

РАЗДЕЛ 2.2.

БОЛЕЗНИ РАКООБРАЗНЫХ

ГЛАВА 2.2.0.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

ВВЕДЕНИЕ¹

В принципах и методах, обсуждаемых в настоящей главе, будет, в силу необходимости, сделан акцент на пенеидных креветках, поскольку большинство болезней, включенных в список (а также болезни, которые изучаются с целью возможного включения в список) МЭБ, являются болезнями пенеидных креветок (Всемирная организация по охране здоровья животных, 2014). Таксономия пенеидных креветок была пересмотрена в 1997 году (Perez Farfante & Kensley, 1997). Подроды пенеид были подняты до уровня полноценных родов. Однако, поскольку данное изменение в таксономии пенеид не получило всеобщего признания, в настоящем Руководстве по водным животным будет использоваться таксономия пенеид, как описано у Holthuis (Holthuis, 1980).

ОТБОР ОБРАЗЦОВ

1. Оценка статуса эпидемиологической единицы по здоровью

Отбор образцов в популяциях диких ракообразных представляет собой сложную задачу при планировании обследований на наличие болезней. Там, где существует промысел диких ракообразных, имеется потенциальная возможность получения образцов. Однако это является репрезентативным для популяции относительно здоровых животных, доживших до достижения ими возраста и размера, подходящих для вылова, а поэтому может быть в недостаточной мере репрезентативным для представляющих интерес болезней.

Общий подход к надзору и отбору образцов представлен в *Ветеринарно-санитарном кодексе по водным животным* (Глава 1.4. *Надзор за здоровьем водных животных*).

1.1. Материал для использования в качестве образца для тестов

Материал, используемый в качестве образца, зависит от болезни или патогена, на которые предстоит проводить тестирование, а также как от размера животных, так и цели тестирования, т.е. диагностика клинической формы болезни, выявление

¹ NB: Версия, принятая Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 года.

субклинических носителей патогенов или отбор образцов для целевого надзора для демонстрации свободы от определенной болезни. Смотрите специфические детали требований в отношении образцов в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Corsin с соавт., 2009) и главы, посвященные отдельным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

1.2. Специфические аспекты, касающиеся размера ракообразных

Специфические детали требований в отношении образцов смотрите в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Corsin с соавт., 2009) и в главах, посвященных отдельным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

1.3. Специфические аспекты, касающиеся популяций ракообразных

В дополнение к соображениям, приведенным в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Corsin с соавт., 2009), при разработке системы надзора следует принимать во внимание следующие моменты, имеющие отношение к популяциям ракообразных:

1. Обычно популяции культивируемых ракообразных распределены по многочисленным участкам хозяйства, которые, как правило, не пользуются общими водными ресурсами и могут совместно подвергаться воздействию различных условий, а могут и не подвергаться.
2. Ракообразные имеют тенденцию к расслоению в пределах участка хозяйства и в толще воды в зависимости от состояния здоровья и прочих поведенческих аспектов взаимодействия (как, например, в случае больных животных, которые нередко перемещаются к краям или к поверхности прудов).
3. Что касается ряда болезней ракообразных, имеется большое количество восприимчивых видов, относительная восприимчивость которых часто недостаточно хорошо известна.
4. Разделение или смешивание популяций ракообразных изменяет характеристики данных популяций.
5. Некоторые популяции диких ракообразных иногда характеризуются стайным поведением, что подразумевает определенную степень однородности в пределах каждой стаи.

Некоторые популяции диких ракообразных иногда характеризуются стайным поведением, что подразумевает определенную степень однородности в пределах каждой стаи.

1.4. Специфические аспекты, касающиеся клинического статуса

В случаях клинической болезни следует получить тщательно выбранные, качественные экземпляры с репрезентативными поражениями из числа живых или умирающих ракообразных. Необходимо приложить все усилия для того, чтобы отобрать для диагностики образцы в виде таких особей, которые являются

