

ГЛАВА 2.3.11.

Болезнь, вызываемая вирусом *ONCORHYNCHUS MASOU*

1. Предмет рассмотрения¹

Болезнь, вызываемая вирусом *Oncorhynchus masou* (OMVD) – это онкогенное и кожно-язвенное состояние, которое сочетается с гепатитом, у лососевых рыб в Японии и, по всей вероятности, в прибрежных реках на территории восточной Азии, которые являются прибежищем тихоокеанского лосося.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Этиологическим возбудителем является вирус *Oncorhynchus masou* (OMV), входящий в семейство *Herpesviridae*; впрочем, ему также было присвоено такое название, как вирус нерки озера Товада, префектура Акита и Амори (NeVTA), вирус опухоли ямаме (YTV), вирус опухоли кижуча (CSTV, COTV), вирус *O. kisutch* (OKV), герпесвирус кижуча (CHV), почечный вирус радужного лосося (RKV) и герпесвирус радужной форели (RHV) (Yoshimizu с соавт., 1995).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Значительное снижение инфекционных титров OMV наблюдалось в пределах 3 и 7 дней в природных водах при температуре 15°C и 10°C, соответственно. Тем не менее, инфекционная активность сохранялась в течение 7–14 дней при температуре ниже 5°C (Yoshimizu с соавт., 2005), указывая на подтверждение присутствия в воде бактериальных штаммов, обладающих антивирусной активностью.

2.1.3. Стабильность возбудителя (описание эффективных методов инактивации)

Свободные от патогенов водоисточники часто имеют существенно важное значение в аквакультуре. Поступающая из рек или озер вода, которая обычно используется в инкубаториях, содержит патогены рыб. Такие открытые водные ресурсы не следует использовать без обработки в целях уничтожения патогенов рыб. Вирусы, поражающие рыб, делятся на две группы в зависимости от чувствительности к УФ. OMV относится к чувствительной группе и инактивируется посредством обработки дозой ультрафиолета 10⁴ мкВт секунда см⁻² (Yoshimizu с соавт., 1986). При температуре 15°C в течение 20 минут минимальные концентрации, демонстрирующие 100% сокращение бляшек OMV под действием йодофора, раствора гипохлорита натрия, раствора бензалкония хлорида, мыльного раствора крезола, раствора формальдегида и раствора калия перманганата, составляли 40, 50, 100, 100, 3500 и 16 мг литр⁻¹, соответственно (Hatori с соавт., 2003).

¹ NB: Версия, принятая Всемирной ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2013 года. Данная болезнь больше не включена в список МЭБ.

OMV является термо-, эфир- и кислото (рН 3)-лабильным и не гемагглютинирует О-клетки человека. Он полностью инактивируется ультрафиолетовым (УФ) облучением в дозе $3,0 \times 10^3$ мкВт секунда см⁻². В присутствии 50 мкг мл⁻¹ аналога пиримидина, 5-йоддезоксисуридина (IUdR), происходит ингибирование репликации. Ингибирование репликации вируса происходит под действием противогерпесвирусных средств, таких как фосфоноацетат (РА), ацикловир (АСV), (Е)-5-(2-бромовинил-2'-дезоксисуридин (BVdU) и 1-В-D-арабино-фураносилцитозин (Ага-С), что обусловлено ингибированием ДНК-полимеразы, индуцируемой OMV (Kimura с соавт., 1981а; Kimura с соавт., 1983а; Kimura et al., 1983b).

2.1.4. Жизненный цикл

Вслед за стадией септицемии инфекции OMV возникает иммунный ответ, в результате чего происходит синтез нейтрализующих антител к OMV. Нередко имеет место статус вирусоносительства, что приводит к выделению вируса через половые продукты во время нереста.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды-хозяева (общепринятые и латинские названия)

К видам рыб, которые являются восприимчивыми к OMV, относятся: лосось кокани (нерка) (*Oncorhynchus nerka*), сима (масу) (*O. masou*), кета (*O. keta*), кижуч (*O. kisutch*) и радужная форель (*O. mykiss*) (Kimura с соавт., 1983с).

2.2.2. Восприимчивые стадии развития хозяина

Возраст рыбы имеет критическое значение, и 1-месячные мальки с желточным мешком представляют собой наиболее уязвимую мишень для вирусной инфекции (Kimura с соавт., 1981b; Kimura с соавт., 1983с). Основным фактором окружающей среды, который создает благоприятные условия для инфекции OMV, является низкая температура воды – ниже 15°C (Kumagai с соавт., 1994).

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность обнаружения)

Лососевые являются единственными видами рыб, восприимчивыми к инфекции OMV, при этом последовательность видов рыб от наиболее восприимчивых до наименее восприимчивых такова: кокани, кета, сима, кижуч и радужная форель (Kimura с соавт., 1983а).

2.2.4. Целевые органы и инфицируемая ткань

С клинической точки зрения, первоначальная инфекция OMV проявляется как генерализованная и часто смертельная инфекция, сопровождающаяся отеком и геморагиями. Клинические признаки обусловлены размножением вируса в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров, гематопозитической ткани и гепатоцитах. Четыре месяца спустя после этого первого клинического состояния варьирующее количество остающихся в живых рыб демонстрируют эпителиому, которая возникает, главным образом, вокруг рта (верхняя и нижняя челюсть) и, в меньшей степени, на хвостовом плавнике, жаберной крышке и поверхности тела

(Kimura с соавт., 1981a; Yoshimizu с соавт., 1987). Эта неоплазия может сохраняться в течение до 1 года после инфицирования. Что касается кижуча, инфицированные рыбы в возрасте 1 года, в частности, демонстрируют язвы на коже, белые пятна на печени и неопластические ткани вокруг ротовых частей или по всей поверхности тела. Среди радужной форели были инфицированы рыбы коммерческого размера, и больные рыбы не демонстрировали почти никаких внешних признаков, хотя у некоторых рыб обнаруживались язвенные поражения на коже. Что касается внутренних органов, наблюдаются кишечная геморрагия и белые пятна на печени (Furihata с соавт., 2003).

2.2.5. Персистентная инфекция пожизненными носителями

В естественных условиях, особи, выжившие после болезни, вызываемой OMV (OMVD), являются персистентно инфицированными вирусом и выделяют вирус, и вирус сохраняется у рыб вплоть до достижения зрелости (Yoshimizu с соавт., 1993).

