

## ВИРУСНАЯ ГЕМОМРАГИЧЕСКАЯ СЕПТИЦЕМИЯ

---

### 1. Предмет рассмотрения<sup>1</sup>

В данной главе вирусная геморрагическая септицемия (VHS) является болезнью, вызываемой инфекцией вирусом вирусной геморрагической септицемии (VHSV, синоним: Egtved вирус).

VHS – болезнь разводимой на ферме радужной форели, разводимого на ферме тюрбо, разводимого на ферме азиатского паралихта, а также широкого круга пресноводных и морских видов (Европейское управление по безопасности пищевых продуктов, 2008; Meyers & Winton, 1995; Skall с соавт., 2005), вызываемая VHSV, вирусом принадлежащим к роду *Novirhabdovirus*, в семействе *Rhabdoviridae* (Walker с соавт., 2000). Все изоляты VHS вируса можно идентифицировать с помощью иммунохимических тестов с использованием моноклонального антитела IP5B11 (Lorenzen с соавт., 1988).

Больная рыба на ранних стадиях инфекции может демонстрировать неспецифические клинические признаки, включая быструю гибель (которая может достигать до 100% у мальков), вялость, потемнение кожи, пучеглазие, анемию (бледные жабры), геморрагии у основания плавников, жабр, глаз и кожи и растянутое брюшко из-за опухоли в брюшной полости. При хронической инфекции у пораженной рыбы внешние признаки обычно не наблюдаются. Может также встречаться нервная форма VHS, которая характеризуется ярко выраженным аномальным поведением при плавании, таким как постоянные всплески и/или движение по спирали. Критерии подтверждающей диагностики кратко изложены в разделе 7 данной главы.

### 2. Информация о болезни

#### 2.1. Факторы возбудителя

##### 2.1.1. Возбудитель, штаммы возбудителя

Возбудителем VHS является рабдовирус (VHSV), относящийся к роду *Novirhabdovirus*, в семействе *Rhabdoviridae*, которое также включает вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) и рабдовирус Хирам азиатского паралихта (*Paralichthys olivaceus*). Вирионы имеют пулевидную форму (приблизительно 70 нм в диаметре и 180 нм в длину), геном с одноцепочечной РНК негативного смысла приблизительно в 11 000 нуклеотидов и обладают оболочкой, которая содержит мембранный гликопротеин, являющийся нейтрализующим поверхностным антигеном. Геном кодирует шесть белков: нуклеопротеин, N; фосфопротеин, Р (ранее обозначаемый, как М1); матриксный белок, М (ранее обозначаемый, как М2); гликопротеин, G; невирионный протеин, NV и полимеразу, L (Walker с соавт., 2000).

Радужная форель, у которой VHSV может вызывать вспышки тяжелой болезни, является традиционным хозяином данного вируса, но многие другие виды пресноводной и морской рыбы также восприимчивы к болезни. Естественные вспышки происходили у разводимого на ферме тюрбо (Ross с соавт., 1994; Schlotfeldt

---

<sup>1</sup> NB: Версия, принятая Всемирной Ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 г.

с соавт., 1991) и как у разводимого на ферме, так и у дикого азиатского паралихта (Isshiki с соавт., 2001; Takano с соавт., 2000). Вдоль тихоокеанского побережья Северной Америки наблюдалась гибель от естественной инфекции у свободно обитающих видов морской рыбы (Meuys с соавт., 1999; Traxler с соавт., 1999). Кроме того, было выявлено, что изоляты, выделенные у тихоокеанской сельди, были патогенными для тихоокеанской сельди в экспериментальных условиях (Kosan с соавт., 1997). Обзор представлен у Skall с соавт., 2005. Вспышки VHS также наблюдались у диких пресноводных видов рыбы в Великих озерах (Elsayed с соавт., 2006; Groosock с соавт., 2007; Lumsden с соавт., 2007).

Большой круг хозяйев и значительные различия в патогенности у различных видов-хозяев могут представлять проблему при осуществлении программ контроля VHS, основной задачей которых является защита важной отрасли по производству радужной форели. Основная проблема состоит в том, должно ли обнаружение морского VHS вируса у свободно обитающей рыбы в утвержденной VHSV-свободной зоне приводить к аннулированию данного статуса свободы. Однако по результатам наблюдений в большей части Европы наличие VHS у свободно обитающей рыбы в морской окружающей среде лишь в нескольких случаях оказывало негативное воздействие на утвержденный статус свободы от VHS. Тем не менее, последняя вспышка у радужной форели в Норвегии была вызвана VHS вирусом генотипа III, морской генотип, который до этого момента считался непатогенным для радужной форели (Dale et al., 2009), что указывает на определенную значимость морских штаммов для отрасли по производству радужной форели.

Моноклональные антитела (MAb) IP5B11 (Lorenzen с соавт., 1988) вступают в реакцию со всеми изолятами VHS вируса всех известных генотипов и серотипов.

Большинство поликлональных антител против VHS вируса типа I (DK-F1) вступают в перекрестную реакцию со всеми изолятами VHS вируса в непрямой реакции флюоресцирующих антител (IFAT) и твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA). Однако по результатам реакции нейтрализации VHS вирус можно разделить на три подгруппы на основании паттерна нейтрализации при исследовании против панели из четырех нейтрализующих MAbs и одного поликлонального антитела (Olesen с соавт., 1993). Таким образом, VHS вирус имеет несколько общих антигенных детерминант, хотя серогруппирование не коррелирует с генотипами, идентифицированными с помощью анализа последовательностей нуклеиновых кислот. Были получены MAbs, вступающие в специфическую реакцию с различными группами VHS вируса, например, изолятами американской/японской геногруппы IVa и геногруппы Ib (Ito с соавт., 2010; Ito с соавт., рукопись находится в процессе подготовки).

Наиболее эффективным дифференцирующим способом типирования VHS вируса является секвенирование нуклеиновых кислот. Сравнение последовательностей многих VHSV изолятов, проведенное несколькими лабораториями, показало, что генетические отличия, по-видимому, больше связаны с географическим расположением, чем с годом выделения или хозяйским видом (Skall с соавт., 2005). Были сгруппированы четыре основных генотипа на основании секвенирования полноразмерных и/или усеченных генов из N-гена (Einer-Jensen et al., 2005; Snow с соавт., 1999; Snow с соавт., 2004), G-гена (Einer-Jensen с соавт., 2004; Einer-Jensen с соавт., 2005) и NV-гена (Einer-Jensen с соавт., 2005), соответственно:

Генотип I: Несколько сублиний (Ia-Ie), включающих европейские пресноводные изоляты VHS вируса, изоляты из района Черного моря и группу морских изолятов из Балтийского моря, проливов Каттегат, Скагеррак, Северного моря и Ла-Манша. Изоляты генотипа Ib в последнее время выделяли севернее всего в районах на уровне 70° северной широты недалеко от мыса Нордкап в Норвегии ([www.fishpathogens.eu](http://www.fishpathogens.eu), отчет №. 2902).

Генотип II: Группа изолятов из Балтийского моря

Генотип III: Изоляты Северной Атлантики (от банки Флемиш-Кап (López-Vázquez с соавт., 2006) до побережья Норвегии (Dale с соавт., 2009)), из Северного моря, проливов Каттегат, Скагеррак).

Генотип IV: североамериканские и японские/корейские изоляты (две сублинии IVa и IVb [Elsayed с соавт., 2006]).

Генотип I разделен на несколько сублиний, при этом морские изоляты, выделенные у дикой рыбы, отнесены к сублинии Ib. Наиболее явно выраженную классификацию сублиний генотипа I получают при анализе полноразмерного G-гена (Einer-Jensen с соавт., 2005).

Поскольку генотип I включает VHS вирус, выделенный у дикой морской рыбы, а также изоляты, вызывающие гибель радужной форели, из континентальной части Европы, предполагалось наличие родства между пресноводными и морскими типами (Skall et al., 2005).

Все японские и другие азиатские изоляты, кроме одного, входят в североамериканский генотип IVa. Оставшийся изолят отнесен к традиционному европейскому генотипу Ib (Nishizawa с соавт., 2002). Считается, что данный изолят занесен из-за пределов Японии.

В Северной Америке, выявлены как минимум две сублинии: генотип IVa - на тихоокеанском побережье и генотип IV - на атлантическом побережье и в районе Великих озер.

### **2.1.2. Выживание вне хозяина**

Выживание VHS вируса вне хозяина зависит от физико-химических условий водной среды (Ahne, 1982) и от температуры: при температуре 4°C вирус выживает в течение более длительных периодов, чем при температуре 20°C (Parry & Dixon, 1997). Зарегистрировано, что вирус сохраняется в пресной воде в течение 28–35 дней при 4°C (Parry & Dixon, 1997) и выявлено, что он сохраняет свою инфекционность в течение одного года при 4°C в фильтрованной пресной воде (Hawley & Garver, 2008). Вирус может присутствовать в течение более длительного периода времени при добавлении в воду органических материалов, таких как овариальные жидкости или продукты крови, такие как бычья сыворотка. В сырой пресной воде при 15°C период 99,9% инактивации составляет 13 дней, а в морской воде инактивация вируса происходит в течение 4 дней (Hawley & Garver, 2008). В ходе других исследований с использованием морской воды при 15°C, инфекционность вируса была снижена на 50% через 10 часов, но все же могла восстанавливаться через 40 часов (Kosap с соавт., 2001).

Замораживание инфицированной VHS вирусом рыбы при коммерческих температурах замораживания, а затем оттаивание не убивает полностью вирус, но снижает титры инфекционности вируса на 90% или более (Arkush с соавт., 2006). Данные авторы отмечали, что оставшийся инфекционный вирус сохранялся в ткани рыбы и не уходил в воду, образующуюся при оттаивании данной мороженой рыбы.

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

VHS вирус чувствителен к ряду общеупотребительных дезинфектантов. Обзорные исследования представлены у Вово с соавт., 2005b; Wolf, 1988.

## 2.2. Факторы хозяина

Резервуарами VHS вируса является клинически инфицированная рыба, а также латентные носители среди культивируемой, одичавшей и дикой рыбы. На восприимчивость к VHS болезни оказывают влияние несколько факторов. У радужной форели наблюдается генетическая вариабельность по восприимчивости (Hengyon с соавт., 2002a; Hengyon с соавт., 2002b), по-видимому, имеет некоторую важность и возраст рыбы – чем моложе рыба, тем выше её восприимчивость. В целом, более взрослая рыба, у которой наблюдается высокая смертность от VHS, ранее никогда до этого не сталкивалась с болезнью.

### 2.2.1. Восприимчивые виды

В течение последних двух десятилетий VHS вирус выделяли у всё большего количества видов морской и пресноводной рыбы (см. таблицы 2.1 и 2.2.). (В таблице 2.1. представлен список видов, в отношении которых имеются убедительные научные данные об их восприимчивости, а в таблице 2.2. перечислены виды, в отношении которых имеются некоторые данные об их восприимчивости.) Вполне вероятно, что VHS вирус является эндемичным в популяциях рыб в больших регионах умеренного пояса Северного полушария. На данный момент, VHS вирус был выделен у приблизительно 80 различных видов рыбы по всему Северному полушарию, включая Северную Америку, Азию и Европу. Было выявлено, что ряд видов восприимчив к VHS вирусу в экспериментальных условиях. Количество возможных видов-хозяев возрастает с увеличением усилий по мониторингу. Однако наиболее восприимчивым аквакультурным видом рыбы к генотипу Ia является радужная форель, хотя также сообщалось, что VHS вызывает гибель у разводимого на ферме тюрбо и азиатского паралихта. У дикой рыбы, случаи значительной гибели наблюдались в последнее время в районе Великих озер США и Канады с вовлечением как минимум 28 видов пресноводной рыбы. Все изоляты VHS вируса, выделенные во время данных вспышек принадлежат к генотипу IVb (Министерство сельского хозяйства США (USDA), 2008; Thompson с соавт., 2011).

