

РАЗДЕЛ 2.3.

БОЛЕЗНИ РЫБ

ГЛАВА 2.3.0.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

ПРОБООТБОР¹

1. Оценка статуса здоровья эпизоотологической единицы

1.1. Материал образцов, используемый для тестирования

Материал образцов и количество образцов, которые должны быть отобраны, зависят от болезни или патогенного организма, размера животных и цели тестирования (т.е. диагностики клинической формы болезни, обнаружения рыб, являющихся субклиническими носителями патогена, или отбора проб для целевого надзора, чтобы продемонстрировать свободу от указанной болезни). См. *Руководство МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Corsin с соавт., 2009) или *Кодекс МЭБ по здоровью водных животных*, глава 1.4 «Надзор за здоровьем водных животных» для получения информации о разработке и оценке систем наблюдения за водными животными и отдельные главы по болезням в *данном Руководстве по водным животным*, чтобы получить информацию о требованиях к образцам.

1.2. Спецификации в зависимости от популяций рыбы

Общие рекомендации см. в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Corsin с соавт., 2009) или в главе 1.4 *Водного кодекса МЭБ*. Конкретные сведения о требованиях к образцу для конкретной болезни из списка МЭБ смотрите в главе по конкретной болезни в *данном Руководстве по водным животным*. При отсутствии доказательств обратного, для разработки системы надзора для демонстрации статуса свободы от болезни страны, зоны или района, необходим минимальный уровень отбора образцов, соответствующий предполагаемой 2%-ной превалентности с использованием предполагаемого 100% чувствительного теста, и для поддержания этого статуса отбор образцов должен проводиться на уровне, соответствующем предполагаемой превалентности равной 5 или 10%.

1.3. Спецификации в зависимости от клинического статуса

В случае клинической инфекции, помимо целого малька или целых внутренних органов, органы, от которых отбираются образцы - это головная почка, селезенка, сердце или головной мозг для большинства вирусологических исследований (жабра и кишка при взятии проб на герпесвирус карпа кои), кожа или мышцы при взятии проб

¹ NB: Версия утверждена Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012г.

для исследований на эпизоотический язвенный синдром, кожа и плавники для обследования на *Gyrodactylus salaris*. Образцы, отобранные от десяти клинически больных рыб должны быть достаточными для тестирования на патогенные организмы для каждой эпизоотологической единицы. Для выявления субклинических носителей вируса или для целевого надзора, где требуется большое количество проб, образцы могут быть объединены в пулы, как указано в каждой отдельной главе по болезням в *Руководстве по водным животным*.

1.4. Спецификации в зависимости от размера рыбы

1.4.1. Для вирусных болезней из списка кроме герпесвирусной болезни карпа кои, вирусной энцефалопатии и ретинопатии

Малёк лосося с желточным мешком: отбор образцов от всей рыбы, но удалить желточный мешок при его наличии.

Рыба от 4 до 6 см: отобрать все внутренности, включая почку. Кусочек головного мозга можно отобрать, отсоединив голову на уровне заднего края жаберной кости и нажав на нее в боковом направлении.

Рыба более 6 см: отобрать почку, селезенку и сердце или головной мозг и/или ткани в соответствии с конкретным патогенным микроорганизмом, в отношении которого проводится тестирование (подробнее смотрите главу по конкретным болезням в данном *Руководстве по водным животным*).

Взрослая рыба: отобрать яичниковую жидкость, молоки и/или ткани, подходящие для тестирования на конкретный патогенный организм (подробнее см. Главу по конкретным болезням в данном *Руководстве по водным животным*).

1.4.2. Инфекция патогенным организмом *Aphanomyces invadans* (эпизоотический язвенный синдром [ЭЯС])

Рыба любого размера: почка, печень, мышечная ткань (см. Главу 2.3.2. «Инфицирование *Aphanomyces invadans*» [эпизоотический язвенный синдром] для более подробной информации).

1.4.3. Инфекция патогенным организмом *Gyrodactylus salaris*

Любой размер рыбы: кожа и плавники (смотри Главу 2.3.3 «Инфицирование патогенным организмом *Gyrodactylus salaris*» для получения более конкретной информации).

1.4.4. Герпесвироз карпа кои (KHV)

Рыба от 4 см до взрослых особей: отобрать ткани жабр, почки, селезенки, головного мозга и внутренностей, в зависимости от используемого теста (смотри Главу 2.3.7 «Герпесвирусная болезнь карпа кои» для получения более подробной информации).

1.4.5. Вирусная энцефалопатия и ретинопатия (VER)

Рыба 2–4 см: взять целую голову.

Рыба размером 4 см до взрослых особей: отобрать головной мозг и, возможно, глаза и спинной мозг (подробности см. в Главе 2.3.12 «Вирусная энцефалопатия и ретинопатия»).

2. Общие процедуры работы с пробами

2.1. Макроскопическое исследование

При перечисленных болезнях макроскопическое исследование в основном используется для выявления клинических признаков эпизоотического язвенного синдрома или *Gyrodactylus salaris*, но за этим следует микроскопическое исследование гистологических предметных стекол для первой болезни или влажных соскобов кожи / плавников для последней болезни.

