфичностью праймеров для некоторых эмерджентных штаммов, все ПЦР продукты, полученные при использовании процедуры 2, должны быть секвенированы для подтверждения генотипа вируса.

*4.3.1.2.3.1.4. Процедура 3: гнездовая ОТ-ПЦР для обнаружения всех охарактеризованных в настоящее время генотипов в комплексе вирусов синдрома желтой головы, YHV1 до YHV7*

В основу данной процедуры, используемой в Референтной лаборатории МЭБ, положен метод Mohr с соавт., 2015, и она является следующей: Для первичной ПЦР 2 мкл матрицы добавляют в 23 мкл реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл 2 × реакционной смеси, 1 мкл Superscript III RT/Platinum Taq смеси (Invitrogen), 180 нМ каждого из YC-F1ab и YC-R1ab праймерных пулов и воду молекулярной чистоты. После одного цикла при 50°C в течение 30 минут и 94°C в течение 2 минут, ПЦР амплификация включает один цикл при 95°C в течение 15 минут с последующими 35 циклами при 94°C в течение 45 секунд, 60°C в течение 45 секунд, and 68°C в течение 45 секунд, с последующей конечной элонгацией при 68°C в течение 7 минут. Для второго этапа, гнездовой ПЦР, готовят 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл ПЦР продукта первого этапа, 12,5 мкл HotStarTaq мастер микса (Qiagen), 180 нМ каждого пула YV-F2ab и YC-R2ab праймеров, и воду молекулярной чистоты. ПЦР амплификация включает один цикл при 95° C в течение 15 минут с последующими 35 циклами при 94°C в течение 45 секунд, 60°C в течение 45 секунд, и 72°C в течение 45 секунд, и конечную элонгацию при 72°C в течение 7 минут. Вместе с подходящей ДНК-лестницей, вносят 20 мкл аликвоту ПЦР в 1,5% агарозный/ТАЕ (Tris-ацетат-ЭДТК) гель, содержащий SYBR-safe (краситель), и после электрофореза производят выявление ампликонов с помощью трансиллюминатора с голубым светом.

Если вирусная нагрузка достаточно высокая, 358 п.н. ДНК будет амплифицирована в ходе ПЦР первого этапа. В ходе второго этапа, гнездовой ПЦР, производится амплификация 146 п.н. продукта. Возможно дальнейшее определение генотипа (если требуется) посредством анализа нуклеотидной последовательности каждого ПЦР продукта с последующим

сравнением с последовательностями известных генотипов посредством множественного выравнивания последовательностей и филогенетического анализа. Пределы чувствительности обнаружения ПЦР первого этапа и гнездовой ПЦР второго этапа составляют 2500 и 2.5 РНК матриц, соответственно.

Последовательности ПЦР праймеров (каждый праймер содержит пул равных количеств двух родственных олигонуклеотидных последовательностей):

YC-F1ab пул: 5'-ATC-GTC-GTC-AGC-TAC-CGC-AAT-ACT-GC-3'

5'-ATC-GTC-GTC-AGY-TAY-CGT-AAC-ACC-GC-3'

YC-R1ab пул: 5'-TCT-TCR-CGT-GTG-AAC-ACY-TTC-TTR-GC-3'

5'-TCT-GCG-TGG-GTG-AAC-ACC-TTC-TTG-GC-3'

YC-F2ab пул: 5'-CGC-TTC-CAA-TGT-ATC-TGY-ATG-CAC-CA-3'

5'-CGC-TTY-CAR-TGT-ATC-TGC-ATG-CAC-CA-3'

YC-R2ab пул: 5'-RTC-DGT-GTA-CAT-GTT-TGA-GAG-TTT-GTT-3'

5'-GTC-AGT-GTA-CAT-ATT-GGA-GAG-TTT-RTT-3'

Коды смешанных оснований:

R(AG), Y(CT), M(AC), K(GT), S(GC), W(AT),

H(ACT), B(GCT), V(AGC), D(AGT), N(AGCT).