**Таблица 2.1.** Виды рыбы, в отношении которых имеются убедительные научные данные об их восприимчивости (Европейское управление по безопасности пищевых продуктов [EFSA], 2008)

Восприимчивые виды согласно правилам Европейского управления по безопасности пищевых продуктов (EFSA)			
Отряд	Семейство	Общее название	Латинское название
		Радужная форель / стальноголовый лосось	<i>Oncorhynchus mykiss</i>

Лососеобразные (Salmoniformes) (лосось)	<i>Salmonidae</i> (лососевые)	(Rainbow trout / Steelhead trout)	
		Чавыча (Chinook salmon)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
		Кижуч (Coho salmon)	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
		Атлантический лосось (Atlantic salmon)	<i>Salmo salar</i>
		Кумжа (Brown trout)	<i>Salmo trutta</i>
		Европейский хариус (Grayling)	<i>Thymallus thymallus</i>
		Обыкновенный сиг (Whitefish) <sup>a</sup>	<i>Coregonus lavaretus</i>
		Сиги (Whitefish)	<i>Coregonus</i> spp.
		_a	<i>O. mykiss</i> × <i>O. kisutch</i>
		_a	<i>O. mykiss</i> × <i>S. fontinalis</i> triploid
		_a	<i>O. mykiss</i> × <i>S. alpinus</i> triploid
Щукообразные (Esociformes)	<i>Щуковые</i> ( <i>Esocidae</i> )	Щука-маскинонг (Muskellunge)	<i>Esox masquinongy</i>
		Обыкновенная щука (Northern pike)	<i>Esox lucius</i>
Сельдеобразные (Clupeiformes)	<i>Сельдевые</i> ( <i>Clupeidae</i> )	Атлантическая сельдь (Atlantic herring)	<i>Clupea harengus</i>
		Тихоокеанская сельдь (Pacific herring)	<i>Clupea pallasii</i>
		Перуанская сардина (South American pilchard)	<i>Sardinops sagax</i>
		Европейские шпроты (European sprat)	<i>Sprattus sprattus</i>
Трескообразные (Gadiformes) (треска)	<i>Тресковые</i> ( <i>Gadidae</i> )	Атлантическая треска (Atlantic cod)	<i>Gadus morhua</i>
		Обыкновенный кападан (Poor cod)	<i>Trisopterus minutus</i>
		Мерланг (Whiting)	<i>Merlangius merlangus</i>
		Северная путассу (Blue whiting)	<i>Micromesistius poutassou</i>
		Тресочка Эсмарка (Norway pout)	<i>Trisopterus esmarkii</i>
		Минтай (Alaska Pollock)	<i>Theragra chalcogramma</i>
	<i>Налимовые</i> ( <i>Lotidae</i> ) (хек и обыкновенный)	Четырехусый морской налим (Fourbeard rockling)	<i>Enchelyopus cimbrius</i>
		Обыкновенный налим	<i>Lota lota</i>

	налим)	(Burbot)	
	<i>Мерлузовые</i> ( <i>Merlucciidae</i> )	Тихоокеанская северная мерлуза (North Pacific hake)	<i>Merluccius productus</i>
Камбалообразные (Pleuronectiformes) (камбала)	<i>Камбаловые</i> ( <i>Pleuronectidae</i> )	Обыкновенная лиманда (Dab)	<i>Limanda limanda</i>
		Речная камбала (Flounder)	<i>Platichthys flesus</i>
		Морская камбала (European plaice)	<i>Pleuronectes platessa</i>
		Черный палтус (Greenland halibut)	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>
		Атлантический белокорый палтус (Atlantic halibut) <sup>a</sup>	<i>Hippoglossus hippoglossus</i> <sup>b</sup>
	<i>Скофталмовые</i> ( <i>Scophthalmidae</i> )	Тюрбо (Turbot)	<i>Scophthalmus maximus</i>
	<i>Паралихтиевые</i> ( <i>Paralichthyidae</i> )	Японский паралихт (Japanese flounder)	<i>Paralichthys olivaceus</i>
Корюшкообразные (Osmeriformes)	<i>Аргентиновые</i> ( <i>Argentinidae</i> )	Европейская аргентина (Lesser argentine)	<i>Argentina sphyraena</i>
	<i>Корюшковые</i> ( <i>Osmeridae</i> ) (корюшка)	Калифорнийская малоротая корюшка (Surf smelt)	<i>Hypomesus pretiosus</i>
Окунеобразные Perciformes (окуне- подобные)	<i>Песчанковые</i> ( <i>Ammodytidae</i> )	Дальневосточная многопозвонковая песчанка (Pacific sand lance)	<i>Ammodytes hexapterus</i>
		Песчанка (Sand eel)	<i>Ammodytes</i> spp.
		Тихоокеанская песчанка (Pacific sand eel)	<i>Ammodytes personatus</i>
	<i>Бычковые</i> ( <i>Gobiidae</i> )	Малый бычок-бубырь (Sand goby)	<i>Pomatoschistus minutus</i>
		Бычок-кругляк (Round goby)	<i>Neogobius melanostomus</i>
	<i>Эмбиотициевые</i> ( <i>Embiotocidae</i> )	Обыкновенный шайнер (Shiner perch)	<i>Cymatogaster aggregata</i>
	<i>Горбылевые</i> ( <i>Sciaenidae</i> )	Речной горбыль (Freshwater drum)	<i>Aplodinotus grunniens</i>
	<i>Скумбриевые</i> ( <i>Scombridae</i> )	Японская скумбрия (Chub mackerel, Pacific mackerel)	<i>Scomber japonicus</i>
	<i>Окуневые Percidae</i> (окунь)	Желтый окунь (Yellow perch)	<i>Perca flavescens</i> <sup>c</sup>

	<i>Мороновые</i> <i>Moronidae</i> (temperate bass)	Обыкновенный лаврак (European seabass) <sup>a</sup>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
Колюшкообразные (Gasterosteiformes)	<i>Колюшковые</i> <i>(Gasterosteidae)</i>	Трехиглая колюшка (Three-spined stickleback)	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Карпообразные (Cypriniformes) (капп)	Карповые <i>Cyprinidae</i> (гольян или карп)	Толстоголовый гольян (Fathead minnow) <sup>a</sup>	<i>Pimephales promelas</i> <sup>d</sup>
Миногообразные (Petromyzontiformes) (миноги)	Миноговые <i>Petromyzontidae</i> (минога)	Речная минога (European river lamprey)	<i>Lampetra fluviatilis</i> <sup>e</sup>

- a. Опыт по инфицированию, погружение
- b. Skall с соавт., 2005;
- c. Kane-Sutton с соавт., 2010;
- d. Al-Hussinee с соавт., 2010;
- e. Gadd с соавт., 2010.

Таблица 2.2. Виды рыбы, в отношении которых имеются некоторые данные об их восприимчивости (EFSA, 2008)

Недостаточные данные для заявления о наличии восприимчивости			
Отряд	Семейство	Общее название	Латинское название
Лососеобразные Salmoniformes (salmon)	<i>Salmonidae</i> (лососевые)	Кета (Chum salmon) <sup>a</sup>	<i>Oncorhynchus keta</i>
		Нерка (Sockeye salmon) <sup>a</sup>	<i>Oncorhynchus nerka</i>
		Озерный голец-кристивомер (Lake trout) <sup>b c</sup>	<i>Salvelinus namaycush</i> <sup>d</sup>
		Американская паляя (Brook trout) <sup>bc</sup>	<i>Salvelinus fontinalis</i> <sup>d</sup>
		Сельдевидный сиг (Lake whitefish)	<i>Coregonus clupeaformis</i>
		Золотая форель (Golden trout) <sup>c</sup>	<i>Oncorhynchus aguabonita</i>
		Арктический голец (Arctic char) <sup>b</sup>	<i>Salvelinus alpinus</i>
		Сплейк (Splake) <sup>c</sup>	<i>Salvelinus namaycush</i> × <i>Salvelinus fontinalis</i> <sup>d</sup>
		_b	<i>O. mykiss</i> × <i>S. namaycush</i>
		_b	<i>O. mykiss</i> × <i>O. kisutch</i> <i>triploid</i>
Сельдеобразные (Clupeiformes)	<i>Сельдевые</i> ( <i>Clupeidae</i> )	Северная доросома (American gizzard shad)	<i>Dorosoma cepedianum</i>
Трескообразные (Gadiformes) (треска)	<i>Тресковые</i> <i>Gadidae</i>	Тихоокеанская треска (Pacific cod)	<i>Gadus macrocephalus</i>
		Пикша (Haddock)	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>
		Тихоокеанская тресочка (Pacific tomcod)	<i>Microgadus proximus</i>
	<i>Налимовые</i> <i>Lotidae</i> (хек и налим)	Обыкновенный налим (Burbot)	<i>Lota lota</i>

Сомообразные Siluriformes (сом)	<i>Иctalуровые</i>	Американский сомик (Brown bullhead)	<i>Ictalurus nebulosus</i>
	<i>Ictaluridae</i> (североамериканский пресноводный сом)	Канальный сомик (Channel catfish)	<i>Ictalurus punctatus</i>
Корюшкообразные Osmeriformes	<i>Корюшковые</i> <i>Osmeridae</i> (корюшка)	Тихоокеанская корюшка (Eulachon)	<i>Thaleichthys pacificus</i>
Окунеобразные Perciformes (окунеподобные)	<i>Центрарховые</i> <i>Centrarchidae</i> (солнечник)	Большеротый окунь (Largemouth bass)	<i>Micropterus salmoides</i>
		Большеротый окунь (Largemouth bass) <sup>c</sup>	<i>Micropterus salmoides</i> <sup>d</sup>
		Малоротый окунь (Smallmouth bass)	<i>Micropterus dolomieu</i>
		Синежаберный солнечник (Bluegill)	<i>Lepomis macrochirus</i>
		Обыкновенный солнечник (Pumpkinseed)	<i>Lepomis gibbosus</i>
		Черный краппи (Black crappie)	<i>Pomoxis nigromaculatus</i>
		Американский каменный окунь (Rock bass)	<i>Ambloplites rupestris</i>
	<i>Окуневые</i> <i>Percidae</i> (окунь)	Светлоперый судак (Walleye)	<i>Sander vitreus</i>
		Речной окунь (European perch)	<i>Perca fluviatilis</i>
	<i>Мороновые</i> <i>Moronidae</i> (temperate bass)	Белый окунь (White bass)	<i>Morone chrysops</i>
		Полосатый лаврак (Striped bass)	<i>Morone saxatilis</i>
		Белый американский лаврак (White perch)	<i>Morone americana</i>
		Дальневосточный морской карась (Black porgy) <sup>c</sup>	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>
		Красный морской карась (Red seabream) <sup>c</sup>	<i>Pagrus major</i>
	<i>Спаровые</i>	Дорада	<i>Sparus aurata</i>

	<i>Sparidae</i>	(Gilthead seabream)	
Окунеобразные Perciformes (окунеподобные)	<i>Серрановые</i> ( <i>Serranidae</i> )	Группер-акаара (Hong Kong grouper) <sup>c</sup>	<i>Epinephelus akaara</i>
	<i>Ставридовые</i> ( <i>Carangidae</i> )	Японская лакедра (Japanese amberjack) <sup>c</sup>	<i>Seriola quinqueradiata</i>
	<i>Горбылевые</i> ( <i>Sciaenidae</i> )	Желтый горбыль (Yellow croacker) <sup>a</sup>	<i>Larimichthys polyactis</i> <sup>e</sup>
	<i>Спарровые</i> ( <i>Sparidae</i> )	Желтый зубан (Yellowback seabream) <sup>a</sup>	<i>Dentex tumifrons</i> <sup>e</sup>
	<i>Волосохвостые</i> ( <i>Trichiuridae</i> )	Рыба-сабля (Largehead hairtail) <sup>a</sup>	<i>Trichiurus lepturus</i> <sup>e</sup>
	<i>Строматеевые</i> ( <i>Stromateidae</i> )	Серебристый памп (Silver pomfret, butter fish)	<i>Pampus argentus</i> <sup>e</sup>
Скорпенообразные Scorpaeniformes (скорпеновые и плоскоголовые)	<i>Анопломовые</i> <i>Anoplopomatidae</i> (аноплома)	Аноплома (Sablefish)	<i>Anoplopoma fimbria</i>
	<i>Sebastidae</i> (скорпены, каменные окуни и шипощеки) (Rockfish, rockcod and thornyheads)	Черный морской окунь, мебару (японский) (Black rockfish, Mebaru (Japanese))	<i>Sebastes inermis</i>
		Темный окунь (Schlegel's black rockfish) <sup>c</sup>	<i>Sebastes schlegelii</i>
	<i>Липаровые</i> ( <i>Liparidae</i> )	Мозаичный липарис (Cubed snailfish) <sup>a</sup>	<i>Liparis tessellatus</i> <sup>e</sup>
<i>Scorpaenidae</i>	Морской ёрш (Izu scorpionfish, sting fish) <sup>a</sup>	<i>Scorpaena izensis</i> <sup>e</sup>	
Угреобразные (Anguilliformes)	<i>Угревые</i> <i>Anguillidae</i>	Обыкновенный угорь (European eel)	<i>Anguilla anguilla</i>
		Американский речной угорь (American eel) <sup>a</sup>	<i>Anguilla rostrata</i> <sup>f</sup>
Карпозубообразные Cyprinodontiformes	<i>Фундуловые</i> ( <i>Fundulidae</i> )	Обыкновенный фундулюс (Mummichog)	<i>Fundulus heteroclitus</i>
Колюшкообразные Gasterosteiformes	<i>Аулоринховые</i> ( <i>Aulorhynchidae</i> )	Длиннорылые колюшки	<i>Aulorhynchus flavidus</i>

