

ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ ЭПИЗОТИЧЕСКОГО ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА

1. Предмет рассмотрения

Инфекция вирусом эпизоотического гематопозитического некроза - это инфекция вирусом эпизоотического гематопозитического некроза (EHNV) рода *Ranavirus* семейства *Iridoviridae*.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический агент, штаммы возбудителя

EHNV является членом рода *Ranavirus* семейства *Iridoviridae*, типовой вид вирус лягушки 3 (FV3) (Chinchar с соавт., 2005). Другие виды: вирус Боле (BIV), вирус европейских сомов (ECV), вирус обыкновенных сомов (ESV) и ранавирус Сенти-Купер. Следует соблюдать осторожность, когда речь идет о ECV и ESV как о двух отдельных вирусах, поскольку в научной литературе (Hyatt с соавт., 2000) указано, что они являются изолятами одного и того же вируса. В этом роде существует много других условных видов. Ранавирусы были выделены от здоровых или больных лягушек, саламандр и рептилий в Америке, Европе и Австралии (Chinchar, 2002; Drury с соавт., 2002; Fijan с соавт., 1991; Hyatt с соавт., 2002; Speare & Smith, 1992; Whittington с соавт., 2010; Wolf с соавт., 1968; Zupanovic с соавт., 1998). Ранавирусы имеют крупные (150-180 Нм) икосаэдрические вирионы, двухцепочечный ДНК-геном 150-170 КБ и реплицируются как в ядре, так и в цитоплазме (Chinchar с соавт., 2005). Они обладают общими антигенами, которые можно обнаружить несколькими методами.

С момента признания болезни, вызванной EHNV в Австралии в 1986 году, аналогичные системные синдромы некротического иридовируса были зарегистрированы у выращиваемых на фермах рыб. К ним относятся сом (*Ictalurus melas*) во Франции (ECV) (Pozet с соавт., 1992), обыкновенный сом (*Silurus glanis*) в Германии (ESV) (Ahne с соавт., 1989; Ahne с соавт., 1990), тюрбо (*Scophthalmus maximus*) в Дании (Bloch & Larsen, 1993) и другие рыбы в Финляндии (Ariel с соавт., 1999).

EHNV и ECV-это различимые вирусы, которые можно дифференцировать с помощью геномного анализа (Ahne с соавт., 1998; Holopainen с соавт., 2009; Hyatt с соавт., 2000; Мао с соавт., 1996; Мао с соавт., 1997; Marsh с соавт., 2002). Это позволяет проводить эпизоотологическое разделение случаев болезни у пелагических рыб в Австралии (EHNV) и Европе (ECV), а также дифференцировать их от случаев болезни ранавирусом у лягушек (FV3 и BIV). Однако многие изоляты ранавируса не были охарактеризованы до такого уровня.

2.1.2. Выживание вне хозяина

EHNV чрезвычайно устойчив к высушиванию и в воде может сохраняться в течение нескольких месяцев (Langdon, 1989). Он может персистировать в замороженных тканях рыбы более 2 лет (Langdon, 1989), а в замороженных рыбных тушах - как минимум год (Whittington с соавт., 1996). По этим причинам предполагается, что EHNV может персистировать в рыбном хозяйстве в воде и осадке, а также на заводах и оборудовании в течение нескольких месяцев или лет.

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

EHNV чувствителен к 70% этанолу, 200 мг литр⁻¹ гипохлориту натрия или нагреванию до 60°C в течение 15 минут (Langdon, 1989). Данные по инактивации ранавируса амфибий также могут быть актуальны: 150 мг литр⁻¹ хлоргексидина и 200 мг литр⁻¹ пероксимоносульфата калия показали свою эффективность после контакта в течение 1 минуты (Bryan с соавт., 2009). Если EHNV сначала высушить - то в супернатанте клеточной культуры он будет устойчив к нагреванию (Whittington et al., 2010).

2.1.4. Жизненный цикл

Путь заражения неизвестен, но экспериментально рыбы становились восприимчивыми при подвергании их воздействию вируса в ванне. Вирус инфицирует разные типы клеток, включая гепатоциты, гемопоэтические клетки и эндотелиальные клетки во многих органах. (Reddacliff & Whittington, 1996). Вирус выделяется в воду из зараженных тканей и туш по мере их разложения.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды, удовлетворяющие критериям включения в перечень как восприимчивые к заражению EHNV в соответствии с Главой 1.5. *Ветеринарно-санитарного Кодекса водных животных (Кодекс здоровья водных животных)* относятся: черный сомик (*Ameiurus melas*), радужная рыба *Melanotaenia fluviatilis*), Гамбузия Хольбрука (*Gambusia holbrooki*), речной окунь (*Perca fluviatilis*), австралийская маккария (*Macquaria australasica*), гамбузия (*Gambusia affinis*), горная галаксия (*Galaxias olidus*), северная щука (*Esox lucius*), Судак (*Sander lucioperca*), радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*) и серебряный окунь (*Bidyanus bidyanus*).

2.2.2. Виды с неполными доказательствами восприимчивости

Виды, в отношении которых имеются неполные данные, удовлетворяющие критериям включения в перечень как восприимчивых к заражению EHNV в соответствии с главой 1.5. *Кодекса здоровья водных животных*: не известны.

Кроме того, положительные результаты патоген-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) были получены в отношении следующих организмов (без доказательства активной инфекции): атлантический лосось (*Salmo salar*), пресноводный сом (*Tnadanus tandanus*), золотистый окунь (*Macquaria ambigua*), маккулочелла (*Maccullochella peelii*) и фиолетово-пятнистый пескарь (*Mogurnda*

adspersa).

2.2.3. Стадии восприимчивости хозяина

Восприимчивыми хозяевами являются все возрастные классы радужной форели и Европейского окуня.

2.2.4. Видовая или субпопуляционная предрасположенность (вероятность обнаружения)

Клинические признаки обычно более очевидны у мальков и молоди рыб, чем у взрослых особей радужной форели и Европейского окуня.

2.2.5. Целевые органы и инфицированные ткани

Целевые органы и ткани, инфицируемые вирусом: почки, селезенка и печень. Неизвестно, можно ли обнаружить EHNВ в тканях гонад, овариальной жидкости или в молоках, а также пригодны ли эти ткани для наблюдения за маточным поголовьем.

2.2.6. Персистентная инфекция

2.2.6.1. Радужная форель

Высокий уровень летальности и низкая распространенность инфекции EHNВ при естественных инфекциях у радужной форели означает, что уровень популяемости носителей, вероятно, будет очень низким (<2%) (Whittington *с соавт.*, 1994). EHNВ был обнаружен у взрослых рыб, но поскольку гистопатологические поражения, соответствующие инфекции EHNВ, также присутствовали, то наблюдалась активная инфекция, а не состояние носительства (Whittington *с соавт.*, 1999). Анти-EHNВ сывороточные антитела не были обнаружены у мальков возраста 0 + во время или после вспышки, но были обнаружены у небольшого процента выросших рыб, поэтому неясно, являлись ли они выжившими после вспышки (Whittington *с соавт.*, 1994; Whittington *с соавт.*, 1999). Имеются данные по европейским запасам радужной форели для экспериментальных заражений, где были выявлены потенциальные носители (Ariel & Bang Jensen, 2009).

2.2.6.2. Обыкновенный окунь

Этот вид чрезвычайно восприимчив к инфекции EHNВ (Whittington & Reddacliff, 1995). EHNВ был выделен у 2 из 40 внешне здоровых взрослых европейских окуней во время эпизоотии среди молоди в Виктории, Австралия (Langdon & Humphrey, 1987), но поскольку инкубационный период длится до 28 дней (Whittington & Reddacliff, 1995), эти рыбы, возможно, находились в доклинической фазе. Несколько изолятов ранавируса были получены от европейского окуня в Виктории во времена, когда не было очевидной эпизоотии, и некоторые, на первый взгляд здоровые европейские окуни в Виктории, имели

сывороточные антитела к EHNV или родственному вирусу (Whittington & Hyatt, неопубликованные данные).

2.2.7. Векторы

Птицы являются потенциальными векторами EHNV. Они переносят его в кишечнике, на перьях, ногах и клюве.

2.3. Клиническая картина болезни

2.3.1. Механизмы передачи

2.3.1.1. Радужная форель

EHNV распространился между фермами радужной форели путем переноса зараженных мальков и, вероятно, с транспортировочной водой (Langdon *с соавт.*, 1988; Whittington *с соавт.*, 1994; Whittington *с соавт.*, 1999). Низкая распространенность инфекции у радужной форели означает, что активная инфекция может легко остаться незамеченной в популяции и распространиться через торговлю рыбой. Нет никаких данных о возможной вертикальной передаче EHNV на или внутри икринок, а протоколы дезинфекции икринок не прошли оценку. EHNV еще не был выделен из тканей яичников или из маточного стада. Ежегодное повторное появление болезни у выращиваемой на фермах радужной форели может быть связано с повторным заражением последовательных партий рыбы от дикого обыкновенного окуня, который находится в том же районе лова.

2.3.1.2. Обыкновенный окунь

Появление инфекции EHNV у обыкновенного окуня в расположенных далеко друг от друга речных системах и водоемах, а также его прогрессирование вверх по течению указывает на то, что EHNV распространяется и другими способами, помимо воды; механизмы включают перемещение живой рыбы или приманок рыболовами-любителями. Миграция обыкновенного окуня в Австралии является неопределенной (см. Также раздел 2.2.7 векторы).

2.3.2. Превалентность

2.3.2.1. Радужная форель

Клиническую болезнь, как правило, трудно обнаружить при очень низком уровне смертности, и инфекция EHNV может присутствовать на ферме, не вызывая при этом подозрений. Во время вспышек EHNV был обнаружен путем выделения вируса у 60-80% умирающих или мертвых рыб, и только у 0-4% контактирующих, клинически здоровых рыб. 99% доверительные пределы для превалентности субклинической инфекции составляют 0-8% (Whittington *с соавт.*, 1994; Whittington *с соавт.*, 1999). Вирус невозможно было обнаружить в выживших когортах после вспышки болезни. Антитела к анти-EHNV были обнаружены у взрослых рыб при низкой превалентности (0,7%, 95% доверительный интервал 0,02% - 3,7%).

2.3.2.2. Обыкновенный окунь

Данную болезнь распознают по эпизоотической смертности рыб любого возраста, поражающей очень большую часть популяции с резким сокращением численности (Langdon *с соавт.*, 1986; Langdon & Humphrey, 1987; Whittington *с соавт.*, 1996). Как правило, в эндемичных районах наблюдается поражение мальков и молоди, однако в свежеинфицированных районах поражение наблюдается и у взрослых особей. Когда болезнь впервые обнаруживают в каком-либо районе, происходит резкое сокращение численности популяции (Langdon *с соавт.*, 1986; Langdon & Humphrey, 1987; Whittington *с соавт.*, 1996).