#### 4.3.1.2.3.2. Гибридизация *in-situ*

Для обнаружения YHV1 или GAV подходит процедура, описанная Tang с соавт., 2002 (Tang & Lightner, 1999). Для сохранения доступности вирусной РНК фиксируют образцы тканей, отобранные у живых креветок, в нейтральном-забуференном модифицированном фиксирующем растворе Дэвидсона без уксусной кислоты (RF-фиксатив) (Hasson с соавт., 1997). Для обеспечения хорошего сохранения тканей при одновременном сохранении доступности РНК можно использовать нормальный фиксирующий раствор Дэвидсона, при условии что время фиксации не будет превышать 24 часов (максимум 48 часов). Производят обработку зафиксированной ткани с помощью стандартных гистологических методов и готовят срезы толщиной 4 мкм на Superfrost Plus предметных стеклах (Fisher Scientific, Pennsylvania, США). Перед гибридизацией инкубируют срезы при 65°C в течение 45 минут, удаляют парафин с помощью Немо-De (Fisher Scientific, Pennsylvania, США), и производят регидратацию посредством серии снижающихся концентраций этанола в воде. Производят расщепление срезов с помощью протеиназы К (100 мкг мл<sup>-1</sup>, в 50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 10 mM NaCl; 1 mM ЭДТА) в течение 15 минут при 37°C, с последующей пост-фиксацией в 0,4% формальдегиде в течение 5 минут. Промывают в 2 × SSC (стандартный цитратно-солевой раствор), затем проводят пред-гибридизацию с использованием 500 мкл предгибридизационного раствора (4 × SSC; 50% формамид; 1 × Denhardt's;

0.25 мг мл<sup>-1</sup> дрожжевая РНК; 0,5 мг мл<sup>-1</sup> стриженной ДНК спермы лосося; 5% сульфат декстрана) при 42°C в течение 30 минут. Для гибридизации нанести на срезы сверху 250 мкл гибридизационного раствора, содержащего меченый дигоксигенином ДНК зонд (20–40 нг мл<sup>-1</sup>), при 42°C и оставить на ночь. На следующий день промыть срезы следующим образом: 2 × SSC один раз в течение 30 минут при комнатной температуре; 1 × SSC два раза в течение 5 минут при 37°C; 0,5 × SSC два раза в течение 5 минут при 37°C. Инкубировать срезы с конъюгатом овечьего анти-дигоксигенина-щелочной фосфатазы (Roche) при 37°C в течение 30 минут. Промыть с помощью 0,1 М Tris/HCl, pH 7,5; 0,15 М NaCl два раза в течение 10 минут при комнатной температуре и ополоснуть с помощью 0,1 М Tris/HCl, pH 9,5; 0,1 М NaCl. Инкубировать вместе с нитросиним тетразолием и 5-бromo-4-хлоро-3-индоил фосфатом в темноте в течение 1–2 часов для проявления цвета. Произвести контрастное окрашивание с помощью бисмарка коричневого Y (0,5%), дегидратировать в серии этанола и Nemo-De (растворитель), добавить Permount (среда для заливки) (Fisher Scientific, Pennsylvania, США) и накрыть покровным стеклом. YHV-инфицированные клетки дают синий до пурпурно-черного цвета на фоне коричневого контрастного красителя. Следует включать положительные контроли YHV-инфицированной ткани и отрицательные контроли неинфицированной ткани креветки. Меченый дигоксигенином ДНК зонд можно получить посредством ПЦР мечения с использованием следующих праймеров:

YHV1051F: 5'-ACA-TCT-GTC-CAG-AAG-GCG-TC-3'

YHV1051R: 5'-GGG-GGT-GTA-GAG-GGA-GAG-AG-3'