		Tube-snout	
Карпообразные Cypriniformes (капп)	Чукучановые ( <i>Catostomidae</i> )	Серебристая моксостома (Silver redhorse)	<i>Moxostoma anisurum</i>
		Северная моксостома (Shorthead redhorse)	<i>Moxostoma macrolepidotum</i>
	Карповые Cyprinidae (гольян или карп)	–	<i>Barbus graellsii</i>
		Толстоголовый гольян (Bluntnose minnow)	<i>Pimephales notatus</i>
		Изумрудный шайнер (Emerald shiner)	<i>Notropis atherinoides</i>
		Гудзонский нотропис (Spottail shiner)	<i>Notropis hudsonius</i>
		Иберийский подуст (Iberian nase)	<i>Chondrostoma polylepis</i>
		Дианио-перио (Zebra danio) <sup>c</sup>	<i>Danio rerio</i>
Серебряный карась (Goldfish) <sup>b</sup>	<i>Carassius auratus</i>		
Перкопсообразные (Percopsiformes) (лососеокунь, пиратоокуневые и слепоглазковые)	Перкопсовые <i>Percopsidae</i> (лососеокунь)	Лососеокунь (Trout-perch)	<i>Percopsis omiscomaycus</i>
Камбалообразные Pleuronectiformes (камбала)	Солеевые ( <i>Soleidae</i> )	Сенегальская соля (Senegalese sole)	<i>Solea senegalensis</i>
		Сенегальская соля (Senegalese sole) <sup>bc</sup>	<i>Solea senegalensis</i> <sup>g</sup>
	Камбаловые <i>Pleuronectidae</i>	Японская камбала (Marbled flounder) <sup>c</sup>	<i>Pleuronectes yokohamae</i>
		Английская камбала (English sole)	<i>Parophrys vetula</i>
	Дальневосточная длинная камбала (Blackfin flounder, Korean flounder) <sup>a</sup>	<i>Glyptocephalus stelleri</i> <sup>e</sup>	
Кефалообразные (Mugiliformes)	Кефаловые ( <i>Mugilidae</i> )	Черная кефаль (плоскоголовая черная кефаль (flathead grey mullet),	<i>Mugil cephalus</i> <sup>d</sup>

		лобан (striped mullet))	
		Плоскоголовая черная кефаль (flathead grey mullet), лобан (striped mullet)) <sup>a</sup>	<i>Mugil cephalus</i> <sup>e</sup>
Ошибнообразные (Ophidiiformes)	<i>Ошибневые (Ophidiidae)</i>	Натальская ласка-рыба (Armoured cusk, Armoured weaselfish) <sup>a</sup>	<i>Hoplobrotula armata</i> <sup>e</sup>
Кархаринообразные <sup>e</sup> (Carcharhiniformes)	Кошачьи акулы <i>Scyliorhinidae</i>	Японская кошачья акула (Cloudy catshark) <sup>a</sup>	<i>Scyliorhinus torozame</i> <sup>e</sup>
Нерыбные объекты		Пиявка (Leech)	<i>Myzobdella lugubris</i> <sup>h</sup>
Нерыбные объекты		Ракообразные (Crustacean)	<i>Diporeia</i> spp. <sup>i</sup>

- a. Только полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР);
- b. Опыт по инфицированию, погружение;
- c. Опыт по инфицированию, внутрибрюшинная инъекция;
- d. Kim & Faisal, 2010;
- e. Lee с соавт., 2007;
- f. Al-Hussinee с соавт., 2011;
- g. López-Vázquez с соавт., 2011;
- h. Faisal & Schulz, 2009;
- i. Faisal & Winters, 2011.

### 2.2.2. Восприимчивые стадии хозяина

Инфицирование VHS вирусом может вызвать болезнь и гибель у восприимчивой рыбы на всех стадиях её жизни. В эндемичных регионах инфекция может привести к развитию протективного иммунитета; поэтому, болезнь более распространена в популяциях молодой, ранее неинфицированной рыбы. Нет сведений о том, что VHS вирус инфицирует икринки рыбы.

### 2.2.3. Предрасположенность видов и субпопуляций (вероятность обнаружения)

В ходе массовых обследований дикой морской рыбы VHS вирус был выделен у рыбы большинства годовых классов. Однако было протестировано лишь небольшое количество молоди, поскольку её обычно не вылавливают в ходе данных массовых обследований. Наивысшая превалентность вируса была выявлена у мелководной рыбы, такой как сельдь, килька, тресочка Эсмарка и т.д.. (Skall с соавт., 2005).

### 2.2.4. Целевые органы и инфицируемые ткани

При септических стадиях болезни вирус в больших количествах присутствует во всех тканях, включая кожу и мышцы. Целевыми органами являются почки, сердце и селезенка, поскольку это места, в которых вирус присутствует в самых больших количествах. При хронических стадиях титры вируса могут быть высокими в головном мозгу (Smail & Snow, 2011; Wolf, 1988).

#### **2.2.5. Персистентное инфицирование пожизненными носителями**

Некоторые особи, оставшиеся в живых после эпизоотий, будут становиться долговременными носителями вируса.

#### **2.2.6. Переносчики**

Учитывая большое количество восприимчивых видов можно предположить, что вирус способен размножаться в достаточно большом круге хозяев, что исключает необходимость переносчиков. Однако у инфицированных особей многих видов рыбы клинические признаки никогда не наблюдались.

VHS вирус был выделен у пиявок, *Myzobdella lugubris*, и у *Diporeia* spp. в Великих озерах, Северная Америка. В настоящее время неизвестно, могут ли пиявки и креветко-подобные *Diporeia* передавать VHS вирус от одной рыбы другой (Faisal & Schulz, 2009; Faisal & Winters, 2011).

VHS вирус может переноситься рыбающими птицами, действующими как внешние механические переносчики (Olesen & Vestergård Jørgensen, 1982; Peters & Neukirch, 1986).

#### **2.2.7. Известные и подозреваемые дикие водные животные-носители**

См. таблицы 2.1 и 2.2., в которых перечислены виды, у которых был выделен VHS вирус. В настоящее время, недостаточно научных данных, обосновывающих включение всех видов из Великих озер в список видов, восприимчивых к VHS вирусу (Европейское управление по безопасности пищевых продуктов, 2008).

### **2.3. Картина болезни**

#### **2.3.1. Механизмы передачи**

Знания о механизме передачи вируса были получены в основном в ходе исследований изолятов VHS вируса, выделенных у радужной форели в Европе; было выявлено, что их передача происходила горизонтально при контакте с другой инфицированной рыбой или контаминированной водой, т.д. Инфицированная рыба выделяла вирус в среду с мочой (Wolf, 1988) и репродуктивными жидкостями. Передача без труда происходит при температуре в диапазоне от 1 до 15°C, но может происходить и при температуре до 20°C. Инкубационный период зависит от температуры и дозы, и при более высоких температурах составляет 5–12 дней.

Во время вспышки и сразу после нее вирус без труда поддается выделению в культуре клеток (Wolf, 1988). Ткани почек, сердца и селезенки дают урожай вируса в самых высоких титрах.

У рыб-носителей (клинически здоровых) выявление VHS вируса более проблематично (Skall с соавт., 2005). VHS вирус растет в ряде линий клеток рыбы, но наиболее восприимчивой к инфекции пресноводными европейскими штаммами вируса является BF-2 клеточная линия (Skall с соавт., 2005). Клетки по восприимчивости располагаются в следующем порядке: BF-2, FHM, RTG-2, и EPC (Lorenzen с соавт., 1999), но другие линии клеток рыбы, такие как CHSE-214 и SSN-1, также восприимчивы. Восприимчивость клеточной линии к инфекции будет зависеть от ряда параметров, включая происхождение клеточной линии и различия в штаммах вируса, таким образом, по-видимому, EPC клеточная линия может быть более восприимчива к изолятам VHS вируса генотипа IV, чем к изолятам генотипа I, II или III (Skall с соавт., 2005).

Хорошо установлено наличие статуса носительства VHS вируса у видов пресноводной рыбы (Enzmann & Konrad, 1985; Jørgensen, 1982). Вирусологический статус таких носителей будет зависеть от ряда параметров, включающих продолжительность периода времени, прошедшего после первоначального подвергания воздействию, и географической близости выпускных сооружений рыбоводческих ферм. С момента выявления штаммов VHS вируса у морских видов, был проведен ряд исследований, включающий обширный пробоотбор от широкого диапазона видов рыбы из прибрежных вод в континентальной Европе (Skall с соавт., 2005), Соединенном Королевстве (Skall с соавт., 2005), Северной Америке (Hedrick с соавт., 2003) и Азии (Kim & Park, 2004; Takano с соавт., 2000). В ходе данных исследований производился анализ образцов на наличие вируса посредством инокуляции в линии клеток рыбы. В ходе некоторых исследований образцы от рыбы объединяли в пулы и, поэтому, было трудно определить точную превалентность. Тем не менее, исходя из результатов процедуры выделения вируса в культуре клеток, и независимо от исследованных видов рыбы, превалентность VHS вируса у видов морской рыбы, у которой в ходе данных исследований были отобраны образцы, составляла от 0,0 до 16,7% (95% доверительный уровень, 8,7–27,5%) (Skall с соавт., 2005).

Болезнь в основном наблюдалась при температуре от 4°C до 14°C. При температуре воды от 15°C до 18°C, болезнь в основном была кратковременной с умеренной совокупной смертностью.

При низких температурах воды (1–5°C) течение болезни обычно было длительным с низкой ежедневной смертностью, но высокой совокупной смертностью. Вспышки VHS происходят в течение всех сезонов года, но наиболее часто - весной, когда наблюдается повышение или колебание температур воды. Более подробные обзорные анализы данного состояния были произведены Wolf, 1988 и Smail & Snow, 2011.

Передача происходит в основном горизонтально через воду, при экскреции вируса с мочой (Smail & Snow, 2011). Исследования с использованием биоиллюминесцентной визуализации живой форели, инфицированной рекомбинантным вирулентным IHN вирусом, вирусом, который очень сходен с

VHS вирусом, несущим репортерный ген, превосходно проиллюстрировали, что урожай вируса на коже рыбы очень высокий (Bremont, 2005). Данный аспект также следует исследовать и в отношении рыбы, инфицированной VHS, прямая экскреция вируса с кожи может быть источником распространения вируса (Smail & Snow, 2011).

Свидетельства и данные о действительной вертикальной передаче VHS вируса отсутствуют (Vovo с соавт., 2005а).

### **2.3.2. Превалентность**

До конца 1980-х годов, считалось, что VHS распространена только у разводимой на ферме радужной форели в континентальной Европе, с редкими случаями выявления у ограниченного количества других видов пресноводной рыбы (например, кумжа, щука [Meier & Jørgensen, 1980; Schlotfeldt & Ahne, 1988]), при этом Скандинавия (кроме Дании), Великобритания и Ирландия считались свободными от VHS. С обнаружением и выделением VHS вируса у тихоокеанского лосося вдали от тихоокеанского побережья Северной Америки в конце 1980-х годов, проведенные последующие исследования показали, VHS вирус присутствует у многочисленных видов разводимой на ферме и дикой рыбы вдоль тихоокеанского и атлантического побережий Северной Америки (Skall с соавт., 2005), в районе Великих озер Северной Америки (Thompson с соавт., 2011), в морях вокруг Соединенного Королевства (Skall с соавт., 2005), в Балтийском море, в проливах Скагерак и Каттегат (Skall с соавт., 2005), в водах вокруг Японии (Skall с соавт., 2005), а в районе Черного моря - отличающийся генотип Ie (Nishizawa с соавт., 2006).

### **2.3.3. Географическое распространение**

В течение двух последних десятилетий VHS вирус был выделен у дикой рыбы во всех зонах умеренного климата в Северном полушарии, как в пресных водах, так и в морских водах (Skall с соавт., 2005). Однако вспышки VHS у разводимой на ферме радужной форели наблюдались только в Европе, где она по-прежнему считается одной из самых серьезных вирусных болезней в аквакультуре. В Америке, VHS главным образом вызывает смертность у дикой рыбы (Meyers & Winton, 1995; Skall с соавт., 2005; Министерство сельского хозяйства США (USDA), 2008). В Азии, были сообщения о вспышках клинической болезни у разводимого на ферме азиатского паралихта, а также производились выделения вируса у видов дикой рыбы (Lee с соавт., 2007; Skall с соавт., 2005).

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

Уровень смертности варьирует в зависимости от многих условий окружающей среды и физиологических условий, большинство из которых в полной мере не определены. Болезнь, в целом, является прохладноводной или холодноводной болезнью с наивысшей смертностью при температуре около 9–12°C. Маленькие мальки радужной форели (0.3–3 g) - наиболее восприимчивы к вирусу генотипа Ia, и уровень смертности у них достигает почти 100%, но болезнь может поражать радужную форель всех размеров и смертность может варьировать от 5 до 90%. Опыты по инфицированию посредством погружения приводили к 100% смертности у тихоокеанской сельди при инфицировании её вирусом генотипа IVa (Skall с

соавт., 2005).

