

ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ

1. Предмет рассмотрения

Инфекция вирусом инфекционного некроза гемопоэтической ткани означает инфицирование патогенным возбудителем, новирабдовирусом лососевых (также известным как вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани [IHNV]) рода *Novirhabdovirus* и семейства *Rhabdoviridae*.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Рабдовирус рыб, IHNV, имеет вирион пулевидной формы, содержащий геном с несегментированной одноцепочечной РНК отрицательного смысла размером примерно в 11 000 нуклеотидов, которая кодирует шесть белков в следующем порядке: нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G), невирионный протеин (NV) и полимеразы (L). Наличие уникального NV гена и сходство последовательности с некоторыми другими рабдовирусами рыб, такими как вирус вирусной геморрагической септицемии, обусловило создание рода *Novirhabdovirus* семейства *Rhabdoviridae*, с отнесением к нему IHNV, как типового вида. Типовым штаммом IHNV является штамм Западного регионального аквакультурного центра (WRAC), имеющийся в Американской коллекции типовых культур (ATCC VR-1392). Геномная последовательность WRAC штамма хранится в GenBank под номером доступа L40883 (Morzunov с соавт., 1995; Winton & Einer-Jensen, 2002).

Анализ последовательности был использован для проведения сравнения изолятов IHNV из Северной Америки, Европы и Азии (Emmenegger с соавт., 2000; Enzmann с соавт., 2005; Enzmann с соавт., 2010; Johansson с соавт., 2009; Kim с соавт., 2007; Kolodziejek с соавт., 2008; Kurath с соавт., 2003; Nishizawa с соавт., 2006; Troyer & Kurath, 2003). В рамках исторического естественного ареала вируса в западной части Северной Америки, большинство изолятов IHNV, выделенных у тихоокеанского лосося, образуют две геногруппы, которые родственны по географическому расположению, но не по году выделения и хозяйскому виду. Изоляты в этих двух геногруппах демонстрируют относительно низкий уровень нуклеотидного разнообразия, что позволяет предположить наличие эволюционного стаза или более старого родства хозяин-патоген. Напротив, изоляты IHNV, выделенные у разводимой на ферме радужной форели в США, образуют третью геногруппу с более высоким уровнем генетического разнообразия и эволюционным паттерном указывающим на продолжающуюся адаптацию к новому хозяину или условиям разведения. Изоляты, выделенные у разводимой на ферме радужной

форели в Европе и Азии, по-видимому, происходили из Северной Америки, но и они демонстрируют дальнейшую независимую дивергенцию в пределах их нового географического ареала (Enzmann с соавт., 2010; Kim с соавт., 2007; Nishizawa с соавт., 2006).

Исходя из результатов антигенных исследований с использованием нейтрализующей поликлональной кроличьей антисыворотки, изоляты IHNV образуют единственную серогруппу (Engelking с соавт., 1991), несмотря на то что при использовании мышинных моноклональных антител был выявлен ряд нейтрализующих антигенных детерминант на гликопротеине (Huang с соавт., 1994; Ristow & Arnzen de Avila, 1991; Winton с соавт., 1988), а также на существование ненейтрализующей групповой антигенной детерминанты, несомой нуклеопротеином (Ristow & Arnzen, 1989). Однако корреляция между генотипами и серотипам небольшая или отсутствует (Johansson с соавт., 2009). Во время природных случаев болезни и при экспериментальном заражении были зарегистрированы вариации в вирулентности и хозяйской преференции штаммов IHNV (Garver с соавт., 2006; LaPatra с соавт., 1993a).

2.1.2. Выживание вне хозяина

IHNV является термолабильным, неустойчив к кислотам и эфирам. Вирус выживает в свежей воде в течение как минимум одного месяца при пониженных температурах, особенно при наличии органического вещества.

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

IHNV без труда инактивируется обычными дезинфектантами и высушиванием (Wolf, 1988).

2.1.4. Жизненный цикл

Резервуарами IHNV являются клинически инфицированная рыба и скрытые носители среди аквакультурной, одичавшей и дикой рыбы. Выделение вируса в среду происходит с мочой, половыми жидкостями и внешней слизистой, тогда как при клинической форме инфекции местами наиболее обильного присутствия вируса являются почки, селезенка и другие внутренние органы (Bootland & Leong, 1999; Wolf, 1988).

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды, которые удовлетворяют критериям включения в список как восприимчивые к инфекции IHNV в соответствии с Главой 1.5. *Ветеринарно-санитарного Кодекса по водным животным (Водный Кодекс)*, являются следующими: арктический голец (*Salvelinus alpinus*), атлантический лосось (*Salmo salar*), голец (*Salvelinus fontinalis*), форель (*Salmo trutta*), чавыча (*Oncorhynchus tshawytscha*), кета (*Oncorhynchus keta*), кижуч (*Oncorhynchus kisutch*), лосось Кларка (*Oncorhynchus clarkii*), озерная форель

(*Salvelinus namaycush*), сима (*Oncorhynchus masou*), мраморная форель (*Salmo marmoratus*), щука (*Esox lucius*), радужная форель и нерка (*Oncorhynchus nerka*).

2.2.2. Виды, данные о восприимчивости которых являются неполными

Виды, данные о восприимчивости которых в соответствии с положениями Главы 1.5 *Водного Кодекса* являются неполными, включают: тихоокеанскую сельдь (*Clupea pallasii*), шайнер (*Cymatogaster aggregate*), длиннорылую колюшку (*Aulorhynchus flavidus*), налима (*Lota lota*) и белого осетра (*Acipenser transmontanus*).

Кроме того, были сообщения о получении положительных результатов при исследовании следующих видов рыбы с помощью патоген-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР): все разновидности и виды обыкновенного карпа (*Cyprinus carpio*) и американский желтый окунь (*Perca flavescens*), но активная инфекция не была выявлена.