2.2. Вирусологическое исследование

2.2.1. Транспортировка и обработка образцов антибиотиками

Пулы органов или овариальных жидкостей помещают в стерильные флаконы и хранят при температуре 4°C или на льду до тех пор, пока в лаборатории не будет произведено вирусвыделение. Вирусвыделение оптимально должно проводиться в течение 24 часов после отбора проб рыбы, но все еще может проводиться в период до 48 часов, если температура поддерживается на уровне 0–4°C, или в течение более длительных периодов времени для проб на исследование клинических болезней, хранящихся в замороженном виде при - 80°C. Однако следует избегать замораживания образцов для испытаний на субклинических носителей.

Образцы органов также можно транспортировать в лабораторию, помещая их во флаконы, содержащие среду для культивирования клеток или сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS) с добавлением антибиотиков для подавления роста бактериальных контаминантов (один объем органа, по меньшей мере, в пяти объемах транспортной жидкости). Подходящими концентрациями антибиотиков являются: гентамицин (1000 мкг мл⁻¹) или пенициллин (800 международных единиц [МЕ] мл⁻¹) и стрептомицин (800 мкг мл⁻¹). Противогрибковые соединения, такие как Mycostatin® или Fungizone®, также могут быть включены в транспортную среду в конечной концентрации 400 МЕ/мл⁻¹. Для стабилизации вируса можно добавить сыворотку или белок (5–10%), если время транспортировки превысит 12 часов.

2.2.2. Вирусвыделение

Эту процедуру следует проводить при температуре ниже 15 ° C (предпочтительно от 0 до 10 ° C).

1. Декантировать среду с добавлением антибиотиков из образца органа.
2. Гомогенизировать пулы органов в транспортной среде в конечном разведении 1/10 с использованием ступки и пестика или электрического гомогенизатора до получения пасты.
3. Центрифугировать гомогенат в центрифуге с охлаждением при 2–5°C при 2000–4000 g в течение 15 минут, собрать супернатант и обработать антибиотиками либо в течение четырех часов при 15°C или в течение ночи при 4°C, например,

гентамицин 1 мг мл⁻¹. Если транспортировка образца была произведена в транспортной среде (то есть с воздействием антибиотиков), обработку супернатанта антибиотиками можно не производить. Обработка антибиотиками делает ненужной фильтрацию через мембранные фильтры.

4. Аналогичным образом, образцы овариальной жидкости можно обрабатывать антибиотиками для контроля микробной контаминации, но их не следует разбавлять более чем в пять раз в среде HBSS и антибиотиках.

5. Образцы овариальной жидкости следует центрифугировать так же, как и гомогенаты органов, а их супернатанты использовать непосредственно на последующих этапах.

2.2.3. Обработка с целью нейтрализации энзоотических вирусов

Рыбы часто являются субклиническими носителями эндемичных вирусов, таких как бирнавирусы (например, вирус инфекционного панкреатического некроза [IPNV]), которые вызывают цитопатический эффект в чувствительных клеточных культурах и, таким образом, усложняют выделение и идентификацию целевых патогенных организмов. В таких ситуациях инфекционность энзоотических вирусов должна быть нейтрализована перед тестированием на вирусы, перечисленные в *Кодексе о водных животных*. Однако, когда важно определить, присутствует ли один из энзоотических вирусов, образцы следует тестировать с использованием нейтрализующих антител (NAbs) или без них.

Для нейтрализации водных бирнавирусов смешать равные объемы (200 мкл) раствора одного или нескольких NAb против серотипов местного бирнавируса с тестируемым супернатантом. Дать смеси вступить в реакцию в течение 1 часа при 15°C или в течение ночи при 4°C до инокуляции в монослой восприимчивых клеток. Титр используемого раствора NAb должен составлять не менее 2000 в 50% тесте на уменьшение бляшек по сравнению с вирусными серотипами, присутствующими в данном географическом регионе.

Если образцы отобраны из страны, региона, популяции рыб или производственной единицы, которые считаются свободными от энзоотических вирусных инфекций, такую обработку гомогената органа производить не следует.

Этот подход также можно использовать для нейтрализации других энзоотических вирусов на территории, где проводятся исследования.

2.3. Исследования на паразитов

См. главу 2.3.3 для более подробной информации

2.4. Исследования на грибы

См. главу 2.3.2 для более подробной информации

МАТЕРИАЛЫ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ В РЫБЕ

3. Вирусы у рыб

3.1. Клеточные линии рыб

Следующие клеточные линии рыбы используются для исследований на вирусные патогенные организмы рыбы, указанные в *Руководстве по водным животным*:

Папилезная эпителиома карповых (EPC)

Мальки синежаберного солнечника (BF-2)

Толстоголовый гольян (FHM)

Гонады радужной форели (RTG-2)

Эмбрион чавычи (CHSE-214)

Голова, почки лосося (SHK-1)

Почка атлантического лосося (ASK)

Плавник пристипомы (GF)

Плавник карпа Кои (KF-1)

Мозг сазана (CCB)

Голова ямчатоглазой змеи (SSN-1)

3.2. Культуральная среда

Традиционная минимальная необходимая среда Игла (MEM) с солями Эрла, дополненная 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС), антимикробными агентами и 2 мМ L-глутамином, является наиболее широко используемой средой для культивирования клеток рыб.