Исследования, о которых говорится выше, были проведены еще до появления ПЦР в реальном времени, которая может иметь большую диагностическую чувствительность и выявлять более высокую превалентность в субклинически инфицированных популяциях.

2.3.3. Географическое распределение

2.3.3.1. Радужная форель

Заражение EHNV известно только на рыбных фермах, расположенных в бассейнах рек Маррамбиджи и Шолхейвен в Новом Южном Уэльсе, Австралия (Whittington *с соавт.*, 2010).

2.3.3.2. Обыкновенный окунь

Инфекция EHNV является эндемичной в Юго-Восточной Австралии, но имеет прерывистое распространение (Whittington *с соавт.*, 2010). Эта инфекция встречается во многих мелких и крупных водоемах в Виктории и с 1986 года постепенно распространяется вверх по течению в бассейне реки Маррамбиджи через Новый Южный Уэльс и Территорию столицы Австралии. Аналогичное распространение наблюдалось и в реке Муррей в Южной Австралии (Whittington *с соавт.*, 1996).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

2.3.4.1. Радужная форель

По-видимому, в естественных условиях EHNV слабо заразен, но дает высокий уровень смертности. Инфекция EHNV может присутствовать на ферме, не вызывая подозрений, потому что уровень смертности не поднимается выше обычного фонового уровня. Чаще всего инфекция EHNV регистрировалась у мальков с длиной тела по Смитту <125 мм, суточная смертность составляла менее 0,2% , а общая смертность - до 4%. Тем не менее, восприимчивой является радужная форель всех возрастов, хотя инфекция еще не была замечена в маточном поголовье (Whittington *et al.*, 1994; Whittington *с соавт.*, 1999). Болезнь оказывает слабое прямое влияние на экономику по причине низкого уровня смертности. Могут наблюдаться различия в восприимчивости между европейскими и австралийскими поголовьями радужной форели (Ariel & Bang Jensen, 2009).

2.3.4.2. Обыкновенный окунь

Существует очень высокий уровень инфицирования и смертности в естественных вспышках, что со временем приводит к сокращению популяций диких рыб (Langdon *с соавт.*, 1986; Langdon & Humphrey, 1987; Whittington *с соавт.*, 1996). Экспериментальная инокуляция в ванне всего лишь 0,08 TCID₅₀ 50 мл⁻¹ оказалась смертельной, а дозы, слишком низкие, чтобы быть обнаруженными при выделении вируса в клетках BF-2, были смертельными при внутрибрюшинной инокуляции (Whittington & Reddacliff, 1995). Между европейскими и австралийскими поголовьями обыкновенного окуня могут иметься различия в восприимчивости (Ariel & Bang Jensen, 2009).

2.3.5. Факторы окружающей среды

2.3.5.1. Радужная форель

Вспышки, по-видимому, связаны с плохими условиями в хозяйствах, особенно с высокой плотностью посадки, недостаточным потоком воды и загрязнением резервуаров с кормом. Поврежденная кожа может являться путем проникновения EHNВ. Вспышки болезни наблюдались на фермах, где температура воды варьировала от 11 до 20°C (Whittington *с соавт.*, 1994; Whittington *с соавт.*, 1999). Инкубационный период после внутрибрюшинной инокуляции составлял 3-10 дней при температуре 19-21°C по сравнению с 14-32 днями при температуре 8-10°C (Whittington & Reddacliff, 1995).

2.3.5.2. Обыкновенный окунь

Естественная эпизоотия EHNВ, поражающая молодь и взрослых особей обыкновенного окуня, происходит в основном летом (Langdon *с соавт.*, 1986; Langdon & Humphrey, 1987; Whittington *с соавт.*, 1994). Предполагают, что заболевание молоди связано с ежегодным появлением большого количества молодых рыб, не имеющих иммунитета, и последующим влиянием на них вируса, когда стаи находятся на мелководье; взрослые особи редко вовлечены в подобные вспышки. Вполне возможно, что температура окружающей среды является триггером для вспышек, поскольку молодые рыбы питаются планктонной фауной на теплом мелководье, в то время как взрослые особи питаются бентическими беспозвоночными и более крупной добычей в более глубоких и более холодных водах (Whittington & Reddacliff, 1995). В условиях эксперимента инкубационный период составлял от 10 до 28 дней при температуре 12-18°C и 10-11 дней при температуре 19-21°C; взрослые окуни были невосприимчивы к инфекции при температуре ниже 12°C (Whittington & Reddacliff, 1995). Европейское поголовье обыкновенного окуня также показало зависимость восприимчивости от температуры (Ariel & Bang Jensen, 2009).

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Отсутствует

2.4.2. Химиотерапия

Отсутствует

2.4.3. Иммуностимуляция

Исследования не проводились.

2.4.4. Разведение резистентных к штаммам популяций

Официальной программы разведения резистентных к штаммам популяций восприимчивых видов не существует. Тем не менее, экспериментальные исследования с подверганием воздействию вирусу в ванне показали, что обыкновенный окунь из водоемов в Новом Южном Уэльсе, Австралия, у которого ранее была инфекция EHNV, показал более низкую смертность по сравнению с обыкновенным окунем из соседних и отдаленных водоемов в Австралии, где EHNV никогда не был зарегистрирован (Becker *с соавт.*, 2016).

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

Исследования не проводились.

2.4.6. Блокирующие агенты

Исследования не проводились.

2.4.7. Дезинфекция яиц и личинок

Исследования не проводились.

2.4.8. Общая практика ведения хозяйства

Борьба с болезнями радужной форели на уровне фермерских хозяйств основана на снижении воздействия инфекции за счет поддержания низких темпов посадки и надлежащего качества воды. Расследования на одной из ферм по разведению радужной форели показали, что пруды с высокой плотностью посадки и слабым потоком воды и, следовательно, более низким качеством воды могут привести к более выраженному клиническому проявлению болезни по сравнению с прудами на той же ферме с более низкой плотностью посадки и более высокой скоростью потока воды (Whittington *с соавт.*, 1994). Механизм защиты может заключаться в поддержании здорового кожного покрова (Whittington *с соавт.*, 1994).

3. Отбор проб

3.1. Отбор индивидуальных образцов

Для культивирования клеток и проведения иммуноферментного анализа (ИФА) был валидирован простой метод подготовки тканей рыб (Whittington & Steiner, 1993).

Крупную рыбу помещают в ванну с 70% этанолом на 30 секунд; мальков помещают в ванну с 70% этанолом на 5 секунд, а затем промывают в стерильной воде. Рыбу

препарируют с соблюдением принципов асептики в боксе биологической безопасности II класса.

3.1.1. Крупная рыба (длина туловища по Смитту >60 мм)

Извлекают 0,1 г печени, почек, селезенки (\pm другие органы в отдельных случаях) и помещают в стерильные пробирки по 1,5 мл. Существуют пробирки с пестиками, пригодные для измельчения тканей (см. ниже), но можно использовать стандартные пробирки объемом 1,5 мл. В некоторых случаях печень, почки и селезенку можно объединить в одну пробирку (см. Раздел 3.3).

3.1.2. Средняя рыба (длина туловища по Смитту 30-60 мм)

Необходимо соскоблить все внутренности в пробирку.

3.1.3. Мелкая рыба (длина туловища по Смитту <30 мм)

Голову и хвост удаляют, остальную часть рыбы помещают в пробирку.

3.2. Сохранение образцов для представления

Для культивирования клеток и проведения ИФА пробирки с тканями замораживают при температуре от -20°C до -80°C до появления необходимости в их использовании. Для светового микроскопического исследования ткани фиксируют в 10% нейтральном буферном формалине.

3.3. Объединение проб в пулы

Влияние объединения образцов тканей от нескольких рыб на чувствительность диагностических тестов не было оценено.

3.4. Лучшие органы или ткани

Печень, передняя почка, селезенка.

3.5. Неподходящие образцы / ткани

Неподходящие ткани включают гонады, гонадные жидкости, молоки и икринки, так как нет никаких доказательств инфекции репродуктивных путей, и нет никакой информации об участии маточного стада в инфекционном цикле.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Нет никаких специфических клинических признаков. Рыб находят мертвыми. Возможно, имеются клинические свидетельства плохой практики ведения хозяйства, такие как повышенная плотность посадки и неоптимальное качество

воды, проявляющееся в виде поражений кожи, плавников и жабр (Reddacliff & Whittington, 1996).

4.1.2. Изменение поведения

У умирающей рыбы может наблюдаться потеря равновесия, оттопыренные жаберные крышки, и она может быть темного цвета (Reddacliff & Whittington, 1996).

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

На коже, плавниках и жабрах могут отсутствовать макроскопические или неспецифические поражения. У небольшой части рыб может наблюдаться увеличение почек, печени или селезенки. В печени могут быть очаговые бело-желтые поражения, соответствующие областям некроза (Reddacliff & Whittington, 1996).

4.2.2. Клиническая химия

Не применимо.

4.2.3. Микроскопические патологические изменения

Острый очаговый, многоочаговый или локальный обширный коагуляционный или колликвационный некроз печени, гематопозитические почки и селезенка обычно видны в окрашенных гематоксилином и эозином (H&E) срезах фиксированного формалином материала. Можно увидеть небольшое количество базофильных интрацитоплазматических телец-включений, особенно в областях, непосредственно окружающих некротические участки в печени и почках. Некротические поражения могут также наблюдаться в сердце, поджелудочной железе, желудочно-кишечном тракте, жабрах и псевдобранхии (Reddacliff & Whittington, 1996).

4.2.4. Срезы нефиксированной ткани

Не применимо.

4.2.5. Мазки

Исследования не проводились.

4.2.6. Электронная микроскопия / цитопатология

Пораженные ткани (например, почки, печень и селезенка) содержат некротические клетки. Клетки содержат очевидные цитоплазматические включения, представляющие собой разреженные участки цитоплазмы, в которых происходит сборка вирусов. В цитоплазме видны агрегаты (паракристаллические массивы) крупных (175 Нм ± 6 Нм) безоболочечных икосаэдрических вирусов; также присутствуют одиночные вирусы. Полные вирусы (содержащие электронно-

плотные ядра) отпочковываются от/выходят из инфицированных клеток через плазматическую мембрану. Ядра инфицированных клеток часто располагаются периферически и имеют искаженную форму.