2.2.3. Восприимчивые стадии развития хозяина

У нескольких видов лососевых при инфицировании ИHNV наиболее высоко восприимчивой стадией является молодь. Более взрослая рыба обычно более резистентна к клинической форме болезни, но у отдельных особей наблюдается высокая степень вариабельности в восприимчивости к инфекции ИHN вирусом. Как и в отношении вируса геморрагической септицемии, хорошее состояние здоровья рыбы, по-видимому, снижает степень восприимчивости к клинической инфекции ИHN вирусом, тогда как одновременное заражение бактериальными болезнями (например, холодноводной бактериальной болезнью), манипуляции и другие стрессогенные факторы могут приводить к переходу субклинических инфекций в клиническую форму. С возрастом резистентность рыбы к инфекции повышается до стадии метания икры, когда она опять становится очень восприимчивой и может выделять большие количества вируса в среду с половыми продуктами. Выжившие после инфекции ИHNV особи имеют напряженный защитный иммунитет с выработкой циркулирующих антител к вирусу (LaPatra с соавт., 1993b).

2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность обнаружения)

ИHNV имеет ярко выраженную филогеографическую сигнатуру (Enzmann с соавт., 2010; Kurath с соавт., 2003; Nishizawa с соавт., 2006), указывающую на хозяйские виды, из которых наиболее часто выделяют вирус в различных географических регионах (например, нерка в северо-восточной части Тихого океана – U геногруппа; чавыча в Калифорнии, США – L геногруппа; и радужная форель в Европе, Азии и Айдахо, США – E, J и M геногруппы, соответственно).

2.2.5. Целевые органы и инфицируемые ткани

Считается, что проникновение вируса происходит через жабры и у основания плавников, поскольку почки, селезенка и другие внутренние органы являются

местами, где во время клинической инфекции вирус присутствует в очень больших количествах (Bootland & Leong, 1999; Wolf, 1988).

2.2.6. Персистентное инфицирование пожизненными носителями

Исторически, географический ареал ИHNV инфекции был ограничен западной частью Северной Америки, но с импортом инфицированной рыбы и икринок болезнь распространилась в Европу и Азию. При заносе ИHNV в разводимую на ферме популяцию, болезнь может укорениться у восприимчивых видов дикой рыбы в водоеме. Продолжительность инфицирования ИHN вирусом отдельных особей рыбы варьирует в зависимости от температуры; однако в отличие от вируса инфекционного панкреатического некроза (IPNV) или вируса канального сома (CCV), состояние истинного пожизненного носительства ИHNV встречается редко.

2.2.7. Переносчики

Горизонтальная передача ИHNV обычно происходит при прямом подвергании воздействию, но было выдвинуто предположение, что в некоторых случаях определенную роль играют беспозвоночные переносчики (Bootland & Leong, 1999).

Двукрылые поденки (*Callibaetis* sp.) (Shors & Winston, 2003) и «лососевые вши» (*Lereophtheirus salmonis*) (Jakob с соавт., 2011) являются потенциальными переносчиками для ИHNV.

2.2.8. Известные и подозреваемые дикие водные животные-носители

ИHNV является эндемичным во многих популяциях свободно обитающих лососевых. Были выдвинуты предположения о наличии морского резервуара, но они не были подтверждены.

2.3. Паттерн болезни

Инфицирование ИHN вирусом часто приводит к смертности из-за нарушения баланса осмотически активных веществ и происходит в клиническом контексте отека и геморрагии. Размножение вируса в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров, гемопоэтической ткани и клетках почек предопределяет характер клинических признаков.

2.3.1. Механизмы передачи

Передача ИHNV между рыбами – преимущественно горизонтальная, большие количества вируса выделяются в среду инфицированной молодью, однако были зарегистрированы случаи вертикальной или ассоциированной с икринками передачи. Хотя ассоциированная с икринками передача значительно снижена благодаря современной общепринятой практике дезинфекции поверхности икринок раствором йодофора, это – единственный механизм, объясняющий появление ИHNV инфекции в новых географических местоположениях у молоди лосося, полученной из икринок, инкубация и выведение из которых производилось в водах, не содержащих вирус (Winton, 1991).

2.3.2. Превалентность

Инфекция ИHN вирусом эндемична и широко превалирует в популяциях свободно обитающих лососевых в бóльшей части его исторического ареала, вдоль западного побережья Северной Америки. Вирус также укоренился с высоким уровнем превалентности в основных регионах выращивания форели Северной Америки, Европы и Азии, куда ИHNV был занесен при перемещении инфицированной рыбы или икринок.

2.3.3. Географическое распространение

ИHNV инфекция была выявлена в Северной Америке, Азии и Европе, но не выявлена в Южном полушарии. Следующие страны сообщили в МЭБ о наличии подтвержденных или подозреваемых случаев ИHNV инфекции: Австрия, Бельгия, Канада, Китай (Китайская Народная Республика), Хорватия, Чешская Республика, Франция, Германия, Иран, Италия, Япония, Республика Корея, Нидерланды, Польша, Россия, Словения, Испания, Швейцария и Соединенные Штаты Америки. Инфекции и клиническая форма болезни были зарегистрированы у рыбы, разводимой как в пресной, так и в морской воде.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Вспышки ИHNV инфекции могут быть эксплозивными до хронических в зависимости от вида рыбы, условий выращивания, температуры и, в некоторой степени, от штамма вируса. Потери при вспышках острой болезни будут составлять более нескольких процентов популяции в день, а совокупный уровень смертности может достигать 90–95% или выше (Bootland & Leong, 1999). В хронических случаях потери растянуты, и в прудах можно наблюдать рыбу на различных стадиях болезни.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Наиболее важным фактором окружающей среды, который влияет на развитие ИHNV инфекции, является температура воды. Экспериментальные исследования показали, что ИHNV инфекция может приводить к гибели при температуре 3°C до 18°C (Bootland & Leong, 1999); однако клиническая форма болезни в естественных условиях обычно наблюдается при 8°C и 15°C.

2.4. Контроль и профилактика

Методы контроля инфекции вирусом ИHN в настоящее время основаны на недопущении воздействия вируса посредством осуществления политики строгого контроля и использования целесообразных практик гигиены (Winton, 1991). Тщательная дезинфекция оплодотворенных икринок, использование источников поставки не содержащей вируса воды для инкубации и выращивания и работа предприятий при наличии внедренных мер биозащиты крайне важны для профилактики ИHNV инфекции на участке по производству рыбы.