Среда Стокера, однако, являющаяся модифицированной формой вышеуказанной среды, содержащей двойную концентрацию определенных аминокислот и витаминов, особенно рекомендуется для усиления роста клеток, используя те же добавки, что и выше + 10% триптозофосфат.

Эти среды забуферены либо бикарбонатом натрия, 0,16 М трис-гидроксиметиламинометан (Трис) HCl, либо, предпочтительно, 0,02 М N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновой кислотой (HEPES). Использование только бикарбоната натрия ограничено теми клеточными культурами, которые были приготовлены в плотно закрытых сосудах для культивирования клеток.

В качестве альтернативы для некоторых клеточных линий, например, SHK-1 и SSN-1, рекомендуется среда Лейбовица (L15), дополненная ФБР (5% или 10%), L-глутамином (4 мМ) и гентамицином (50 мкг / мл).

выделения вируса или продукции вируса оно может быть уменьшено до 2%. Аналогично, рН культуральной среды для роста клеток составляет 7,3-7,4 и доводится до 7,6 для продуцирования вируса или количественного анализа вируса.

В состав наиболее часто используемой смеси противомикробных препаратов входят пенициллин (100 МЕ мкг/мл⁻¹) и дигидрострептомицин (100 мкг/мл⁻¹). Добавить микостатин (50 МЕ мкг/мл⁻¹), если возможна контаминация грибами. Другие концентрации или другие антимикробные агенты могут использоваться как удобно оператору в зависимости от чувствительности к противомикробным препаратам встречающихся штаммов бактерий и грибов.

3.1. Положительные контроли вируса и приготовление антигена

3.1.1. Номенклатура вируса

Вирус эпизоотического шематопозитического некроза (EHNV)

Инфекционный некроз гемопоэтической ткани (IHNV)

Вирус инфекционной анемии лососевых (ISAV)

Герпесвирус карпа кои (KHV)

Oncorhynchus masou вирус (OMV)

Иридовирус красноперого пагеля (RSIV)

Альфовирус лососевых (SAV)

Вирус вирусной геморрагической септицемии (VHSV)

Вирус вирусной энцефалопатии и ретинопатии (вирус) (VERV) известный как вирус вирусного нервного некроза (VNNV)

3.3.2. Продуцирование вируса

Для производства исходных культур этих вирусов *in vitro*, монослойные культуры восприимчивых клеток (см. соответствующие разделы в данном *Руководстве по водным животным*) в подходящих сосудах для культивирования тканей (например, в пластиковых плашках) должны быть инокулированы при довольно низком уровне множественности заражения (М.О.И.) т. е. от 10⁻² до 10⁻³ бляшкообразующих единиц (PFU) на клетку.

Предпочтительные температуры для размножения вируса:

15°C для IHNV, ISAV, OMV и VERV (генотип BFNNV) и VHSV

20°C для KHV, SVCV и VERV (генотипы BFNNV, SJNNV и TPNNV)

22°C для EHNV

25°C для RSIV и VERV (генотипы RGNNV и SJNNV)

30 ° C для VERV (генотип RGNNV)

3.3.3. Консервация и хранение исходных культур вируса

1. Центрифугировать инфицированные клеточные культуры при $2-5^{\circ}\text{C}$ и 2000–4000 g в течение 15 минут, затем разбавить вирусосодержащие супернатанты, чтобы получить вирусные титры в среднем равные 10^6 БОЕ мл^{-1} .
2. Разлить полученные вирусные суспензии в стерильные флаконы объемом 0,3–0,5 мл каждый.
3. Заморозить и хранить каждую серию стандартных исходных вирусов при -80°C или жидком азоте и регулярно проверять титр каждого исходного вируса, если он не использовался в течение этого периода времени.

Лиофилизация: длительное хранение (десятилетия) посевов стандартных штаммов вируса достигается лиофилизацией. Для этой цели вирусные суспензии в среде для культивирования клеток с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка смешивают (по объему) с равным объемом криоконсервативной среды (такой как 20% гидролизат лактальбумина в дистиллированной воде) перед обработкой. Уплотнить или закрыть пробкой под вакуумом и хранить при 4°C в темноте.

4. Методы

4.1. Серология

4.1.1. Производство кроличьей антисыворотки и поликлональных антител к вирусам у рыб

Существуют различные способы, которыми могут быть получены антитела против вирусов рыб у кроликов. Однако на титр и специфичность влияет используемая инокуляционная программа. Следующие протоколы иммунизации могут применяться для получения антисыворотки для использования в процедурах выделения и / или идентификации вируса, описанных ниже.

4.1.1.1. Антисыворотка к вирусу инфекционного панкреонекроза

Внутривенная инъекция 50–100 мкг очищенного вируса в день 0, затем идентичная бустерная доза в день 21 и кровопроизвлечение через 5–7 дней. Кролики могут быть повторно использованы, если не будут полностью обескровлены.