репрезентативными в отношении болезни (болезней), поражающей (поражающих) представляющее интерес поголовье ракообразных, и которые являются умирающими или клинически больными. Отбора павших экземпляров во время эпидемий болезней следует по возможности избегать, однако образцы в виде недавно павших особей могут быть пригодны для ряда диагностических исследований. Когда популяции культивируемых или диких ракообразных демонстрируют клинические признаки активной формы болезни, которые соответствуют или позволяют предположить наличие любой болезни ракообразных из включенных в список МЭБ, следует следить за тем, чтобы обеспечить, что отобранные образцы надлежащим образом сохраняются для ожидаемых диагностических тестов (смотрите рекомендуемые методы в разделе о сохранении образцов). Что касается болезней, включенных в список МЭБ, настоятельно рекомендуется спланировать график отбора образцов (например, на основе графика фермы, сезона и т.д.) таким образом, чтобы отбор образцов конкретной стадии (стадий) развития производился в период времени, когда наиболее велика вероятность обнаружения соответствующего патогена. Это особенно важно, когда имеющиеся в распоряжении диагностические методы полагаются на простую микроскопию или гистологические методы и не включают в себя молекулярные методы. Что касается синдрома Таура, инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза, болезни белых пятен, инфекционного мионекроза, некротизирующего гепатопанкреатита (ННР) и болезни желтой головы, то молодь и подвзрослая молодь представляют собой наиболее подходящие образцы; а что касается чумы раков, то подходящими образцами являются молодь и взрослые особи.

Образцы, отбираемые для молекулярных тестов или тестов на основе антител на включенные в список МЭБ болезни ракообразных, можно объединять в пулы, состоящие из не более чем пяти экземпляров на каждый объединенный в пул образец. Недавно павшие раки или другие ракообразные могут подойти (в зависимости от их состояния) для определенных диагностических исследований, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), выделение и/или культивирование возбудителя болезни, биопроба и т.д.).

2. Общая подготовка образцов

2.1. Макроскопическое исследование

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

2.2. Вирусологическое исследование

2.2.1. Транспортировка образцов и обработка их антибиотиками

Не применимо.

2.2.2. Экстракция вируса

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

2.2.3. Обработка для нейтрализации энзоотических вирусов

Не применимо.

2.3. Бактериологическое исследование

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время, за исключением случаев ННР. Поскольку ННР не культивировали, а также из-за его очень маленького размера, при бактериологическом исследовании можно ограничиться окраской по Граму.

2.4. Обследование на наличие паразитов

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время.

2.5. Исследование на наличие грибов и других протистов

Смотрите Главу 2.2.2 Инфекция *Aphanomyces astaci* (Чума раков), а также Главу 2.3.2 Инфекция *Aphanomyces invadans*.

МАТЕРИАЛЫ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕНОВ РАКООБРАЗНЫХ

3. Вирусы ракообразных

3.1. Линии клеток ракообразных

Не применимо. В настоящее время нет подтвержденных или документально оформленных линий клеток ракообразных.

3.2. Культуральные среды

Не применимо.

3.3. Вирус-положительные контроли и получение антигена

3.3.1. Номенклатура вирусов

В целом, номенклатура вирусов, используемая в главах, посвященных конкретным болезням, следует самой последней таксономии вирусов, как она представлена в Отчете Комитета по таксономии вирусов (Fauquet с соавт., 2005). Также в главах, посвященных конкретным болезням, приводятся названия болезней и вирусов, которые обычно используются в отраслях по разведению различных видов креветок, а также наиболее распространенные синонимы, которые использовались или используются в настоящее время.

3.3.2. Получение вирусов

Поскольку линии клеток (ракообразных, членистоногих или беспозвоночных), которые можно использовать для получения вирусов ракообразных, неизвестны, инфицирование известных восприимчивых видов-хозяев является предпочтительным методом для получения вируса в экспериментальных целях.

3.3.3. Сохранение и хранение вирусов

Инфекционную активность всех известных вирусов ракообразных можно сохранить путем замораживания инфицированных ракообразных в целом виде или инфицированных целевых тканей при температуре -20°C для кратковременного хранения, либо при температуре -80°C или ниже для длительного хранения.

4. Бактерии ракообразных

4.1. Культуральные среды

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время.

4.2. Хранение культур

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время.

5. Паразиты ракообразных

5.1. Культуральные среды

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время.

5.2. Хранение культур

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время.

6. Гриб ракообразных

6.1. Культуральные среды

Смотрите главу 2.2.1 и главу 2.3.2.

6.2. Хранение культур

Смотрите главу 2.2.1.