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Вид микроскопии

4.3.1.1.1.1. Световая микроскопия

Следующие рутинные методы могут быть использованы для фиксации тканей: фиксация в 10% буферном нейтральном формалине, заливка парафином, подготовка срезов 10 мкм и их окрашивание гематоксилином и эозином для демонстрации некроза тканей и базофильных интрацитоплазматических телец-включений. Эти тельца-включения могут указывать на инфекцию EHNV, но не подтверждают ее наличие. Фиксированные формалином залитые парафином срезы также могут быть окрашены с помощью иммунопероксидазного метода (см. ниже) для идентификации антигена EHNV, ассоциированного с некротическими поражениями.

4.3.1.1.1.2. Электронная микроскопия

Для подготовки тканей и культур клеток можно использовать рутинные методы ультратонких срезов (*Eaton et al., 1991*), чтобы продемонстрировать некроз тканей, наличие вирусов и вирусных телец-включений. Для обнаружения антигена можно использовать ткани и клетки, зафиксированные с помощью альтернативного метода фиксации и заливки (*Huatt, 1991*).

4.3.1.1.1.3. Электронная микроскопия с негативным контрастированием

Для обнаружения вирусов можно использовать супернатанты из гомогенизированных в гомогенизаторе Даунса тканей (10% [масса/объем]) и клеточных культур. Ранавирусы имеют определенный внешний вид. Они различаются по диаметру (150-180 Нм) и имеют ограничивающую клеточную оболочку (плазматическую мембрану), которая окружает капсид со спиральной симметрией. В основе капсида лежит мембрана *de novo*, которая сама окружает ядро, содержащее двухцепочечную ДНК (ds) и минорные белки. Эти препараты также можно использовать для подтверждения антигенности ранавируса (*Eaton с соавт., 1991*).

4.3.1.1.2. Тип образца

4.3.1.1.2.1. Срезы нефиксированной ткани

Не применимо.

4.3.1.1.2.2. Мазки

Не применимо.

4.3.1.1.2.3. Фиксированные срезы

См. раздел 4.3.1.1 Микроскопические методы.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток / искусственные среды

4.3.1.2.1.1. Подготовка тканей рыб для выделения вируса и ИФА

Был валидирован простой метод подготовки тканей рыб для культивирования клеток и ИФА (Whittington & Steiner, 1993) (см. Раздел 3. Отбор индивидуальных образцов).

Заморозить пробирки, содержащие ткани, при -80°C до тех пор, пока не возникнет необходимость в их использовании.

- i) Добавить 0,5 мл гомогенизирующей среды (минимальная эссенциальная среда Игла, с солями Эрла с глутамином) [MEM] с 200 международными единицами [IU] мл^{-1} пенициллина, 200 мкг мл^{-1} стрептомицина и 4 мкг мл^{-1} амфотерицина В) в каждую пробирку. Измельчить ткань до мелкой мульчи с помощью стерильного пестика.
- ii) Добавить еще 0,5 мл гомогенизирующей среды в каждую пробирку и перемешать пестиком.
- iii) Добавить в каждую пробирку по три стерильных стеклянных шарика (диаметром 3 мм) и закрыть пробирку крышкой.
- iv) Тщательно перемешать суспензию на вортексе в течение 20-30 секунд и оставить при температуре 4°C на 2 часа.
- v) Перемешать суспензию еще раз, как указано выше, и центрифугировать в течение 10 минут при 2500 g в настольной микроцентрифуге.
- vi) Перенести супернатант, который теперь называется осветленным гомогенатом ткани, в свежую стерильную пробирку. Гомогенаты можно замораживать при температуре -80°C до тех пор, пока они не понадобятся для выделения вируса и проведения ИФА.

4.3.1.2.1.2. Культура клеток / искусственные среды

ЕННУ хорошо растет во многих клеточных линиях рыб, включая BF-2 (малек синезаберника ATCC CCL 91), FHM (черный толстоголовый гольян; ATCC CCL 42), EPC (*epithelioma papulosum cyprini* [Sinkova *с соавт.*, 2010]) и CHSE-214 (клеточная линия эмбриона чавыча; ATCC CRL 1681) при температурах от 15 до 22°C (Crane *et al.*, 2005). Температуры инкубации 20°C или 24°C приводят к более высоким титрам, чем 15°C ; для максимального увеличения титра рекомендуется использовать клетки BF-2 EPC или CHSE-214 и температуру 22°C . Это может быть важно для обнаружения низких количеств вирусов в

тканях рыб (Ariel *с соавт.*, 2009). Референтные лаборатории МЭБ предпочитают использовать клетки BF-2 при температуре инкубации 22°C. Процедура для клеток BF-2 приведена ниже. Процедура для клеток CHSE-214 при иммунопероксидажном окрашивании приведена ниже (Раздел 4.3.1.2.2). Идентичность вирусов в клеточной культуре определяется с помощью иммунного окрашивания, ИФА, иммуноэлектронной микроскопии, полимеразной цепной реакции (ПЦР) или других методов.

Образцы: гомогенаты тканей.

Техническая процедура культивирования клеток: клетки культивируют (в колбах, пробирках или многоруночных планшетах) с питательной средой (MEM + 10% фетальная телячья сыворотка [ФТС] со 100 МЕ мл⁻¹ пенициллина, 100 мкг мл⁻¹ стрептомицина и 2 мкг мл⁻¹ амфотерицина В). Клетки инкубируют почти до полного слияния при температуре 22°C, что может занять до 4 дней в зависимости от скорости роста. Среду меняют на поддерживающую среду (MEM с 2% ФТС и 100 МЕ мл⁻¹ пенициллина, 100 мкг мл⁻¹ стрептомицина и 2 мкг мл⁻¹ амфотерицина В) в день инокуляции. Из одиночных или объединенных гомогенатов готовят разведение 1/10 с использованием гомогенизирующей среды. Каждую культуру инокулируют 100 мкл образца на мл культуральной среды. Это представляет собой окончательное разведение 1/100 гомогената ткани (0,1 мг мл⁻¹). Далее делают разведение 1/10, представляющее собой окончательное разведение 1/1000, и инокулируют две культуры. Стадию адсорбции не проводят. В качестве альтернативы две-три культуры можно инокулировать непосредственно 10 мкл неразбавленного гомогената на мл культуральной среды. Обратите внимание, что высокая степень токсичности клеток или загрязнения часто сопровождается использованием большого количества неразбавленного инокулята. Культуры инкубируют при температуре 22°C в инкубаторе в течение 6 дней. Культуры считывают на 3-й и 6-й день. Культуры пропускают как минимум один раз, чтобы обнаружить образцы с низкими уровнями вируса. На 6-й день первичные культуры (P1) замораживают на ночь при температуре -20°C, размораживают, осторожно перемешивают, а затем супернатант культуры инокулируют на свежие клетки, как и раньше (P2), т. е. 100 мкл супернатанта P1 на мл культуральной среды. Оставшиеся супернатанты P1 переносят в стерильные пробирки по 5 мл и помещают при температуре 4°C для тестирования методом ИФА или ПЦР или другим способом, чтобы подтвердить, что причиной цитопатического эффекта (ЦПЭ) является EHNV. P2 инкубируют, как указано выше, и при необходимости процедуру проводят в третий раз.

4.3.1.2.1.3. *Интерпретация результатов*

ЦПЭ хорошо развит и состоит из очагового лизиса, окруженного округлыми зернистыми клетками. Это изменение быстро распространяется на весь монослой, который отделяется и распадается.

4.3.1.2.2. *Методы на основе антител для обнаружения антигенов*

Следует отметить, что поликлональные антитела, используемые во всех

родственных методах (иммунопероксидаза, ИФА с захватом антигена и иммуноэлектронная микроскопия), перекрестно реагируют со всеми известными ранавирусами, за исключением ранавирусов Santee Cooper (Ahne с соавт., 1998; Cinkova с соавт., 2010; Hedrick с соавт., 1992; Nyatt с соавт., 2000).

4.3.1.2.2.1. Обнаружение EHNV с помощью иммуноцитохимии инфицированных клеточных культур

4.3.1.2.2.1.1. Принцип проведения теста

Репликация EHNV происходит внутри культивируемых клеток. Добавление мягкого детергента пермеабилзирует клетки, позволяя аффинно очищенному кроличьему антителу связываться с внутриклеточными вирусными белками. EHNV обнаруживают с помощью биотинилированного анти-видового антитела и конъюгата стрептавидин-пероксидазы. Добавление субстрата приводит к "кирпично-красному" окрашиванию участков, маркированных антителами.

4.3.1.2.2.1.2. Рабочие характеристики

При выполнении, как описано в этом протоколе, окрашивание является заметным и специфичным. Однако этот тест не был валидирован с точки зрения чувствительности или воспроизводимости.

4.3.1.2.2.1.3. Образцы

Гомогенаты тканей.

4.3.1.2.2.1.4. Подготовка клеток

Процедура, описанная ниже, предназначена для клеток CHSE-214. Можно также использовать и другие рекомендуемые клеточные линии.

- i) CHSE-214, 24-луночные планшеты засевают за день до использования 250 000 клеток/лунку (или 4 млн. клеток в 40 мл питательной среды на планшет) в 1,5 мл питательной среды (Эрла MEM с неосновными аминокислотами [EMEM], 10% ФТС, 10 ммоль N-2-гидроксиэтил-пиперазин-N-2-этансульфоновой кислоты [HEPES], 2 ммоль глутамина, 100 МЕ пенициллина и 100 мкг стрептомицина) и инкубируют в 5% CO₂ при температуре 22°C в течение ночи.

Примечание: культуры должны быть почти сливающимися и иметь здоровые делящиеся клетки перед использованием.

- ii) Среду удаляют, в каждую лунку вносят по 150 мкл 10% - ной суспензии измельченной ткани (например, печени, почек или селезенки), инкубируют в течение 1 часа (22°C), затем добавляют 1,5 мл свежей поддерживающей среды (как и для питательной среды, за исключением 2% ФТС) и возвращают в инкубатор (22°C).
- iii) За культурами ведут наблюдение на предмет появления цитопатического эффекта. Если к 10-му дню цитопатический эффект не возникает, культуры переносят на свежие клетки CHSE, собирая клетки и среду и

добавляя 150 мкл к клеткам свежего планшета; обратите внимание, что клетки не замораживают и не размораживают. Нет никакой необходимости сливать имеющуюся среду, необходимо просто вернуть новый планшет в инкубатор (22°C). Снова ежедневно наблюдают за появлением цитопатического эффекта.