4.1.1.2. Антисыворотка к другим вирусам

В протоколах иммунизации чередуются внутримышечная или внутрикожная инъекции с другими внутривенными бустерными инъекциями:

1. День 0: первичная инъекция, 500–1000 мкг очищенного вируса смешивают (об./об.) с адьювантом (неполным или другими² адьювантами Фрейнда, которые считаются более приемлемыми), получая общий объем 1,2 мл. Этот антиген вводят кролику в виде многоточечных внутрикожных инъекций (по 2 точки с каждой стороны) после того, как животное было побрито.

² Использование полных адьювантов Фрейнда может быть ограничено из соображений благополучия животных.
Альтернативные синтетические адьюванты включают димиколит-трегалозы и монофосфатный липид А.

2. День 21: отобрать около 2 мл крови и проверить на реактивность (нейтрализация, флуоресценция); ввести бустерную дозу внутривенно тем же количеством очищенного вируса, что и при первичной инъекции, но без адъюванта.

Перед внутривенной бустерной инъекцией кролик должен быть обработан прометазинем (12 мг внутримышечно) для предотвращения возможной анафилактической реакции.

3. День 28: отобрать кровь, проверить реактивность сыворотки, пустить кровь или ввести бустерную дозу в соответствии с результатами.

Что касается рабдовирусов, эта процедура иммунизации хорошо подходит для производства антисывороток, которые будут использоваться в иммунофлуоресценции и в иммуноферментном анализе. Однако более эффективным методом продуцирования нейтрализующей антисыворотки является регулярная внутривенная инъекция без адъюванта (0,2 мл) каждые 3-4 дня (два раза в неделю). Могут быть необходимы 15 инъекций. Через 1 неделю после последней инъекции следует собрать и протестировать образцы сыворотки.

4.1.2. После свертывания крови отобрать и центрифугировать сыворотку при 20°C и нагревать ее в течение 30 минут при 56°C. Отфильтровать полученную инактивированную теплом сыворотку через мембранный фильтр (размер пор - 450 нм) и временно хранить ее при 4°C в течение времени, необходимого для скрининга ее реакционной способности и специфичности и для проверки того, что на эти свойства не влияют условия консервации (например, замораживание или лиофилизация). Стерильные кроличьи сыворотки можно хранить в течение не менее 2 месяцев при 4°C без каких-либо изменений их свойств. Дозировать (обычно в небольших объемах) и заморозить при -20°C или лиофилизировать.

Иммуноглобулины (Ig) могут быть извлечены из антисыворотки с использованием обычных методов, подходящих для очистки Ig. Селективное прикрепление к белку А является надежным и эффективным методом. Концентрация растворов Ig доводится до значений, необходимых для дальнейшего приготовления или хранения конъюгата.

Консервация Ig: смешать раствор Ig концентрации 2 мг/л⁻¹ со стерильным чистым глицерином (об./об.) и хранить при -20°C. Растворы Ig с более высокой концентрацией также могут быть приготовлены в глицерине.

4.1.3. Мышиные моноклональные антитела

Моноклональные антитела (MAbs) к большинству вирусов рыб были получены в последние годы. Некоторые из них, по отдельности или в виде двух или трех ассоциированных МАб, дали начало биологическим реагентам, подходящим для идентификации вирусных групп (IPN, VHS, IHN). Другие МАб, взятые по отдельности или в качестве компонентов Ab панелей, позволяют выполнять точное типирование VHSV и IHNV. Эти MAbs можно получить в Референтных лабораториях, перечисленных в конце данного *Руководства по водным животным*

Теоретически, мышиные моноклональные IgG можно обрабатывать и хранить как поликлональные IgG. Однако реакционная способность некоторых МАб может быть

нарушена такими процессами, как ферментативное мечение или радиомечение или лиофилизация. Таким образом, необходимо протестировать различные МАб для условий, при которых они будут использоваться.

4.2. Прямая микроскопия

Образцы для прямого микроскопического исследования мазков или отпечатков тканей должны быть исследованы как можно скорее после отбора. Живые образцы следует использовать всегда, когда это возможно, или свежие, охлажденные при 4°C или 10% буферизованные образцы, зафиксированные в формалине, используемые, когда живые образцы нецелесообразны. Если имеется соответствующая полевая лаборатория, ее следует использовать для обработки и исследования образцов вблизи места сбора.

4.3. Методы гистологического исследования

4.3.1. Фиксация и погружение ткани

Для гистологии следует отбирать только живые или умирающие образцы рыбы с клиническими поражениями. Удаленные ткани должны быть немедленно зафиксированы в 10% забуференном формалине. Использовать не менее десяти объемов фиксатора для каждого объема образца ткани и оставить на 24 часа. После удаления из фиксатора образцы ткани затем дегидратируют в возрастающих концентрациях этанола, очищают в смешивающемся с воском агенте, таком как ксилол, и затем вводят в парафин с использованием стандартных протоколов.

4.3.2. Приготовление срезов тканей и окрашивание

Отрезать срезы толщиной примерно 5 мкм от блока. Поместить каждый срез на предметное стекло, удалить воск в смешивающемся с воском агенте, таком как ксилол или Clearene®, и регидратировать.

Для большинства исследований болезней срезы могут быть окрашены гематоксилином и эозином (H & E), используя следующую процедуру:

4.3.2.1. Погружение предметных стекол

1. Поместить предметные стекла в ксилол или Clearene®, чтобы удалить воск минимум на 2 минуты.
2. Повторить этап 1, используя свежий ксилол или Clearene®.
3. Поместить в 100% спирт, чтобы удалить растворитель минимум на 2 минуты.
4. Повторить шаг 3 в свежем 100% спирте.