2.4.1. Вакцинация

В течение 40 лет проводились научные исследования по созданию экспериментальных вакцин для защиты лососевых от инфекции ИHN вирусом с получением обнадеживающих результатов в отношении некоторых из них как при проведении лабораторных, так и полевых испытаний, с использованием методов введения погружением или посредством инъекции (Kurath, 2008; Winton, 1991; Winton, 1997). Как аутогенные, инактивированные вакцины, так и ДНК-вакцины были лицензированы для коммерческого использования в отрасли по аквакультурному разведению атлантического лосося в садках на западном побережье Северной Америки, где такие вакцины можно вводить экономично посредством инъекции. Однако в других странах вакцины против ИHNV инфекции пока не лицензированы, поскольку введение вакцин миллионам особей более мелкой рыбы потребует дополнительных научных исследований новых методов массового введения.

2.4.2. Фармакотерапия

Хотя производилось изучение применения фармакотерапевтических подходов к контролю ИHNV инфекции, ученые не установили их коммерческой целесообразности при использовании против данной болезни в аквакультуре (Winton, 1991).

2.4.3. Иммуностимуляция

Иммуностимуляторы являются предметом активных научных исследований, но коммерческая целесообразность их применения против ИHNV инфекции не установлена.

2.4.4. Выведение резистентной популяции

Экспериментальные испытания триплоидных или внутривидовых гибридов показали обнадеживающие результаты (Barroso с соавт., 2008; Winton, 1991), и в последнее время активно проводятся научные исследования генетической основы резистентности к ИHNV (Miller с соавт., 2004; Purcell с соавт., 2010).

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

В эндемичных районах, применяли практику использования менее восприимчивых видов для снижения степени воздействия ИHNV инфекции в аквакультуре.

2.4.6. Блокирующие агенты

В водных микробах были выявлены природные соединения, обладающие антивирусной активностью; однако, не установлено, что они подходят для коммерческого использования против ИHNV инфекции в аквакультуре (Winton, 1991).

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Дезинфекция икринок – очень эффективный метод блокирования ассоциированной с икринками передачи IHNV в местах аквакультурного разведения (Vovo с соавт., 2005).

Данный метод широко используется в районах, где вирус является эндемичным.

2.4.8. Общие практики ведения хозяйства

Кроме дезинфекции икринок, было выявлено, что использование источника подачи воды, не содержащей вирус, является крайне важным фактором для контроля IHNV инфекции в эндемичных районах. Имеется несколько подходов, которые включают использование скважин или природных источников воды, в которых отсутствует рыба или другие источники IHNV, и дезинфекцию источников поверхностных вод с помощью ультрафиолетового света или озона (Winton, 1991).

3. Отбор образцов

3.1. Выбор отдельных образцов

Клинические обследования лучше всего проводить в период, когда температура воды ниже 14°C. Все производственные объекты (пруды, резервуары, садки и т.д.) необходимо обследовать на наличие погибшей, ослабленной рыбы или рыбы с ненормальным поведением. Особое внимание следует уделять местам, где производится водосброс, где обычно собирается ослабленная рыба.

На фермах с лососевыми, при наличии радужной форели, для отбора образцов выбирается только рыба этого вида. Если радужной форели нет, образцы следует отбирать от рыбы всех других присутствующих видов, которые восприимчивы к IHNV инфекции, как указано в списке в Разделе 2.2.1. Отбор образцов от восприимчивых видов следует производить пропорционально или 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 при использовании популяций с неизвестным статусом по риску). Если для производства рыбы используется более одного водоема, то в образец должна быть включена рыба из всех водоемов. При наличии ослабленной рыбы, рыбы с ненормальным поведением, или недавно погибшей (неразложившейся) рыбы, выбирается такая рыба. 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 в целях 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 200 международных

единиц (МЕ) пенициллина, 200 мкг стрептомицина и 200 мкг канамицина на один мл, хотя можно также 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 не менее 4 мл транспортной среды, что представляет собой один объединенный в пул образец. В каждом образце должно быть как минимум 0,5 г ткани. Пробирки следует помещать 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 никогда не должна превышать 10°C и при получении в транспортном контейнере должен присутствовать лед или один или несколько морозильных блоков должны оставаться частично или полностью замороженными. Вирусологическое исследование необходимо начать как можно быстрее и не позднее чем через 48 часов после отбора образцов. В исключительных случаях вирусологическое исследование должно быть начато самое позднее в течение 72 часов после отбора материала при условии, что отобранный материал, подлежащий исследованию, 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 температурных требований во время транспортировки. Цельную рыбу можно завернуть в адсорбирующую бумагу и необходимо отправлять в пластиком пакете охлажденной, как указано выше. Можно также отправлять живую рыбу. Все операции по упаковке и этикетировке необходимо производить в соответствии с действующими национальными и международными требованиями к транспортировке, в зависимости от ситуации.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

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

Для маленькой молодежи, цельные особи рыбы длиной менее 4 см можно измельчить стерильными ножницами или скальпелем, после удаления части тушки за анальным отверстием. Если образец представляет собой цельную рыбу длиной 4-6 см, следует производить отбор внутренних органов, включая почки. Если образец состоит из цельных рыб длиной менее 4 см, их следует измельчать стерильными ножницами или скальпелем после удаления части тушки за анальным отверстием. Если образец состоит из цельной рыбы с длиной тушки от 4 до 6 см, следует отбирать внутренние органы, включая почки. Если образец состоит из цельной рыбы длиной более 6 см, следует отбирать образцы ткани, как описано выше. Образцы ткани следует измельчать стерильными ножницами или скальпелем, гомогенизировать и суспендировать в транспортной среде.

3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

IHNV – очень чувствителен к деградации, поэтому по возможности следует избегать отбора в качестве образцов тканей с высокой ферментативной активностью или большим количеством контаминирующих бактерий, таких как кишечник и кожа. Мышечная ткань также менее пригодна, поскольку обычно вирусная нагрузка в ней ниже.