#### 4.3.1.2.3.3. Очистка возбудителя

Описан метод очистки YHV1, в основу которого положено ультрацентрифугирование в градиенте плотности (Wongteerasupaya с соавт., 1995). В качестве источника для вируса, предназначенного для очистки, в идеале следует использовать 250 здоровых ювенильных *P. monodon* (или *P. vannamei*) креветок (приблизительно 10 г). После акклиматизации в течение нескольких дней в резервуарах объемом 1500 литров (приблизительно 80 креветок в одном резервуаре) при солёности воды 3,5 части на тысячу (мг мл<sup>-1</sup>), каждой креветке внутримышечно вводят 100 мкл 1/100 суспензии экстракта жабр, полученного от инфицированных YHV креветок. Через 2 дня после инфицирования собирают умирающих креветок с типичными признаками YHV1. С помощью шприца вытягивают гемолимфу из синусов у основания ходильных ног и осторожно перемешивают на льду с таким же количеством среды из гемолимфы омара (LHM) (486 mM NaCl; 15 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 8,1 mM MgSO<sub>4</sub>; 36 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,05% декстрозы в минимальной среде Игла, при откорректированном с помощью 1 н NaOH pH =7,6). Центрифугируют смесь при 480 g в течение 30 минут при 4°C для удаления клеточного дебриса. Производят ультрацентрифугирование супернатанта при 100,000 g в течение одного часа при 4°C. Сливают супернатант и осторожно ресуспендируют осадок в течение ночи при 4°C в 1 мл LHM. Данную суспензию наносят слоем на непрерывный градиент из 20–



40% урографина и производят ультрацентрифугирование при 100,000 *g* в течение одного часа при 4°C. После центрифугирования собирают вирусную полоску с помощью пастеровской пипетки и разводят с помощью NTE буфера (0,02 М ЭДТК; 0,2 М NaCl; 0,2 М Tris/HCl [pH 7,4]) до конечного объема в 12 мл. Производят ультрацентрифугирование суспензии при 100,000 *g* в течение одного часа при 4°C и ресуспендируют осадок (очищенный вирус) в 100 мкл TE буфера (10 мМ Tris/HCl; 1 мМ ЭДТА [pH 7,4]) и хранят в 20 мкл аликвотах при –80°C, пока не потребуется.

#### 4.3.1.2.4. Биопроба

В основу анализа методом биопробы положена процедура, описанная Spann с соавт., 1997, но сходные процедуры были описаны несколькими другими авторами (Lu с соавт., 1994). Биопроба должна проводиться на восприимчивых креветках (см. Раздел 2.2 выше), которые в идеале были сертифицированы как СПФ и получены с предприятия по разведению с высокой степенью биозащиты. Альтернативно, восприимчивые дикие или разводимые на ферме креветки, предназначенные для биопробы, должны быть обследованы с помощью гнездовой ОТ-ПЦР с использованием РНК, экстрагированной из ткани или гемолимфы, в целях подтверждения отсутствия ранее существующих у них хронических инфекций вирусами комплекса YHV или родственными вирусами. В течение всей процедуры исследования креветки должны содержаться в условиях оптимальных для выживания данных видов в резервуарах лабораторных систем.

Собрать умирающих креветок из зараженных YHV1 прудов или креветок, в отношении которых имеется подозрение, что они являются носителями инфекции, и выдержать при 4°C или на льду. Удалить и выбросить хвост и конечности. Если необходимо целую креветку или сохраненную голову можно подвергнуть быстрой заморозке и хранить при –80°C или в жидком азоте, пока не понадобятся. Произвести быстрое оттаивание хранящихся образцов на 37°C водяной бане в двух пластиковых пакетах с защелкивающимся уплотнением, а затем держать при 4°C или на льду в течение всех процедур. Удалить карапакс и известковые ротовые части. Суспендировать оставшиеся ткани в шести объемах TN буфера (0,02 М Tris/HCl; pH 7,4; 0,4 М NaCl) и гомогенизировать в измельчителе тканей до образования однородной суспензии. Центрифугировать гомогенат для осветления при 1300 *g* в течение 20 минут при 4°C. Удалить жидкость супернатанта ниже липидного слоя и пропустить через 0,45 мкм фильтр. Хранить фильтрат при 4°C для немедленного использования или подвергнуть быстрой заморозке и хранить в аликвотах при –80°C или в жидком азоте. Произвести быстрое оттаивание фильтрата при 37°C и сохранять на льду до его использования.