- iv) Клетки фиксируют (добавляют 50 мкл в 96-луночный планшет с 200 мкл/лунка культуральной среды или 400 мкл (для 24-луночных планшетов с 1,6 мл/лунка культуральной среды) 20% - ного раствора формалина в каждую лунку), не сливая культуральную среду при первом появлении цитопатического эффекта. После инкубации (22°C) в течение 1 часа при комнатной температуре (RT) смесь среда/формалин сливают и лунки дважды промывают PBS-A (фосфатный буферный физиологический раствор, свободный от Ca^{++} и Mg^{++}) для удаления формалина. Если планшеты необходимо хранить при температуре 4°C, то добавляют больше PBS-A.

4.3.1.2.2.1.5. Протокол

- i) Развести первичное антитело против EHNВ и нормальную сыворотку до рабочего, как описано ниже (протокол фиксации для иммуоцитохимии) для соответствующего агента в 1% растворе обезжиренного молока (SM) (PBS-A [SM]) до объема, необходимого для теста.
- ii) Удалить PBS-A из лунки (с фиксированными культурами клеток) и дважды промыть лунки 0,05% (v/v) PBS/Tween 20 (PBST). Добавить 50 мкл растворов первичных антител в каждую лунку в 96-луночного планшета или 200 мкл в 24-луночный планшет. Инкубировать на планшетном шейкере при 100-200 об / мин при комнатной температуре (22-24°C) в течение 15-30 минут или без встряхивания при 37°C в течение 1 часа.
- iii) Развести биотинилированную анти-видовую сыворотку (вторичное антитело) в 0,1% растворе SM, как описано в протоколе фиксации (ниже) для соответствующего агента, до объема, необходимого для проведения теста.
- iv) Удалить раствор первичного антитела и промыть лунки три раза PBST. Добавить вторичные антитела в каждую лунку. Инкубировать на планшетном шейкере при 100-200 об / мин при комнатной температуре (22-24°C) в течение 15-30 минут или без встряхивания при 37°C в течение 1 часа.
- v) Развести конъюгат стрептавидин-пероксидаза в 0,1% растворе SM для соответствующего агента до объема, необходимого для проведения теста.
- vi) Удалить вторичные антитела из лунки и трижды промойте лунки с помощью PBST. Добавить конъюгат в каждую лунку. Инкубировать на планшетном шейкере при 100-200 об / мин при комнатной температуре (22-24°C) в течение 15-30 минут или без встряхивания при 37°C в течение 1 часа.
- vii) Приготовить исходный субстрат из раствора 3-амино-9-этилкарбазола (АЭК): растворить одну таблетку АЕС (20 мг) в 2,5 мл

диметилформамида.

- viii) Удалить конъюгат из лунок. Промыть (три раза) с помощью PBST.
- ix) Развести разбавленный исходный раствор АЭК в 47,5 мл ацетатного буфера (4,1 мл безводного ацетата натрия в 1 л деионизированной воды; рН довести до 5,0 с помощью ледяной уксусной кислоты). Непосредственно перед использованием добавить 25 мкл 30% - ной перекиси водорода в раствор АЭК, а затем добавить в каждую лунку. Инкубировать при комнатной температуре в течение 20 минут.
- x) Удалить раствор субстрата и дважды промыть лунки деионизированной водой, чтобы остановить реакцию.
- xi) Чтобы визуализировать все клетки необходимо произвести контрастирующее окрашивание гематоксилином Майера (50 мкл / лунка или 200 мкл / лунка) в течение 1 минуты и промыть деионизированной водой.
- xii) Добавить 50 мкл водопроводной воды Скотта, ополоснуть деионизированной водой и высушить на воздухе.

4.3.1.2.2.1.6. Интерпретация результатов

Положительная реакция: зернообразное, очаговое кирпично-красного цвета окрашивание клеток указывает на наличие вируса, идентифицированного диагностическим антителом.

Отрицательная реакция: отсутствие видимого красного окрашивания – все клетки должны быть окрашены в бледно-голубой цвет из-за контрастирующего окрашивания.

Фоновое окрашивание: незернистое, неочаговое, более генерализованное, бледное, розоватое окрашивание может происходить по всей культуре. Это фоновое окрашивание может быть вызвано целым рядом причин, например, неспецифической реакцией антител с невирусными компонентами, неэффективной промывкой и истечением срока годности других реагентов.

4.3.1.2.2.1.7. Реагенты для иммуноцитохимических тестов 4.3.1.2.2.1.7.1.

20% раствор формальдегида (PBS-A)

| | |
|--------------------------------|-------|
| Формалин (36-38% формальдегид) | 54 мл |
| Дистиллированная вода | 36 мл |
| 10 × PBS-A | 10 мл |

4.3.1.2.2.1.7.2. 10 x PBS-A

Для приготовления 1 литра 10 × PBS-а использовать:

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 80.0 г |
| Na ₂ HPO ₄ | 11.5 г |

| | |
|---------------------------------|-------|
| КСІ | 2,0 г |
| КН ₂ РО ₄ | 2,0 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |

Примечание: некоторые соли поставляются с дополнительными группами воды. При использовании этих реагентов необходимо отрегулировать массы, чтобы обеспечить соответствующую массу соли, например, для Na₂HPO₄ · 2H₂O необходимо добавить 15 г вместо 11,5 г ($156 \text{ МВт} / 120 \text{ МВт} \times 11,5 \text{ г} = 14,95 \text{ г}$), чтобы устранить влияние молекул воды.

4.3.1.2.2.2. Обнаружение ЕННУ с помощью ИФА с захватом антигена

ИФА с захватом антигена была валидирована для обнаружения ЕННУ в клеточных культурах и непосредственно в гомогенатах тканей рыб. Аналитическая чувствительность составляет от 10^3 до 10^4 ЦПД₅₀ мл⁻¹. Специфичность приближается к 100% , а чувствительность для прямого обнаружения в тканях рыб составляет 60% по отношению к выделению вируса в клетках BF-2 (Nyatt с соавт., 1991; Whittington & Steiner, 1993). Реакция нейтрализации не может быть использована для идентификации ЕННУ, поскольку нейтрализующие антитела не вырабатываются после иммунизации млекопитающих или рыб. Мышиные моноклональные антитела, продуцируемые против ЕННУ, направлены против основных эпитопов капсидного белка (МСР). Кроличьи анти-ЕННУ антитела были разработаны для использования в ИФА с захватом антигена, иммунопероксидазном окрашивании и иммуноэлектронной микроскопии (Hengstberger с соавт., 1993; Nyatt с соавт., 1991; Reddacliff & Whittington, 1996). Реактивы и протоколы доступны в справочной лаборатории.

4.3.1.2.2.2.1. Образцы

Образцы гомогената тканей, приготовленные по протоколу (см. ниже), а также клеточные культуры.

4.3.1.2.2.2.2. Принцип проведения теста

Аффинно очищенное кроличье антитело, нанесенное на пластину, захватывает частицы ЕННУ из образца. С помощью второго антитела и конъюгата, меченного пероксидазой, обнаруживают ЕННУ, используя хромоген АВТS (2,2' - Азино-Ди - [3-этилбензтиазолин] - 6-сульфо кислота). Фермент инактивируется через 20 минут, и полученную оптическую плотность (OD) сравнивают со стандартами.

4.3.1.2.2.2.3. Рабочие характеристики

Протокол основан на опубликованных процедурах (Nyatt с соавт., 1991; Steiner с соавт., 1991; Whittington, 1992; Whittington & Steiner, 1993). При проведении испытаний, как это описано в настоящем протоколе, рабочие характеристики испытания будут как те, что приведены в Таблице 4.1. Точность анализа составляет <10% коэффициента вариации, измеряемой как изменение оптической плотности контролей между планшетами и с течением времени, когда соблюдается рекомендуемая процедура

нормализации.

Таблица 4.1. Рабочие характеристики ИФА для обнаружения EHNВ по сравнению с выделением вируса в клетках BF-2

| Образец | Положительно-отрицательный порог ¹ | Чувствительность % | Специфичность % |
|---|---|--------------------|-----------------|
| Ткани рыбы ² | ОП 0,5 | 60 | >99 |
| Супернатанты культуры тканей с цитопатическим эффектом (клетки BF2) | ОП 0.3 | >99 | >99 |

1. Данные пороговые значения определены референтной лабораторией МЭБ по EHNВ и будут варьироваться в зависимости от партии контрольного антигена. Приведенные выше значения относятся к партии 86/8774-4-5-01.
2. Только европейский окунь и радужная форель. Более высокая фоновая ОП возникает при исследовании золотистого окуня. По другим видам данных нет.

4.3.1.2.2.4. Тестовые компоненты и подготовка реагентов

- i) Необходимы микротитровальные планшеты с плоским дном.
- ii) Аффинные очищенные кроличьи анти-EHNВ иммуноглобулины и овечьи анти-EHNВ антисывороточные реагенты поставляют в лиофилизированном виде. Восстановить с помощью 1 мл очищенной воды и дать флакону постоять при комнатной температуре в течение 2 минут. Осторожно перемешать содержимое пробирки. Данные реагенты сохраняют стабильность как минимум в течение 4 лет, если их хранить при температуре -20°C. Для рутинного использования в ИФА рекомендуется, чтобы рабочие запасы обоих антител были приготовлены в виде 1/10 разведения в Трис-буферном солевом растворе с глицерином и мертиолятом TSGM (формула в конце этого раздела). Такие запасы сохраняют стабильность как минимум в течение 5 лет при температуре -20°C и не затвердевают при этой температуре.
- iii) Конъюгат антиовечьих иммуноглобулинов, меченный пероксидазой (коммерческий реагент, KPL #14-23-06; 0,5 мг) поставляется в виде лиофилизированного порошка. Данный реагент показал замечательное постоянство в плане активности в разных партиях в течение 15 лет. Продукт необходимо восстановить в стерильной 50% - ной глицериновой воде, разлить на аликвоты по 150 мкл и хранить при температуре -20°C в неразбавленном виде. Рабочий раствор получают путем добавления 900 мкл TSGM к 100 мкл неразбавленного запаса. Рабочий раствор также хранят при температуре -20°C, и он сохраняет стабильность не менее 1 года. Титрование новые партии данного конъюгата проводят против более старой партии, следуя стандартным протоколам.
- iv) Термически инактивированный контрольный антиген EHNВ поставляется в виде лиофилизированного порошка. Восстановить в 1 мл стерильной воды и хранить в небольших аликвотах при температуре -20°C. Приготовить разведения с использованием PBSTG (PBS + Tween + желатин) в тот день, когда проводится тест. Контрольные разведения антигенов EHNВ (А, В, D и F) охватывают диапазон сигнальной реакции анализа и позволяют провести процедуру нормализации.