4. Диагностические методы

«Золотым стандартом» для обнаружения IHNV является выделение вируса в культуре клеток с последующей его иммунологической и молекулярной идентификацией. Несмотря на то что для подтверждения идентичности вируса, выделенного в культуре клеток, или для подтверждения клинических инфекций у рыбы можно использовать и другие методы, перечисленные ниже, они не разрешены для использования в качестве методов первичного надзора для получения или сохранения статуса свободы от IHNV инфекции.

Ввиду значительной вариации в силе и продолжительности серологических ответов рыбы на вирусные инфекции, обнаружение у рыбы антител к вирусам до настоящего времени не было признано рутинным диагностическим методом для оценки вирусного статуса популяций рыбы. В будущем, валидация серологических методов для диагностики вирусных инфекций рыб может сделать серологическое исследование рыбы более широко применимым для диагностических целей. Однако наличие положительной серологической реакции, если таковая присутствует, считается предполагаемым свидетельством инфицирования IHNV в прошлом (Jorgensen с соавт., 1991).

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Болезнь обычно характеризуется макроскопическими признаками, которые включают вялость вперемежку с приступами бешеной ненормальной активности, потемнение кожи, бледные жабры, асцит, растянутое брюшко, пучеглазие и петехиальные геморрагии внутри и снаружи.

4.1.2. Изменения в поведении

Во время вспышек рыба обычно вялая с приступами бешеной ненормальной активности, такой как плавание по спирали и плескание. У некоторых видов наблюдается тянущийся след выброса фекалий. У некоторых из оставшихся в живых рыб наблюдается деформация позвоночника (Bootland & Leong, 1999).

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

У пораженной рыбы наблюдается потемнение кожи, бледные жабры, асцит, растянутое брюшко, пучеглазие и петехиальные геморрагии внутри и снаружи. Внутри у рыбы наблюдается анемия и отсутствие пищи в кишечнике. Печень,

почки и селезенка бледные. В органах брюшной полости наблюдается асцитические жидкости и петехии.

4.2.2. Клиническая химия

В крови пораженной молодежи наблюдается пониженный гематокрит, лейкопения, дегенерация лейкоцитов и тромбоцитов и большие количества продуктов распада клеток. Как и при других геморрагических вирусемиях рыбы в тяжелых случаях химия крови изменена (Bootland & Leong, 1999).

4.2.3. Микроскопическая патология

Гистопатологические выявления включают дегенеративный некроз в кроветворных тканях, почках, селезенке, печени, поджелудочной железе и пищеварительном тракте. Некроз эозинофильных гранулярных клеток в стенке кишечника является патогномичным для инфекции IHNV (Bootland & Leong, 1999).

4.2.4. Влажные препараты

Влажные препараты имеют ограниченную диагностическую ценность.

4.2.5. Тканевые отпечатки и мазки

Некробиотические тельца и пенистые макрофаги, характерные для клинического проявления инфекции IHNV, лучше всего поддаются выявлению при использовании тканевых отпечатков, полученных с почек и селезенки, а не при использовании мазков.

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

При электронной микроскопии инфицированных вирусом клеток выявляют вирионы пулевидной формы, приблизительно 150–190 нм в длину и 65–75 нм в ширину (Wolf, 1988). Вирионы видны у клеточной поверхности или внутри вакуолей или внутриклеточных пространств после баддинга через клеточные мембраны. Вирион имеет внешнюю оболочку, содержащую хозяйские липиды и шипы вирусного гликопротеина, которые вступают в реакцию при исследовании иммунологическим методом окрашивания золотом в целях очерчивания поверхности вириона.

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

В основе традиционной процедуры для обнаружения IHNV лежит выделение вируса в культуре клеток. Подтверждающую идентификацию можно произвести, используя иммунологические (реакция нейтрализации, непрямая реакция флуоресцирующих антител или твердофазный иммуноферментный анализ) или молекулярные (полимеразная цепная реакция, ДНК-зонд или секвенирование) методы (Arakawa с соавт., 1990; Amzen с соавт., 1991; Deering с соавт., 1991; Dixon & Hill, 1984; Jorgensen с соавт., 1991; LaPatra с соавт., 1989; Purcell с соавт., 2006; Winton & Einer-Jensen, 2002).

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Влажные препараты не подходят для обнаружения и идентификации ИHNV.

4.3.1.1.2. Мазки

Мазки не подходят для обнаружения и идентификации ИHNV.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

В ходе научных исследований использовали методы иммуногистохимии и гибридизации in-situ (ISH), но они не подходят для обнаружения или идентификации ИHNV в целях диагностики.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные среды

Следует использовать следующие линии клеток: EPC или FHM.

Обнаружение вируса на основании развития вирусного цитопатогенного действия (ЦПД) в культуре клеток должно производиться с последующей идентификацией с использованием либо тестов на основе антител, либо тестов на основе нуклеиновых кислот. При использовании любых тестов на основе антител необходимо, чтобы используемые антитела были валидированы в отношении их чувствительности и специфичности.

4.3.1.2.1.1. Выделение вируса

В лаборатории ткань в пробирках необходимо полностью гомогенизировать (либо с помощью гомогенизатора Stomacher, блендера, ступки и пестика со стерильным песком, либо с помощью любого подходящего и валидированного гомогенизатора), а затем суспендировать в оригинальной транспортной среде. В лаборатории необходимо откорректировать итоговое соотношение тканевого материала и транспортной среды, чтобы оно составляло 1:10.

Гомогенат центрифугируют в охлаждаемой центрифуге при 2°C–5°C и 2000–4000 g в течение 15 минут, супернатант отбирают и обрабатывают антибиотиками либо в течение четырех часов при 15°C, либо в течение ночи при 4°C (например, на данной стадии возможно полезно использовать 1 мг мл⁻¹ гентамицина). Если образец был доставлен в транспортной среде (т.е. подвергался воздействию антибиотиков), обработку антибиотиками можно не проводить. Обработка антибиотиками проводится с целью контроля бактериальной контаминации в образцах и делает ненужной фильтрацию через мембранные фильтры.

При возникновении трудностей на практике (например, поломка инкубатора, проблемы с культурами клеток 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. Если собранный супернатант хранится при -80°C в течение 48 часов после отбора образцов, его можно использовать для вирусологического исследования только один раз.