2.2.6. Переносчики

Вода является основным абиотическим переносчиком. Тем не менее, переносчики-живые организмы, например, другие виды рыб, паразитические беспозвоночные и рыбоядные птицы и млекопитающие, также могут участвовать в передаче.

2.2.7. Известные или подозреваемые дикие водные животные-носители

У сим, выловленных в устье реки, наблюдалась неоплазия вокруг рта, а из опухолей был выделен OMV. Не так давно радужные форели, живущие в реке и которые, возможно, ушли с ферм, были инфицированы OMV и погибли (Furihata с соавт., 2003; Yoshimizu & Nomura, 2001).

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Резервуарами OMV являются клинически инфицированные рыбы и скрытые носители среди групп культивируемых, одичавших или диких рыб. Выделение инфекционного вируса происходит с фекалиями, мочой, половыми продуктами и, по всей вероятности, с кожной слизью, в то время как почка, селезенка, печень и опухоли являются местами, где вирус наиболее широко распространен при клинической инфекции. Передача вируса OMV происходит горизонтальным путем и, возможно, является «ассоциированной с поверхностью икринок». Горизонтальная передача может быть как прямой, так и происходящей посредством переносчиков, при этом вода является основным абиотическим фактором. Дезинфекция икринок сразу после оплодотворения и на стадии глазка эффективна в плане предотвращения инфекции OMV. Болезнь, вызываемая OMV, не регистрировалась у мальков с желточным мешком, появившихся из подвергнутых дезинфекции икринок, инкубация которых и появление мальков из которых происходили в свободной от вируса воде (Yoshimizu, 2009).

2.3.2. Превалентность

OMV был выделен от симы во всех местах, где проводилось расследование, за исключением одного инкубатория. Исходя из результатов нашего эпидемиологического исследования, истоки OMV, как предполагалось, были расположены вдоль

япономорского побережья Хоккайдо, а предполагаемым изначальным видом-хозяином была сима. В 1960-е годы икринки симы были отобраны из рек япономорского побережья Хоккайдо и привезены на остров Хонсю, основной остров Японии. При неограниченном перемещении рыб вирус распространился на несколько мест на территории Хонсю, где наблюдались первые случаи раковой болезни у симы (Kimura, 1976). Впоследствии кижуча и радужную форель культивировали в тех же водных системах, где культивировали симу. Возможно, инфицирование кижуча OMV произошло на стадии малька в пресной воде, потому что опухолевые ткани были обнаружены вокруг рта у кижучей, которые выращивались в специально огороженных участках, при этом в инкубатории, откуда кижуч был пересажен в специально огороженный участок, в прошлом регистрировалась OMVD (Furihata с соавт., 2003; Kumagai с соавт., 1994; Yoshimizu & Nomura, 2001).

2.3.3. Географическое распространение

После первых сообщений относительно OMVD в северной Японии (Kimura с соавт., 1980) географический диапазон болезни на территории Японии расширился. Сообщения о возникновении болезни за пределами Японии отсутствуют.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Восприимчивость к OMV мальков ряда лососевых изучалась экспериментальным путем посредством погружения в воду с содержанием ТЦД₅₀ (средняя инфекционная доза для культуры ткани) мл⁻¹ OMV при температуре 10°C на 1 час. При сравнении икринок пяти различных лососевых в возрасте 1 месяца лосось кокани продемонстрировал самую высокую чувствительность при 100% смертности. Сима и кета также продемонстрировали высокую чувствительность при 87% и 83% смертности, соответственно. Кижуч и радужная форель, как было показано, менее чувствительны к заражению OMV при смертности 39% и 29%, соответственно. Таким образом, диапазон хозяев широко представлен среди видов лососевых (Kimura с соавт., 1983с). Восемь возрастных групп кеты (в возрасте 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 месяцев) были подвергнуты погружению при тех же самых условиях. Кумулятивная смертность только что появившейся из икринок кеты, находившейся под наблюдением в течение последующих 4 месяцев, составила 35%, но у мальков в возрасте от 1 до 5 месяцев она составляла более 80%. В возрасте 6 и 7 месяцев восприимчивость мальков снизилась, и лишь 7% и 2% рыб стали жертвами болезни. Среди 8-месячной молодежи случаев гибели не наблюдалось. С другой стороны, мальки симы в возрасте 1 месяца были наиболее чувствительными, и кумулятивная смертность достигла 87%. У мальков в возрасте от 3 до 5 месяцев кумулятивная смертность снизилась с 65% до 24% (Kimura с соавт., 1983с). Начиная с 1988 года герпесвирус выделяли из печени, почки и развивающейся неоплазмы у прудовых и выращивавшихся в специально огороженных участках кижучей (Kumagai с соавт., 1994). Пораженные рыбы демонстрировали следующие признаки болезни: язвы на коже, белые пятна на печени и неопластические ткани вокруг ротовой части или по всей поверхности тела. Данная болезнь наносит экономический ущерб культуре кижуча. Все эти вирусы нейтрализовали посредством кроличьей сыворотки против OMV или NeVTA, а онкогенность была подтверждена путем экспериментального заражения. Изолированный вирус демонстрировал сильную

патогенность в отношении кижуча. Массовая смертность регистрировалась среди радужной форели в возрасте 1 года в прудовых культурах начиная с 1992 года на территории Хоккайдо. Больные рыбы не демонстрировали практически никаких клинических признаков. Некоторые же рыбы демонстрировали язвенные поражения на коже. Со стороны внутренних органов наблюдались кишечная геморрагия и белые пятна на печени. В период с февраля 2000 года по январь 2001 года имели место эпидемии среди культивируемой радужной форели весом от 12 г до 1,5 кг на 18 фермах по разведению рыбы в префектуре Нагано, Япония. Были продемонстрированы высокие титры инфекционности (около 10^8 ТЦД₅₀ г⁻¹) в основных внутренних органах, а в печени наблюдались многочисленные некротические очаги. Вирус был идентифицирован как ОМV при помощи серологических тестов и полимеразной цепной реакции (ПЦР). В более чем 80% случаев вспышки были связаны с завозом живой рыбы (Furihata с соавт., 2003).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Общие санитарно-профилактические меры являются стандартной практикой в инкубаториях. Следует обратить особое внимание на то, чтобы избежать перемещения оборудования из одного резервуара в другой, а после использования все следует подвергать дезинфекции. Методы для проведения санитарной обработки инкубаторного участка следует разрабатывать с осмотрительностью в том, что касается химической токсичности для рыб, влияния температуры воды и их неоднократного применения. Следует помнить о том, что работники сами могут выступать в качестве эффективных переносчиков для патогенов, и для предотвращения распространения вирусов требуется надлежащая дезинфекция рук и обуви. Хотя проведение санитарной обработки участков инкубирования и выращивания во время их использования может быть затруднительным, следует дезинфицировать выростные каналы и пруды с помощью хлора до и после использования (Yoshimizu, 2009).