4.3.2.2. Окрашивание

1. Промыть проточной водопроводной водой (RTW) в течение 2–5 минут. Предметные стекла должны быть чистыми, не мутными.
2. Поместить в раствор гематоксилина на 3 минуты.
3. Подержать в RTW в течение 5–10 минут до изменения цвета на синий (или в

насыщенном карбонате лития); но не допускать темно синего цвета.

4. Окунуть в кислоту/спирт максимум на 10 секунд.
5. Промыть в RTW (или карбонате лития) до синего цвета.
6. Проверить под микроскопом на наличие чистой цитоплазмы и голубых ядер.
7. Водный эозин в течение 3 минут.
8. Хорошо промыть в RTW для дифференциации эозина.

4.3.2.3. Дегидрирование, очистка и заключение

1. Хорошо промыть в 70% спирте, но не слишком долго, так как он удаляет эозин.
2. Повторить этап 14, используя свежий спирт.
3. Поместить в 100% спирт, чтобы удалить растворитель минимум на 2 минуты.
4. Поместить в 50/50 спирт/Clearene® на 1–2 минуты.
5. Поместить в Clearene®.
6. Повторить погружение используя свежий Clearene®, предметные стекла должны быть чистыми.
7. Поместить в DPX (дистирен, пластификатор и ксилол) и оставить для высыхания.

Для наблюдения за гранулами и грибными гифами, возникающими при эпизоотическом язвенном синдроме, вместо H & E можно использовать обычный краситель для грибов, такой как Grocott-Gomori.

4.3.3. Подготовка предметных стекол для иммуногистохимического исследования

Важно отметить, что длительная фиксация может маскировать интересующие антигены. Поэтому рекомендуется осуществлять фиксацию до минимума, при этом достигая оптимального уровня консервирования (24–48 часов). Ее можно уменьшить и далее используя небольшие кусочки ткани. Тем не менее, рекомендуется включать этап извлечения антигена (включен в протокол ниже), где это возможно. Ниже описан стандартный протокол иммуногистохимии, обычно используемый в гистологических лабораториях, но из-за различий, которые могут существовать между антителами и коммерчески доступными наборами для обнаружения, вполне вероятно, что людям потребуется оптимизировать методику для своих собственных целей. Это будет включать такие факторы, как определение оптимального титра антител. Именно самое высокое разведение приводит к наиболее интенсивному специфическому окрашиванию при достижении наименее неспецифического фонового окрашивания. Кроме того, специалистам может потребоваться изменить продолжительность инкубации реагентов.

1. Выполнить этапы 1–5 раздела 2.3.2.
2. Промыть предметные стекла дважды в ФБР (2% Твин 20) в течение 2 минут.
3. Извлечь антиген, поместив предметные стекла в пластиковую емкость Коплина, содержащую натрий-цитратный буфер, и поместить на подставку для приготовления на пару, расположенную внутри скороварки.
4. Поставить скороварку на сильный огонь, пока не будет достигнуто максимальное давление, на что будет указывать «качание» регулятора давления.
5. Уменьшить температуру и оставить на плите примерно на 10 минут, сохраняя давление.
6. Снять с конфорки и дать скороварке остыть и продуть в течение примерно 20–30 минут в вытяжном шкафу перед открытием.
7. Вынуть сосуд Коплина из скороварки и заменить натриевый цитратный буфер теплой водопроводной водой, затем холодной водопроводной водой и дистиллированной водой. Данная процедура применяется для постепенного охлаждения предметных стекол.
8. При необходимости выполнить блокирование активности эндогенного биотина/авидина (а) инкубировать предметные стекла в течение 15–20 минут в 0,005% авидине в ФБР (b) промыть в ФБР с последующей (c) инкубацией в 0,005% биотине в ФБР в течение 15–20 минут. В качестве альтернативы, использовать коммерчески доступную систему блокировки в соответствии с рекомендациями производителя. Это обычно применяется для тканей, содержащих высокие уровни биотина, таких как печень, почки и селезенка.
9. Быстро промыть предметные стекла в водопроводной воде.
10. Промыть предметные стекла в ФБР (0,2% Твин 20) в течение 2 минут.
11. Снять реактив и насухо промокнуть вокруг среза ткани, чтобы срез оставался влажным.
12. Инкубировать с первичными антителами при 25°C в течение 30 минут легким круговым вращением, если это доступно.
13. Промыть предметные стекла в ФБР (0,2% Твин 20) из промывочных флаконов.
14. Снять реактив и насухо промокнуть вокруг среза ткани, чтобы срез оставался влажным.
15. Инкубировать с биотинилированным вторичным антителом при 25°C в течение 10 минут легким круговым вращением, если это доступно.
16. Промыть предметные стекла в ФБР (0,2% Твин 20) из промывочного флакона.
17. Гасить активность эндогенной пероксидазы путем помещения предметных стекол в ФБР, содержащим 0,3% перекись водорода с 0,1% азида натрия в

течение 10–15 минут при комнатной температуре.