Необязательная обработка гомогената для инактивации конкурирующего вируса: обработка инокулятов антисывороткой против IPNV (который в некоторых частях света встречается в 50% образцов, отобранных у рыбы) производится с целью недопущения развития ЦПД, вызванного IPNV, чтобы можно было обнаружить IHNV в культуре клеток. Когда образцы поступают с производственных площадок, которые считаются свободными от IPN, обработку инокулятов антисывороткой против IPNV производить не следует. Перед инокуляцией клеток, супернатант смешивают с равными частями соответствующим образом разведенного пула антисывороток к местным серотипам IPNV и инкубируют в течение как минимум одного часа при 15°C или максимум в течение 18 часов при 4°C . Титр антисыворотки в реакции 50% нейтрализации бляшек должен быть не менее 1/2000.

4.3.1.2.1.2. Инокуляция клеточных монослоев

ЕРС или FHM клетки выращивают при 25°C в подходящей среде, например, минимальной поддерживающей среде Игла (или её модификациях) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки. (FBS) и антибиотиков в стандартных концентрациях. Когда клетки культивируют в закрытых флаконах, рекомендуется буферировать среду бикарбонатом. Среда, используемая для культивирования клеток в открытых сосудах, может быть буферирована Tris/HCl (23 mM) и Na-бикарбонатом (6 mM). Уровень pH должен составлять $7,6 \pm 0,2$. Культуры клеток, подлежащие инокуляции тканевым материалом, должны быть во время инокуляции молодыми (возраст: 4–48 часов) и активно растущими (не конфлюэнтными).

Обработанную антибиотиками органныю суспензию инокулируют в культуры клеток как минимум в двух разведениях, т.е. в первичном разведении и, дополнительно, в разведении 1:10, что дает конечные разведения материала тканей в клеточной культуральной среде в 1:100 и 1:1000, соответственно, (для недопущения гомологичной интерференции). Соотношение размера инокулята и объема клеточной культуральной среды должно составлять примерно 1:10. Для каждого разведения и каждой линии клеток следует использовать, как минимум, площадь клеток в примерно 2 см^2 , что соответствует одной лунке на 24-луночном планшете для культивирования клеток. Рекомендуется использовать планшеты для культивирования клеток, но также допустимо использовать и другие установки с такой же или бóльшей 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 инфекции вирусом.

Титрование замороженных запасов IPNV проводится как минимум каждые 6 месяцев или в целях подтверждения чувствительности клеток к инфекции при возникновении подозрения в сниженной чувствительности клеток.

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. Рекомендуется использовать фазово-контрастный микроскоп. При наличии явного ЦПД, следует немедленно начать процедуры по идентификации вируса.

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.

Аликвотные пробы 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 в Разделе 4.3.1.2.1.2. выше.

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

Затем инокулированные культуры инкубируют в течение 7–10 дней при 15°C, производя их обследование, как указано в Разделе 4.3.1.2.1.4. 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, 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 для токсического ЦПД.

При отсутствии ЦПД тест можно объявить отрицательным.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигена

4.3.1.2.2.1. Реакция нейтрализации (идентификация в культуре клеток)

- i) Собрать культуральную среду клеточных монослоев, демонстрирующих ЦПД, и центрифугировать аликвотную пробу 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 10^2 – 10^4 .
- iii) Смешать аликвотные пробы (например, 200 мкл) каждого разведения с равными объемами раствора антител к ИHNV. Раствор нейтрализующих антител (Nab) должен иметь 50% нейтрализующий бляшки титр не менее 2000. Таким же образом обработать набор аликвотных проб каждого разведения вируса клеточной культуральной средой для получения не-нейтрализованного контроля.
- iv) Параллельно, необходимо провести реакцию нейтрализации против гомологичного штамма ИHNV (положительная реакция нейтрализации) для подтверждения реактивности антисыворотки.
- v) Инкубировать все смеси при 15°C в течение 1 часа.
- vi) Перенести аликвотные пробы каждой из указанных выше смесей на 24-часовые монослои с нанесенной на них клеточной культуральной средой, содержащей 10% FBS (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.
- vii) Как только в ненейтрализованных контролях проявится ЦПД, проверить культуры клеток на появление ЦПД и произвести считывание результатов для каждого подозрительного по ИHNV образца. 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.
- viii) Тестируемый вирус идентифицируют как ИHNV, когда в культурах клеток, в которые была внесена вирусная суспензия, обработанная ИHNV-специфичными антителами, развития ЦПД не произошло или оно было

значительно замедленным, тогда как во всех других культурах клеток ЦПД было явным.

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

4.3.1.2.2.2. Непрямая реакция флуоресцирующих антител (IFAT)

В течение нескольких лет для обнаружения ИHNV были разработаны методы на основе антител для обнаружения антигенов, такие как IFAT, ИФА и другие иммуногистохимические методы. При использовании данных методов можно довольно быстро производить обнаружение и идентификацию по сравнению с процедурой выделения вируса в культуре клеток. Однако на результаты 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.

4.3.1.2.2.2.1. Непрямая реакция флуоресцирующих антител в культурах клеток

- i) Подготовить клеточные монослои в 2 см² лунках пластиковых планшетов для культивирования клеток или на покровных стеклах до получения примерно 80% конфлюэнтности, 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 FBS в клеточной культуральной среде можно снизить до 2–4%. Если необходимо идентифицировать большое количество изолятов вируса, рекомендуется использовать черные 96-луночные планшеты для иммунофлуоресценции.
- ii) Когда клеточные монослои готовы для инфицирования (т.е. в тот же день или на следующий день после посева), инокулировать вирусные суспензии, подлежащие идентификации, производя этапы десятикратных разведений прямо в лунках или сосудах с культурой клеток.
- iii) Произвести разведение контрольной вирусной суспензии ИHNV таким же образом для получения титра вируса примерно в 5000–10000 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на мл 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 (PBS), pH 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 см² 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 ИHNV антитела или сыворотки в 0,01 М PBS, pH 7,2, содержащем 0,05% Tween-80 (PBST), 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) Обработать 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 $0,25 \text{ мл } 2 \text{ см}^{-2}$ на лунку.
- xi) Промыть четыре раза с помощью PBST, как указано выше.
- xii) Обработать клеточные монослои в течение одного часа при 37°C раствором ФИТЦ- или тетраметилродамин-5-(и-6-) изоцитиоцианат (TRITC)-конъюгированных антител к иммуноглобулинам, использованным в первом слое 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 подготовить их на покровных стеклах с помощью, например, солевого раствора глицерина, pH 8,5, для микроскопического исследования.
- xv) Исследовать под падающим ультрафиолетовым светом, используя микроскоп с $\times 10$ окулярами и $\times 20$ – 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.

