

ИРИДОВИРУСНАЯ БОЛЕЗНЬ КРАСНОГО МОРСКОГО КАРАСЯ**1. Область применения¹**

В целях данной главы, причиной иридовирусной болезни красного морского карася (RSIVD) (Inouye с соавт., 1992) считается инфицирование иридовирусом красного морского карася (RSIV).

RSIVD вызывает высокий уровень смертности среди разводимого красного морского карася (*Pagrus major*) и более тридцати других видов разводимой морской рыбы (Kawakami & Nakajima, 2002; Matsuoka с соавт., 1996), в основном принадлежащих к отряду Окунеобразные и Камбалообразные. Первая вспышка RSIVD была зарегистрирована у разводимого красного морского карася на острове Сикоку, Япония в 1990 году (Inouye с соавт., 1992). С тех пор болезнь вызывает массовую смертность среди популяций разводимой рыбы в западной части Японии, в основном среди ювенильных особей красного морского карася. У пораженной рыбы отмечается вялость, тяжелая анемия, петехии на жабрах и увеличение селезенки (Inouye с соавт., 1992; Jung с соавт., 1997; Nakajima & Maeno, 1998). Болезнь характеризуется появлением увеличенных клеток при окраске по Гимзе во время проведения гистопатологических исследований селезенки, сердца, почек, кишечника и жабр инфицированной рыбы (Inouye с соавт., 1992).

В течение последних лет было доказано, что болезнь вызывается не только RSIV (Inouye с соавт., 1992; Jeong с соавт., 2003; Jeong с соавт., 2006; Kurita с соавт., 2002; Kusuda с соавт., 1994; Nakajima & Kurita, 2005; Nakajima & Sorimachi, 1994) и синонимичными вирусами (Chou с соавт., 1998; Do с соавт., 2004; Do с соавт., 2005; Gibson-Kueh с соавт., 2004; Jung с соавт., 1997; Jung & Oh, 2000; Kim с соавт., 2002; Kurita с соавт., 2004; Miyata с соавт., 1997; Nakajima & Kurita, 2005; Sudthongkong с соавт., 2002b), но также вирусом инфекционного некроза селезенки и почек (ISKNV) (He с соавт., 2001; Oseko с соавт., 2004). Болезнь регистрируется не только в Японии, но также странах Восточной и Юго-Восточной Азии (Chou с соавт., 1998; Do с соавт., 2004; Do с соавт., 2005; Gibson-Kueh с соавт., 2004; Jeong с соавт., 2003; Jeong с соавт., 2006; Jung с соавт., 1997; Jung & Oh, 2000; Kim с соавт., 2002; Kurita с соавт., 2004; Miyata с соавт., 1997; Nakajima & Kurita, 2005; Oseko с соавт., 2004; Sudthongkong с соавт., 2002b).

С помощью моноклонального антитела (MAb) против RSIV (Nakajima & Sorimachi, 1995) можно обнаружить RSIV и ISKNV, однако оно не подходит для обнаружения ранавирусов рыб (семейство: Iridoviridae) методом иммунофлуоресцентного анализа (IFAT) (Nakajima с соавт., 1998; Oseko с соавт., 2004).

Используется ряд эффективных диагностических методов, таких как: исследования окрашенных мазков-отпечатков или срезов ткани, IFAT с использованием моноклонального антитела (Mab) и полимеразная цепная реакция (PCR/ПЦР) (Jeong с соавт., 2004; Kurita с соавт., 1998; Nakajima с соавт., 1995; Nakajima с соавт., 1998; Oshima с соавт., 1996; Oshima с соавт., 1998).

¹ NB: Версия принята на Всемирной ассамблее делегатов МЭБ в мае 2012 года.

Инактивированная формалином вакцина против RSIVD является эффективной и коммерчески доступной на рынке Японии (Nakajima с соавт., 1997; Nakajima с соавт., 1998).