18. Промыть предметные стекла в ФБР (0,2% Твин 20) из промывочного флакона.
19. Инкубировать с предпочтительным коммерчески доступным меченным пероксидазой комплексом для обнаружения стрептавидина при 25°C в течение 10 минут легким круговым вращением, если это доступно.
20. Промыть предметные стекла в ФБР (0,2% Твин 20) из промывочного флакона.
21. Нанести ДАБ хромоген на предметные стекла и обнаружить продукт реакции путем мониторинга под микроскопом в течение оптимального времени. Продолжительность будет зависеть от используемого продукта ДАБ.
22. Остановить реакцию, поместив предметные стекла в водопроводную воду.
23. Выполнить усиление хромогеном (необязательно), поместив слайды в ФБР с добавлением 0,5% сульфата меди на 1–5 минут при 25°C легким круговым вращением.
24. Промыть в дистиллированной воде.
25. Выполнить контрастное окрашивание гемотоксилином Харриса в течение 2–3 минут.
26. Промыть водой.
27. Дегидратировать, очистить и заключить.

Подготовка реактива

ФБР - Твин 20 (0,2%):	Физиологический раствор с фосфатным буфером	10 литров
	Твин 20	2 мл
Натриевый цитратный буфер:	Тринатрийцитрат (дигидрат)	2,94 г
	Вода дистиллированная	1 литр
	Твин 20	0,5 мл

Смешать до растворения, довести рН до 6,0 с помощью 1 N HCl перед добавлением Твин 20. Хранить этот раствор при комнатной температуре в течение 3 месяцев или при 4°C для более длительного хранения.

4.4. Электронная микроскопия

Электронная микроскопия (трансмиссия или сканирование) является ценным исследовательским инструментом для изучения болезней водных животных. Однако эти методы обычно не используются для обычной диагностики заболеваний рыб, из списка МЭБ, поэтому они не описаны в данном Руководстве по водным животным.

4.5. Использование молекулярных методов для подтверждающего тестирования и диагностики

Молекулярные методы, включая зонды нуклеиновых кислот и полимеразную цепную

реакцию (ПЦР), были разработаны для идентификации многих патогенных организмов водных животных. Однако, как и в случае с некоторыми другими диагностическими методами, преимущество в чувствительности часто компенсируется проблемами в интерпретации или подверженностью техническим проблемам. При использовании ПЦР в качестве метода диагностики важное значение имеют дизайн праймеров и зонда, использование контролей, а также валидация выбранного метода ПЦР. ПЦР может в значительной степени зависеть от условий, в которых она проводится, и может подвергаться лабораторной контаминации предыдущими продуктами ПЦР, что дает ложноположительные результаты. Таким образом, хотя несколько протоколов нуклеиновых кислот и протоколов ПЦР включены в эту версию *Руководства по водным животным* как диагностические или подтверждающие методы исследования рыб, где это возможно, в качестве стандартных методов скрининга указаны хорошо известные методы (например, выделение вируса). Всякий раз, когда используются эти новые молекулярные методы, они должны выполняться с осторожностью и с особым вниманием к включению адекватных положительных и отрицательных контролей.

4.5.1. Подготовка образцов и их виды

Для этих методов должны быть подготовлены образцы для сохранения нуклеиновой кислоты патогенного организма. Аналогичным образом, образцы, предназначенные для тестирования методами на основе антител, должны быть сохранены для сохранения реактивных антигенных участков для используемых антител.

Образцы, отобранные для диагностических тестов на основе нуклеиновых кислот или антител, прежде чем проводить анализ, должны обрабатываться и упаковываться с максимальной осторожностью, чтобы минимизировать вероятность перекрестной контаминации среди образцов или деградации мишени. Для предотвращения контаминации следует использовать новые контейнеры (пластиковые пакеты для образцов или флаконы). Водостойкая этикетка с заполненными соответствующими данными должна быть помещена в каждую упаковку или контейнер для каждого набора образцов.

Некоторые подходящие методы для сохранения и транспортировки образцов, отобранных для молекулярных или основанных на антителах испытаний:

1. *Живые образцы со льдом или охлажденные образцы:* что касается образцов, которые можно быстро доставить в лабораторию для тестирования в течение 24 часов, упаковать образцы в пакеты для образцов, обложенных достаточным количеством мокрого льда вокруг упакованных образцов в изолированной коробке и отправить в лабораторию.
2. *Замороженные цельные образцы:* отобрать живые образцы в соответствии с целью пробоотбора, быстро заморозить на месте с использованием измельченного сухого льда или заморозить в полевой лаборатории с использованием механического морозильника при температуре -20°C или ниже. Подготовить и вставить этикетку в контейнер с образцами, упаковать образцы с достаточным количеством сухого льда в изолированную коробку и отправить в лабораторию.
3. *Образцы, сохраняемые в спирте:* в регионах, где хранение и отгрузка замороженных образцов проблематичны, для хранения, хранения и транспортировки определенных типов образцов можно использовать 90–95% этанол. Упаковать для отправки в соответствии с описанными выше методами.