4.3.1.2.2.2.2. 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.
- vi) Регидратировать вышеуказанные препараты и заблокировать с помощью 5% обезжиренного молока или 1% бычьего сывороточного альбумина, в PBST в течение 30 минут при 37°C.
- vii) Промыть четыре раза с помощью PBST.
- viii) Обработать отпечатки раствором антител к ИННВ и промыть.
- ix) Блокировать и промыть.
- x) Выявить реакцию с помощью подходящих флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ)-конъюгированных специфических антител, промыть и исследовать.
- xi) Если тест отрицательный, подготовить образцы органов, хранящиеся при 4°C для проведения процедуры выделения вируса в культуре клеток, как описано выше.

Альтернативно можно использовать другие IFAT или иммуноцитохимические (щелочная фосфатаза или пероксидаза) методы с доказанной эффективностью.

4.3.1.2.2.3. Твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА)

- i) Сенсibilизировать лунки микропланшетов для проведения ИФА соответствующими разведениями очищенных иммуноглобулинов (Ig) или ИННВ-специфичной сыворотки, в 0,01 М PBS, рН 7,2 (200 мкл/лунка).
- ii) Инкубировать в течение ночи при 4°C.
- iii) Промыть четыре раза с помощью 0,01 М PBS, содержащего 0,05% Tween-20 (PBST).
- iv) Блокировать с помощью обезжиренного молока (5% в PBST) или другого блокирующего раствора в течение 1 часа при 37°C (200 мкл/лунка).
- v) Промыть четыре раза с помощью PBST.
- vi) Добавить 2% Triton X-100 в суспензию вируса, подлежащего идентификации.
- vii) Распределить по лункам, 100 мкл/лунка, двух- или четырех-этапные разведения вируса, подлежащего идентификации, и ИННВ контрольного вируса, и гетерологичного контроля вируса (например, вирус вирусной геморрагической септицемии). Отставить образцы для реагирования с сенсibilизирующими антителами к ИННВ на один час при 20°C.
- viii) Промыть четыре раза с помощью PBST.

- ix) Добавить в лунки либо биотинилированную поликлональную анти-ИHNV антисыворотку или МАb к N белку, специфичные для домена, отличные от таковых сенсibiliзирующих МАb и ранее конъюгированных с биотином.
- x) Инкубировать в течение одного часа при 37°C.
- xi) Промыть четыре раза с помощью PBST.
- xii) Добавить стрептавидин-конъюгированную пероксидазу хрена в те лунки, в которые были добавлены биотин-конъюгированные антитела, и инкубировать в течение одного часа при 20°C.
- xiii) Промыть четыре раза с помощью PBST. Добавить субстрат и хромаген. Остановить исследование при наличии реакции положительных контролей и произвести считывание результатов.
- xiv) Провести интерпретацию результатов в соответствии с показателями оптической плотности положительных и отрицательных контролей, и в обязательном порядке следовать руководствам для каждого теста, например плотность при 450 нм положительного контроля должна составлять как минимум 5–10 × A450 отрицательного контроля.

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

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция

4.3.1.2.3.1.1. Подготовка вирусной РНК

Производится экстракция всей РНК из инфицированных клеток с помощью метода разделения фаз (например, фенол-хлороформ или Trizol) или с помощью коммерческих наборов для выделения РНК, используемых в соответствии с инструкциями производителя. Несмотря на то, что все эти методы показывают хорошие результаты для осушенных клеточных монослоев или для дебриса, соли, присутствующие в тканевых культуральных средах, могут оказывать негативное воздействие на связывание РНК с колонками аффинной хроматографии, и для экстракции РНК из клеточных культуральных жидкостей следует использовать методы разделения фаз.

4.3.1.2.3.1.2. Процедура обратной транскрипции (ОТ) и стандартной полимеразной реакции (ПЦР)

- i) Приготовить мастер-микс для ряда образцов, подлежащих анализу. Работы следует производить под вытяжным колпаком и в перчатках.
- ii) Приготовление мастер-микса для проведения одной 50 мкл ПЦР с обратной транскрипцией осуществляется следующим образом: 23,75 мкл не

содержащей рибонуклеазу (DEPC-обработанной) воды или воды молекулярно-биологического класса чистоты; 5 мкл $10 \times$ буфера; 5 мкл 25 мМ $MgCl_2$; 5 мкл 2 мМ dNTP; 2,5 мкл (20 пмолей $мкл^{-1}$) расположенного выше праймера 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3'; 2,5 мкл (20 пмолей $мкл^{-1}$) расположенного ниже праймера 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'; 0,5 мкл Taq полимеразы (5 Е $мкл^{-1}$); 0,5 мкл AMV обратной транскриптазы (9 Е $мкл^{-1}$); 0,25 мкл RNазина (39 Е $мкл^{-1}$).

- iii) Центрифугировать пробирки в течение короткого периода времени (10 секунд), чтобы убедиться, что содержимое находится на дне.
- iv) Поместить пробирки в термоциклер и начать производить следующие циклы— 1 цикл: 50°C в течение 30 минут; 1 цикл: 95°C в течение 2 минут; 30 циклов: 95°C в течение 30 секунд, 50°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 60 секунд; 1 цикл: 72°C в течение 7 минут и пропитывание при 4°C.
- v) Визуализировать 693п.н-ПЦР ампликон посредством электрофореза продукта в 1,5% агарозном геле с этидиум бромидом и исследовать с использованием УФ трансиллюминации.