Как минимум 12 ювенильных (1–5 г) креветок известных восприимчивых видов (*P. monodon*, *P. esculentus*, *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. vannamei*, *P. stylirostris*) вводят посредством инъекции 5 мкл фильтрата на один грамм веса тела во второй абдоминальный сегмент с помощью иглы 26 калибра. Инъецируют две эквивалентные группы по как минимум 12 креветок TN буфером и фильтрованным тканевым экстрактом, полученным из неинфицированных креветок. Одна дополнительная группа из как минимум 12 креветок должна быть

инфицирована последней известным и калиброванным инокулятом положительного контроля из креветок, инфицированных YHV1. Во время анализа методом биопробы следует содержать каждую группу креветок в отдельном крытом резервуаре с индивидуальной системой подачи воды. Следует обеспечить отсутствие непреднамеренного перемещения воды между резервуарами, применяя принципы надлежащей лабораторной практики. Следует производить наблюдение за креветками и регистрировать количество погибших в течение не менее 21 дня или до проведения тестирования и пока смертность в группе положительных контролей не достигнет 100%. Отбирают как минимум одну умирающую креветку из каждой из четырех групп для исследования методом гистологии, трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ), *in-situ* гибридизации нуклеиновых кислот и ПЦР или вестерн-блоттинга для подтверждения присутствия YHV1 в образце (см. разделы выше по процедурам тестирования).

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Креветки, подлежащие тестированию, в отношении которых подозреваются, что они являются носителями низкоуровневых хронических инфекций, могут продуцировать инокулят, содержащий очень низкую дозу вируса. При проведении биопробы, такой инокулят не всегда обязательно вызывает гибель, появление макроскопических признаков болезни или дает гистологические данные, характерные для летальной инфекции. В этом случае для креветок, исследуемых методом биопробы, необходимо применять молекулярные тесты (ПЦР или гибридизацию *in-situ*) или трансмиссионную электронную микроскопию (ТЕМ).

#### 4.3.2. Серологические методы

Не применимы.

### 5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для целевого надзора и диагностики YHV1 указаны в таблице 5.1. Используемые в таблице обозначения означают: a = данный метод является рекомендованным методом ввиду его наличия, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = данный метод применяется в некоторых ситуациях, но его стоимость, точность или другие факторы значительно ограничивают его применение; и d = данный метод в настоящее время не рекомендуется использовать для этой цели. Данные рекомендации в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает аспекты достоверности, чувствительности, специфичности и полезности. Хотя не все тесты, обозначенные, как категория a или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются без получения сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

*Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики*

Метод	Целевой надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	Пост-личиноч	Ювениль-ная стадия	Взрослые		

		ная стадия				
Макроскопические признаки	d	d	c	c	c	d
Биопроба	d	d	d	d	c	b
Прямая световая микроскопия	d	d	d	d	a	d
Гистопатология	d	d	c	c	a	d
Трансмиссионная микроскопия	d	d	c	c	d	b
Анализы на основе антител	d	d	c	c	a	b
<i>In-situ</i> ДНК зонды	d	d	c	c	b	a
ПЦР	a	a	a	a	a	a
Секвенирование	a	a	a	a	d	a

ПЦР = полимеразная цепная реакция.

## 6. Тест(-ты), рекомендованные для целевого надзора в целях объявления свободы от инфекции вирусом желтой головы генотипа 1

Гнездовая ОТ-ПЦР (раздел 4.3.1.2.3.1.4) с последующим подтверждающим секвенированием амплифицированного ПЦР продукта является предписанным методом для объявления свободы от инфекции. Требуется, чтобы результаты двухэтапной ПЦР были отрицательными.

## 7. Критерии подтверждающей диагностики

### 7.1. Дефиниция подозрительного случая

Подозрительный случай YHV1 инфекции определяется, как вспышка болезни у морских креветок с быстро нарастающим количеством случаев гибели (до 100%) на ранней до поздней ювенильной стадиях, которой может предшествовать прекращение питания и скопление креветок у края пруда. У умирающих креветок может наблюдаться общая бледность и пожелтение головогруды, вызванное расположенным под этим отделом желтым гепатопанкреасом. При гистологическом исследовании зафиксированных тканей лимфоидного органа выявляют средние до больших количества глубоко базофильных, равномерно окрашенных, сферических цитоплазматических включений (приблизительно 2 мкм в диаметре или меньше).