4. *Фиксированные ткани для гибридизации на месте и иммуногистохимии*: для этой цели подходят классические методы сохранения тканей. Буферный формалин обычно является хорошим выбором для последующего использования молекулярных зондов. Для ДНК, в частности, следует избегать чрезмерной фиксации (более 24–48 часов).

4.5.2. Сохранение РНК и ДНК в тканях

Ткань разрезают до размеров менее 0,5 см в одном измерении и погружают в 10 объемов RNAlater (например, 0,5г. образца требует около 5мл. RNAlater). Мелкие органы, такие как почка, печень и селезенка, могут храниться целиком в RNAlater. Эти образцы могут храниться при 4°C в течение 1 месяца, при 25°C в течение 1 недели или неопределенно долго при –20°C или ниже. Архивировать ткани, обработанные RNAlater при -20°C или ниже.

4.5.3. Экстракция ДНК

Для экстракции ДНК растереть в 10 объемах буфера для экстракции (NaCl [100 мМ], этилендиаминтетрауксусной кислоты [EDTA, 25 мМ], pH 8 и додецилсульфат натрия [SDS, 0,5%]) с добавлением протеиназы К (100 мкг мл⁻¹). После инкубации в течение ночи при 50°C ДНК экстрагируют с использованием стандартного протокола фенол/хлороформ и осаждают этанолом. Чтобы выделить ДНК из тканей, сохраненных в RNAlater, просто удалите ткань из RNAlater и обработайте ее, как если бы она была только что отобрана. Большинство тканей можно гомогенизировать непосредственно в буфере для лизиса или экстракции.

Учитывая временные ограничения и риски для лабораторного персонала, имеющиеся в продаже наборы могут быть удовлетворительными техническими альтернативами. Использование коммерческих наборов должно быть валидировано путем сравнения со стандартным фенол/хлороформ протоколом перед их обычным использованием в диагностических лабораториях.

4.5.4. Экстракция РНК

Чтобы экстрагировать РНК из тканей, сохраненных в RNAlater, просто удалить ткань из RNAlater и обработать ее, как если бы она была только что отобрана. Большинство тканей можно гомогенизировать непосредственно в буфере для лизиса или экстракции.

Учитывая временные ограничения и риски для лабораторного персонала, имеющиеся в продаже наборы могут быть удовлетворительными техническими альтернативами. Использование коммерческих наборов должно быть валидировано путем сравнения со стандартным фенол/хлороформ протоколом перед их обычным использованием в диагностических лабораториях.

4.5.5. Подготовка предметных стекол для гибридизации на месте

Для гибридизации на месте (ISH) ткани рыб должны быть зафиксированы в забуференном формалине в течение приблизительно 24 часов, а затем помещены в парафин в соответствии со стандартными гистологическими методами, как описано в разделе 3.3. Срезы нарезают толщиной 5 мкм и помещают на предметные стекла, покрытые аминоалкилсиланом, которые затем выпекают в течение ночи в печи при

40°C. Срезы удаляют воском путем погружения в ксилол на 10 минут. Этот этап повторяют один раз, а затем растворитель удаляют погружением в две последовательные ванны с абсолютным этанолом на 10 минут каждая. Затем срезы регидратируют погружением в этанол. Протокол может потребовать проведение этапа мембранной проницаемости, обеспечивающей доступ к целевой ДНК. Для этого срезы обрабатывают протеиназой К (100 мкг мл⁻¹) в ТЕ-буфере (Трис [50 мМ], ЭДТА [10 мМ]) при 37 °С в течение 30 минут. Для ISH тестов важно, чтобы как известные положительные, так и известные отрицательные стекла были окрашены, чтобы исключить ложноположительные результаты из-за неспецифического окрашивания/отсутствия окрашивания и ложноотрицательные результаты из-за ошибок в протоколе окрашивания.

5. Дополнительная информация, которую необходимо собрать

Географическое происхождение образцов должно определяться названием места отбора образцов, связанного либо с его географическими координатами, либо с его местоположением вдоль русла реки или водоема. Другая минимальная информация об образце должна включать имя лица, отобравшего образец, организацию, дату, время, название водоема и описание местоположения. Также необходимо вести записи, которые предоставляют информацию, позволяющую отследить перемещение образца от места отбора проб до хранилища или лаборатории и внутри этих объектов. Хранилища должны регистрировать информацию о способе хранения, месте хранения, дате и времени хранения в каждом шкафу или морозильной камере, а также информацию о температуре хранения (предпочтительнее непрерывный мониторинг). Эта информация должна отслеживаться с помощью индивидуальных кодов образца, присваиваемых для всех образцов. Лабораториям следует регистрировать дату получения, информацию о месте хранения, дату проведения анализа, примечания к анализу и дату отчета для всех закодированных образцов. Эти данные значительно облегчат отслеживание образцов при возникновении проблем и обеспечат гарантию того, что образцы были правильно обработаны.

БИБЛИОГРАФИЯ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ПРОЧТЕНИЯ

AMEND D., YASUTAKE W. & MEAD R. (1969). A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. Trans. Am. Fish. Soc., 98, 796–804.

ARNZEN J.M., RISTOW S.S., HESSON C.P. & LIENTZ J. (1991). Rapid fluorescent antibody test for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) utilizing monoclonal antibodies to nucleoprotein and glycoprotein. J. Aquat. Anim. Health, 3, 109–113.