ПРИМЕЧАНИЕ: Данные ПЦР праймеры нацелены на центральную область G гена HN_V (Emmenegger с соавт., 2000). Несмотря на то, что для амплификации фрагментов N или G генов HN_V можно использовать другие наборы праймеров (Winton & Einer-Jensen, 2002), было продемонстрировано, что последовательности праймеров, указанные выше, являются консервативными у широкого круга изолятов HN_V и не присутствуют в G гене родственных рабдовирусов рыб, в вирусе вирусной геморрагической септицемии или рабдовирусе Хирам. Кроме того, новые праймеры продуцируют ампликон, который можно использовать в качестве матрицы для анализа последовательности. 'средней-G' области генома HN_V в эпизоотологических целях (Emmenegger с соавт., 2000; Kurath с соавт., 2003).

4.3.1.2.3.2. Другие основанные на амплификации анализы

Были разработаны другие методы для обнаружения HN_V на основе амплификации целевых последовательностей геномной или матричной РНК, в которых используется метод петлевой изотермической амплификации (LAMP) (Gunimaladevi с соавт., 2005) или высокочувствительный метод количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (Overturf с соавт., 2001). Однако эти анализы еще не прошли надлежащую лабораторную валидацию с использованием набора изолятов, представляющих различные генотипы HN_V, чтобы считаться подходящими для включения в список в качестве подтверждающего метода.

4.3.1.2.3.3. Секвенирование

Анализ последовательностей ПЦР ампликонов стал в последние годы более быстрым и менее дорогим и представляет собой хороший метод для

подтверждения IHNV (Winton & Einer-Jensen, 2002). Кроме того, анализ последовательности является одним из лучших подходов для идентификации генетических штаммов и для эпизоотологического отслеживания перемещения вируса (Emmenegger с соавт., 2000; Kim с соавт., 2007; Kurath с соавт., 2003; Nishizawa с соавт., 2006).

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для надзора, обнаружения и диагностики инфекции IHNV вирусом 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 обозначения 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 целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Гаметы	Мальки	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	c	c	d	b	d
Выделение вируса	a	a	a	a	a	c
Прямая световая микроскопия	d	c	d	d	b	c
Гистопатология	d	c	d	d	b	c
Трансмиссионная электронная микроскопия	d	d	d	d	b	c
Анализы на основе антител	d	c	c	c	a	b
ПЦР анализы	c	c	c	c	a	a
Секвенирование	d	d	d	d	c	a

ПЦР- полимеразная цепная реакция

6. Тест(-ы), рекомендованные для целевого надзора в целях объявления свободы от инфекционного некроза гемопоэтической ткани

Методом для целевого надзора в целях объявления свободы от инфекции IHNV является процедура выделения вируса в культуре клеток. Для этой цели следует проводить исследование наиболее восприимчивых видов на наиболее восприимчивых стадиях. Каждый год как минимум в один из периодов пробоотбора следует включать репродуктивные жидкости и ткани, отобранные у взрослой рыбы восприимчивого вида при нересте.

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Подозрительный случай определяется как присутствие типичных макроскопических клинических признаков болезни в популяции восприимчивой рыбы, ИЛИ типичной внутренней гистопатологической картины у восприимчивых видов, ИЛИ обнаружение антител к IHNV у восприимчивых видов, ИЛИ типичного цитопатогенного действия в культуре клеток без идентификации возбудителя, ИЛИ единичного положительного результата в одном из диагностических исследований, обозначенных как 'a' или 'b' в таблице 5.1.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Подтвержденный случай определяется как подозрительный случай, который ЛИБО: 1) продуцировал типичное цитопатогенное действие в культуре клеток с последующей идентификацией возбудителя с помощью одного из тестов на основе антител или молекулярных тестов, указанных в таблице 5.1., ЛИБО: 2) является вторым положительным результатом в одном из диагностических исследований, обозначенных как 'a' или 'b' в последней колонке таблицы 5.1.

Библиография

ARAKAWA C.K., DEERING R.E., HIGMAN K.H., OSHIMA K.H., O'HARA P.J. & WINTON J.R. (1990). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 8, 165–170.

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

BARROSO R.M., WHEELER P.A., LAPATRA S.E., DREW R.E. & THORGAARD G.H. (2008). QTL for IHNV resistance and growth identified in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) X Yellowstone cutthroat (*Oncorhynchus clarki bouvieri*) trout cross. *Aquaculture*, 277, 156–163.

BOOTLAND L.M. & LEONG J.C. (1999). Infectious hematopoietic necrosis virus. In: *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Woo P.T.K. & Bruno D.W., eds. CAB International, Oxon, UK, 57–121.

BOVO G., HÅSTEIN T., HILL B., LAPATRA S.E., MICHEL C., OLESEN N.J., SHCHELKUNOV I., STORSET A., WOLFFROM T. & MIDTLYING P.J. (2005). Hazard identification for vertical transfer of fish disease agents. Available at: <http://www.crl-fish.eu/upload/sites/crl-fish/reports/links/fisheggtrade%20wp1.pdf>.

DEERING R.E., ARAKAWA C.K., OSHIMA K.H., O'HARA P.J., LANDOLT M.L. & WINTON J.R. (1991). Development of a biotinylated DNA probe for detection and identification of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 11, 57–65. DIXON P.F. & HILL B.J. (1984). Rapid detection of fish rhabdoviruses by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture*, 42, 1–12.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) (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. EFSA J., 808, 1–144. Available at: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/ahaw_op_ej808_susceptspecies_opinion_en.pdf?ssbinary=true EMMENEGGER E.J.,

MEYERS T.R., BURTON T.O. & KURATH G. (2000). Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska. *Dis. Aquat. Org.*, 40, 163–176.

ENGELKING H.M., HARRY J.B. & LEONG J.C. (1991). Comparison of representative strains of infectious hematopoietic necrosis virus by serological neutralization and cross-protection assays. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1372–1378.

ENZMANN P.J., CASTRIC J., BOVO G., THIERY R., FICHTNER D., SCHÜTZE H. & WAHLI T. (2010). Evolution of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), a fish rhabdovirus, in Europe over 20 years: implications for control. *Dis. Aquat. Org.*, 89, 9–15.