### 7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Наличие YHV1 можно подтвердить посредством обнаружения высоких уровней распространения инфекции в тканях эктодермального и мезодермального происхождения путем исследования методом гибридизации *in-situ* в сочетании с обнаружением амплифицированных продуктов предписанного размера с помощью дифференцирующих анализов методом ОТ-ПЦР и секвенирования, как описано в разделе 4.3 данной главы.

## 8. Список литературы

ASSAVALAPSAKUL W., SMITH D.R. & PANYIM S. (2003). Propagation of infectious yellow head virus particles prior to cytopathic effect in primary lymphoid cell cultures of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 253–258.

CASTRO-LONGORIA R., QUINTERO-ARREDONDO N., GRIJALVA-CHON J.M. & RAMOS-PAREDES J. (2008). Detection of the yellow-head virus (YHV) in wild blue shrimp, *Penaeus stylirostris*, from the Gulf of California and its experimental transmission to the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Fish Dis.*, **31**, 953–956.

CHANTANACHOOKIN C., BOONYARATPALIN S., KASORNCHANDRA J., DIREKBUSARAKOM S., AEKPANITHANPONG U., SUPAMATAYA K., SRIURAIATANA S. & FLEGEL T.W. (1993). Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 145–157.

COWLEY J.A., CADOGAN L.C., WONGTEERASUPAYA C., HODGSON R.A.J., SPANN K.M., BOONSAENG V. & WALKER P.J. (2004). Differential detection of gill-associated virus (GAV) from Australia and yellow head virus (YHV) from Thailand by multiplex RT-nested PCR. *J. Virol. Methods*, **117**, 49–59.

COWLEY J.A., HALL M.R., CADOGAN L.C., SPANN K.M. & WALKER P.J. (2002). Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 95–104.

COWLEY J.A., WALKER P.J., FLEGEL T.W., LIGHTNER D.V., BONAMI J.R., SNIJDER E.J. & DE GROOT R.J. (2012). Family *Roniviridae*. In: *Virus Taxonomy*, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. King A., Adams M., Carstens E. & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier, Academic Press, London, UK, 797–801.

FLEGEL T.W., BOONYARATPALIN S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1997). Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In: *Diseases in Asian Aquaculture III*. Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 285–296.

FLEGEL T.W., FEGAN D.F. & SRIURAIATANA S. (1995a). Environmental control of infectious shrimp diseases in Thailand. In: *Diseases in Asian Aquaculture II*. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 65–79.

FLEGEL T.W., SRIURAIATANA S., WONGTEERASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1995b). Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*. In: *Swimming Through Troubled Water*, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 76–83.

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 assay using cDNA probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.

KHONGPRADIT R., KASORNCHANDRA J. & BOONYARATPALIN S. (1995). Susceptibility of the postlarval stages of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to yellow-head

baculovirus (YBV). *In: Diseases in Asian Aquaculture II*. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 6.

LIGHTNER D.V. (1996). *Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.

LIGHTNER D.V., HASSON K.W., WHITE B.L. & REDMAN R.M. (1998). Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **10**, 271–281.

LIU Q., HUANG J., YANG H.-L., YANG B., WANT H.-L., WANT Q.-T., LIU F. & ZHANG Q.-L. (2014). Detection of a new genotype of yellow-head virus in farmed shrimp suspicious of EMS/AHPNS infection. *Oceanol. Limnol. Sin.*, **45**, 703–709.

LOH P.C., CESAR E., NADALA B. Jr, TAPAY L.M. & LU Y. (1998). Recent developments in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. *In: Advances in Shrimp Biotechnology* Flegel T.W., ed. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand, 255–259.

LONGYANT S., SATTAMAN S., CHAIVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & SITHIGORNGUL P. (2006). Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV). *Aquaculture*, **257**, 83–91.