4.3.1.2.2.2.5. Оборудование

Рекомендуется использовать автоматическую мойку планшетов, хотя их можно мыть и вручную. Анализ чувствителен к условиям промывки планшетов. Если оптическая плотность контролей неожиданно низка, а конъюгат и другие реагенты находятся в пределах срока годности, оборудование для мойки планшетов следует отрегулировать таким образом, чтобы давление промывки при заполнении и аспирации лунок было сведено к минимуму.

Рекомендуется использовать автоматический считыватель для планшетов, хотя результаты можно считывать и на глаз.

Для приготовления разведений всех реагентов и для переноса реагентов в лунки микротитровального планшета используют прецизионные откалиброванные пипетки (например, Gilson).

4.3.1.2.2.2.6. Протокол

- i) Сенсibilизировать 96-луночный планшет для ИФА (100 мкл/лунка) аффинно очищенным кроличьим-анти-ЕHNV, разбавленным 1/12800 в боратном буфере для сенсibilизации. Инкубировать в течение ночи при температуре 4°C.
- ii) Промыть планшет пять раз с помощью промывочного буфера (очищенная вода Milli-Q (MQ) плюс 0,05% Tween 20). Обратите внимание, что на этом и всех других этапах можно также использовать дистиллированную и деионизированную воду.
- iii) Приготовить блокирующий раствор: нагреть растворы в микроволновой печи или на водяной бане, чтобы растворить желатин, затем охладить до комнатной температуры.
- iv) Блокировать оставшиеся сайты связывания с помощью блокирующего раствора (100 мкл / лунка) (1% [масса/объем] желатина в разбавителе PBSTG [ФБР, 0,05% [об/об] Tween 20, 0,1% [масса/объем] желатина]). Инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут.
- v) Помыть планшет пять раз, как указано выше.
- vi) Работу проводить в боксе биологической безопасности класса II. Развести контрольный антиген (см. ниже) в PBSTG и добавить в нижний правый угол планшета. Добавить образцы гомогената ткани или образцы супернатанта культуры и контрольные антигены (100 мкл / лунку) Добавить все образцы и контроли в дублирующие лунки. Инкубировать в течение 90 минут при комнатной температуре.

Контрольные антигены - это разведения убитого нагреванием супернатанта клеточной культуры EHNV 86/8774. Ожидается, что контроли дадут следующие показатели оптической плотности, хотя в разных лабораториях будут наблюдаться некоторые вариации, и поэтому следует допускать вариации $\pm 10\%$:

| Контроль | Разведение в PBS ¹ | Оптическая плотность (405 нм) ¹ |
|----------|-------------------------------|--|
| A | 1/5 | >2.0 |
| B | 1/40 | 1,90 |
| D | 1/200 | 0,68 |
| F | 1/3000 | 0,16 |

1. Эти разведения и значения оптической плотности определяются референтной лабораторией МЭБ по инфекции EHNV и будут варьироваться в зависимости от партии контрольного антигена. Приведенные выше значения относятся к партии 86/8774-4-5-01. Положительно-отрицательный порог для образцов осветленного гомогената тканей европейского окуня и радужной форели в этом ИФА аппроксимировано значением оптической плотности контроля D на каждом планшете.

- vii) Промыть пластину вручную, чтобы избежать контаминации устройством для промывки планшетов. Работу проводить в кабинете класса II. Аспирировать жидкость из лунок с помощью многоканальной пипетки. Дважды ополоснуть планшет.
- viii) Промыть планшет пять раз на устройстве для мытья планшетов, как описано выше.
- ix) Добавить второе антитело овцы-анти-EHNV, разведенное 1/32 000 в PBSTG (100 мкл/лунка). Инкубировать в течение 90 минут при комнатной температуре.
- x) Промыть планшет пять раз на устройстве для мытья планшетов.
- xi) Добавить конъюгат, разведенный 1/1500 в PBSTG (100 мкл/лунка). Инкубировать в течение 90 минут при комнатной температуре.
- xii) Промыть планшет пять раз на устройстве для мытья планшетов.
- xiii) Добавить субстрат ABTS (22 мл ABTS + 10 мкл H₂O₂) (100 мкл/лунка) и поместите планшет на планшетный шейкер. Время этого этапа начинается с момента добавления субстрата в первые лунки планшета 1. Инкубировать в течение 20 минут.
- xiv) Немедленно добавить стоп-раствор ABTS (50 мкл / лунка), слегка встряхнуть планшет и считать оптическую плотность при длине волны 405 нм. Рассчитать среднее значение полученной при ИФА оптической плотности дублирующих лунок. Рассчитать коэффициент вариации дубликатов: образцы с коэффициентом вариации >15% должны быть повторно протестированы, если среднее значение оптической плотности лежит вблизи положительно-отрицательного порога.

4.3.1.2.2.2.7. *Нормализация данных и контроль качества пределов обнаружения*

Если требуется нормализовать данные от планшета к планшету и с течением времени, или принять контроля качества предела обнаружения, можно выполнить следующую процедуру. Прогнать контрольные антигены в ИФА не менее пяти раз в течение 3 недель (всего 20 отдельных планшетов ИФА).

Вычислить среднее значение оптической плотности для каждого контрольного антигена. Затем для каждого последующего используемого планшета рассчитать поправочный коэффициент планшета (PCF) следующим образом:

ФКП = (средний контроль ОП/фактическая ОП + средний контроль ОП В/фактическая ОП + средний контроль ОП D/фактическая ОП + средний контроль ОП F/фактическая ОП)/4. Умножить фактическое среднее значение ОП каждого образца на PCF для этого планшета и указать эти значения.

Допускается вариабельность PCF в пределах от 0,8 до 1,2, что приближается к коэффициенту вариации 10%. Значения за пределами этого диапазона говорят о том, что в отношении данного планшета необходимо провести повторное тестирование. Графики PCF с течением времени являются готовым средством контроля стабильности реагентов, процедурных вариаций и ошибок оператора. Данный метод контроля качества был валидирован для ИФА с захватом антигена.

4.3.1.2.2.2.8. Буферы и другие реагенты

4.3.1.2.2.2.8.1. Боратный буфер

| | |
|---|--------|
| Борная кислота | 6.18 г |
| Тетраборат динатрия (Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O) | 9.54 г |
| NaCl | 4.38 г |
| MQ воды до 1 литра. | |
| Автоклавировать. | |

4.3.1.2.2.2.8.2. 10 x фосфатно-буферный физиологический раствор

| | |
|----------------------------------|---------|
| NaCl | 80.00 г |
| KCl | 2.00 г |
| Na ₂ HPO ₄ | 11.50 г |
| KH ₂ PO ₄ | 2.00 г |

MQ воды до 900 мл.
Отрегулировать pH до 7,2 с помощью HCl или NaOH. Довести до 1 литра.
Автоклавировать.

Для получения рабочей силы развести 1/10 и перепроверить pH. Для хранения порошка в банках, необходимо сделать в два раза больше вышеуказанного количества порошка. Хранить. Для приготовления добавить 1,8 литра MQW, pH, довести до 2 литров.

4.3.1.2.2.2.8.3. АБТС

Цитрат-фосфатный буфер:

| | |
|------------------|---------|
| Лимонная кислота | 21.00 г |
|------------------|---------|

Na₂HPO₄ 14.00 г

MQ воды до 800 мл. Отрегулировать pH до 4,2. Довести до 1 литра. АБТС буфер:

АБТС 0.55 г

Цитрат-фосфатный буфер на 1 литр. Поделить на аликвоты (22 мл) и заморозить.

Непосредственно перед использованием добавить 10 мкл H₂O₂ на 22-мл аликвоту.

4.3.1.2.2.2.8.4. *АБТС стоп-раствор (0.01% NaN₃ в 0,1 м лимонной кислоте)*

Лимонная кислота 10.5 г

MQ воды до 500 мл.

Добавить 50 мг азиды натрия или 1 мл 5% раствора.

4.3.1.2.2.2.8.5. *Конъюгат KPL #14-23-06¹*

4.3.1.2.2.2.8.6. *Криопротектор TSGM*

10 × Трис / физиологический раствор, pH 7,4 50 мл

Глицерин 250 мл

Стерильная очищенная вода до 500 мл. Автоклавировать.

Добавить 10% Мертиолат (1 мл). Хранить в темной бутылке при температуре 4°C.

4.3.1.2.2.2.8.7. *10 x Трис / физиологический раствор (250 мм Трис, 1,5 м NaCl)*

Трис 15.14 г

¹ Поставщик реагентов: Bio-Mediq DPC Australia, а/я 106, Донкастер, Виктория 3108, Австралия; тел.: (+61-3) 9840 2767; факс: (+61-3) 9840 2767. Посетите: <http://www.kpl.com> для ссылок на дистрибьюторов всемирной сети. Ссылка на конкретные коммерческие продукты в качестве примеров не означает их одобрения МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, упомянутым в данном руководстве по водным животным.

| | |
|---------------------------|---------|
| NaCl | 43.83 г |
| Стерильная очищенная вода | 500 мл |

довести рН до 7,4.

4.3.1.2.2.3. Иммуноэлектронная микроскопия

4.3.1.2.2.3.1. Мечение золотом срезов, содержащих ткани или клеточные культуры

4.3.1.2.2.3.2. 4.3.1.2.2.3.1.1. Принцип проведения теста

Для исследования методом электронной микроскопии можно использовать культуры клеток, ткани и / или гомогенаты тканей. Обычная электронная микроскопия (исследование ультратонких срезов) позволит получить данные о структуре и морфогенезе вируса. Отрицательная контрастная электронная микроскопия позволит получить изображения, которые можно использовать для изучения структуры частиц вируса. Использование ранавирус-специфических антител и конъюгированного золота с данными препаратами позволяет рассмотреть одновременно как ультраструктуру, так и антигенность (Хаят, 1991). Такие объединенные данные позволяют классифицировать вид как принадлежащий к роду Ранавирус.