7. Методы

Имеющиеся методы диагностики болезней ракообразных включают в себя традиционные методы морфологической патологии (прямая световая микроскопия, гистопатология и электронная микроскопия), методы биопроб с использованием восприимчивых хозяев-индикаторов и молекулярные методы (генетические зонды и ПЦР). При том, что культура тканей считается стандартным инструментом в медицинских, ветеринарных лабораториях и лабораториях по диагностическим исследованиям рыб, она все еще нуждается в разработке в качестве пригодного для использования, рутинного диагностического инструмента для патогенов ракообразных. Клиническая химия пока не стала диагностическим инструментом, применяемым специалистами по патологии ракообразных на рутинной основе.

На момент написания настоящего раздела *Руководства по водным животным* имеющиеся диагностические методы, которые могут быть выбраны для диагностики болезней ракообразных, включенных в список МЭБ, или для обнаружения их этиологических возбудителей, основаны на следующем:

1. Макроскопические и клинические признаки.
2. Прямая светлопольная, фазово-контрастная или темнопольная микроскопия с использованием тотальных окрашенных или неокрашенных влажных препаратов тканей, давленных препаратов тканей и мазков-отпечатков; а также влажных препаратов фекалий.
3. Гистология фиксированных образцов.
4. Биопробы на подозреваемых или субклинических носителях с использованием высокочувствительного хозяина (стадии развития или вида) в качестве индикатора присутствия патогена.
5. Трансмиссионная или сканирующая электронная микроскопия.
6. Тесты на основе антител для обнаружения патогенов с использованием поликлональных антител (ПКА, PABs) иммунной сыворотки или моноклональных антител (МКА, MAbs).
7. Молекулярные методы (включая секвенирование, в соответствующих случаях, для определения штамма):

ДНК-зонды при исследованиях методом дот-блот гибридизации прямым методом с использованием образцов нефиксированных тканей или с использованием экстрагированной ДНК;

ДНК-зонды или РНК-зонды для исследований методом гибридизации *in-situ* (ISH) с использованием гистологических срезов фиксированных тканей;

Стандартная ПЦР и ПЦР в реальном времени, а также ОТ-ПЦР для исследования прямым методом с использованием образцов нефиксированных тканей или с использованием экстрагированной ДНК или РНК.

Имеется очень небольшое количество диагностических тестов на основе антител для патогенов, которые вызывают болезни ракообразных. Поскольку у ракообразных не вырабатываются антитела, применение диагностических тестов на основе антител ограничивается обнаружением патогена. При том, что целый ряд диагностических методов на основе антител разработан и описан в литературе, эти методы были разработаны с использованием антител мыши или кролика, сгенерированных к специфическим возбудителям болезней, очищенным и полученным от инфицированных хозяев. Поскольку вирусы ракообразных невозможно в рутинном порядке культивировать *in vitro* (т.е. получать в культуре клеток), для получения антитела традиционно использовался очищенный вирус, полученный от инфицированных хозяев. Не так давно на основе данных вирусной последовательности были получены рекомбинантные вирусные структурные белки, и эти белки использовали для получения антител. Отсутствие методов культивирования клеток ракообразных до недавнего времени резко ограничивало разработку и доступность данного диагностического инструмента. Недавнее использование технологий на основе МКА в отношении данной проблемы положило начало появлению нескольких тестов на основе антител. Имеются МКА к возбудителям

ряда включенных в список МЭБ болезней ракообразных (вирус синдрома белых пятен (WSSV), вирус синдрома Таура (TSV), вирус желтой головы (YHV) и вирус инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза (IHNV)). В настоящее время доступны из коммерческих источников диагностические тест-наборы/реагенты на основе антител для выявления инфекций TSV, WSSV и YHV.