AUBERTIN A.M. (1991). Family Iridoviridae. In: Classification and Nomenclature of Viruses, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. Arch. Virol. (Suppl. 2). Springer, New York and Vienna, USA and Austria.

BOOTLAND L.M. & LEONG J.A. (1992). Staphylococcal coagglutination, a rapid method of identifying infectious hematopoietic necrosis virus. Appl. Environ. Microbiol., 58, 6–13.

BOWSER P.R. & PLUMB J.A. (1980). Fish cell lines: establishment of a line from ovaries of channel catfish. In Vitro, 16, 365–368.

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.

DOBOS P. (1991). Family Birnaviridae. In: Classification and Nomenclature of Viruses, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. Arch. Virol. (Suppl. 2). Springer, New York and Vienna, USA and Austria, 200–202.

EAGLE H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130, 432.

FIJAN N., PETRINEC Z., SULIMANOVIC D. & ZWILLENBERG L.O. (1971). Isolation of the causative agent from the acute form on infectious dropsy of carp. *Vet. Arch. Zagreb*, 41, 125–138.

FIJAN N., SULIMANOVIC D., BEARZOTTI M., MUZINIC D., ZWILLENBERG L.O., CHILMONCZYK S., VAUTHEROT J.F. & DE KINKELIN P. (1983). Some properties of the Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*). *Ann. Virol. Institut Pasteur*, 134E, 207–220.

HEDRICK R.P., MCDOWELL T.S., AHNE W., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. *Dis. Aquat. Org.*, 13, 203–209.

HILL B.J., WILLIAMS R.F. & FINLAY J. (1981). Preparation of antisera against fish virus disease agents. *Dev. Biol. Stand.*, 49, 209–218.

HSU Y.L., MARK ENGELKING H. & LEONG J. (1986). Occurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1353–1361.

HYATT A.D., EATON B.T., HENGSTBERGER S. & RUSSEL G. (1991). Epizootic hematopoietic necrosis virus: detection by ELISA, immuno-histochemistry and electron microscopy. *J. Fish Dis.*, 14, 605–618.

JENSEN M.H. (1965). Research on the virus of Egtved disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 126, 422–426.

LANGDON J.S., HUMPHREY J.D., WILLIAMS L.M., HYATT A.D. & WESTBURY H.A. (1986). First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.*, 9, 263–268.

LANNAN C.N., WINTON J.R. & FRYER J.L. (1984). New cell lines. Fish cells: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro*, 20, 671–676.

LORENZEN E., CARSTENSEN B. & OLESEN N.J. (1999). Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Dis. Aquat. Org.*, 37, 81–88.

LORENZEN N., OLESEN N.J. & VESTERGAARD-JORGENSEN P.E. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. *Dis. Aquat. Org.*, 4, 35–42.

- MOURTON C., ROMESTAND., DE KINKELIN P., JEFFROY J., LEGOUVELLO R. & PAU B. (1992). A highly sensitive immunoassay for the direct diagnosis of viral haemorrhagic septicaemia, using anti-nucleocapsid monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 2338–2345.
- MUNDAY B.L., KWANG J. & MOODY N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, 25, 127–142.
- NAKANE P.K. & KAWAOI A. (1974). Peroxidase-labeled antibody, a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 22, 1084–1091.
- OLESEN N.J., LORENZEN E. & LAPATRA S. (1999). Production of neutralizing antisera against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus by intravenous infection of rabbits. *J. Aquat. Anim. Health*, 11, 10–16.
- OLESEN N.J. & VESTERGAARD-JORGENSEN P.E. (1992). Comparative susceptibility of three fish cell lines to Egtved virus, the virus of viral haemorrhagic septicaemia. *Dis. Aquat. Org.*, 12, 235–237.
- PANZARIN V., PATARNELLO P., MORI A., RAMPAZZO E., CAPPELLOZZA E., BOVO G. & CATTOLI G. & (2010). Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Arch. Virol.*, 155, 1193–1203.
- PAUL J. (1976). Media for culturing cells and tissues. In: *Cell and Tissue Culture*, Paul J., ed. Churchill Livingstone, Edinburgh and London, and New York, UK and USA, 91–123.
- RISTOW S.S. & ARNZEN J.M. (1989). Development of monoclonal antibodies that recognize a type 2 specific and a common epitope on the nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, 1, 119–125.
- ROIZMAN B. (1991). Family Herpesviridae. In: *Classification and Nomenclature of Viruses*, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. *Arch. Virol. (Suppl. 2)*. Springer, New York and Vienna, USA and Austria, 103–110.
- STOKER M. & MCPHERSON I. (1961). Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus in vitro. *Virology*, 14, 359–370.
- WALKER P. & SUBASINGHE R.P. (2000). DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, n°395, 93 pp.
- WOLF K. (1988). *Fish Viruses and Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 476 pp.
- WOLF K. & QUIMBY M.C. (1962). Established eurythermic line of fish cell in vitro. *Science*, 135, 1065–1066.
- WOLF K. & QUIMBY M.C. (1973). Fish viruses: Buffers and methods for plaquing eight agents under normal atmosphere. *Appl. Microbiol.*, 25, 659–664.

*

* *