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

Вспышки VHS были зарегистрированы как в пресноводных водоемах, так и в водоемах с морской водой при солености воды до 36 частей на тысячу (ppt) и диапазонах температур от 2 до 20°C. Большинство вспышек наблюдалось весной, когда наблюдаются колебания температуры.

Лабораторные исследования показали, диапазон температур для VHS вируса генотипа IVb такой же, как и для генотипа I, при этом оптимальной является температура 9–12°C, а верхним пределом – температура 18–20°C (Goodwin & Merry, 2011).

## **2.4. Контроль и профилактика**

При отсутствии антивирусных обработок, методы контроля VHS в настоящее время представляют собой схемы официального надзора за здоровьем в сочетании с мерами контроля. Примеры практик, которые были успешными в плане снижения количества инфицированных ферм в эндемичном районе и недопущения повторного инфицирования, таких как процедура полного санитарного убоя или процедура выдержки, были описаны в обзорных статьях ранее (Olesen, 1998; Olesen & Korsholm, 1997). Успешное искоренение вспышек острой болезни было недавно проведено в Соединенном Королевстве в 2006 г. (Stone с соавт., 2008) и в Норвегии в 2007 г. (Dale с соавт., 2009), поскольку с того времени вспышек больше не было, и в Дании, в которой спустя 45 лет надзора и контроля VHS была искоренена на более чем 400 эндемично инфицированных фермах, последняя вспышка была зарегистрирована в феврале 2009 г. (рукопись находится в процессе подготовки).

### **2.4.1. Вакцинация**

Хотя научные исследования по разработке вакцины против VHS продолжают в течение более трех десятилетий, коммерческой вакцины пока нет. Кандидатные вакцины включают инактивированные вакцины, аттенуированные живые вакцины, рекомбинантную вакцину в прокариотической и эукариотической экспрессирующих системах и вакцины на основе ДНК. Однако последние были признаны очень перспективными, индуцирующими хорошую защиту от VHS. Обзоры представлены у Lorenzen & Lapatra, 2005.

### **2.4.2. Химиотерапия**

В настоящее время терапевтические методы отсутствуют.

### **2.4.3. Иммуностимуляция**

Производился анализ нескольких иммуностимулирующих средств, таких как полученные из дрожжей бета-глюканы, полученные из IL-1 $\beta$  пептиды и пробиотики, на наличие у них способности усиливать защиту от VHS (Peddie с соавт., 2003). Несколько авторов сообщали о положительных эффектах, но иммуностимуляторы, направленные конкретно на усиление резистентности к VHS, отсутствуют.

#### **2.4.4. Выведение резистентной популяции**

У радужной форели была обнаружена аддитивная генетическая вариация в отношении резистентности к VHS (Dorson с соавт., 1995; Henryon с соавт., 2002a; Henryon с соавт., 2002b). В исследовании, проведенном Henryon с соавт., 2005, наследуемость резистентности к VHS составляла 0,11 в течение временного периода до гибели по логарифмической временной шкале. Таким образом, было продемонстрировано наличие хорошего потенциала для выведения резистентной популяции. Однако в настоящее время коммерческие резистентные линии радужной форели пока отсутствуют.

#### **2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами**

На некоторых фермах в Дании, на которых периодически наблюдались случаи высокой смертности, вызванной VHS, предпринимались попытки восполнения поголовья более резистентными видами, такими как кумжа (*Salmo trutta*) и судак (*Sander lucioperca*) (H. Korsholm, персональное сообщение).

#### **2.4.6. Дезинфекция икринок и личинок**

Дезинфекция икринок на стадии «глазка» и только что оплодотворенных икринок является эффективной и рентабельной защитной мерой для прекращения распространения болезни (более подробно процедуры описаны у Вою с соавт., 2005b).

#### **2.4.7. Общие практики ведения хозяйства**

На течение и степень тяжести болезни могут оказывать влияние низкое качество воды, высокая плотность рыбы, высокая скорость кормления, другие болезни, такие как пролиферативная почечная болезнь (PKD), ихтиофтириоз, бактериальная почечная болезнь (BKD), т.д. В целом, повышение температуры, ограничения в кормлении, снижение плотности рыбы и ограниченные манипуляции могут снизить уровень смертности. На эндемично инфицированных фермах обычно зарыбление производится с использованием не подвергавшихся никакому воздействию мальков с желточным мешком при максимально возможной высокой температуре воды.

### **3. Отбор образцов**

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

Клинические обследования следует производить в период, когда температура ниже 14°C, или всякий раз, когда температура воды достигает своего самого низкого годового значения. Все производственные подразделения (пруды, резервуары, садки и т.д.) должны быть проинспектированы на наличие погибшей, слабой рыбы или рыбы с аномальным поведением. Особое внимание следует уделять местам, где производится водосброс, где обычно собирается ослабленная рыба, ввиду присутствия там течения воды.

Выбор рыбы, подлежащей отбору в качестве образца, необходимо производить

следующим образом:

- Для генотипа I: на фермах с лососевыми, при наличии радужной форели отбор образцов следует производить только от рыбы данного вида. Если радужной форели нет, образцы следует отбирать от рыбы всех других присутствующих восприимчивых к VHS вирусу видов рыбы, перечисленных в таблицах 2.1 и 2.2. Однако данные виды рыбы должны быть пропорционально представлены в образце. Для других генотипов: следует отбирать образцы от видов рыбы, в отношении которых известно об их восприимчивости к указанному генотипу. Отбор образцов от восприимчивых видов рыбы следует производить пропорционально и в соответствии с риск-ориентированными критериями для целевого выбора партий или популяций с историей аномальной смертности или случаями потенциального воздействия (например, через необработанные поверхностные воды, вылов дикой рыбы или ремонт стада с использованием популяций с неизвестным статусом по риску).
- Если для производства рыбы используется более чем один водоем, в образец должна быть включена рыба из всех используемых водоемов.
- При наличии ослабленной рыбы, рыбы с аномальным поведением или недавно погибшей рыбы (неразложившейся) следует выбирать такую рыбу. При отсутствии такой рыбы выбранная рыба должна включать внешне нормальную, здоровую рыбу, отобранную таким образом, чтобы в образце была пропорционально представлена рыба из всех частей фермы, а также всех годовых классов.

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

Перед отправкой или доставкой в лабораторию, части органов, подлежащих исследованию, необходимо извлечь из рыбы с помощью стерильных иссекающих инструментов и перенести в стерильные пластиковые пробирки, содержащие транспортную среду, т.е. клеточную культуральную среду с 10% фетальной телячьей сывороткой (FCS) и антибиотиками. Рекомендуется добавлять комбинацию из 200 международных единиц (МЕ) пенициллина, 200 мкг стрептомицина и 200 мкг канамицина на один мл, хотя также можно использовать и другие антибиотики с доказанной эффективностью.

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

Овариальную жидкость или кусочки органов максимум от десяти особей рыбы можно собирать в одну стерильную пробирку, содержащую как минимум 4 мл транспортной среды, что представляет собой один объединенный в пул образец. Вес ткани в каждом образце должен составлять минимум 0,5 г. Пробирки следует поместить в изотермические контейнеры (например, пенопластовые коробки с толстыми стенками), добавляя достаточное количество льда или «морозильные блоки» для обеспечения сохранения образцов в охлажденном состоянии во время их транспортировки в лабораторию. Необходимо избегать замораживания. Температура образца во время перевозки всегда должна оставаться ниже 10°C, и при приемке в лаборатории в транспортном контейнере должен все еще присутствовать лед или один или

несколько морозильных блоков должны оставаться частично или полностью замороженными. Вирусологическое исследование необходимо начать как можно быстрее или не позднее чем через 48 часов после отбора образцов. В исключительных случаях, вирусологическое исследование должно быть начато не позднее чем в течение 78 часов после отбора материала при условии, что подлежащий исследованию материал защищен транспортной средой и при соблюдении требований к температуре во время транспортировки.

В лабораторию может быть отправлена и цельная рыба при условии наличия возможности соблюдения требований к температуре во время транспортировки. Цельную рыбу можно завернуть в адсорбирующую бумагу и необходимо отправить в пластиковом пакете охлажденной, как указано выше. Можно также отправлять живую рыбу. Все операции по упаковке и этикетировке следует производить в соответствии с действующими национальными и международными регламентами по транспортировке, в зависимости от ситуации.

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

Оптимальным тканевым материалом для исследования является селезенка, передняя часть почки и либо сердце, либо головной мозг. В некоторых случаях необходимо исследовать овариальную жидкость и молоки.

Для маленьких мальков, цельные особи рыбы длиной менее 4 см можно измельчить стерильными ножницами или скальпелем после удаления части тушки за анальным отверстием. Если образец состоит из цельной рыбы длиной от 4 до 6 см, следует производить отбор внутренних органов, включая почки.

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

VHS вирус очень чувствителен к ферментативному расщеплению, поэтому, следует избегать отбора образцов тканей с высокой ферментативной активностью, таких как кишечник и печень.

## **4. Диагностические методы**

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

#### **4.1.1. Клинические признаки**

Расширенное клиническое обследование на наличие VHS следует проводить при наличии следующих признаков: быстрое начало смертности, вялость, потемнение кожи, пучеглазие, анемия (бледные жабры), геморрагии у основания плавников, жабр, глаз и кожи, аномальное плавание, такое как плескание и плавание по спирали, вздутое брюшко из-за опухоли в брюшной полости.

#### **4.1.2. Изменения в поведении**

Неврологическая форма болезни характеризуется ярко выраженным аномальным плавательным поведением, таким как постоянное плескание и плавание по спирали, ввиду тропизма вируса к головному мозгу. В отличие от рыбы с

бактериальной септицемией VHS-инфицированная рыба не будет пытаться ускользнуть при ловле её сетью.

## **4.2. Клинические методы**

### **4.2.1. Макроскопическая патология**

Макроскопические поражения включают генерализованную петехиальную геморрагию в коже, мышечной ткани (особенно в дорсальных мышцах) и внутренних органах. Важно исследовать дорсальную мускулатуру на наличие петехиального кровотечения, которое является очень частым признаком VHS инфекции. Почка в острой фазе - темно красные, но у умирающей рыбы может наблюдаться сильный некроз почек. Селезенка - умеренно увеличенная. Печень - часто бледная и пятнистая. Желудочно-кишечный тракт, особенно задняя часть кишечника, – бледный и не содержит пищи.

### **4.2.2. Клиническая химия**

В острой фазе VHS уровень эритроцитов в крови – очень низкий, кровь по внешнему виду светло красная и прозрачная.

### **4.2.3. Микроскопическая патология**

При исследовании методом иммуногистохимии выявляют VHSV-положительные эндотелиальные клетки, главным образом в сердечнососудистой системе (Evensen et al., 1994). В почках, печени и селезенке наблюдается обширный очаговый некроз и дегенерация – цитоплазматические вакуоли, пикноз, кариолизис и инвазия лимфоцитов. Поскольку скелетные мышцы, по-видимому, не являются местом инфицирования, эритроциты могут скапливаться в пучках и волокнах скелетных мышц, не вызывая повреждения самих мышц.

### **4.2.4. Электронная микроскопия/цитопатология**

VHS вирус является типичным рабдовирусом пулевидной формы, 60–75 нм в диаметре и 180–240 нм в длину. Ультраструктуральные аспекты развития вирусной инфекции в клеточной культуре были описаны ранее (Вагоні с соавт., 1982).

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

В основе стандартного метода надзора (для выявления рыб-носителей) с целью обнаружения VHS лежат прямые методы, т.е. выделение VHS вируса в клеточной культуре с последующей идентификацией с помощью методов на основе антител (IFAT, ИФА) или методов на основе нуклеиновых кислот (например, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией [ОТ-ПЦР]). Поскольку прямая иммунологическая демонстрация VHSV антигена в тканях инфицированной рыбы (посредством анализа связывания с антителом) имеет низкую чувствительность, данный метод можно использовать только при подозрении на наличие VHS инфекции (на основании клинических признаков, эпизоотологических данных и гистопатологии). Было установлено, что недавно опубликованная валидированная ОТ-ПЦР в реальном времени для прямой

идентификации генома VHSV в тканях рыбы имеет уровни специфичности и чувствительности очень сходные с таковыми методов культивирования в клетках с последующей идентификацией (Garver с соавт., 2011; Jonstrup с соавт., 2013). Данный метод потенциально можно использовать в программах прямого надзора для получения утвержденного статуса свободы от VHS, если в будущем страны-члены МЭБ одобряют его использование для данной цели.