Были разработаны молекулярные методы, и некоторые методы широко используются для обнаружения многих вирусных, бактериальных, грибных и протозойных патогенов пенидных креветок (или некоторых других десятиногих ракообразных). Методы обнаружения на основе нуклеиновых кислот легко найти в литературе, а некоторые доступны из коммерческих источников в виде тест-наборов для выявления включенных в список МЭБ патогенов TSV, WSSV и YHV/GAV (вирус, поражающий жабры креветок), IHNV, MBV (монодон-бакуловирус), BP (Baculovirus penaei) и IMNV (вирус инфекционного мионекроза). Методы ПЦР или ОТ-ПЦР существуют для всех этих вирусов и используются в рутинном порядке некоторыми секторами отрасли аквакультуры ракообразных. Что касается возбудителей других болезней, включенных в список МЭБ, то либо о специфических ДНК-зондах, меченных нерадиоактивными метками, имеются сообщения в литературе, либо они доступны коммерчески для применения в формате дот-блот с экстрактами из гемолимфы или тканей или для применения с рутинными гистологическими срезами при использовании ISH.

Образцы, отобранные для молекулярных тестов или тестов на основе антител на болезни ракообразных, включенные в список МЭБ, могут быть объединены в пулы, состоящие из не более чем пяти экземпляров на один объединенный в пул образец молоди, подвзрослой молоди и взрослых особей. Однако, что касается икринок, личинок и постличинок, может потребоваться объединить в пул и большее количество (например, ~150 или более икринок или личинок, либо от 50 до 100 постличинок в зависимости от их размера/возраста) для получения достаточного количества материала образца (антигена для тестов на основе антител или экстрагированной нуклеиновой кислоты для молекулярных тестов с целью проведения диагностического исследования).

7.1. Тесты на основе антител

7.1.1. Получение кроличьей антисыворотки и поликлональных антител к вирусам ракообразных

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

7.1.2. Антисыворотка к бактериям ракообразных

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время.

7.1.3. Подготовка и хранение иммунной сыворотки

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

7.1.4. Мышиные моноклональные антитела к вирусам и бактериям

ракообразных

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

7.1.5. Прямая микроскопия

Образцы для исследования методом прямой микроскопии следует подвергнуть исследованию в ближайшее возможное время после отбора. По возможности используйте живые экземпляры или же нефиксированные, охлажденные или фиксированные 10% забуференным формалином, когда использование живых экземпляров практически невозможно. Если имеется соответствующая требованиям полевая лаборатория, следует воспользоваться ею для проведения подготовки и исследования образцов поблизости от места отбора.

7.1.6. Гистологические методы

Отберите креветок (или других десятиногих ракообразных) при помощи любых имеющихся средств с минимальным стрессом, связанным с манипуляциями с ними. Либо зафиксируйте креветок (или других десятиногих ракообразных) возле резервуара или пруда, либо транспортируйте в лабораторию, используя приспособление, наполненное водой с высоким содержанием кислорода. Обеспечьте достаточную аэрацию контейнера, если креветок (или других десятиногих ракообразных) предстоит оставить на непродолжительное время до фактической фиксации. Для изучения предположительно больных креветок (или других десятиногих ракообразных) выбирайте животных умирающих, с изменением окраски, демонстрирующих аномальное поведение или иного рода отклонения от нормы, за исключением тех случаев, когда целью отбора образцов является оценка распространенности болезни (например, оценка превалентности болезни), предпочтительным методом отбора для которой является вероятностная выборка.

7.1.6.1. Держите наготове достаточный запас фиксатора

Общее правило заключается в том, что для какого-либо объема образца ткани следует использовать как минимум десятикратный объем фиксатора (например, для 10-граммового образца креветки [или другого десятиногого ракообразного] потребовалось бы 100 мл фиксатора).

7.1.6.2. Фиксатор АФА (спирт, формалин, уксусная кислота) Дэвидсона

Фиксатор АФА Дэвидсона рекомендуется для большинства случаев гистологического применения. Фиксатор обладает быстрым действием, сокращает автолитические изменения у десятиногих ракообразных (то есть, в особенности, у пенеидных креветок, *Macrobrachium rosenbergii*, лангустов рода *Panilurus* и других разводимых на ферме десятиногих ракообразных в тропических и субтропических регионах), а его кислотное содержимое декальцифицирует кутикулу. Состав фиксатора АФА Дэвидсона (для получения 1 литра) следующий:

330 мл 95% этилового спирта

220 мл 100% формалина* (насыщенный 37–39% водный раствор формальдегида (газа))

115 мл ледяной уксусной кислоты**

335 мл водопроводной воды (для морских ракообразных возможна замена морской водой)

Храните фиксатор в стеклянных или пластиковых бутылках с надежными крышками при комнатной температуре.