2.4. Контроль и профилактика

ОМV чувствителен к обработке ультрафиолетовым облучением, озоном и йодофором (Yoshimizu & Kasai, 2011). Начиная с 1983 года, настоятельно рекомендуется в качестве одной из стратегий контроля проводить исследование овариальной жидкости, полученной от зрелой рыбы, и дезинфекцию собранных икринок во всех инкубаториях на территории Хоккайдо с использованием йода в начале стадии глазка. На данный момент ОМV больше уже не выявляется в большинстве инкубаториев в данном регионе. В настоящее время все икринки и объекты уже продезинфицированы йодофором сразу после оплодотворения и еще раз в начале стадии глазка. В результате этого ОМV не выделяется на территории Хоккайдо и Тохоку, а также удалось избежать вспышки ОМVD у симы и кижуча, но не у радужной форели (Furihata с соавт., 2003; Yoshimizu, 2009).

2.4.1. Вакцинация

Вакцинация зрелой радужной форели ОМV, инактивированным формалином, обеспечила возможность снизить положительное соотношение ОМV в овариальной жидкости (Yoshimizu & Kasai, 2011). Также вакцинация с использованием инактивированного формалином ОМV весьма эффективна в целях защиты от инфекции

OMV на стадии малька (Yoshimizu & Kasai, 2011).

2.4.2. Химиотерапия

Терапевтическую эффективность ацикловира (ACV) оценивали при использовании OMV и мальков кеты. Рыб подвергали экспериментальному заражению OMV, а затем обработке ACV либо пероральным путем, либо путем погружения. Ежедневное погружение рыб в раствор ACV (25 мкг мл⁻¹, 30 минут в день, 15 раз) снизило смертность инфицированной рыбы. Пероральное введение ACV (25 мкг на каждую рыбу в день, 60 раз) не оказало влияния на выживаемость кеты. Напротив, группа, в которой осуществлялось пероральное введение IUdR, продемонстрировала более высокую выживаемость, чем группа, получавшая ACV. Это дало основание предположить, что у рыб, которым вводили лекарственный препарат оральным путем, не поддерживался эффективный уровень ACV. Ежедневное погружение инфицированной рыбы в раствор ACV (25 мкг мл⁻¹, 30 минут в день, 60 раз) в значительной степени подавляло развитие опухолей, вызванных OMV (Kimura с соавт., 1983a; Kimura с соавт., 1983b).

2.4.3. Иммуностимуляция

На сегодняшний день опубликованная информация об использовании иммуностимуляторов для контроля OMVD у лососевых отсутствует. Однако это, как известно, является областью, представляющей научно-исследовательский интерес.

2.4.4. Выведение резистентных особей

На сегодняшний день опубликованная информация о применении выведения резистентных особей для контроля OMVD у лососевых отсутствует.

2.4.5. Пополнение поголовья резистентными видами

Гибриды представляют собой потенциальный метод контроля для предотвращения серьезных потерь, обусловленных OMVD. В ходе исследований, проведенных в отношении популяции триплоидных гибридных лососевых (тетрамерная радужная форель × кумжа), было установлено, что они являются резистентными к OMVD (Kohara & Denda, 2010).

2.4.6. Блокирующие агенты

Не применимо.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Дезинфекция икринок может осуществляться посредством обработки йодофором. OMV, как было показано, инактивируется путем применения йодофора из расчета 50 мг литр⁻¹ в течение 15 минут при температуре 15°C или 25 мг литр⁻¹ в течение 20 минут при температуре 15°C (Yoshimizu, 2009).

2.4.8. Общие практики ведения хозяйства

Меры биозащиты должны включать в себя обеспечение того, что новые поступления рыбы осуществляются из свободных от болезни источников, а также устройство

карантинной системы, где можно держать новых рыб вместе с индикаторными рыбами при пермиссивных для OMVD температурах. Тогда рыб карантинируют в течение как минимум 4 недель – 2 месяцев перед перемещением на основной участок и смешиванием с не подвергавшейся никакому воздействию рыбой. Меры гигиены на местах должны быть аналогичными мерам, рекомендованным для ИHN, и включать в себя дезинфекцию икринок, регулярную дезинфекцию прудов, химическую дезинфекцию оборудования фермы, бережное обращение с рыбой во избежание стресса и безопасное уничтожение погибшей рыбы.

3. Отбор образцов

3.1. Выбор отдельных образцов

3.1.1. Рыба с клиническими признаками

Малек с желточным мешком в целом виде (длина тела ≤ 4 см), внутренние органы, включая почку (4 см \leq длина тела ≤ 6 см), или, если речь идет о рыбе более крупного размера, язвенные поражения кожи или неопластические ткани, а также почка, селезенка, печень и головной мозг.

3.1.2. Внешне здоровая рыба

Почка, селезенка и головной мозг (рыба любого размера) и/или овариальная жидкость от рыб-производителей в период нереста.

3.2. Сохранение образцов в целях предоставления на исследование

Целых рыб следует отправлять в лабораторию в живом виде или подвергнув их умерщвлению и упаковав по отдельности в герметизированные асептические контейнеры. Однако весьма предпочтительно и рекомендуется отбирать образцы органов от рыб сразу же после того, как они были выбраны на рыбоводческом объекте. Рыб в целом виде или отобранные образцы органов следует направлять в лабораторию в охлаждаемых контейнерах (от $+0^{\circ}\text{C}$ до 5°C) со льдом. Следует избегать замораживания отобранных рыб или иссеченных органов.

3.3. Объединение образцов в пул

При тестировании рыб с клиническими признаками методом культуры клеток или методами на основе ПЦР, объединения образцов в пул следует избегать или же ограничиться не более чем пятью рыбами в каждом пуле. Что касается тестирования с помощью методов культуры клеток в рамках надзора за здоровьем, следует проводить тестирование образцов при не более чем пяти рыбах в пуле.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

3.4.1. Рыба с клиническими признаками

Малек в целом виде (длина тела ≤ 4 см), внутренние органы, включая печень или почку (4 см \leq длина тела ≤ 6 см), или, если речь идет о рыбе более крупного размера, язвенные поражения кожи или неопластические ткани, а также печень или почка.