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

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

Почки и печень являются главными целевыми тканями, исследование гистологических срезов тканей больной рыбы показывает наличие дегенерации и некроза кровеносных тканей почек (и селезенки) с очаговой дегенерацией и некрозом печени. На срезах скелетных мышц можно увидеть многочисленные очаги эритроцитов, в то время как мышечные волокна остаются неповрежденными.

##### **4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя**

###### *4.3.1.2.1. Клеточные культуральные/искусственные среды*

Выделение VHS вируса в культурах ряда стабильных линий клеток рыбы убедительно подтверждено документальными доказательствами (Lorenzen с соавт., 1999; Olesen & Vestergård Jørgensen, 1992). Хотя инокуляция линий клеток рыбы для выделения вируса считается «золотым» стандартом для программ надзора (с целью обнаружения рыб-носителей) с точки зрения чувствительности, точная чувствительность данной процедуры неизвестна. Какой материал от инфицированной рыбы пригоден для вирусологического исследования, зависит от размера рыбы. Так, подходящими образцами являются цельные мальки (длина тела < 4 см), внутренние органы, включая почки (4 см < длина тела < 6 см) или, для рыбы большего размера – почки, селезенка, сердце и головной мозг, для рыб-производителей – овариальная жидкость в момент метания икры.

Рекомендуется использовать линию клеток рыбы BF-2. Альтернативно, можно использовать EPC или FHM клетки (Lorenzen с соавт., 1999; Olesen & Vestergård Jørgensen, 1992; Министерство внутренних дел США, 2007). В целом, EPC клетки менее чувствительны к вирусу генотипов I, II и III, чем BF-2 клетки (Lorenzen с соавт., 1999; Olesen & Vestergård Jørgensen, 1992). Однако EPC клеточная линия очень чувствительна к нескольким изолятам генотипа IV (Министерство внутренних дел США, 2007).

После обнаружения вируса на основании развития вирусного цитопатогенного действия (ЦПД) в клеточной культуре производится идентификация вируса с помощью тестов на основе антител или тестов на основе нуклеиновых кислот. В любых тестах на основе антител следует использовать антитела, валидированные по своей чувствительности и специфичности (Ariel & Olesen, 2001). Рекомендуется использовать МАb IP5B11 (Lorenzen с соавт., 1988) в качестве эталонного реагента,

поскольку все выделенные на данный момент VHS вирусы вступают в реакцию с данным моноклональным антителом (MAb).

#### *4.3.1.2.1.1. Выделение вируса*

В лаборатории, ткань в пробирке необходимо полностью гомогенизировать (либо с помощью лопастной мешалки (Stomacher), блендера, валидированного гомогенизатора, либо, что более эффективно, с помощью ступки и пестика с добавлением стерильного песка) и затем суспендировать в оригинальной транспортной среде. Если образец представляет собой цельную рыбу длиной менее 4 см, её следует измельчить стерильными ножницами или скальпелем после удаления участка тела за анальным отверстием. Если образец представляет собой цельную рыбу длиной от 4 см до 6 см, следует отбирать внутренние органы, включая почки. Если образец представляет собой цельную рыбу длиной более 6 см, следует произвести отбор образцов тканей, как описано в Разделе 3.4. Образцы ткани следует измельчить стерильными ножницами или скальпелем и гомогенизировать, как описано выше, а затем суспендировать в транспортной среде. В лаборатории следует откорректировать итоговое соотношение тканевого материала и транспортной среды таким образом, чтобы оно составляло 1:10.

Гомогенат центрифугируют в охлаждаемой центрифуге при температуре 2–5°C при 2000-4000 *g* в течение 15 минут, супернатант собирают и обрабатывают антибиотиками либо в течение 4 часов при 15°C, либо в течение ночи при 4°C, например, на данной стадии полезно будет использовать гентамицин, 1 мг мл<sup>-1</sup>. Если образец доставлен в транспортной среде (т.е. подвергался воздействию антибиотиков), обработку супернатанта антибиотиками можно не проводить. Обработка антибиотиками проводится с целью контроля бактериальной контаминации в образцах и делает ненужной фильтрацию через мембранные фильтры.

Если собранный супернатант хранится при –80°C в течение 48 часов с момента отбора образцов, его можно повторно использовать для вирусологического исследования только один раз.

При возникновении трудностей на практике (например, поломка инкубатора, проблемы с клеточными культурами и т.д.), в результате которых невозможно инокулировать клетки в течение 48 часов после отбора образцов ткани, допускается замораживание супернатанта при –80°C и проведение вирусологического исследования в течение 14 дней.

Перед инокуляцией клеток супернатант смешивают с равными частями соответствующим образом разведенного пула антисывороток к местным серотипам вируса инфекционного панкреатического некроза (IPNV), и инкубируют данный раствор в течение как минимум 1 часа при 15°C или максимум 18 часов при 4°C. Титр антисыворотки в реакции 50% нейтрализации бляшек должен быть не менее 1/2000.

Обработка всех инокулятов антисывороткой к IPN вирусу (вирусу, который в некоторых частях Европы присутствует в 50% образцов от рыбы) производится с целью предотвращения развития ЦПД, вызванного IPN вирусом, в инокулированных клеточных культурах. Это сокращает продолжительность вирусологического исследования, а также количество случаев, в которых наличие ЦПД будет считаться потенциально указывающим на присутствие VHS вируса. Когда образцы поступают с производственных площадок, которые считаются свободными от IPN, обработку инокулятов с помощью антисыворотки против IPN вируса можно не проводить.

#### *4.3.1.2.1.2. Инокулирование клеточных монослоев*

BF-2 клетки выращивают при 20–24°C в подходящей среде, например минимальная поддерживающая среда Игла (или её модификации) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и антибиотиков в стандартных концентрациях. При культивировании клеток в закрытых флаконах рекомендуется буферировать среду бикарбонатом. Среда, используемая для культивирования клеток в открытых сосудах, может быть буферирована с помощью Tris/HCl (23 мМ) и Na-бикарбоната (6 мМ), или с помощью HEPES-буферированной среды (HEPES = N-2-гидроксиэтил-пиперазин-N-2-этансерная кислота). Необходимо поддерживать рН на уровне  $7,6 \pm 0,2$ . Клеточные культуры, подлежащие инокулированию тканевым материалом, в момент инокуляции должны быть молодыми (4-48 часов) и активно растущими (не конфлюэнтными).

Обработанные антибиотиками органические суспензии инокулируют в клеточные культуры как минимум в двух разведениях, т.е. в первичном разведении и в разведении 1/10, что дает конечные разведения тканевого материала в клеточной культуральной среде в 1/100 и 1/1000, соответственно (в целях недопущения гомологичной интерференции). Соотношение размера инокулята и объема клеточной культуральной среды должно составлять примерно 1:10. Для каждого разведения и каждой клеточной линии следует использовать, как минимум, площадь клеток в 2 см<sup>2</sup>, что соответствует одной лунке на 24-луночной планшете для культивирования клеток. Рекомендуется использовать планшеты для культивирования клеток, но также допускается использование других установок с такой же или большей площадью роста.

#### *4.3.1.2.1.3. Инкубация культур клеток*

Инокулированные культуры клеток инкубируют при 15°C в течение 7–10 дней. При изменении цвета клеточной культуральной среды с красного на желтый, что указывает на закисление среды, следует произвести корректировку уровня рН с помощью стерильного бикарбонатного раствора или эквивалентных веществ для сохранения чувствительности клеток к инфицированию вирусом.

Как минимум каждые 6 месяцев или при возникновении подозрения в сниженной чувствительности клеток производится титрование

замороженных запасов VHS вируса в целях подтверждения чувствительности клеточных культур к инфекции вирусом.

#### *4.3.1.2.1.4. Микроскопия*

Инокулированные культуры клеток необходимо регулярно обследовать (не менее трех раз в неделю) на наличие ЦПД при 40–150 × увеличении. При наличии явного ЦПД, следует немедленно начать процедуры по идентификации вируса. Рекомендуется использовать фазово-контрастный микроскоп.

#### *4.3.1.2.1.5. Субкультивирование*

Если развитие ЦПД после первичной инкубации в течение 7-10 дней не наблюдается, проводят субкультивирование на свежих культурах клеток с использованием такой же площади клеток, что и в первичной культуре.

Аликвоты среды (супернатант) из всех культур/лунок, содержащих первичную культуру, объединяют в пул в соответствии с линией клеток через 7-10 дней после инокуляции. Затем данные пулы инокулируют в гомологичные культуры клеток и разводят 1:10 (в результате чего получают конечные разведения супернатанта 1:10 и 1:100, соответственно), как описано выше (Инокулирование клеточных монослоев).

Альтернативно, аликвоты 10% среды, содержащей первичную культуру, инокулируют прямо в лунку со свежей культурой клеток (субкультивирование из лунки-в лунку). Для образцов, отобранных от лососевых, перед инокуляцией можно провести предварительную инкубацию разведений с антисывороткой к IPNV в соответствующем разведении, как описано выше (Раздел 4.3.1.2.1.1. Выделение вируса).

Затем инокулированные культуры инкубируют в течение 7–10 дней при 15°C, производя их обследование, как указано выше (Раздел 4.3.1.2.1. Микроскопия). При наличии токсического ЦПД в течение первых трех дней инкубации, можно провести субкультивирование на этой стадии, но клетки затем необходимо культивировать в течение семи дней и снова подвергнуть субкультивированию с дальнейшей инкубацией в течение семи дней. Если развитие токсического ЦПД происходит через 3 дня, клетки можно пассировать один раз и инкубировать в течение такого периода времени, чтобы с момента первичной инокуляции прошло 14 дней. В течение последних семи дней инкубации признаки токсичности должны отсутствовать.

При наличии бактериальной контаминации, несмотря на обработку антибиотиками, перед субкультивированием необходимо произвести центрифугирование при 2000–4000 g в течение 15–30 минут при 2–5°C, и/или фильтрацию супернатанта через фильтр с размером пор в 0,45 мкм

(мембрана с низким связыванием белков). Кроме этого, процедуры субкультивирования являются такими же, как и при токсическом ЦПД.

При отсутствии ЦПД тест можно объявить отрицательным.

#### 4.3.1.2.1.6. Идентификация вируса

##### 4.3.1.2.1.6.1. Реакция нейтрализации

- i) Собрать культуральную среду клеточных монослоев, демонстрирующих ЦПД, и центрифугировать её при 2000 *g* в течение 15 минут при 4°C, или фильтровать через мембрану с размером пор в 0,45 мкм (или 450 нм) для удаления клеточного дебриса.
- ii) Приготовить разведения вирус-содержащей среды от 10<sup>-2</sup> до 10<sup>-4</sup>.
- iii) Смешать аликвоты (например, 200 мкл) каждого разведения с равными объемами раствора антител к VHSV и таким же образом обработать аликвоты каждого разведения вируса клеточной культуральной средой. Раствор нейтрализующих антител [Nab] должен иметь 50% нейтрализующий бляшки титр не менее 2000.
- iv) Параллельно, необходимо провести еще одну реакцию нейтрализации против гомологичного штамма вируса (положительная реакция нейтрализации).
- v) При необходимости сходную реакцию нейтрализации можно провести с использованием антител к IPNV.
- vi) Инкубировать все смеси при 15°C в течение 1 часа.
- vii) Перенести аликвоты каждой из указанных выше смесей на 24-48-часовые монослои с нанесенной на них клеточной культуральной средой, содержащей 10% фетальную телячью сыворотку (FCS) (каждое разведение инокулировать в две лунки) и инкубировать при 15°C; для этой цели подходят 24- или 12-луночные планшеты для культивирования клеток при использовании 50 мкл инокулята.
- viii) Обследовать культуры клеток на появление ЦПД, как только ЦПД проявится в ненейтрализованных контролях (клеточные монослои, защищенные в положительных контролях нейтрализации). Результаты регистрируют либо после простого микроскопического обследования (предпочтительно с использованием фазово-контрастного микроскопа), либо после удаления клеточной культуральной среды и окрашивания клеточных монослоев раствором 1% кристаллического фиолетового в 20% этаноле.
- ix) Тестируемый вирус идентифицируют как VHSV, когда в культурах клеток, в которые была внесена вирусная суспензия, обработанная VHSV-специфичными антителами, развития ЦПД не произошло или оно было значительно замедленным, тогда как во всех других культурах клеток ЦПД было явным.
- x) При отсутствии нейтрализации нейтрализующими антителами (Nab)

к VHS вирусу, следует обязательно провести IFAT, иммунопероксидазный тест, ИФА или ОТ-ПЦР с использованием подозрительного образца. Наблюдалось несколько случаев антигенного дрейфа поверхностного антигена, что время от времени приводило к неудаче при проведении реакции нейтрализации с использованием NAb к VHS вирусу.

В качестве альтернативы можно использовать другие реакции нейтрализации с доказанной эффективностью.