*Не используйте ранее приготовленный 10% формалин для приготовления фиксатора АФА Дэвидсона, поскольку содержания формалина в АФА Дэвидсона будет недостаточно для обеспечения удовлетворительной фиксации.

**Не заменяйте уксусную кислоту другими кислотами, как, например, HCl. Гистологические срезы, приготовленные с помощью раствора Дэвидсона с использованием HCl, не подходят для рутинного гистологического окрашивания гематоксилином и эозином.

7.1.6.3. Процедуры фиксации с помощью фиксатора АФА Дэвидсона

1. Для личинок и постличинок, которые слишком малы для того, чтобы без труда сделать инъекцию фиксатора с помощью туберкулинового шприца:

Используя сетку с мелкими отверстиями или пастеровскую пипетку, выберите и отберите экземпляры. Погрузите креветок (или других десятиногих ракообразных), выбранных с целью отбора образцов, непосредственно в фиксатор. Фиксируйте в течение 12–24 часов в фиксаторе, а затем перенесите в 70% этиловый спирт для хранения.

2. Для более крупных постличинок и очень мелкой молодежи, которые слишком малы, для того, чтобы сделать инъекцию:

Выберите и отберите экземпляры. Используйте иглу или остроконечный пинцет для того, чтобы рассечь кутикулу и сразу же погрузите креветок (или других десятиногих ракообразных), выбранных с целью отбора образцов, непосредственно в фиксатор. Фиксируйте в течение 12–24 часов в фиксаторе, а затем перенесите в 50–70% этиловый спирт для хранения.

3. Для более крупных постличинок, молодежи и взрослых особей:

Сделайте инъекцию фиксатора (используйте 5–10% соотношение объем:вес) при помощи иглы и шприца (калибр иглы – в зависимости от размера креветок [или других десятиногих ракообразных], то есть игла калибра 27 – для постличинок и мелкой молодежи) живой креветке (или другим десятиногим ракообразным).

Сначала следует сделать инъекцию фиксатора в гепатопанкреас (HP) и в два других места или более в объеме, достаточном для того, чтобы изменить

цвет гепатопанкреаса на белый и до оранжевого (при использовании фиксатора АФА Дэвидсона); затем сделайте инъекцию фиксатора в прилегающие участки головогруды, в переднюю часть брюшного отдела и в заднюю часть брюшного отдела.

Фиксатор следует распределить между различными отделами, при этом на головогрудной отдел, а конкретно, на гепатопанкреас, должна приходиться большая доля, чем на брюшной отдел.

Чтобы гарантировать надлежащую фиксацию, следует руководствоваться следующим: вводить количество, эквивалентное 5–10% веса тела креветки (или другого ракообразного); все признаки жизни должны быстро прекратиться, и на участках инъекций должно произойти видимое изменение цвета.

Сразу же после инъекции, разрежьте кутикулу при помощи анатомических ножниц от шестого брюшного сегмента до основания рострума, особенно следя за тем, чтобы не разрезать на большую глубину подлежащую ткань. Разрез в области головогруды должен быть чисто боковым до дорсальной срединной линии, в то время как в брюшном отделе он должен быть примерно срединно-боковым.

4. Для креветок (и большинства других ракообразных) весом более ~12 г:

После инъекции фиксатора следует затем рассечь тело на две части в поперечном направлении, по меньшей мере один раз, сразу позади сочленения брюшка/головогруды, а также (необязательно) еще раз посередине брюшного отдела.

5. Для очень крупных ракообразных (например, лобстеры, крабы, взрослые особи пенеид, взрослые особи *Macrobrachium rosenbergii*, некоторые виды и стадии развития крабов и т.д.):

Представляющие интерес органы можно иссечь после инъекции фиксатора. Затем производится завершение фиксации данных образцов тканей согласно описанному выше.

После инъекции, выполнения разрезов и рассечения на две/три части или иссечения ключевых органов погрузите экземпляр в фиксатор (используйте соотношение фиксатор:ткань 10:1).

Оставьте для фиксации при комнатной температуре на 24–72 часа в зависимости от размера сохраняемого ракообразного. При использовании фиксатора АФА Дэвидсона можно применять более длительные периоды фиксации для того, чтобы тщательно декальцифицировать панцири крабов, лобстеров, раков и т.д.