4.3.1.2.2.3.1.2. Протокол

- i) Ткани или культуры клеток фиксируют, как описано в работе Drury с соавт., 2002. Вкратце, для фиксации клеток используют 2,5% (об/об) забуферный глутаральдегид (какодилат или фосфат) в течение 40 минут. После первичной фиксации клетки промывают в том же буфере (3 × 20 минут), после фиксации в 1% (масса/объем) забуферном тетроксиде осмия (1 час), промывают (3 × 5 минут) в воде двойной дистилляции/обратного осмоса (RO), дегидратируют через градуированный спирт (70-100%), инфильтрируют и встраивают в эпоксидную смолу (например, Spurr's или epon). Чтобы провести мечение золотом ультратонких полимерных срезов необходимо уделять должное внимание режимам фиксации и встраивания. Например, клетки должны быть зафиксированы в 0,25% (об/об) глутаральдегиде с 2-4% параформальдегидом. Вторичная фиксация не требуется, клетки инфильтрируют и внедряют в акриловую смолу, такую как LR White.
- ii) После фиксации и встраивания делают ультратонкие срезы и переносят их на покрытые пленкой никелевые сетки.
- iii) Из соответствующих блоков вырезают секции.
- iv) Блокируют в 2% (масса/объем) сухом обезжиренном молоке в PBS-A (10 минут).
- v) Свободные альдегиды блокируют с помощью 0,1 м глицина в PBS-A (20 минут).
- vi) Промывают в PBS-A (3 × 1 мин). Это необязательный шаг, используемый только в том случае, если имеется избыток свободных альдегидов (об этом может свидетельствовать высокий фон).

- vii) Если используется протеин А-золото - то блокирование осуществляется в сыворотке обычных видов - данная сыворотка должна быть гомологична той, что связывается с золотом. Рекомендуемое разведение составляет примерно 1/40 (10 минут).
- viii) Инкубируют в первичном антителе. Если детали инкубации неизвестны, то проводят начальные реакции с разведениями от 1/100 до 1/2700 (с трехкратными разведениями). Антитела разводят в 1% (об/об) желатине холодноводных рыб в PBS-A (60 минут, RT).
- ix) Промывают в 1% (об/об) желатине холодноводных рыб в PBS-A (6 × 3 минуты).
- x) Инкубируют в меченном золотом вторичном антителе или протеине А-золота или протеине G-золота. Рекомендуемое разведение 1/40 в PBS-A, содержащем 1% (масса/объем) бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0,1% (об/об) Tween 20 и 0,1% (v/v) Triton X, 60 минут, при комнатной температуре.
- xi) Промывают в PBS-A (6 × 3 минуты, при комнатной температуре).
- xii) Постфиксация в 2,5% (об/об) глутаральдегиде в PBS-A (5 минут, при комнатной температуре).
- xiii) Промывают в воде (RO) (3 × 3 минуты, при комнатной температуре).
- xiv) Высушивают на фильтровальной бумаге (тип не важен).
- xv) Окрашивают с помощью уранилацетата и ацетата свинца.

4.3.1.2.2.3.1.3. *Интерпретация результатов*

Вирусы в цитоплазме инфицированных клеток будут особым образом мечены золотом. Вирусы будут располагаться изолированно, в пределах тел сборки (тел включения) и в паракристаллических массивах.

4.3.1.2.2.3.3. *Мечение золотом вирусных частиц (вирусов, адсорбированных на сетках)*

4.3.1.2.2.3.4.

4.3.1.2.2.3.2.1. *Протокол*

- i) 10% (масса/объем) печени, почек или селезенки гомогенизируют в гомогенизаторе Даунса и освещают (5 минут, 2500 g).
- ii) Супернатант адсорбируются (из гомогената или клеточных культур) на субстрате (сетке).
- iii) Используют покрытые углеродом золотые сетки (200 ячеек) .
- iv) Образец фиксируют с помощью 0,1% (об/об) глутарового альдегида и 1% (об/об) Nonidet P40 (NP40) в PBS (2 минуты).
- v) Промывают в PBS (3 × 3 мин).
- vi) Блокируют с помощью 5% (об/об) желатина холодноводных рыб (Sigma) в PBS (10 минут) с последующим инкубационным буфером (PBS/0,1% желатин холодноводных рыб).

- vii) Инкубируют с антителом (аффинно очищенным кролика анти-EHNV, серия № M708; поставляется референтной лабораторией МЭБ; рекомендуемое разведение 1/500) в течение 1 часа, при комнатной температуре.
- viii) Сетки промывают (6 × 3 минуты) в инкубационном буфере.
- ix) Инкубируют с 10 нм протеина А-золота (для разведения см. Рекомендации поставщиков) в течение 1 часа, при комнатной температуре.
- x) Промывают (6 × 3 минуты).
- xi) Фиксируют с помощью 2,5% глутарового альдегида (5 минут).
- xii) Промывают дистиллированной водой (3 × 3 минуты) и окрашивают 2% - ной фосфотунгстовой кислотой (рН 6,8) в течение 1 минуты.

4.3.1.2.2.3.2.2. Интерпретация результатов

Включение NP40 позволит антителам и протеину А-золота проникнуть через внешнюю мембрану и вступить в реакцию с нижележащим капсидом. Мечение должно быть специфичным для данного вируса. В качестве отрицательного контроля необходимо включить не содержащую EHNV аффинно очищенную кроличью сыворотку (1/500).

4.3.1.2.2.4. Иммуногистохимия (иммунопероксидазное окрашивание)

4.3.1.2.2.4.1. Образцы

Фиксированные в формалине залитые парафином срезы ткани.

4.3.1.2.2.4.2. Техническая процедура

Следующий протокол предназначен для качественной демонстрации антигенов EHNV в фиксированных в формалине залитых парафином срезах ткани (Reddacliff & Whittington, 1996). Он предполагает, что антигены могут стать перекрестно сшитыми, и поэтому включает в себя стадию переваривания протеазы, которая можно пропустить, если исследуются незафиксированные образцы. Для окрашивания используют коммерческий набор (DAKO® LSAB K0679) со стрептавидином, маркированным пероксидазой, и смесь биотинилированных анти-кроличьих/анти-мышинных/анти-козьих иммуноглобулинов в качестве связующих антител. Также можно использовать и другие коммерческие реагенты. Для удобства они также поставляются компанией DAKO². Первичное аффинно очищенное кроличье анти-EHNV антитело (Номер серии M708) поставляется в лиофилизированной форме референтной лабораторией МЭБ.

- i) Приготовить срезы толщиной 5 мкм и установить на предметные стекла SuperFrost® Plus G/Edge (Menzel-Glaser, HD Scientific Cat. номер HD 041300 72P3). Вокруг срезов делают разметку алмазным карандашом, чтобы ограничить распределение реагентов.

² Dako Cytomation California Inc., 6392 via Real, Карпинтерия, Калифорния 93013, США, тел.: (+1-805) 566 6655, факс: (+1-805) 566 6688; Dako Cytomation Pty Ltd, Unit 4, 13 Lord Street, Botany, NSW 2019, Австралия, факс: (+61-2) 9316 4773; посетите <http://www.dakocytomation.com> для связи с другими странами.

ii) Срезы депарафинизируют:

Предварительно нагреть предметные стекла в инкубаторе при температуре 60°C в течение 30 минут.

Поместить предметные стекла в ксилоловую ванну и инкубировать в течение 5 минут. Повторить один раз. Обратите внимание, что замена ксилола может быть произведена без вредных последствий.

Отвести лишнюю жидкость и поместить предметные стекла в абсолютный этанол на 3 минуты. Повторить один раз. Отвести лишнюю жидкость и поместить предметные стекла в 95% - ный этанол на 3 минуты. Повторить один раз.

Отвести лишнюю жидкость и поместить предметные стекла в дистиллированную или деионизированную воду на 30 секунд.

- iii) Экспонировать антигены с помощью протеазной обработки. Предметное стекло залить протеиназой К (5-7 мкг мл⁻¹) и инкубировать в течение 20 минут (готовый к применению раствор, DakoCytomation Cat. номер S3020). Промыть предметное стекло, трижды погрузив его в воду. Поместить в ванну PBST на 5 минут (PBS pH 7,2, 0,05% [об/об] Tween 20). Слить излишки промывочного раствора и тщательно протереть участок вокруг среза.
- iv) Провести иммунное окрашивание с использованием Universal DAKO LSAB®+ Kit, Peroxidase (DakoCytomation Cat No. K0679). Убедившись, что срез ткани полностью покрыт, добавить на предметное стекло следующие реагенты. Избегать высыхания.
- v) 3% перекись водорода: покрыть предметное стекло и инкубировать в течение 5 минут. Аккуратно промыть PBST и поместить в ванну со свежей водой.
- vi) Первичное антитело (аффинно очищенное кроличье анти-ЕHNV 1/1500 лот № M708) и отрицательный контроль (неиммунная сыворотка кролика в разведении 1/1500) на втором предметном стекле. Покрыть предметное стекло и инкубировать в течение 15 минут. Ополоснуть предметные стекла.
- vii) Ссылка: покрыть предметное стекло и инкубировать в течение 15 минут. Ополоснуть предметные стекла.
- viii) Стрептавидин пероксидаза: покрыть предметное стекло и инкубировать в течение 15 минут. Ополоснуть предметные стекла.
- ix) Раствор субстрата/хромогена: покрыть предметное стекло и инкубировать в течение 5 минут. Аккуратно ополоснуть предметные стекла дистиллированной водой.
- x) Провести контрастирующее окрашивание, поместив предметные стекла в ванну с гематоксилином Майера фирмы DAKO® в течение 1 минуты (модификация Лилли, кат. номер S3309). Аккуратно ополоснуть дистиллированной водой. Погрузить 10 раз в водяную баню. Поместить в дистиллированную или деионизированную воду на 2 минуты.

- xi) Поместить образцы и покрыть с помощью заливочной среды на водной основе (Dako® Faramount Waterfront Mounting Medium кат. номер S3025).

4.3.1.2.2.4.3. Интерпретация результатов

Антиген EHNВ появляется в виде коричневого пятна в областях, окружающих дегенеративные и некротические участки в в области паренхимы. На этом же срезе не должно быть окрашивания отрицательной контрольной кроличьей сывороткой.

4.3.1.2.2.4.4. Наличие теста и реагентов

Реактивы (антитела) и протоколы испытаний доступны в справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

Несмотря на то что описано несколько традиционных методов ПЦР или количественной ПЦР в реальном времени, ни один из данных методов не был подтвержден в соответствии с руководящими принципами МЭБ по первичному обнаружению EHNВ или других ранавирусов в тканях рыб. Однако идентификация ранавируса на уровне рода и вида возможна с использованием нескольких опубликованных стратегий ПЦР. В первом методе, описанном здесь, проводят два ПЦР-анализа с использованием праймеров МСР и рестрикционный анализ для обнаружения и быстрой дифференциации EHNВ от европейского (ECV), североамериканского (FV3) и других австралийских ранавирусов (BIV) (Marsh с соавт., 2002). Это может быть выполнено менее чем за 24 часа при относительно низких затратах. Во втором методе, описанном здесь, проводят один ПЦР-анализ использованием праймеров МСР для получения продукта (580 пар оснований), который затем секвенируют для идентификации типа ранавируса. Кроме того, можно провести ПЦР гена ДНК-полимеразы и H1-подобных генов триплет белков нейрофиламентов (Holopainen et al., 2011) (этот метод не описан в данной главе).