#### *4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов*

В течение нескольких лет для обнаружения VHS вируса были разработаны методы на основе антител для обнаружения антигенов, такие как IFAT, ИФА и различные иммуногистохимические процедуры. В целом, считается, что основными целевыми органами являются почки, сердце и селезенка. При использовании данных методов можно довольно быстро производить обнаружение и идентификацию по сравнению с процедурой выделения вируса в культуре клеток. Однако на результаты тестов могут оказывать влияние различные параметры, такие как чувствительность и специфичность антител и подготовка образцов, и отрицательные результаты должны рассматриваться с осторожностью. Данные методы не следует использовать при попытках обнаружения рыб-носителей.

##### *4.3.1.2.2.1. Непрямая реакция флуоресцирующих антител на отпечатках*

- i) Провести полное обескровливание рыбы.
- ii) Сделать отпечатки почки на очищенных предметных стеклах или на дне лунок пластиковых планшетов для культивирования клеток.
- iii) Хранить кусочки почки вместе с другими органами, необходимыми для процедуры выделения вируса, если данную процедуру понадобится провести позже.
- iv) Оставить отпечатки для высыхания на воздухе на 20 минут.
- v) Зафиксировать ацетоном или этанолом/ацетоном и высушить, как указано в разделе 4.3.1.2.2.3, этапы v–vii.
- vi) Регидратировать вышеуказанные препараты (см. Раздел 4.3.1.2.2.3, этап ix) и блокировать с помощью 5% обезжиренного молока или 1% бычьего сывороточного альбумина, в 0,01 М забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР), pH 7,2, содержащем 0,05% Tween-80 (PBST), в течение 30 минут при 37°C.
- vii) Промыть четыре раза с помощью PBST.
- viii) Обработать отпечатки раствором антител к VHSV и промыть, как указано в Разделе 4.3.1.2.2.3
- ix) Блокировать и промыть, как описано ранее в этапах vi и vii.
- x) Проявить реакцию с помощью подходящих флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ)-конъюгированных специфических антител,

промыть и исследовать, как указано в Разделе 4.3.1.2.2.3, этапы xii–xv.

- xi) Если тест отрицательный, подготовить образцы органов, хранящихся при 4°C, для проведения процедуры выделения вируса в культуре клеток, как описано выше.

#### 4.3.1.2.2.2. *Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) (модифицированный Olesen и Jørgensen, 1991)*

##### 4.3.1.2.2.2.1. *Процедура ИФА на материалах тканей*

*Процедуры отбора образцов:* см. Главу 2.3.0 и *Руководство МЭБ по надзору за здоровьем гидробионтов* (2009).

*Подготовка образцов органов:* см. Главу 2.3.0 и *Руководство МЭБ по надзору за здоровьем гидробионтов* (2009).

##### 4.3.1.2.2.2.2. *Необходимо следовать процедуре, описанной ниже (процедура ИФА на супернатанте клеточной культуры)*

- i) Оставить аликвоту 1/4 разведения каждого гомогената, если в будущем требуется проведение процедуры выделения вируса в культуре клеток.
- ii) Обработать оставшуюся часть гомогената с помощью 2% Triton X-100; осторожно перемешать.
- iii) Выполнить другие этапы (v–xiii) процедуры, описанной в «Процедуре ИФА на супернатанте культуры клеток».
- iv) Если тест отрицательный, подготовить образцы органов, хранящихся при 4°C, для проведения процедуры выделения вируса в культуре клеток, как описано выше.

##### 4.3.1.2.2.2.3. *Процедура ИФА на супернатанте культуры клеток*

- i) Сенсибилизировать лунки микропланшетов для проведения ИФА соответствующими разведениями очищенных от белка-A иммуноглобулинов (Ig) из кроличьей антисыворотки против VHSV, в карбонатном буфере, pH 9,6 (50 мкл лунка<sup>-1</sup>).
- ii) Инкубировать в течение ночи при 4°C.
- iii) Промыть 3ФР, содержащем 0,05% Tween-20 (PBST).
- iv) Добавить 1% Triton X-100 в суспензию вируса, подлежащего идентификации.
- v) Распределить по лункам, 50 мкл лунка<sup>-1</sup>, двух- или четырех-этапные разведения (в PBST, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин) вируса, подлежащего идентификации, и VHSV контрольного вируса, а также отрицательный контроль (например, вирус инфекционного некроза кроветворной ткани), и отставить для реагирования с сенсибилизирующими антителами к VHSV на один час при 37°.
- vi) Промыть с помощью PBST.

- vii) Добавить в лунки МАб к N белка VHS вируса (IP5B11), 50 мкл лунка<sup>-1</sup>.
- viii) Инкубировать в течение 1 часа при 37°C.
- ix) Промыть с помощью PBST.
- x) Добавить в лунки (50 мкл лунка<sup>-1</sup>) конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) моноклональные антитышине антитела.
- xi) Инкубировать в течение 1 часа при 37°C.
- xii) Промыть с помощью PBST.
- xiii) Визуализировать реакцию с помощью орто-фенилендиамина и измерить оптическую плотность при длине волны в 492 нм.

Вышеуказанный вариант ИФА приведен в качестве примера. Вместо него можно использовать другие варианты ИФА с доказанной эффективностью.

#### 4.3.1.2.2.3. *Непрямая реакция флуоресцирующих антител*

- i) Подготовить клеточные монослои в 2 см<sup>2</sup> лунках пластиковых планшетов для культивирования клеток или на покровных стеклах до получения примерно 80% конfluence, что обычно достигается в течение 24 часов инкубации при 22°C (посеять шесть клеточных монослоев для одного изолята вируса, подлежащего идентификации, плюс два для положительного и два для отрицательного контролей). Содержание FCS в клеточной культуральной среде можно снизить до 2–4%. Если необходимо идентифицировать большое количество изолятов вируса, настоятельно рекомендуется использовать Terasaki планшеты.
- ii) Когда клеточные монослои готовы для инфицирования, т.е. в тот же день или на следующий день после посева, внести вирусные суспензии, подлежащие идентификации, производя этапы десятикратных разведений прямо в лунках или сосудах с культурой клеток.
- iii) Произвести разведение контрольной вирусной суспензии VHSV таким же образом для получения титра вируса примерно в 5000–10000 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на мл<sup>-1</sup> в клеточной культуральной среде.
- iv) Инкубировать при 15°C в течение 24 часов.
- v) Удалить клеточную культуральную среду, промыть один раз 0,01 М забуференным фосфатом солевым раствором (ЗФР), рН 7,2, затем быстро три раза холодной смесью ацетона, 30%/этанола, 70% (в объемном отношении) (хранить при –20°C).
- vi) Оставить для фиксации на 15 минут. Объем в 0,5 мл соответствует 2 см<sup>2</sup> клеточного монослоя.
- vii) Оставить клеточные монослои для высыхания на воздухе примерно на 30 минут и произвести немедленное исследование или заморозить при –20°C.

- viii) Подготовить раствор очищенного анти-VHSV антитела или сыворотки в 0,01 М PBST, pH 7,2, в соответствующем разведении (которое следует определить заранее или которое указано поставщиком реагента).
- ix) Регидратировать высушенные клеточные монослои посредством четырех этапов промывания PBST раствором и полностью удалить данный буфер после последнего промывания.
- x) Обрабатывать клеточные монослои раствором антител в течение одного часа при 37°C во влажной камере и не допускать испарения, например, посредством добавления кусочка влажной ваты во влажную камеру. Объем используемого раствора должен составлять 0,25 мл 2 см<sup>-2</sup> лунка<sup>-1</sup>.
- xi) Промыть четыре раза с помощью PBST, как указано выше.
- xii) Обрабатывать клеточные монослои в течение одного часа при 37°C раствором флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТЦ)- или тетраметилродамин-5-(и-6-) изотиоцианат (TRITC)-конъюгированных антител к иммуноглобулину, использованному в качестве первичного антитела и приготовленным в соответствии с инструкциями поставщика. Такими конъюгированными антителами чаще всего являются кроличьи или козы антитела.
- xiii) Промыть четыре раза с помощью PBST.
- xiv) Немедленно провести исследование обработанных клеточных монослоев на пластиковых планшетах или произвести их заключение под покровные стекла с помощью, например, солевого раствора глицерина, pH 8,5, для микроскопического исследования.
- xv) Исследовать под падающим ультрафиолетовым светом, используя микроскоп с × 10 окулярами и × 20–40 линзами объектива с числовой апертурой >0,65 и >1,3, соответственно. Перед любым другим исследованием следует обследовать положительные и отрицательные контроли и убедиться, что они дают ожидаемые результаты.

Альтернативно могут быть использованы другие IFAT или иммуноцитохимические (щелочная фосфатаза или пероксидаза) методы с доказанной эффективностью.

#### *4.3.1.2.3. Молекулярные методы*

Широко используют молекулярные тесты (ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени) ввиду их быстроты, чувствительности и специфичности. Кроме того, в условиях существования различных штаммов с различными патогенными характеристиками, с учетом обнаружения разнообразных североамериканских, азиатских, европейских и атлантических морских штаммов, с помощью секвенирования ПЦР продуктов можно получить важные эпизоотологические данные (Einer-Jensen с соавт., 2002; Skall с соавт., 2005). Тесты методом ОТ-ПЦР в реальном времени, в целом, более чувствительны, чем тесты с помощью традиционной ОТ-ПЦР. Несмотря на

то, что эти тесты для обнаружения и идентификации вируса во время острой фазы болезни оправданно использовали в течение ряда лет, степень чувствительности и специфичности анализов ОТ-ПЦР в реальном времени по сравнению с процедурой выделения вируса в культуре клеток и последующей идентификацией была однозначно установлена лишь недавно (Garver с соавт., 2011; Jonstrup с соавт., 2013). Выявлено, что эти два анализа подходят для идентификации VHS вируса всех генотипов.

В момент написания (2011), нельзя было рекомендовать использование петлевой изотермической амплификации (LAMP) для VHSV в качестве общего анализа для выявления VHSV, поскольку единственный опубликованный LAMP анализ не был валидирован относительно всех генотипов и при выравнивании последовательностей, вероятно, что опубликованный LAMP анализ не будет распознавать все генотипы (Soliman & El-Matbouli, 2006).

#### *4.3.1.2.3.1. Подготовка вирусной РНК*

Все работы с РНК следует производить на льду и в перчатках.

Отобрать аликвоты культуральной среды из клеток инфицированного монослоя, демонстрирующих ЦПД. Центрифугировать при 1000 g в течение 5 минут для удаления клеточного дебриса.

РНК экстрагируют с помощью метода фенол-хлороформа или РНК аффинных спин-колонок в соответствии с инструкциями производителя. РНК необходимо ресуспендировать в дистиллированной не содержащей РНазу воде (например, вода, обработанная 0,1% диэтилпиروкарбонатом).

#### *4.3.1.2.3.2. Традиционная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)*

ОТ-ПЦР амплификацию можно произвести в один или два этапа. В основе обеих процедур лежит этап ПЦР амплификации с использованием праймеров: 5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3' (VN forward (прямой)) и 5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3' (VN reverse (обратный)) (Snow с соавт., 2004). VN forward и VN reverse праймеры созданы для амплификации области, соответствующей основаниям 1–505 N-гена VHS вируса (Snow с соавт., 2004).

**ПРИМЕЧАНИЕ:** При использовании данных праймеров может не происходить распознавание изолятов вируса генотипа IVb; поэтому рекомендуется производить подтверждение результатов с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени или методов на основе антител.

##### *4.3.1.2.3.2.1. Одноэтапная ОТ-ПЦР*

Анализ методом ОТ-ПЦР в 50 мкл одной пробирке можно провести с использованием, например, Qiagen одноэтапной ОТ-ПЦР системы (Qiagen, Германия), в соответствии с инструкциями изготовителя. Вкратце, реакционная смесь состоит из: 5 мкл экстрагированной вирусной РНК, 2 мкл

10 мМ dNTP, 10 мкл 5 × ОТ-ПЦР реакционного буфера (с 12,5 мМ MgCl<sub>2</sub>) и 2 мкл ферментативной смеси. ОТ-ПЦР можно провести с помощью VN forward (прямой) и VN reverse (обратный) праймеров в итоговой концентрации в 0,6 мкМ каждый. Рекомендуется провести следующие циклы: 50°C в течение 30 минут, 95°C в течение 15 минут, 35 циклов при 94°C в течение 30 секунд, 55°C в течение 30 секунд, и 68°C в течение 60 секунд. Впоследствии, реакцию проводят при 68°C в течение 7 минут.