После фиксации экземпляры следует перенести в 70% этиловый спирт, где их можно хранить в течение неопределенного периода времени.

Запишите полное описание экземпляров на момент отбора: макроскопические наблюдения в отношении состояния ракообразного, вид, возраст, вес, источник (дикое или, если речь идет о культивируемом, то номер пруда или резервуара, номер популяции и т.д.) и любую другую относящуюся к делу информацию, которая может понадобиться позже.

Этикетка должна оставаться вместе с образцами в том же контейнере во время фиксации, хранения и транспортировки в лабораторию. Всегда используйте мягкий графитовый карандаш № 2 на водостойкой бумаге (рекомендуется использовать пластиковую бумагу; никогда не используйте чернильные ручки или фломастеры, поскольку чернила растворяются спиртом).

7.1.6.4. Перевозка и отправка сохраненных образцов

Поскольку большие количества спирта не подлежат пересылке по почте или отправке, рекомендуются следующие способы. Достаньте образцы из 70% этилового спирта. Для личинок, постличинок или молоди небольшого размера используйте герметичные пластиковые сосуды с завинчивающейся крышкой при наличии таковых; если должны быть использованы стеклянные сосуды, упакуйте их, чтобы они не разбились. Что касается более крупных экземпляров, оберните образцы белыми бумажными полотенцами так, чтобы полностью покрыть их (не используйте хлопок сырец или переработанный хлопок). Поместите обернутые полотенцами экземпляры в плотно закрывающийся пластиковый пакет и пропитайте 70% этиловым спиртом. Вложите этикетку и запечатайте пакет. Поместите этот пакет во второй плотно закрывающийся пакет. Большое количество небольших плотно закрывающихся пакетов можно в свою очередь поместить в твердый, ударопрочный, соответствующим образом маркированный контейнер для отправки (подробную информацию смотрите в Главе 5.10 *Меры, касающиеся международной перевозки возбудителей болезней водных животных и патологических материалов Кодекса по водным животным*).

7.1.7. Трансмиссионная или сканирующая электронная микроскопия

Электронная микроскопия (ЭМ – трансмиссионная или сканирующая) является ценным исследовательским инструментом для изучения болезни у ракообразных. Тем не менее, методы ЭМ доступны только в качестве подтверждающих методов применительно к некоторым болезням и не используются в рутинном порядке для диагностики болезней, включенных в список МЭБ. Поэтому применение ЭМ ограничивается специфическими целями (смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*).

7.1.8. Использование молекулярных методов и методов на основе антител для подтверждающего тестирования и диагностики

7.1.8.1. Подготовка образцов и виды

Манипуляции с образцами, выбранными для диагностических тестов на основе

нуклеиновых кислот или антител, и их упаковку (в новые пластиковые пакеты или флаконы для образцов) следует осуществлять с большой осторожностью, чтобы свести к минимуму возможность перекрестной контаминации между образцами, отобранными от разных (диких или разводимых на ферме) популяций, резервуаров, прудов, ферм и т.д. Необходимо использовать новые пластиковые пакеты или флаконы для образцов. Водостойкую этикетку с соответствующими данными, заполненную карандашом № 2, следует поместить внутрь каждой упаковки или контейнера для каждого комплекта образцов.

Некоторые методы, подходящие для сохранения и транспортировки образцов, отобранных для молекулярных тестов или тестов на основе антител:

1. Живые экземпляры:

Можно провести подготовку живых экземпляров в полевых условиях или отправить их в диагностическую лабораторию для тестирования.

2 Гемолимфа:

Гемолимфа является предпочтительным образцом для определенных молекулярных и основанных на антителах диагностических тестов (смотрите главы, посвященные конкретным болезням). Образцы можно отобрать при помощи иглы и шприца путем пункции сердца, из гемоцели (т.е. вентрального синуса у пенеид) или из отрезанного придатка и сразу же перенести в пробирку, наполовину наполненную ~90–95% этанолом или подходящим консервантом (например, RNALater®) для сохранения образца.