ENZMANN P.J., KURATH G., FICHTNER D. & BERGMANN S.M. (2005). Infectious hematopoietic necrosis virus: Monophyletic origin of European IHNV isolates from North-American genogroup M. *Dis. Aquat. Org.*, 66, 187–195.

GARVER K.A., BATTS W.N. & KURATH G. (2006). Virulence comparisons of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) U and M genogroups in sockeye salmon and rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health*, 18, 232–243.

GUNIMALADEVI I., KONO T., LAPATRA S.E. & SAKAI M. (2005). A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Virol.*, 150, 899–909.

HUANG C., CHIEN M.S., LANDOLT M. & WINTON J.R. (1994). Characterization of the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein using neutralizing monoclonal antibodies. *Dis. Aquat. Org.*, 18, 29–35.

JAKOB E., BARKER D.S. & GARVER K.A. (2011). Vector potential of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* in the transmission of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV). *Dis. Aquat. Org.*, 97, 155–165.

JOHANSSON T., EINER-JENSEN K., BATTS W.N., AHRENS P., BJÖRKBLÖM C., KURATH G., BJÖRKLUND H. & LORENZEN N. (2009). Genetic and serological typing of European infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates. *Dis. Aquat. Org.*, 86, 213–221.

JORGENSEN P.E.V., OLESEN N.J., LORENZEN N., WINTON J.R. & RISTOW S.S. (1991). Infectious hematopoietic necrosis (IHN) and viral hemorrhagic septicemia (VHS): detection of trout antibodies to the causative viruses by means of plaque neutralization, immunofluorescence, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Aquat. Anim. Health*, 3, 100–108.

- KIM W.S., OH M.J., NISHIZAWA T., PARK J.W., KURATH G. & YOSHIMIZU M. (2007). Genotyping of Korean Isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Arch. Virol.*, 152, 2119–2124.
- KOŁODZIEJEK J., SCHACHNER O., DÜRRWALD R., LATIF M. & NOWOTNY N. (2008). "Mid-G" region sequences of the glycoprotein gene of Austrian infectious hematopoietic necrosis virus isolates form two lineages within European isolates and are distinct from American and Asian lineages. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 22–30.
- KURATH G. (2008). Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 27, 175–196.
- KURATH G., GARVER K.A., TROYER R.M., EMMENEGGER E.J., EINER-JENSEN K. & ANDERSEN E.D. (2003). Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *J. Gen. Virol.*, 84, 803–814.
- LAPATRA S.E., FRYER J.L. & ROHOVEC J.S. (1993a). Virulence comparison of different electropherotypes of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 16, 115–120.
- LAPATRA S.E., ROBERTI K.A., ROHOVEC J.S. & FRYER J.L. (1989). Fluorescent antibody test for the rapid diagnosis of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, 1, 29–36.
- LAPATRA S.E., TURNER T., LAUDA K.A., JONES G.R. & WALKER S. (1993b). Characterization of the humoral response of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, 5, 165–171.
- MILLER K.M., WINTON J.R., SCHULZE A.D., PURCELL M.K. & MING T.J. (2004). Major histocompatibility complex loci are associated with susceptibility of Atlantic salmon to infectious hematopoietic necrosis virus. *Environ. Biol. Fish.*, 69, 307–316.
- MORZUNOV S.P., WINTON J.R. & NICHOL S.T. (1995). The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vir. Res.*, 38, 175–192.
- NISHIZAWA T., KINOSHITA S., KIM W.S., HIGASHI S. & YOSHIMIZU M. (2006). Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Dis. Aquat. Org.*, 71, 267–272.
- OVERTURF K., LAPATRA S.E. & POWELL M. (2001). Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids. *J. Fish Dis.*, 24, 325–333.
- PURCELL M.K., HART S.A., KURATH G. & WINTON J.R. (2006). Strand-specific, real-time RT-PCR assays for quantification of genomic and positive-sense RNAs of the fish rhabdovirus, infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Virol. Methods*, 132, 18–24.
- PURCELL M.K., LAPATRA S.E., WOODSON J.C., KURATH G. & WINTON J.R. (2010). Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol.*, 28, 98–105.

RISTOW S.S. & ARNZEN J.M. (1989). Development of monoclonal antibodies that recognize a type 2 specific and a common epitope on the nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, 1, 119–125.

RISTOW S.S. & ARNZEN DE AVILA J.M. (1991). Monoclonal antibodies to the glycoprotein and nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) reveal differences among isolates of the virus by fluorescence, neutralization and electrophoresis. *Dis. Aquat. Org.*, 11, 105–115.

SHORS S.T. & WINSTON V. (2003). Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in an invertebrate (*Callibaetis* sp). *Am. J. Vet. Res.*, 50, 1307–1309.

TROYER R.M. & KURATH G. (2003). Molecular epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus reveals complex virus traffic and evolution within southern Idaho aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, 55, 175–185.

WINTON J.R. (1991). Recent advances in the detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1, 83–93.

WINTON J.R. (1997). Immunization with viral antigens: Infectious hematopoietic necrosis. *Dev. Biol. Stand.*, 90, 211– 220. Chapter 2.3.4. - Infection with infectious haematopoietic necrosis virus 2019 © OIE - Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals - 14/11/2019 15

WINTON J.R., ARAKAWA C.K., LANNAN C.N. & FRYER J.L. (1988). Neutralizing monoclonal antibodies recognize antigenic variants among isolates of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 4, 199–204.

WINTON J.R. & EINER-JENSEN K. (2002). Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis and viral hemorrhagic septicemia. In: *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*. Cunningham C.O., ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 49–79.

WOLF K. (1988). Infectious hematopoietic necrosis. In: *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 83–114.

*

* *

NB: Имеются Референтные лаборатории МЭБ по инфекционному некрозу гемопоэтической ткани (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 инфекционному некрозу гемопоэтической ткани)

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 1995 г. ПОД НАЗВАНИЕМ ИНФЕКЦИОННЫЙ НЕКРОЗ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ, САМОЕ ПОСЛЕДНЕЕ ОБНОВЛЕНИЕ БЫЛО ПРОИЗВЕДЕНО В 2019 г.