#### 4.3.1.2.3.2.2. Двухэтапная ОТ-ПЦР

Синтез 20 мкл кДНК можно провести с использованием, например, iScript cDNA Synthesis Kit (набор для синтеза кДНК) (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями производителей. Вкратце, реакционная смесь состоит из: 5 мкл экстрагированной вирусной РНК, 4 мкл 5× iScript реакционной смеси, 1 мкл iScript обратной транскриптазы, и 10 мкл не содержащей нуклеазу воды. Инкубировать образцы по следующей программе: 25°C в течение 5 минут, 42°C в течение 30 минут, 85°C в течение 5 минут. Использовать 5 мкл для ПЦР.

После синтеза сДНК (описанного выше) можно провести 25 мкл ПЦР, используя, например, Go Taq Flexi полимеразу (Promega), в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, реакционная смесь состоит из: 5 мкл кДНК; 11,125 мкл Milli Q воды; 5 мкл 5× Green GoTaq Flexi буфера; 2,5 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,5 мкл VN forward (10 мкМ); 0,5 мкл VN reverse (10 мкМ); 0,25 мкл 25 мкМ (каждого) dNTP; 0,125 мкл Go Taq Flexi ДНК полимеразы. Инкубировать образцы, используя следующую программу: 94°C в течение 5 минут, 36 циклов при 94°C в течение 30 секунд, 55°C в течение 30 секунд, и 68°C в течение 60 секунд. Впоследствии, реакцию проводят при 68°C в течение 7 минут.

Количество и специфичность одноэтапной и двухэтапной ОТ-ПЦР реакций можно оценить с помощью гель-электрофореза 1/10 реакции в 1,5% агарозном геле с этидиум бромидом и исследовать с помощью УФ просвечивания.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** ПЦР может варьировать в зависимости от условий, в которых она проводится, например, возможно понадобится оптимизация протоколов термоциклинга в зависимости от используемого термоциклера. Более того, могут наблюдаться ложноположительные результаты ввиду, например, отжига ложного праймера или лабораторной контаминации. Следует также соблюдать осторожность, когда вирус выращивают в ВФ-2 клетках, поскольку в редких случаях может наблюдаться ложная положительная полоса размером лишь незначительно меньшим, чем истинная VHSV полоса. Поэтому, важно включать адекватные положительные и отрицательные контроли и обязательно секвенировать ампликоны, если имеются какие-либо сомнения.

#### 4.3.1.2.3.3. ОТ-ПЦР в реальном времени

ОТ-ПЦР амплификацию можно провести, используя праймеры/зонд, адаптированные из Jonstrup с соавт., 2013: прямой праймер: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3'; обратный праймер: 5'-TCT-GCG-ATC-

TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3'; и зонд: 5'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1. Эти праймеры нацелены на нуклеотиды 532–608 в соответствии с номером доступа в GenBank Z93412. Альтернативно, можно адаптировать праймеры/зонд из Garver с соавт., 2011: прямой праймер (2F): 5'-ATG-AGG-CAG-GTG-TCG-GAG-G-3'; обратный праймер (2R): 5'-TGT-AGT-AGG-ACT-CTC-CCA-GCA-TCC-3'; и зонд (2-MGB): 5'-FAM-TAC-GCC-ATC-ATG-ATG-AGT-MGBNFQ-3', нацеленные на нуклеотиды 787–868, в соответствии с номером доступа в GenBank Z93412.

#### *4.3.1.2.3.3.1. Одноэтапная ОТ-ПЦР в реальном времени*

ОТ-ПЦР 25 мкл в одной пробирке можно провести, используя, например, Quantitect Probe RT-PCR kit (ОТ-ПЦР набор с зондом) (Qiagen, Германия), в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, реакционная смесь состоит из: 5 мкл экстрагированной вирусной РНК (приблизительно 0,05–2 мкг), 12,5 мкл 2×кОТ-ПЦР мастер-микса и 0,25 мкл ОТ/РНАзной блокирующей ферментативной смеси. ОТ-ПЦР в реальном времени можно проводить, используя прямой и обратный праймеры в итоговой концентрации 0,9 мкМ каждый, и зонд в итоговой концентрации 0,25 мкМ. ПЦР программа зависит от используемого набора и оборудования для ПЦР в реальном времени. Для mx3005p (Stratagene) с использованием Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen, Германия) используют следующую программу: 50°C в течение 30 минут, 95°C в течение 15 минут, 40 циклов при 94°C в течение 15 секунд, 60°C в течение 40 секунд, 72°C в течение 20 секунд, в случае использования разной платформы и/или набора, следует произвести корректировки, если это необходимо.

Просим обратить внимание на то, что чувствительность анализов ОТ-ПЦР в реальном времени очень во многом зависит используемого набора (см. Jonstrup с соавт., 2013 для дополнительной информации).

#### **4.3.2. Серологические методы**

Надзор, базирующийся на серологических тестах, имеет ряд преимуществ по сравнению с процедурой выделения вируса, особенно в случаях, когда температура воды слишком высокая для проведения процедуры выделения вируса, и в эндемично инфицированных популяциях без клинических признаков болезни. Однако гуморальный иммунный ответ впервые может быть обнаружен через 3-4 недели после инфицирования. С другой стороны, высокие уровни антител могут сохраняться в течение длительного времени: > 6 месяцев после инфицирования (Fregeneda-Grandes & Olesen, 2007; Lapatra, 1996; Lorenzen & Lapatra, 1999). Недостатком серологических методов является медленная выработка антител у рыбы после инфицирования, особенно при низких температурах воды. В настоящее время производится итоговая оценка чувствительности, специфичности тестов и воспроизводимости серологических методов для обнаружения у рыбы антител против VHS вируса. После надлежащей оценки и валидации данные методы будут вставлены в текст данной главы.

## 5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

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

*Таблица 5.1. Методы для надзора, обнаружения и диагностики*

Метод	Целевой надзор			Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	d	d	b	d
Гистопатология	d	d	d	b	d
Трансмиссионная электронная микроскопия	d	d	d	c	d
Выделение в культуре клеток с последующим исследованием одним из идентификационных методов	a	a	a	a	a
Анализ на основе антител	d	d	d	b	a
Традиционная ОТ-ПЦР с последующим секвенированием	c	c	c	b	a
ОТ-ПЦР в реальном времени	c	c	c	a	a

ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

## 6. Тесты, рекомендованные для целевого надзора в целях объявления свободы от вирусной геморрагической септицемии (VHS)

Тест, рекомендованный для целевого надзора, представляет собой культивирование образцов ткани рыбы в BF-2 клетках с последующей идентификацией с помощью

иммунохимических тестов или тестов на основе нуклеиновых кислот, как описано в Разделе 4 данной главы.

## **7. Критерии подтверждающей диагностики**

### **7.1. Дефиниция подозрительного случая**

Присутствие VHSV следует подозревать при соответствии как минимум одному из нижеследующих критериев:

- i) Наличие VHS-сообразных поражений выявленных при патологоанатомическом исследовании, при наличии или отсутствии клинических признаков болезни. Выявленные при патологоанатомическом исследовании поражения и клинические признаки должны соответствовать таковым, описанным в Разделах 4.1. и 4.2 данной главы;
- ii) VHSV-типичное ЦПД в культурах клеток до подтверждения;
- iii) Если в ходе эпизоотологического расследования выявлены эпизоотологические связи с фермами, на которых подозревается или подтверждено наличие VHS: обнаружение антител к VHS вирусу у рыбы.

Подозрение на наличие VHS можно исключить, если продолжающиеся расследования не выявили никаких дополнительных доказательств присутствия патогена.

### **7.2. Дефиниция подтвержденного случая**

Присутствие VHS вируса считается подтвержденным, если, дополнительно к критериям, указанным в Разделе 7.1., наблюдается соответствие одному или нескольким нижеследующим критериям:

- i) Выделение VHS вируса производится в культуре клеток с последующей идентификацией вируса либо с помощью теста на основе антител (IFAT, ИФА, реакция нейтрализации, иммуногистохимия) и/или ОТ-ПЦР с последующим секвенированием ампликона, либо с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени;
- ii) VHS вирус выявлен в тканях или тканевых препаратах посредством иммунологического анализа с использованием специфических антител к VHS вирусу;
- iii) Обнаружение VHS вируса в тканевых препаратах посредством ОТ-ПЦР с последующим секвенированием ампликона или посредством ОТ-ПЦР в реальном времени.

Подтверждение первого случая VHS на фермах, находящихся в неинфицированных зонах или компартментах, не должно основываться только на критериях пунктов ii) или iii).

Материал тканей для вирусологического исследования может, в некоторых случаях, сопровождаться дополнительным материалом для бактериологического, паразитологического, гистологического или другого исследования в целях проведения дифференциальной диагностики.

## 8. Список литературы

- AHNE W. (1982). Vergleichende Untersuchung über die Stabilität von vier fischpathogenen Viren (VHSV, PFR, SVCV, IPNV) (Comparative studies on the stability of four fish-pathogenic viruses [VHSV, PFR, SVCV, IPNV]). *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **29**, 457–476.
- AL-HUSSINEE L., HUBER P., RUSSELL S., LEPAGE V., REID A., YOUNG K.M., NAGY E., STEVENSON R.M.W. & LUMSDEN J.S. (2010). Viral haemorrhagic septicaemia virus IVb experimental infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and fathead minnow, *Pimphales promelas* (Rafinesque). *J. Fish Dis.*, **33**, 347–360.
- AL-HUSSINEE L., LORD S., STEVENSON R.M.W., CASEY R.N., GROOCOCK G.H., BRITT K.L., KOHLER K.H., WOOSTER G.A., GETCHELL R.G., BOWSER P.R. & LUMSDEN J.S. (2011). Immunohistochemistry and pathology of multiple Great Lakes fish from mortality events associated with viral hemorrhagic septicemia virus type IVb. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 117–127.
- ARIEL E. & OLESEN N.J. (2001). Assessment of a commercial kit collection for diagnosis of the fish viruses: IHNV, IPNV, SVCV and VHSV. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **21**, 6–11.
- ARKUSH K.D., MENDONCA H.L., MCBRIDE A.M., YUN S., MCDOWELL T.S. & HEDRICK R.P. (2006). Effects of temperature on infectivity and of commercial freezing on survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.*, **69**, 145–151.
- BARONI A., GALESSO R. & BOVO G. (1982). Ultrastructural observations on the virus of viral haemorrhagic septicaemia in culture. *J. Fish Dis.*, **5**, 439–444.
- BOVO G., HÅSTEIN T., HILL B., LAPATRA S., MICHEL C., OLESEN N.J., SHCHELKUNOV I., STORSET A., WOLFFFROM T. & MIDTLYNG P.J. (2005a). QLK2-CT-2002-01546: Fish Egg Trade Work package 1 report: Hazard identification for vertical transfer of fish disease agents, 1-35. VESO, P.O. Box 8109, Dep., N-0032 Oslo, Norway. Available at: [http://www.eurl-fish.eu/-/media/Sites/EURL-FISH/english/activities/scientific%20reports/fisheggtrade%20wp\\_1.ashx?la=da](http://www.eurl-fish.eu/-/media/Sites/EURL-FISH/english/activities/scientific%20reports/fisheggtrade%20wp_1.ashx?la=da)
- BOVO G., HILL B., HUSBY A., HÅSTEIN T., MICHEL C., OLESEN N.J., STORSET A. & MIDTLYNG P.J. (2005b). Fish Egg Trade Work package 3 report: Pathogen survival outside the host, and susceptibility to disinfection, 1-53. VESO, P.O. Box 8109 Dep., N-0032 Oslo, Norway. Available at: [http://www.eurl-fish.eu/-/media/Sites/EURL-FISH/english/activities/scientific%20reports/fisheggtrade%20wp\\_3.ashx?la=da](http://www.eurl-fish.eu/-/media/Sites/EURL-FISH/english/activities/scientific%20reports/fisheggtrade%20wp_3.ashx?la=da)
- BREMONT M. (2005). Reverse genetics on fish rhabdoviruses: tools to study the pathogenesis of fish rhabdoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **292**, 119–141.
- DALE O.B., ØRPETVEIT I., LYGSTAD T.M., KAHNS S., SKALL H.F., OLESEN N.J. & DANNEVIG B.H. (2009). Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 93–103.
- DORSON M., QUILLET E., HOLLEBECQ M.G., TORHY C. & CHEVASSUS B. (1995). Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Vet. Res.*, **26**, 361–368.