3.4.2. Внешне здоровая рыба

Печень, почка, селезенка и головной мозг (рыба любого размера) и/или овариальная жидкость от рыб-производителей в период нереста.

3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

Трупы рыб с очень глубокими признаками разложения тканей могут не подойти для тестирования какими бы то ни было методами.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

С клинической точки зрения, первоначальная инфекция OMV проявляется как генерализованная и часто смертельная инфекция, сопровождающаяся отеком и гемorragиями. Клинические признаки обусловлены размножением вируса в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров, гематопозитической ткани и гепатоцитах (Kimura с соавт., 1981b). Четыре месяца спустя после этого первого клинического состояния варьирующее количество остающихся в живых рыб демонстрируют эпителиому, которая возникает, главным образом, вокруг рта (верхняя и нижняя челюсть) и, в меньшей степени, на хвостовом плавнике, жаберной крышке и поверхности тела (Kimura с соавт., 1981a). Эта неоплазия может сохраняться в течение до 1 года после инфицирования. Если говорить о кижуче, инфицированные рыбы в возрасте 1 года, в частности, демонстрируют язвы на коже, белые пятна на печени и неопластические ткани вокруг ротовых частей или по всей поверхности тела. У радужной форели больные рыбы не демонстрировали почти никаких внешних признаков, хотя у некоторых рыб обнаруживались язвенные поражения на коже. Что касается внутренних органов, наблюдаются кишечная гемorragия и белые пятна на печени (Yoshimizu & Kasai, 2011).

4.1.2. Изменения в поведении

Рыбы становятся вялыми, собираются у водостока или боковых сторон пруда. У некоторых рыб могут наблюдаться потеря равновесия и дезориентация.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Макроскопические признаки у инфицированных рыб – это отсутствие аппетита и экзофтальм (пучеглазие), а также петехии на поверхности тела, в особенности под нижней челюстью. Агональное или аномальное плавательное поведение не наблюдалось. Что касается внутренних органов, на печени наблюдаются поражения в виде белых пятен, а в сложных случаях вся печень становится жемчужно-белой. В некоторых случаях устанавливают, что вздута селезенка. В пищеварительном тракте отсутствует пища (Kimura с соавт., 1981b).

4.2.2. Клиническая химия

Опубликованная информация отсутствует.

4.2.3. Микроскопическая патология

Почка инфицированных ОМV симы в возрасте 1-го и 3-х месяцев, кижуча в возрасте 1-го месяца и кеты в возрасте 2-х месяцев является главным целевым органом для вируса, насколько можно судить по тяжести гистопатологических изменений, обнаруженных у инфицированных 1-месячных сим. Некроз эпителиальных клеток и почки наблюдался у экземпляров на ранней стадии умирания, в то время как частичный некроз печени, селезенки и поджелудочной железы наблюдался у особей на более поздних стадиях умирания из данной группы. Некроз гематопозитической ткани почки наблюдался у инфицированных 3-х месячных сим. При том, что почка считалась рано поражаемым органом-мишенью для ОМV, она постепенно приобрела резистентность к инфекции ОМV. По этой причине было сочтено, что целевой орган переместился с почки на печень, и заметные гистопатологические изменения наблюдались на более поздних стадиях. Очаги некроза в печени имели тенденцию становиться более тяжелыми при более продолжительном инкубационном периоде. Присутствовали гепатоциты с маргинацией хроматина. Также наблюдалась клеточная дистрофия в селезенке, поджелудочной железе, сердечной мышце и мозге (Kimura с соавт., 1983с). Гистопатологические изменения, наблюдавшиеся у кижуча и кеты, были такими же, как наблюдавшиеся у симы (Такака с соавт., 1984). Что касается радужной форели, были продемонстрированы высокие титры инфекционной активности в основных внутренних органах и наблюдались многочисленные некротические очаги в печени. Несомненным изменением был некроз инфицированных ОМV клеток, которые наблюдались в селезенке, гематопозитических тканях почки, печени, кишечнике, сердце, жаберных лепестках, эпидермисе и латеральной мускулатуре. В частности, со стороны кишечника наблюдался тяжелый некроз и геморрагия в эпителии и подлежащих тканях, что представляет собой новое описание ОМVD радужной форели (Furuhata с соавт., 2003).

4.2.4. Влажные препараты

ОМV был идентифицирован в мазках-отпечатках почки посредством непрямой реакции флуорисцирующих антител (IFAT).

4.2.5. Мазки

Опубликованная информация отсутствует.

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

Вирусные частицы были обнаружены путем исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ, ТЕМ) тканей печени, полученных от клинически инфицированных кеты, симы, кижуча и радужной форели (Kimura с соавт., 1980; Такака с соавт., 1984). Электронная микроскопия инфицированных клеток показывает, что интрануклеарные гексагональные капсиды имеют диаметр 115 нм. Обилие почкующихся, заключенных в оболочку вирионов, 200 × 240 нм в диаметре, также наблюдается на поверхности и внутри цитоплазматических везикул. Рассчитанное число капсомеров негативно окрашенных вирионов составляет 162. Данные характеристики подтверждают, что ОМV является гересвирусом.

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

Инфекционная активность возбудителя остается неизменной в течение по меньшей мере 2 недель при температуре от 0°C до 5°C, однако при температуре –20°C 99,9% инфекционной активности теряется в пределах 17 дней. Вирусыведение следует проводить с использованием рыб, которых транспортировали в лабораторию на льду. Для фильтрации OMV рекомендуется фильтр-нуклеопор (0,40 мкм, поликарбонат), поскольку фильтр с целлюлозо-ацетатной мембраной улавливает вирусные частицы. В целях вирусологического обследования зрелых лососевых, отбирают овариальную жидкость при помощи метода, описанного Yoshimizu с соавт., 1985, с добавлением такого же объема антибиотика и оставляют для реакции при температуре 5°C на протяжении ночи. Если речь идет об опухолевой ткани, ткань нарезают и дезинфицируют йодоформом, затем промывают сбалансированным солевым раствором (BSS) Хэнка и транспортируют вместе с раствором антибиотика в лабораторию. Необходимо подготовить опухолевую ткань для первичной культуры или сокультуры с клетками RTG-2. После проведения одного пассажа первичной культуры клеток следует провести исследование культуральной среды на наличие вируса. Обычно собирают и инокулируют клетки RTG-2, подходящая температура инкубации составляет 15°C. В лаборатории использовали кроличью сыворотку или моноклональное антитело против OMV для реакции флуоресцирующих антител (Hayashi с соавт., 1993), а также использовали ДНК-зонд для обнаружения вирусного генома (Gou с соавт., 1991). В ходе ПЦР с использованием праймера F10 и праймера R05 (Aso с соавт., 2001) амплифицировали состоящий из 439 пар-оснований сегмент ДНК из штаммов OMV, выделенных от симы, кижуча и радужной форели, а также печени, почки, мозга и нервных тканей. Посредством профиля амплифицированной ДНК в агарозном геле смогли дифференцировать OMV и *H. salmonis* (Aso с соавт., 2001).