3. Сохраняемые при помощи льда или охлажденные экземпляры:

Сохраняемые при помощи льда или охлажденные экземпляры – это для экземпляров, которых можно транспортировать в лабораторию для тестирования в пределах 24 часов. Упакуйте образцы в пакетах для образцов, поместив вокруг помещенных в пакеты образцов достаточное количество влажного льда, в контейнер, термоизолированный при помощи Styrofoam™², и отправьте в лабораторию.

4. Замороженные целые экземпляры:

Выберите живые экземпляры в соответствии с критериями, перечисленными в главах, посвященных конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*, быстро заморозьте их в полевых условиях или проведите заморозку в полевых лабораториях, используя морозильник с механическим управлением, при температуре –20°C или ниже. Подготовьте и вложите в контейнер с образцами этикетку, упакуйте образцы, используя достаточное количество сухого льда, в термоизолированный при помощи Styrofoam™ контейнер и отправьте в лабораторию.

² Ссылка на конкретные коммерческие продукты в качестве примеров не подразумевает их одобрения со стороны МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, упоминаемым в настоящем *Руководстве по водным животным*.

5. Образцы, сохраненные при помощи спирта:

В регионах, где хранение и отправка замороженных образцов проблематичны, может быть использован 90–95% этанол для сохранения, хранения и перевозки определенных видов образцов для молекулярных тестов. Образцы, сохраненные при помощи спирта, как правило, не подходят для тестов на основе антител. Ракообразных в целом виде (любую стадию развития при условии, что экземпляр весит не более 2-3 г), иссеченные ткани (например, плеоподы) от крупных ракообразных или гемолимфу можно сохранить в 90-95% этаноле, а затем упаковать для отправки в соответствии с методами, приведенными в Разделе 5.3, параграф iv (смотрите дополнительную подробную информацию о международной перевозке таких образцов в главе 5.10 *Кодекса по водным животным*).

7.1.8.2. Сохранение РНК или ДНК в тканях

Для рутинного диагностического тестирования методом ПЦР, ОТ-ПЦР или для тестов методом дот-блота с использованием ДНК-зондов, необходимо подготовить образцы, чтобы сохранить нуклеиновую кислоту патогена. Для большинства целей сохранение образцов в спирте (70–100%) является предпочтительным методом для последующих молекулярных тестов. Коммерчески доступны и другие продукты (например, RNAlater, разнообразные лизирующие буферы и т.д.) для этой же цели, и информация о данных продуктах представлена в главах, посвященных конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*, там, где это применимо.

7.1.8.3. Экстракция ДНК

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

7.1.8.4. Экстракция РНК

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

7.1.8.5. Подготовка предметных стекол для гибридизации *in-situ*

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

8. Сбор дополнительной информации

Рекомендации в отношении любой дополнительной информации, которая может потребоваться или которая может помочь диагностической лаборатории в определении наиболее подходящего теста (тестов), который (которые) следует провести в отношении предоставленных образцов, смотрите в главах, посвященных конкретным болезням в настоящем *Руководстве по водным животным*.

9. КЛЮЧЕВЫЕ БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО

ЧТЕНИЯ

- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Asian Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper, No. 402, supplement 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 240 pp.
- BROCK J.A. & MAIN K. (1994). A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. Published by the Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA.
- CORSIN F., GEORGIADIS M., HAMMELL K.L. & HILL B. (2009). Guide for Aquatic Animal Health Surveillance. The World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France., 114 pp.
- FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego and London, USA and UK, 1259 pp.
- JOHNSON P.T. (1980). Histology of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*. A Model for the Decapoda. Prager, New York, USA, 440 pp.
- HOLTHUIS L.B. (1980). FAO Species Catalogue. Vol. 1 – Shrimp and Prawns of the World. FAO Fisheries Synopsis No. 125. FAO, Rome, Italy, 271 pp.
- LIGHTNER D.V. (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.
- LIGHTNER D.V. (1996). The penaeid shrimp viruses IHNV and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15**, 579–601.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.*, **33**, 165–180.
- LOTZ J.M. (1997). Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 405–413.
- PEREZ FARFANTE I. & KENSLEY B.F. (1997). The Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnosis for the Families and Genera. *Editions du Museum national d'Histoire Naturelle, Paris, France*, **175**, 1–233.
- WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2014). Chapter 1.3. Diseases

listed by the OIE. *In*: Aquatic Animal Health Code, Seventeenth Edition. OIE, Paris, France.

*

* *