Образцы: вирус из клеточной культуры или прямой анализ гомогената ткани.

4.3.1.2.3.1. ПЦР и рестрикционный эндонуклеазный анализ (РЭА): техническая процедура

Аmplифицированный продукт ПЦР-анализа МСР-1, переваренный с помощью *Pfu* I, позволяет дифференцировать австралийские иридовирусы (EHNВ и BIV) от неавстралийских иридовирусов (FV3, Америки; и ECV, Европа). Amplифицированный продукт ПЦР-анализа МСР-2, переваренный с помощью *Hinc* II, *Acc* I and *Fnu*4H I (индивидуально), позволяет дифференцировать EHNВ и BIV (Австралия) друг от друга и от FV3 (Аmericи) и ECV (Европа).

4.3.1.2.3.1.1. Подготовка реагентов

Ehnv-очищенная ДНК и BIV-очищенная ДНК ПЦР-контрольные реагенты поставляются референтной лабораторией в лиофилизированном виде. Восстановить с помощью 0,5 мл Трис-ЭДТА (ТЭ) буфера (10 мм Трис/НСl, 1 мм ЭДТА, рН 8,0) и дать флакону постоять при комнатной температуре в

течение 2 минут. Осторожно перемешать содержимое пробирки. Для рутинного использования, например проведения ПЦР, рекомендуется готовить рабочие растворы в виде 1/10 разведения в ТЭ буфере (рН 8,0). Аликвоты по 250 мкл хранят при температуре -20°C. Одной аликвоты достаточно для проведения не менее 50 реакций (от 1 до 5 мкл добавляют в коктейль), минимальный срок хранения - 6 месяцев с момента разбавления.

Праймеры M151 и M152 (MCP-1, 321 пар оснований), M153 и M154 (MCP-2, 625 пар оснований) поставляют в рабочей концентрации (100 нг мкл⁻¹) и хранят при температуре -20°C. Праймеры также можно заказать у коммерческих поставщиков. Последовательность праймеров приведена в таблице 4.2.

Таблица 4.2. Последовательности праймеров MCP-1 и MCP-2

| ПЦР | Праймер | Последовательность | Размер продукта | Расположение гена |
|-------|----------|--------------------------------|----------------------|-------------------|
| MCP-1 | M15 1 | AAC-CCG-GCT-TTC- GGG-CAG-CA | 321 пар оснований | 266–586 |
| | M15 2 | CGG-GGC-GGG-GTT- GAT-GAG-AT | | |
| MCP-2 | M15 3 | ATG-ACC-GTC-GCC- CTC-ATC-AC | 625 пар оснований | 842–1466 |
| | M15 4 | CCA-TCG-AGC-CGT- TCA-TGA-TG | | |

4.3.1.2.3.1.2. ПЦР-коктейль

Реакции амплификации в конечном объеме 50 мкл (включая 5 мкл образца ДНК) содержат 2,5 мкл (250 нг) каждого рабочего праймера, 200 мкм каждого из нуклеотидов dATP, dTTP, dGTP и dCTP, 5 мкл 10 × ПЦР-буфера (66,6 мм Tris/HCl, 16,6 мм (NH₄)₂SO₄, 2,5 mM MgCl₂, 1,65 mg ml⁻¹ BSA, 10 мм бета-меркаптоэтанол) и 2 ед Taq-полимеразы. Инструкции по приготовлению 10 × ПЦР буфера приведены в Таблице 4.3.

Таблица 4.3. Приготовление 10 × ПЦР буфера

| Ингредиенты | Количество | Конечная концентрация в 50 мкл смеси для ПЦР |
|--|------------|--|
| Трис | 4,050 г | 66,6 мм |
| Сульфат аммония | 1.100 г | 16.6 мм |
| BSA (Альбумин бычий сывороточный, фракция V без жирных кислот) | 0.825 г | 1,65 мг мл ⁻¹ |
| Хлорид магния | 1.25 мл | 2.5 мм |

Таблица 4.3. Приготовление 10 × ПЦР буфера

| Ингредиенты | Коли | Конечная концентрация в 50 |
|-------------|------|----------------------------|
|-------------|------|----------------------------|

| | честв о | мкл смеси для ПЦР |
|-----------------------|--------------------|--------------------------|
| ТЭ буфер (стерильный) | 50 мл | – |

ПРИМЕЧАНИЕ: Можно также использовать альтернативные коммерческие буферы.

Включены два отрицательных контроля, один из которых содержит только ПЦР-коктейль, а второй-5 мкл ТЭ-буфера.

Реакции МСР-1 и МСР-2 имеют следующий профиль: 1 цикл денатурации при 94°C в течение 3 минут, затем 35 циклов денатурации при 94°C в течение 30 секунд, отжиг при 50°C в течение 30 секунд и удлинение при 72°C в течение 1 минуты; окончательное удлинение 72°C в течение 5 минут и охлаждение до 4°C.

Примечание: температура отжига может быть увеличена до 60 или 62°C для уменьшения неспецифической амплификации, когда анализ используется для тестирования тканей рыб.

Результаты ПЦР оценивают методом электрофореза в 2% агарозных гелях, окрашенных бромидом этидия. Контрольная ДНК ПЦР ЕННВ (1/10 рабочего запаса) должна давать результат, близкий по интенсивности к полоске 10⁻³ в обоих случаях.

4.3.1.2.3.2. *Альтернативная ПЦР и секвенирование для идентификации вируса*

В этом анализе два праймера, обратный праймер (5' - AAA-GAC-CCG-TTT-TGC-AGC-AAA-C-3') и прямой праймер (5' -CGC-AGT-CAA-GGC-СТТ-GAT-GT-3'), используются для амплификации целевой последовательности МСР (580 пар оснований [п.о.] ДНК ЕННВ методом ПЦР. Эта процедура ПЦР может быть использована для специфического обнаружения ранавирусов у Европейского окуня, радужной форели, сома, зубатки, гуппи (*Poecilia reticulata*), губана-доктора обыкновенного (*Labroides dimidiatus*) и ряда ранавирусов амфибий (Huatt с соавт., 2000). Нуклеиновую кислоту (1 мкл) добавляют в Taq - полимеразный буфер, содержащий 0,1 мкм каждого праймера, 2,5 ЕД Taq полимеразы (Promega) и 2,5 мм MgCl₂. Смесь инкубируют в автоматическом термоциклере, запрограммированном на 35 циклов при 95°C в течение 60 секунд, при 55°C в течение 60 секунд и при 72°C в течение 60 секунд, и, наконец, выдерживают при 72°C в течение 15 минут. Амплифицированную ДНК (580 п.о.) анализируют методом электрофореза в агарозном геле, иссекают и секвенируют с использованием ряда стандартных технологий). Каждый вид вируса идентифицируют по его уникальной последовательности ДНК, доступной в GenBank. Образцы могут быть представлены в справочную лабораторию МЭБ для специфической идентификации.

4.3.1.2.4. *Очистка агента*

Процедура очистки ЕННУ была описана (Hyatt с соавт., 1991; Steiner с соавт., 1991), протокол доступен в справочной лаборатории.

4.3.2. Серологические методы

Нейтрализующие антитела не были обнаружены у рыб или млекопитающих, подвергшихся воздействию ЕННУ. Непрямой ИФА для выявления антител, индуцированных после воздействия ЕННУ, был описан для радужной форели и Европейского окуня (Whittington с соавт., 1994; Whittington с соавт., 1999; Whittington & Reddacliff, 1995). Чувствительность и специфичность этих анализов по отношению к стандартному тесту неизвестны, и интерпретация результатов в настоящее время затруднена. Протоколы и специальные антииммуноглобулиновые реагенты, необходимые для проведения этих тестов, можно получить в референтной лаборатории.

5. Оценка испытаний по целевому назначению

Методы, доступные в настоящее время для надзора, выявления и диагностики инфекции ЕННУ, перечислены в таблице 5.1. Обозначения, используемые в таблице: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод имеет применение в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение; d = метод в настоящее время не рекомендуется для этой цели; и нп = неприменимо. Данная оценка является несколько субъективной, поскольку пригодность включает в себя такие параметры, как надежность, чувствительность, специфичность и полезность. Хотя не все испытания, перечисленные в категории а или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию (см. главу 1.1.2 данного руководства по *водным животным*), их рутинный характер и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы целевого надзора и диагностики

| Метод | Целевой надзор | | | | Предположительный диагноз | Подтверждающий диагноз |
|--|----------------|--------|--------|----------------|---------------------------|------------------------|
| | Икринка/молоки | Мальки | Молодь | Взрослые особи | | |
| Макроскопические признаки | нп | d | d | d | d | d |
| Гистопатология | нп | d | d | d | b | d |
| Иммуногистохимия | нп | c | c | c | c | c |
| Просвечивающая электронная микроскопия | нп | d | d | d | c | b |
| Иммунная электронная микроскопия | нп | d | d | d | c | b |
| Клеточная культура | нп | a | a | a | a | b |
| ИФА с захватом | нп | a | a | a | a | a |

| | | | | | | |
|---|----|---|---|---|---|---|
| антигенов | | | | | | |
| ИФА с захватом антител | нп | d | d | c | c | d |
| Анализ последовательности ПЦР-продукта | нп | d | d | d | c | a |

ЭМ = электронная микроскопия; ИФА = иммуноферментный анализ; ПЦР = полимеразная цепная реакция; нп = неприменимо.

6. Тест(ы), рекомендованный для целевого надзора, чтобы объявить о благополучии по эпизоотическому гемопозитическому некрозу

Тест, рекомендуемый для целевого надзора - это культура клеток и ИФА с захватом антигена. Серология (ИФА с захватом антител) также может играть полезную роль в исследованиях для выявления инфицированных популяций форели.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение подозрения на болезнь

Наличие EHNВ должно быть заподозрено, если соблюдается хотя бы один из следующих критериев:

- i) Гистопатология, согласующаяся с EHNВ, с клиническими признаками заболевания или без них;
- ii) ЦПЭ, типичный для EHNВ в клеточных культурах;
- iii) Положительный результат традиционной ПЦР ;
- iv) Положительный результат ИФА с захватом антигена.

7.2. Определение подтвержденного случая

Наличие EHNВ считается подтвержденным, если в дополнение к критериям, изложенным в Разделе 7.1, удовлетворяются один или несколько из следующих критериев:

- i) Выделение EHNВ проводят в клеточной культуре с последующей идентификацией вируса либо с помощью теста на основе антител (иммунопероксидазное окрашивание, ИФА, иммуногистохимия), либо с помощью традиционной ПЦР с последующим секвенированием ампликона;
- ii) EHNВ выявляют в гистологических срезах методом иммуноферментного анализа с использованием специфических анти-EHNВ антител;
- iii) Обнаружение EHNВ в тканевых препаратах методом традиционной ПЦР с последующим секвенированием ампликона.