4.3.1. Методы прямого обнаружения

OMV был идентифицирован в мазках-отпечатках почки при помощи IFAT. Наиболее широко применяемым методом обнаружения OMV непосредственно в тканях рыб является использование методов ПЦР, специфических для OMV.

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Вирусные антигены были обнаружены в инфицированных тканях посредством IFAT. Что касается кижуча, культивируемых в прудах рыб пересаживают в специально огороженные сетями участки в море. Ткани почки подвергались сильному давлению, чтобы адаптироваться к морской среде. Во время этого периода происходит репликация OMV и появление антигена OMV в тканях почки. Метод непрямой реакции флуоресцирующих антител полезен и эффективен для выявления рыб, инфицированных OMV (Kumagai с соавт., 1994).

4.3.1.1.2. Мазки

Опубликованная информация отсутствует.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

Метод, подробно описанный в Пункте 4.3.1.1.1 выше, также подходит для обнаружения антигена ОМV в срезах залитых в парафин тканей, фиксированных в 10% нейтральном забуференном формалине (NBF). Общепринятая обработка состоит в инкубировании срезов с 0,1% трипсином в ФБР (PBS) при температуре 37°C в течение 30 минут. Затем срезы промывают в холодном ФБР.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные среды

Линия клеток, которую надлежит использовать: *RTG-2* или *CHSE-214*.

4.3.1.2.1.1. Инокулирование клеточных монослоев

- i) Выполните дополнительное десятикратное разведение супернатантов гомогенатов органов (1/10) и перенесите соответствующий объем каждого из двух разведений на 24-часовые монослои клеток. Инокулируйте как минимум 2 см² осушенного клеточного монослоя, используя 100 мкл каждого разведения.
- ii) Оставьте для адсорбции на 1 час при температуре 15°C и, не удаляя инокулят, добавьте культуральную среду, забуференную при pH 7,4 и обогащенную 2% фетальной бычьей сывороткой (ФБС, FBS) (1 мл/лунку для 24-луночных культуральных планшетов), и инкубируйте при 15°C.

4.3.1.2.1.2. Мониторинг инкубирования

- i) Следите за течением инфекции на позитивных контролях и других инокулированных культурах клеток путем исследования под микроскопом при увеличении 4× или 10× в течение 14 дней. Рекомендуется использовать фазово-контрастный микроскоп.
- ii) Поддерживайте pH культуральной среды на уровне между 7,2 и 7,4 во время инкубирования. Этого можно добиться путем добавления стерильного бикарбонатного буфера (для плотно закрытых культуральных матрасов) или Трис-буферного раствора (для культуральных планшетов) к инокулированной культуральной среде или, еще лучше, путем использования забуференной HEPES среды (HEPES = N-2-гидроксэтил-пиперазин-N-2-этансульфоная кислота).
- iii) Если в культурах клеток, которые были инокулированы разведениями тестируемых супернатантов гомогенатов, проявляется цитопатический эффект (ЦПЭ, CPE), необходимо сразу же провести процедуры идентификации (смотрите пункт «Реакция нейтрализации» ниже).

В случае реализации программы по надзору/контролю за здоровьем рыб, возможно, необходимо принять положения для приостановки действия утвержденного статуса по здоровью производственного участка или зоны (если он был утвержден ранее), которые являются местом происхождения вирус-положительного образца. Приостановка действия утвержденного статуса будет сохраняться в силе до тех пор, пока не будет

продемонстрировано, что вирус, о котором идет речь, не является ОМV.

- iv) Если в инокулированных культурах ЦПЭ не развивается (несмотря на нормальное развитие ЦПЭ в вирусных контролях), инокулированные культуры следует подвергнуть субкультивированию в течение последующих 7 дней. Если вдруг ЦПЭ не будет развиваться на вирусных контролях, тогда процесс следует повторить с использованием свежих чувствительных клеток и новых партий образцов.

4.3.1.2.1.3. *Процедуры субкультивирования*

- i) Отберите аликвоты культуральной среды от всех монослоев, инокулированных разведениями каждого супернатанта гомогенатов органов.
- ii) При необходимости, повторите реакцию нейтрализации в отношении вируса инфекционного панкреонекроза (IPNV) и/или вируса инфекционного гемопоэтического некроза (IHNV), как описано ранее (смотрите Главу 2.3.0., Пункт 2.2.3.), используя разведение вышеуказанного супернатанта (от 1/1 до 1/100).
- iii) Инокулируйте клеточные монослои, как описано выше.
- iv) Инкубируйте и осуществляйте мониторинг, как описано выше.
- v) При отсутствии ЦПЭ тест может быть признан отрицательным.

4.3.1.2.1.4. *Выделение ОМV из культур неопластических клеток*

- i) Отберите неопластические ткани, проведите дезинфекцию йодоформом, 50 частей на миллион в течение 20 минут, и промойте три раза сбалансированным солевым раствором Хэнкса.
- ii) Оставьте ткани на ночь в 0,25% трипсине в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ФБР, PBS) при температуре 5°C. Затем $3,5 \times 10^5$ неопластических клеток/мл высеваются в матрас для культивирования тканей, содержащий 20% фетальную бычью сыворотку (ФБС, FBS).
- iii) Соберите первичную культуру неопластических клеток и культивируйте совместно с клетками RTG-2 или CHSE-214.
- iv) Инкубируйте и осуществляйте мониторинг, как описано выше.

4.3.1.2.2. *Методы обнаружения антигена, основанные на использовании антител*

Реакция нейтрализации

- i) Отберите культуральную среду клеточного монослоя, демонстрирующего ЦПЭ, и центрифугируйте при 2000 g в течение 15 минут при температуре 4°C для удаления клеточного детрита.
- ii) Разведите вирус-содержащую среду от 10^2 до 10^4 мл⁻¹.