- EINER-JENSEN K., AHRENS P., FORSBERG R. & LORENZEN N. (2004). Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.*, **85**, 1167–1179.
- EINER-JENSEN K., AHRENS P. & LORENZEN N. (2005). Parallel phylogenetic analyses using the N, G or Nv gene from a fixed group of VHSV isolates reveal the same overall genetic typing. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 39–45.
- EINER-JENSEN K., BJÖRKLUND H., ORESHKOVA S., SHCHELKUNOV I., VESELY T. & LORENZEN N. (2002). Detection and typing of fish viruses. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **22**, 158–165.
- ELSAYED E., FAISAL M., THOMAS M., WHELAN G., BATTIS W. & WINTON J. (2006). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *J. Fish Dis.*, **29**, 611–619.
- ENZMANN P.J. & KONRAD M. (1985). Inapparent infections of brown trout with VHS-virus. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **5**, 81–83.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2008). Scientific Opinion of the panel on AHAW on a request from the European Commission on aquatic animal species susceptible to diseases listed in the Council Directive 2006/88/EC. *The EFSA Journal*, **808**, 1–144.
- EVENSEN Ø., MEIER W., WAHLI T., OLESEN N.J., JØRGENSEN P.E.V. & HÅSTEIN T. (1994). Comparison of immunohistochemistry and virus cultivation for detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **20**, 101–109.
- FAISAL M. & SCHULZ C.A. (2009). Detection of Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from the leech *Myzobdella lugubris* Leidy, 1851. *Parasit. Vectors*, **2**, 45.
- FAISAL M. & WINTERS A.D. (2011). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from *Diporeia* spp. (*Pontoporeiidae*, *Amphipoda*) in the Laurentian Great Lakes, USA. *Parasit. Vectors*, **4**, 2.
- FREGENEDA-GRANDES J.M. & OLESEN N.J. (2007). Detection of rainbow trout antibodies against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) by neutralisation test is highly dependent on the virus isolate used. *Dis. Aquat. Org.*, **74**, 151–158.
- GADD T., JAKAVA-VILJANEN M., EINER-JENSEN K., ARIEL E., KOSKI P. & SIHVONEN L. (2010). Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype II isolated from European river lamprey *Lampetra fluviatilis* in Finland during surveillance from 1999 to 2008. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 189–198.
- GARVER K.A., HAWLEY L.M., MCCLURE C.A., SCHROEDER T., ALDOUS S., DOIG F., SNOW M., EDES S., BAYNES C. & RICHARD J. (2011). Development and validation of a reverse transcription quantitative PCR for universal detection of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 97–112.
- GOODWIN A.E. & MERRY G.E. (2011). Mortality and carrier status of bluegills exposed to viral hemorrhagic septicemia virus genotype IVb at different temperatures. *J. Aquat. Anim.*

*Health*, **23**, 85–91.

GROOCOCK G.H., GETCHELL R.G., WOOSTER G.A., BRITT K.L., BATTIS W.N., WINTON J.R., CASEY R.N., CASEY J.W. & BOWSER P.R. (2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia in round gobies in New York State (USA) waters of Lake Ontario and the St. Lawrence River. *Dis. Aquat. Org.*, **76**, 187–192.

HAWLEY L.M. & GARVER K.A. (2008). Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 171–178.

HEDRICK R.P., BATTIS W.N., YUN S., TRAXLER G.S., KAUFMAN J. & WINTON J.R. (2003). Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 211–220.

HENRYON M., BERG P., OLESEN N.J., KJÆR T.E., SLIERENDRECHT W.J., JOKUMSEN A. & LUND I. (2005). Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture*, **250**, 621–636.

HENRYON M., JOKUMSEN A., BERG P., LUND I., PEDERSEN P.B., OLESEN N.J. & SLIERENDRECHT W.J. (2002a). Erratum to “Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout” (*Aquaculture*, 2002, **209**, 59–76). *Aquaculture*, **216**, 389–390.

HENRYON M., JOKUMSEN A., BERG P., LUND I., PEDERSEN P.B., OLESEN N.J. & SLIERENDRECHT W.J. (2002b). Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. *Aquaculture*, **209**, 59–76.

ISSHIKI T., NISHIZAWA T., KOBAYASHI T., NAGANO T. & MIYAZAKI T. (2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 87–99.

ITO T., OLESEN N.J., SKALL H.F., SANO M., KURITA J., NAKAJIMA K. & IIDA T. (2010). Development of a monoclonal antibody against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype IVa. *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 17–27.

JONSTRUP S.P., KAHNS S., SKALL H.F., BOUTRUP T.S. & OLESEN N.J. (2013). Development and validation of a novel Taqman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Fish Dis.*, **36** (1), 9–23.

JØRGENSEN P.E.V. (1982). Egtved virus: occurrence of inapparent infections with virulent virus in free-living rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at low temperature. *J. Fish Dis.*, **5**, 251–255.

KANE-SUTTON M., KINTER B., DENNIS P.M. & KOONCE J.F. (2010). Viral hemorrhagic septicemia virus infection in yellow perch, *Perca flavescens*, in Lake Erie. *J. Great Lake Res.*, **36**, 37–43.

KIM R. & FAISAL M. (2010). Experimental studies confirm the wide host range of the Great Lakes viral haemorrhagic septicaemia virus genotype IVb. *J. Fish Dis.*, **33**, 83–88.

- KIM S.M. & PARK S.I. (2004). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in wild marine fishes in the coastal region of Korea *J. Fish Pathol.*, **17**, 1–10.
- KOCAN R., BRADLEY M., ELDER N., MEYERS T.R., BATTS W.N. & WINTON J.R. (1997). North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus is highly pathogenic for laboratory-reared pacific herring. *J. Aquat. Anim. Health*, **9**, 279–290.
- KOCAN R.M., HERSHBERGER P.K., ELDER N.E. & WINTON J.R. (2001). Survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in filtered seawater and seawater containing ovarian fluid, crude oil and serum-enriched culture medium. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 75–78.
- LAPATRA S.E. (1996). The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **6**, 15–28.
- LEE W.L., YUN H.M., KIM S.R., JUNG S.J. & OH M.J. (2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from marine fish in the South Western Coastal Area and East China Sea. *J. Fish Pathol.*, **20**, 201–209.
- LÓPEZ-VÁZQUEZ C., CONDE M., DOPAZO C.P., BARJA J.L. & BANDÍN I. (2011). Susceptibility of juvenile sole *Solea senegalensis* to marine isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus from wild and farmed fish. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 111–116.
- LÓPEZ-VÁZQUEZ C., RAYNARD R.S., BAIN N., SNOW M., BANDÍN I. & DOPAZO C.P. (2006). Genotyping of marine viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from the Flemish Cap by nucleotide sequence analysis and restriction fragment length polymorphism patterns. *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 23–31.
- 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. & LAPATRA S.E. (1999). Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response. *Fish Shellfish Immunol.*, **9**, 345–360.
- LORENZEN N. & LAPATRA S.E. (2005). DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 201–213.
- LORENZEN N., OLESEN N.J. & VESTERGÅRD JØRGENSEN P.E. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. *Dis. Aquat. Org.*, **4**, 35–42.
- LUMSDEN J.S., MORRISON B., YASON C., RUSSELL S., YOUNG K., YAZDANPANA A., HUBER P., AL-HUSSINEE L., STONE D. & WAY K. (2007). Mortality event in freshwater drum *Aplodinotus grunniens* from Lake Ontario, Canada, associated with viral haemorrhagic septicemia virus, Type IV. *Dis. Aquat. Org.*, **76**, 99–111.
- MEIER W. & JØRGENSEN P.E.V. (1980). Isolation of VHS virus from pike fry (*Esox lucius*) with hemorrhagic symptoms. *In: Fish Diseases, Third COPRAQ Session, Ahne W., ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany and New York, USA*, 8–17.
- MEYERS T.R., SHORT S. & LIPSON K. (1999). Isolation of the North American strain of viral

hemorrhagic septicemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality in two new host species of Alaskan marine fish. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 81–86.

MEYERS T.R. & WINTON J.R. (1995). Viral hemorrhagic septicemia virus in North America. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **5**, 3–24.

NISHIZAWA T., IIDA H., TAKANO R., ISSHIKI T., NAKAJIMA K. & MUROGA K. (2002). Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 143–148.

NISHIZAWA T., SAVAS H., ISIDAN H., ÜSTÜNDAG C., IWAMOTO H. & YOSHIMIZU M. (2006). Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from free-living turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2373–2378.

OLESEN N.J. (1998). Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *J. Appl. Ichthyol.*, **14**, 173–177.

OLESEN N.J. & JØRGENSEN P.E.V. (1991). Rapid detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in fish by ELISA. *J. Appl. Ichthyol.*, **7**, 183–186.

OLESEN N.J. & KORSHOLM H. (1997). Control measures for viral diseases in aquaculture: eradication of VHS and IHN. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **17**, 229–233.

OLESEN N.J., LORENZEN N. & JØRGENSEN P.E.V. (1993). Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 163–170.

OLESEN N.J. & VESTERGÅRD JØRGENSEN P.E. (1982). Can and do herons serve as vectors for Egtved virus? *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **2**, 48.

OLESEN N.J. & VESTERGÅRD JØRGENSEN P.E. (1992). Comparative susceptibility of three fish cell lines to Egtved virus, the virus of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 235–237.

PARRY L. & DIXON P.F. (1997). Stability of nine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates in seawater. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **17**, 31–36.

PEDDIE S., MCLAUCHLAN P.E., ELLIS A.E. & SECOMBES C.J. (2003). Effect of intraperitoneally administered IL-1b-derived peptides on resistance to viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 195–200.

PETERS F. & NEUKIRCH M. (1986). Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron, *Ardea cinerea*. *J. Fish Dis.*, **9**, 539–544.

ROSS K., MCCARTHY U., HUNTLY P.J., WOOD B.P., STUART D., ROUGH E.I., SMAIL D.A. & BRUNO D.W. (1994). An outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus maximus*) in Scotland. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **14**, 213–214.

SCHLOTTFELDT H.J. & AHNE W. (1988). Epizootics in brown trout (*Salmo trutta fario*) caused by VHSV-F1. *J. Appl. Ichthyol.*, **4**, 147–148.

- SCHLOTTFELDT H.J., AHNE W., JØRGENSEN P.E.V. & GLENDE W. (1991). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) – a natural outbreak. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **11**, 105–107.
- SKALL H.F., OLESEN N.J. & MELLERGAARD S. (2005). Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming - a review. *J. Fish Dis.*, **28**, 509–529.
- SMAIL D.A. & SNOW M. (2011). Viral Haemorrhagic Septicaemia. *In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Second Edition.* Woo P.T.K. & Bruno D.W. eds. CABI, Wallingford, UK, 110–142.
- SNOW M., BAIN N., BLACK J., TAUPIN V., CUNNINGHAM C.O., KING J.A., SKALL H.F. & RAYNARD R.S. (2004). Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 11–21.
- SNOW M., CUNNINGHAM C.O., MELVIN W.T. & KURATH G. (1999). Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. *Virus Res.*, **63**, 35–44.
- SOLIMAN H. & EL-MATBOULI M. (2006). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS) *Vet. Microbiol.*, **114**, 205–213.
- STONE D.M., FERGUSON H.W., TYSON P.A., SAVAGE J., WOOD G., DODGE M.J., WOOLFORD G., DIXON P.F., FEIST S.W. & WAY K. (2008). The first report of viral haemorrhagic septicaemia in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in the United Kingdom. *J. Fish Dis.*, **31**, 775–784.
- TAKANO R., NISHIZAWA T., ARIMOTO M. & MUROGA K. (2000). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **20**, 186–192.
- THOMPSON T.M., BATTS W.N., FAISAL M., BOWSER P., CASEY J.W., PHILLIPS K., GARVER K.A., WINTON J. & KURATH G. (2011). Emergence of viral hemorrhagic septicemia virus in the North American Great Lakes region is associated with low viral genetic diversity. *Dis. Aquat. Org.*, **96** (1), 29–43.
- TRAXLER G.S., KIESER D. & RICHARD J. (1999). Mass mortality of pilchard and herring associated with viral hemorrhagic septicemia virus in British Columbia, Canada. *Fish Health Sect. Am. Fish Soc. Newslett.*, **27**, 3–4.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2008). Species affected by the Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS). Amended Federal Order, Available at: [http://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/animal\\_dis\\_spec/aquaculture/downloads/vhs\\_fed\\_order\\_amended.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_dis_spec/aquaculture/downloads/vhs_fed_order_amended.pdf).
- UNITED STATES DEPARTMENT OF THE INTERIOR (2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus. USGS FS 2007-3055. US Department of the Interior, US Geological Survey. Fact Sheets.
- WALKER P.J., BENMANSOUR A., DIETZGEN R., FANG R.X., JACKSON A.O., KURATH G., LEONG J.C., NADIN-DAVIS S.A., TESH R.B. & TORDO N. (2000). Family *Rhabdoviridae*. *In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report*

of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. с соавт., eds. Academic Press, San Diego, USA and London, UK, 563–583.

WOLF K. (1988). Viral hemorrhagic septicemia. *In*: Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 217–249.

\*

\*       \*

**NB:** Имеется Референтная лаборатория МЭБ по вирусной геморрагической септицемии (см. таблицу в конце данного *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>)

Просим обращаться в Референтные лаборатории МЭБ для получения любой дополнительной информации по вирусной геморрагической септицемии.