LONGYANT S., SITHIGORNGUL P., CHAIVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & MENASVETA P. (2005). Differences in the susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 5–12.

LU Y., TAPAY L.M., BROCK J.A. & LOH P.C. (1994). Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **17**, 649–656.

MA H., OVERSTREET R.M. & JOVONOVICH J.A. (2009). Daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*): A reservoir host for yellow-head virus (YHV). *J. Invert. Pathol.*, **101**, 112–118.

MOHR P.G., MOODY N.J.G., HOAD J., WILLIAMS L.M., BOWATER R.O., CUMMINS D.M., COWLEY J.A. & CRANE M.STJ. (2015). New yellow head virus genotype (YHV7) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* indigenous to northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **115**, 263–268.

OANH D.T., VAN HULTEN M.C., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2011). Pathogenicity of gill-associated virus and Mourilyan virus during mixed infections of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Gen. Virol.*, **92**, 893–901.

SANCHEZ-BARAJAS M., LINAN-CABELLO M.A. & MENA-HERRERA A. (2009). Detection of yellow-head disease in intensive freshwater production systems of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Int.*, **17**, 101–112.

SENAPIN S., THAOWBUT Y., GANGNONNGIW W., CHUCHIRD N., SRIURAIATANA S. & FLEGEL T.W. (2010). Impact of yellow head virus outbreaks in the whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in Thailand. *J. Fish Dis.*, **33** (5), 421–430.

SPANN K.M., COWLEY J.A., WALKER P.J. & LESTER R.J.G. (1997). A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 169–179.

SPANN K.M., DONALDSON R.A., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2000). Differences in susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 221–225.

SPANN K.M., MCCULLOCH R.J., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2003). Detection of gill-associated virus (GAV) by *in situ* hybridisation during acute and chronic infections in *Penaeus monodon* and *Penaeus esculentus* shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 1–10.

STENTIFORD G.D., BONAMI J.R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, **291**, 1–17.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (1999). A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 165–173.

TANG K.F.J., SPANN K.M., OWENS L. & LIGHTNER D.V. (2002). *In situ* detection of Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe. *Aquaculture*, **205**, 1–5.

TIRASOPHON W., YODMUANG S., CHINNIRUNVONG W., PLONGTHONGKUM N. & PANYIM S. (2007). Therapeutic inhibition of yellow head virus multiplication in infected shrimps by YHV-protease dsRNA. *Antiviral Res.*, **74**, 150–155.

WALKER P.J., COWLEY J.A., SPANN K.M., HODGSON R.A.J., HALL M.R. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2001). Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region. 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, 292–302.

WIJEGOONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., SITTIDILOKRATNA N., PHETCHAMPAI N., COWLEY J.A., GUDKOV N. & WALKER P.J. (2009). Homologous genetic recombination in the yellow head complex of nidoviruses infecting *Penaeus monodon* shrimp. *Virology*, **390** (1), 79–88.

WIJEGOONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., PHAN T., HODGSON R.A.J., NIELSEN L., KIATPATHOMCHAI W. & WALKER P.J. (2008a). Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. *Virology*, **380**, 213–225.

WIJEGOONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2008b). Consensus RT-nested PCR to detect yellow head virus genotypes in penaeid shrimp. *J. Virol. Methods*, **153**, 168–175.

WONGTEERASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1997). Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 181–186.

WONGTEERASUPAYA C., SRIURAIRATANA S., VICKERS J.E., AKRAJAMORN A., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1995). Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.*, **22**, 45–50.

\*

\* \*

**NB:** Имеется Референтная лаборатория МЭБ по инфекции вирусом синдрома желтой головы генотипа 1 (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/>).

Просим обращаться в Референтные лаборатории МЭБ для получения любой дополнительной информации по инфекции вирусом болезни желтой головы генотипа 1.

**NB:** ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 1995 г., ПОД НАЗВАНИЕМ БОЛЕЗНЬ ЖЕЛТАЯ ГОЛОВА, САМАЯ ПОСЛЕДНЯЯ ОБНОВЛЕННАЯ ВЕРСИЯ ПРИНЯТА В 2019 г.