- iii) Смешайте аликвоты (например, 200 мкл) каждого разведения вируса с равными объемами раствора антител, специфических к OMV, и аналогичным образом обработайте аликвоты каждого разведения вируса культуральной средой.
- (Раствор нейтрализующих антител [NAb] должен иметь титр, вызывающий 50%-е снижение количества бляшек, не менее 2000.)
- iv) Параллельно необходимо проводить другие реакции нейтрализации против:
- Гомологичного вирусного штамма (положительная реакция нейтрализации),
 - Гетерологичного вирусного штамма (отрицательная реакция нейтрализации).
- v) При необходимости, аналогичную реакцию нейтрализации можно провести при использовании антител к IPNV, чтобы гарантировать, что ни одному IPNV-контаминанту не удалось избежать первого анти-IPNV теста.
- vi) Инкубируйте все смеси при температуре 15°C в течение 1 часа.
- vii) Перенесите аликвоты каждой из указанных выше смесей на клеточные монослои (инокулируйте две культуры клеток на разведение) и оставьте для адсорбции на 0,5~1 час(а) при температуре 15°C; 24- или 12-луночные культуральные планшеты подходят для данной цели при использовании 50 мкл инокулюма.
- viii) По завершении адсорбции добавьте культуральную среду, обогащенную 2% ФТС (фетальная телячья сыворотка, FCS) и забуференную при pH 7,4~7,6, в каждую лунку и инкубируйте при температуре 10~15°C.
- ix) Проверяйте культуры клеток на предмет начала ЦПЭ и произведите считывание результатов, как только это произойдет в не подвергнутых нейтрализации контролях (в положительных контролях нейтрализации клеточные монослои защищены). Результаты регистрируются либо после простого исследования под микроскопом (предпочтительно, фазово-контрастным) или после сливания культуральной среды и окрашивания клеточных монослоев раствором 1% кристаллического фиолетового в 20% этаноле.
- x) Тестируемый вирус идентифицируется как OMV, когда развитие ЦПЭ предотвращается или заметно задерживается в культурах клеток, в которые вносили вирусную суспензию, обработанную OMV-специфическим антителом, в то время как в других культурах клеток ЦПЭ очевиден.
- xi) При отсутствии какой-либо нейтрализации нейтрализующим антителом (Nab) к OMV, обязательным является проведение IFAT с использованием подозрительного образца.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

ПЦР (Aso с соавт., 2001).

- i) Экстрагируйте нуклеиновую кислоту из клеток, инфицированных штаммом ОО-7812 ОМV и *H. salmonis*, с использованием InstGene Matrix (Biorad²).
- ii) Пеллетируйте инфицированные вирусом ткани или инфицированные культивируемые клетки центрифугированием при 19000 *g* в течение 15 минут.
- iii) Промойте осадки после центрифугирования два раза при помощи 1 мл ФБР и смешайте с 200 мкл хелатообразующей смолы (Sigma).
- iv) Инкубируйте смесь при температуре 56°C в течение 20 минут в водяной бане, встряхните на вортексе, а затем поместите в кипящую водяную баню на 8 минут.
- v) Встряхните образцы на вортексе и центрифугируйте при 8200 *g* (10000 об/мин) в течение 90 секунд.
- vi) Подвергните супернатант ПЦР.
- vii) Прямой праймер (F10) – 5'-GTA-CCG-AAA-CTC-CCG-AGT-C-3', а обратный праймер (R5) – 5'-AAC-TTG-AAC-TAC-TCC-GGG-G-3'.
- viii) Инкубируйте образцы, наборы праймеров и реакционные смеси в течение 30 циклов в автоматическом термоциклере (GeneAmp PCR 9700, Applied Biosystems), при этом каждый цикл состоит из денатурации при температуре 94°C в течении 30 секунд, отжига при температуре 56°C в течение 30 секунд и элонгации при температуре 72°C в течение 30 секунд.
- ix) Проведите анализ продукта амплификации для определения размера и чистоты при помощи электрофореза (100 В в течение 30 минут) в 2% агарозном геле и произведите окраску бромидом этидия.
- x) С помощью ПЦР с использованием данных наборов праймеров амплифицировали сегмент ДНК длиной 439 пар-оснований, полученный из штаммов ОМV, выделенных от симы, кижуча и радужной форели, а также печени, почки, мозга и нервной ткани, и сегмент ДНК длиной 800 пар-оснований, полученный из SalHV-1. SalHV-1 и SalHV-2 смогли дифференцировать посредством профиля данной амплифицированной ДНК в агарозном геле (Aso с соавт., 2001).

4.3.2. Серологические методы

4.3.2.1. Непрямая реакция флуоресцирующих антител

- i) Подготовьте монослой клеток в лунках (2 см²) культуральных пластиковых

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

планшетов или на покровных стеклах с тем, чтобы получить приблизительно 80% конфлюэнтность, что обычно достигается в пределах 4 часов инкубирования при температуре 22°C (произведите высеив шести клеточных монослоев на каждый изолят вируса, подлежащий идентификации, плюс два для положительных и два для отрицательных контролей). Содержание ФБС в среде для культивирования клеток можно сократить до 2–4%. Если необходимо идентифицировать многочисленные вирусные изоляты, настоятельно рекомендуется использовать планшеты Терасаки.

- ii) Когда клеточные монослои будут готовы для инфицирования, то есть в тот же день или на следующий день после высева, инокулируйте вирусные суспензии, которые необходимо идентифицировать, выполнив шаги для десятикратного разведения непосредственно в культуральных лунках или матрасах.
- iii) Проведите разведение контрольной вирусной суспензии OMV аналогичным образом, чтобы получить вирусный титр приблизительно 5000-10000 бляшкообразующих единиц (БОЕ, PFU) мл⁻¹ в культуральной среде.
- iv) Инкубируйте при температуре 15°C в течение 48 часов.
- v) Удалите культуральную среду, ополосните один раз при помощи 0,01 М ФБР, рН 7,2, затем три раза в течение непродолжительного времени холодным ацетоном (хранившимся при температуре –20°C) для покровных стекол или смесью ацетона 30%/этанола 70%, также при –20°C, для пластиковых лунок.
- vi) Дайте фиксатору подействовать в течение 15 минут. Объемом 0,5 мл достаточно для 2 см² клеточного монослоя.
- vii) Дайте клеточным монослоям просохнуть на воздухе в течение, по меньшей мере, 30 минут и сразу же процессируйте или заморозьте при температуре –20°C.
- viii) Приготовьте раствор очищенного антитела или сыворотки к OMV в 0,01 М ФБР, рН 7,2, с содержанием 0,05% Tween 80 (PBST) при соответствующем разведении (которое было установлено ранее или предлагается поставщиком реактивов).
- ix) Регидратируйте клеточные монослои путем 4 шагов ополаскивания раствором PBST, и полностью удалите данный буфер после последнего ополаскивания.
- x) Проведите обработку клеточных монослоев раствором антитела в течение 1 часа при 37°C в камере влажности и не допускайте испарения. Объем раствора, который надлежит использовать, составляет 0,25 мл на лунку 2 см².
- xi) Ополосните четыре раза с помощью PBST, как описано выше.
- xii) Проведите обработку клеточных монослоев в течение 1 часа при температуре 37°C раствором конъюгированного с флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ, FITC) антитела к иммуноглобулину, использовавшегося в первом слое и подготовленного согласно инструкциям производителя. Эти FITC-меченые антитела представляют собой, в большинстве случаев, антитела кролика или