8. Список литературы

АННЕ W., BEARZOTTI M., BREMONT M. & ESSBAUER S. (1998). Comparison of European

systemic piscine and amphibian iridoviruses with epizootic haematopoietic necrosis virus and frog virus 3. *J. Vet. Med. [B]*, **45**, 373–383.

AHNE W., OGAWA M. & SCHLOTFELDT H.J. (1990). Fish viruses: transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish *Silurus glanis*. *J. Vet. Med. [B]*, **37**, 187–190.

AHNE W., SCHLOTFELDT H.J. & THOMSEN I. (1989). Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). *J. Vet. Med. [B]*, **36**, 333–336.

ARIEL E. & BANG JENSEN B. (2009). Challenge studies of European stocks of redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with epizootic haematopoietic necrosis virus. *J. Fish Dis.*, **32**, 1017–1025.

ARIEL E., NICOLAJSEN N., CHRISTOPHERSEN M.-B., HOLOPAINEN R., TAPIOVAARA H. & BANG JENSEN B. (2009). Propagation and isolation of ranaviruses in cell culture. *Aquaculture*, **294**, 159–164.

ARIEL E., TAPIOVAARA H. & OLSESEN N.J. (1999). Comparison of Pike-perch (*Stizostedion lucioperca*), Cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) iridovirus isolates with reference to other piscine and amphibian iridovirus isolates. VIIIth International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Rhodes, Greece, 20–24 September. European Association of Fish Pathologists.

BANG JENSEN B., ERSBOLL A.K. & ARIEL E. (2009). Susceptibility of pike *Esox lucius* to a panel of ranavirus isolates. *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 169–179.

BECKER J.A., TWEEDIE A., GILLIGAN D., ASMUS M. & WHITTINGTON R.J. (2016). Susceptibility of Australian Redfin Perch *Perca fluviatilis* Experimentally Challenged with Epizootic Hematopoietic Necrosis Virus (EHNV). *J. Aquat. Anim. Health*, **28**, 122–130.

BLOCH B. & LARSEN J.L. (1993). An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 235–240.

BRYAN L.K., BALDWIN C.A., GRAY M.J. & MILLER D.L. (2009). Efficacy of select disinfectants at inactivating Ranavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **84**, 89–94.

CANNON R.M. & ROE R.T. (1982). *Livestock Disease Surveys: A Field Manual for Veterinarians*. Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia.

CHINCHAR V.G., ESSBAUER S., HE J.G., HYATT A.D., MIYAZAKI T., SELIGY V. & WILLIAMS T. (2005). Family Iridoviridae. In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, 145–162.

CHINCHAR V.G. (2002). Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers – brief review. *Arch. Virol.*, **147**, 447–470.

CINKOVA K., RESCHOVA S., KULICH P. & VESELY T. (2010). Evaluation of a polyclonal antibody for the detection and identification of ranaviruses from freshwater fish and amphibians. *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 191–198.

- CRANE M.S.J., YOUNG J. & WILLIAMS L. (2005). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): growth in fish cell lines at different temperatures. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **25**, 228–231.
- DRURY S.E.N., GOUGH R.E. & CALVERT I. (2002). Detection and isolation of an iridovirus from chameleons (*Chamaeleo quadricornis* and *Chamaeleo hoehnelli*) in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, **150**, 451–452.
- EATON B.T., HYATT A.D. & HENGSTBERGER S.G. (1991). Epizootic haematopoietic necrosis virus: purification and classification. *J. Fish Dis.*, **14**, 157–169.
- FIJAN N., MATASIN Z., PETRINEC Z., VALPOTIC I. & ZWILLENBERG L.O. (1991). Isolation of an iridovirus-like agent from the green frog (*Rana esculenta* L.). *Veterinarski Arhiv*, **61**, 151–158.
- GOBBO F., CAPPELLOZA E., PASTORE M.R. & BOVO G. (2010). Susceptibility of black bullhead *Ameiurus melas* to a panel of ranavirus isolates. *Dis. Aquat. Org.*, **90**, 167–174.
- 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.
- HENGSTBERGER S.G., HYATT A.D., SPEARE R. & COUPAR B.E.H. (1993). Comparison of epizootic haematopoietic necrosis and Bohle iridoviruses, recently isolated Australian iridoviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 93–107.
- HOLOPAINEN R., HONKANEN J., JENSEN B.B., ARIEL E. & TAPIOVAARA H. (2011). Quantitation of ranaviruses in cell culture and tissue samples. *J. Virol. Methods*, **171**, 225–233.
- HOLOPAINEN R., OHLEMEYER S., SCHÜTZE H., BERGMANN S.M. & TAPIOVAARA H. (2009). Ranavirus phylogeny and differentiation based on major capsid protein, DNA polymerase and neurofilament triplet H1-like protein genes. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 81–91.
- HYATT A.D. (1991). Immunogold labelling techniques. *In: Electron Microscopy in Biology: a Practical Approach*. Harris R., ed. IRL Press, Oxford, UK, 59–81.
- HYATT A.D., EATON B.T., HENGSTBERGER S.G. & RUSSEL G. (1991). Epizootic hematopoietic necrosis virus: detection by ELISA, immuno-histochemistry and electron microscopy. *J. Fish Dis.*, **14**, 605–617.
- HYATT A.D., GOULD A.R., ZUPANOVIC Z., CUNNINGHAM A.A., HENGSTBERGER S.G., WHITTINGTON R.J., KATTENBELT J. & COUPAR B.E.H. (2000). Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch. Virol.*, **145**, 301–331.
- HYATT A.D., WILLIAMSON M., COUPAR B.E.H., MIDDLETON D., HENGSTBERGER S.G., GOULD A.R., SELLECK P., WISE T.G., KATTENBELT J., CUNNINGHAM A.A. & LEE J. (2002). First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). *J. Wildl. Dis.*, **38**, 239–252.
- LANGDON J.S. (1989). Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *J. Fish Dis.*, **12**, 295–310.
- LANGDON J.S. & HUMPHREY J.D. (1987). Epizootic Hematopoietic Necrosis a New

Viral Disease in Redfin Perch *Perca fluviatilis* L. in Australia. *J. Fish Dis.*, 10, 289–298.

LANGDON J.S., HUMPHREY J.D. & WILLIAMS L.M. (1988). Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. *J. Fish Dis.*, 11, 93–96.

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.

MAO J., THAM T.N., GENTRY G.A., AUBERTIN A. & CHINCHAR V.G. (1996). Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology*, 216, 431–436.

MAO J.H., HEDRICK R.P. & CHINCHAR V.G. (1997). Molecular characterisation, sequence analysis and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology*, 229, 212–220.

MARSH I.B., WHITTINGTON R.J., O'ROURKE B., HYATT A.D. & CHISHOLM O. (2002). Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Molec. Cell. Probes*, 16, 137–151.

POZET F., MORAND M., MOUSSA A., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish (*Ictalurus melas*). *Dis. Aquat. Org.*, 14, 35–42.

REDDACLIFF L.A. & WHITTINGTON R.J. (1996). Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L.). *J. Comp. Pathol.*, 115, 103–115.

SIMON R.C. & SCHILL W.B. (1984). Tables of sample size requirements for detection of fish infected by pathogens: three confidence levels for different infection prevalence and various population sizes. *J. Fish Dis.*, 7, 515–520.

SPEARE R. & SMITH J.R. (1992). An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, 14, 51–57.

STEINER K.A., WHITTINGTON R.J., PETERSEN R.K., HORNITZKY C. & GARNETT H. (1991). Purification of epizootic haematopoietic necrosis virus and its detection using ELISA. *J. Virol. Methods*, 33, 199–210.

WHITTINGTON R.J. (1992). Evaluation of a simple method for improving the precision of an ELISA detecting antibody in serum. *J. Immunol. Methods*, 148, 57–64.

WHITTINGTON R.J., BECKER J.A. & DENNIS M.M. (2010). Iridovirus infections in finfish – critical review with emphasis on ranaviruses. *J. Fish Dis.*, 33, 95–122.

WHITTINGTON R.J., KEARNS C., HYATT A.D., HENGSTBERGER S.G. & RUTZOU T. (1996). Spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch (*Perca fluviatilis*) in southern Australia. *Aust. Vet. J.*, 73, 112–114.

WHITTINGTON R.J., PHILBEY A., REDDACLIFF G.L. & MACGOWN A.R. (1994). Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. *J. Fish Dis.*, 17, 205–218.

WHITTINGTON R.J. & REDDACLIFF G.L. (1995). Influence of environmental temperature on experimental infection of redbfin perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Aust. Vet. J.*, **72**, 421–424.

WHITTINGTON R.J., REDDACLIFF L.A., MARSH I.B., KEARNS C., ZUPANOVIC Z. & CALLINAN R.B. (1999). Further observations on the epidemiology and spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in southeastern Australia and a recommended sampling strategy for surveillance. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 125–130.

WHITTINGTON R.J. & STEINER K.A. (1993). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): improved ELISA for detection in fish tissues and cell cultures and an efficient method for release of antigen from tissues. *J. Virol. Methods*, **43**, 205–220.

WOLF K., BULLOCK G.L., DUNBAR C.E. & QUIMBY M.C. (1968). Tadpole edema virus: a viscerotropic pathogen for anuran amphibians. *J. Infect. Dis.*, **118**, 253–262.

ZUPANOVIC Z., MUSSO C., LOPEZ G., LOURIERO C.L., HYATT A.D., HENGSTBERGER S.G. & ROBINSON A.J. (1998). Isolation and characterisation of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 1–9.

*

* *

NB: В настоящее время не существует референтной лаборатории МЭБ по эпизоотическому гемопоэтическому некрозу (EHNV)

(см. таблицу в конце настоящего *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения дополнительной информации об инфекции EHNV, пожалуйста, свяжитесь с референтными лабораториями МЭБ. Референтные лаборатории МЭБ поставляют очищенную ДНК EHNV, термоинактивированный антиген EHNV и поликлональные антитела против EHNV вместе с техническими методами. За реагенты взимается плата, покрывающая расходы на эксплуатацию лаборатории.

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТ В 1995 ГОДУ КАК ЭПИЗОТИЧЕСКИЙ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЙ НЕКРОЗ; САМЫЕ ПОСЛЕДНИЕ ОБНОВЛЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2018 ГОДУ.