КОЗЫ.

- xiii) Ополосните четыре раза с помощью PBST.
- xiv) Исследуйте обработанные клеточные монослои непосредственно на пластиковых планшетах или смонтируйте покровные стекла, используя солевой раствор глицерина при pH 8,5 перед наблюдением под микроскопом.
- xv) Исследуйте под падающим УФ-светом, используя микроскоп с окулярами 10× и линзами объектива 20–40× с числовой апертурой > 0,65 и > 1,3, соответственно. Что касается положительных и отрицательных контролей, необходимо убедиться, что они дали ожидаемые результаты, до любого другого наблюдения.

4.3.2.2. Твердофазный иммуноферментный анализ

- i) Сенсибилизируйте лунки микропланшетов, предназначенных для твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA), соответствующими разведениями моноклонального антитела или очищенных иммуноглобулинов (Ig), специфических к OMV, в 0,01 М ФБР, pH 7,2 (200 мкл/лунку).
- ii) Инкубируйте в течение ночи при температуре 4°C.
- iii) Ополосните четыре раза с помощью 0,01 М ФБР с содержанием 0,05% Tween 20 (PBST).
- iv) Блокируйте обезжиренным молоком (5% в PBST) или другим блокирующим раствором в течение 1 часа при 37°C (200 мкл/лунку).
- v) Ополосните 4 раза с помощью PBST.
- vi) Добавьте 2% Triton X-100 к вирусной суспензии, подлежащей идентификации.
- vii) Распределите по 100 мкл/лунку разведения (с шагом 2 или 4) вируса, который необходимо идентифицировать, и контрольного вируса OMV, и оставьте для реакции с сенсибилизирующим антителом к OMV в течение 1 часа при 20°C.
- viii) Ополосните 4 раза с помощью PBST.
- ix) Добавьте в лунки биотинилированное поликлональное антитело к OMV.
- x) Инкубируйте в течение 1 часа при 37°C.
- xi) Ополосните 4 раза с помощью PBST.
- xii) Добавьте конъюгат пероксидазы хрена со стрептавидином к тем лункам, в которые вносили конъюгат антитела с биотином, и инкубируйте в течение 1 часа при 20°C.
- xiii) Ополосните 4 раза с помощью PBST.
- xiv) Добавьте субстрат и хромоген. Произведите остановку теста, когда среагируют

положительные контроли, и осуществите мониторинг результатов.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

В качестве примера имеющиеся в настоящее время методы для целевого надзора и диагностики OMVD перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, использованные в Таблице, означают: a = данный метод является методом, рекомендованным по причинам доступности, целесообразности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = данный метод применяется в некоторых ситуациях, однако затраты, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение; и d = данный метод в настоящее время не рекомендуется для данной цели. Данные обозначения в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает в себя такие аспекты, как достоверность, чувствительность, специфичность и целесообразность. Хотя не все из тестов, перечисленных как относящиеся к категории А или В, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются, не давая при этом вызывающих сомнение результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	PL	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	b	b	b	b	c
Культура клеток	b	b	b	b	b	a
Прямая СМ	d	d	d	d	d	d
Гистопатология	b	b	b	b	b	a
Трансмиссионная ЭМ	c	c	c	c	c	c
Исследования, основанные на использовании антител	b	b	b	b	b	a
<i>In situ</i> с использованием ДНК-зондов	c	c	c	c	c	c
ПЦР	b	b	b	b	a	a
Секвенирование	d	d	d	d	d	d

PL = постличинки; СМ = световая микроскопия; ЭМ = электронная микроскопия; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора для объявления свободы от болезни, вызываемой вирусом *Oncorhynchus masou*

Информация о распределении и инцидентности OMV важна для предотвращения передачи потомству от зрелых лососевых. В этой связи важное значение имеет изучение

распространенности ОМВ среди зрелых лососевых рыб. Произведен отбор образцов от шестидесяти рыб, и образцы отбирались в индивидуальном порядке. Образцы овариальной жидкости отбирали по методу Yoshimizu с соавт., 1985. Стерилизованный наконечник автоматической пипетки вводили в уrogenитальное отверстие зрелой рыбы. Один миллилитр овариальной жидкости, отобранной от рыб, подвергали обработке в соответствии с методом обработки антибиотиками. Подвергнутые обработке антибиотиками образцы перевозили в лабораторию с использованием льда.

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

ОМВ подозревают, если удовлетворен по меньшей мере один из следующих критериев:

- i) Наличие типичных клинических признаков ОМВД в популяции восприимчивых рыб.
- ii) Демонстрация типичной гистопатологии на срезах тканей печени, сообразной с ОМВД.
- iii) Единственный положительный результат, полученный в ходе одного из диагностических исследований, таких как IFAT на мазках-отпечатках тканей печени или почки или ПЦР.
- iv) Перемещение живой рыбы с какого-либо места, где было подтверждено или подозревают присутствие ОМВ из-за наличия клинической болезни, в места, не подозрительные по ОМВ.
- v) Были обнаружены антитела к ОМВ.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Следующие критерии должны быть удовлетворены для подтверждения ОМВ:

- i) Смертность, клинические признаки и патологические изменения, сообразные с болезнью, вызываемой ОМВ, и обнаружение ОМВ с помощью одного или нескольких из нижеперечисленных методов:
 - a) Выделение и идентификация ОМВ в культуре клеток из по меньшей мере одного образца, полученного от любой рыбы в данном месте, как описано в Пункте 4.3.1.2.1;
 - b) Обнаружение ОМВ при помощи PCR методами, описанными в Пункте 4.3.1.2.3;
 - c) Обнаружение ОМВ в препаратах тканей путем использования специфических антител к ОМВ (например, IFAT на отпечатках тканей, как описано в Пункте 4.3.2.
- ii) При отсутствии смертности или клинических признаков – при помощи одного или нескольких из нижеперечисленных методов:
 - a) Обнаружение и подтверждение ОМВ при помощи PCR методами, описанными

в Пункте 4.3.1.2.3;

- b) Положительные результаты, полученные в ходе двух отдельных и отличных друг от друга диагностических исследований, описанных выше.

8. Библиография

ASO Y., WANI J., KLENNER D.A.S. & YOSHIMIZU M. (2001). Detection and identification of *Oncorhynchus masou* virus (OMV) disease by polymerase chain reaction (PCR). *Bull. Fish. Sci. Hokkaido Univ.*, **52**, 111–116.

FURIHATA M., HOSOE A., TAKEI K., KOHARA M., NAKAMURA J., MOTONISHI A. & YOSHIMIZU M. (2003). Outbreak of salmonid herpesviral disease in cultured rainbow trout. *Fish Pathol.*, **38**, 23–25.

GOU D.F., KUBOTA H., ONUMA M. & KODAMA H. (1991). Detection of salmonid herpesvirus (*Oncorhynchus masou* virus) in fish by southern-blot technique. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 43–48.

HATORI S., MOTONISHI A., NISHIZAWA T. & YOSHIMIZU M. (2003). Virucidal effect of disinfectants against *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Fish Pathol.*, **38**, 185–187.

HAYASHI Y., IZAWA H., MIKAMI T. & KODAMA H. (1993). A monoclonal antibody cross-reactive with three salmonid herpesviruses. *J. Fish Dis.*, **16**, 479–486.

KIMURA I. (1976). Tumor of lower vertebrates. *In: Cancer*. Sugiyama T. & Yamamoto Y., eds., Iwanami-Shoten, Tokyo, Japan, 270–283.

KIMURA T., SUZUKI S. & YOSHIMIZU M. (1983a). *In vitro* antiviral effect of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine on the fish herpesvirus *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Antiviral Res.*, **3**, 93–101.

KIMURA T., SUZUKI S. & YOSHIMIZU M. (1983b). *In vivo* antiviral effect of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine on experimental infection of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) fry with *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Antiviral Res.*, **3**, 103–108.

KIMURA T., YOSHIMIZU M. & TANAKA M. (1980). Salmonid viruses, a syncytium-forming herpesvirus from landlocked *Oncorhynchus masou*. *Fish Health News*, **9**, iii.

KIMURA T., YOSHIMIZU M. & TANAKA M. (1981a). Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou* II. Oncogenic nature. *Fish Pathol.*, **15**, 149–153.

KIMURA T., YOSHIMIZU M. & TANAKA M. (1983c). Susceptibility of different fry stages of representative salmonid species to *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Fish Pathol.*, **17**, 251–258.

KIMURA T., YOSHIMIZU M., TANAKA M. & SANNOHE H. (1981b). Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou* virus (OMV) I. Characteristics and pathogenicity. *Fish Pathol.*, **15**, 143–147.

KOHARA K. & DENDA I. (2010). Production of allotriploid “Shinsyu Salmon” by chromosome manipulation. *Fish Genet. Breed Sci.*, **37**, 6–66.

KUMAGAI A., TAKAHASHI K. & FUKUDA H. (1994). Epizootics caused by salmonid herpesvirus type 2 infection in maricultured coho salmon. *Fish Pathol.*, **29**, 127–134.

TANAKA M., YOSHIMIZU M. & KIMURA T. (1984). *Oncorhynchus masou* virus: Pathological changes in masu salmon (*Oncorhynchus masou*), chum salmon (*O. keta*) and coho salmon (*O. kisutch*) fry infected with OMV by immersion method. *Bull. Jpn Soc. Scientif. Fisheries*, **50**, 431–437.

YOSHIMIZU M. (2009). Control strategy for viral diseases of salmonid fish, flounders and shrimp at hatchery and seeds production facility in Japan. *Fish Pathol.*, **44**, 9-13.

YOSHIMIZU M., FUKUDA H., SANO T. & KIMURA T. (1995). Salmonid herpesvirus 2. Epizootiology and serological relationship. *Vet. Res.*, **26**, 486–492.

YOSHIMIZU M. & KASAI H. (2011). Chapter 7: Oncogenic viruses and *Oncorhynchus masou* virus. In: Fish Diseases and Disorders, Vol. 3, Second Edition: Viral, Bacterial and Fungal Infections. Woo P.T.K. & Bruno D.D., eds., CAB International, UK, 276–301.

YOSHIMIZU M., KIMURA T. & WINTON J.R. (1985). An improved technique for collecting reproductive fluid samples from salmonid fishes. *Prog. Fish Culturist*, **47**, 199–200.

YOSHIMIZU M. & NOMURA T. (2001). *Oncorhynchus masou* virus (OMV): Epidemiology and its control strategy. *Bull. Nat. Res. Inst. Aquaculture*, **Suppl. 5**, 11–14.

YOSHIMIZU M., NOMURA T., EZURA Y. & KIMURA T. (1993). Surveillance and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and *Oncorhynchus masou* virus (OMV) of wild salmonid fish returning to the northern part of Japan 1976 to 1991. *Fisheries Res.*, **17**, 163–173.

YOSHIMIZU M., TAKIZAWA H. & KIMURA T. (1986). U.V. susceptibility of some fish pathogenic viruses. *Fish Pathol.*, **21**, 47–52.

YOSHIMIZU M., TANAKA M. & KIMURA T. (1987). *Oncorhynchus masou* virus (OMV): Incidence of tumor development among experimentally infected representative salmonid species. *Fish. Pathol.*, **22**, 7–10.

YOSHIMIZU M., YOSHINAKA T., HATORI S. & KASAI H. (2005). Survivability of fish pathogenic viruses in environmental water, and inactivation of fish viruses. *Bull. Fish. Res. Agen.*, **Suppl. 2**, 47–54.

*
* * *

NB: Существует Референтная лаборатория МЭБ по болезни, вызываемой вирусом *Oncorhynchus masou*

(смотрите 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/>).

За любой дополнительной информацией о болезни, вызываемой вирусом *Oncorhynchus masou*, пожалуйста, обращайтесь в Референтные лаборатории МЭБ.