2. Сведения о болезни

2.1. Характеристика возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Возбудителем болезни является иридовирус красного морского карася (RSIV) (Inouye с соавт., 1992; Jeong с соавт., 2003; Jeong et al., 2006; Kurita с соавт., 2002; Kusuda с соавт., 1994; Nakajima & Kurita, 2005; Nakajima & Sorimachi, 1994), штамм Ehime-1 и другие генотипы RSIV, включая вирусы, которые считаются синонимичными RSIV (Chou с соавт., 1998; Do с соавт., 2004; Do с соавт., 2005; Gibson-Kueh с соавт., 2004; Jung с соавт., 1997; Jung & Oh, 2000; Kim с соавт., 2002; Miyata с соавт., 1997; Nakajima & Kurita, 2005; Sudthongkong с соавт., 2002b). Болезнь также вызывается вирусом инфекционного некроза селезенки и почек (ISKNV) (Oseko с соавт., 2004), который является одним из вирусов, связанных с, но отличных от RSIV. Был обнаружен ряд других иридовирусов, которые вызывают схожие болезни у декоративной пресноводной рыбы (Sudthongkong с соавт., 2002a). Данные вирусы сложно отличить генетически от ISKNV, и не было установлено, должны ли данные болезни быть включены в группу RSIVD. В недавнее время иридовирус краснотелого тюрбо (TRBIV) (Shi с соавт., 2004; Shi с соавт., 2010) и его возможные синонимы (Do с соавт., 2005; Jeong с соавт., 2006), которые связаны с, но отличаются от RSIV и ISKNV, были зарегистрированы в Китайской Народной Республике и Республике Корея. Необходимо провести дальнейшие исследования, чтобы установить, нужно ли включить данную болезнь, вызываемую TRBIV, в группу RSIVD. Все вышеперечисленные возбудители принадлежат пятому роду семейства *Iridoviridae*, и они генетически и биологически отличимы от ранавирусов рыб, таких как, вирус эпизоотического гематопозитического некроза (EHNV), иридовируса европейского сома (ECV) и иридовируса групера (GIV= вирус сингапурского групера [SGIV]) (Kasornchandra & Khongpradit, 1997; Murali с соавт., 2002; Qin с соавт., 2001; Qin с соавт., 2003; Shi с соавт., 2004; Song с соавт., 2004), ни один из которых не является патогенным для красного морского карася (Nakajima & Maeno, 1998).

2.1.2. Выживание вне организма хозяина

Нет данных.

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Инактивируется при 56°C в течение 30 минут; чувствителен к эфиру и хлороформу; инактивируется хлороформом (0,1%); стабилен в тканях при –80°C.

2.1.4. Жизненный цикл

Неприменимо.

2.2. Характеристики хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Нижеследующие виды восприимчивы к RSIV: красный морской карась (*Pagrus major*), дальневосточный морской карась (*Acanthopagrus schlegeli*), крупночешуйный морской карась (*Acanthopagrus latus*), японский тай (*Evynnis japonica*), японская лакедра (*Seriola quinqueradiata*), большая сериола (*Seriola dumerili*), золотистая лакедра (*Seriola lalandi*), гибрид золотистой лакедры и японской лакедры (*S. lalandi* × *S. quinqueradiata*), зубатый каранкс (*Pseudocaranx dentex*), обыкновенный тунец (*Thunnus thynnus*), мелкопятнистая макрель (*Scomberomorus nipponius*), аргентинская скумбрия (*Scomber japonicus*), японская ставрида (*Trachurus japonicus*), полосатый оплегнат (*Oplegnathus fasciatus*), пятнистый ножезуб knifejaw (*Oplegnathus punctatus*), кобия (*Rachycentron canadum*), тупорылый помпано (*Trachinotus blochii*), трехлинейная парапристиптома (*Parapristipoma trilineatum*), пятнистый гатерин (*Plectorhinchus cinctus*), японский летрин (*Lethrinus haematopterus*), звездчатый летрин (*Lethrinus nebulosus*), пятнистая гирелла (*Girella punctata*), морской окунь (*Sebastes schlegeli*), большой желтый горбыль (*Pseudosciaena crocea*), группер-акаара (*Epinephelus akaara*), полосатый группер (*Epinephelus septemfasciatus*), малабарский группер (*Epinephelus malabaricus*), длиннозубый группер (*Epinephelus bruneus*), оранжево-пятнистый группер (*Epinephelus coioides*), группер-авоара (*Epinephelus awoara*), группер-таувина (*Epinephelus tauvina*), буропятнистый группер (*Epinephelus fuscoguttatus*), индоокеанский малоглазый группер (*Epinephelus lanceolatus*), японский морской судак (*Lateolabrax japonicus*), японские морские судаки *Lateolabrax* sp., баррамунд или морской окунь (*Lates calcarifer*), гибрид полосатого морского окуня и белого американского окуня (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*), большеротый окунь (*Micropterus salmoides*), ложный палтус (*Paralichthys olivaceus*), пятнистый палтус (*Verasper variegatus*), и красный иглобрюх-фугу (*Takifugu rubripes*). Нижеследующие виды восприимчивы к ISKNV: китайский окунь (*Siniperca chuatsi*), красный горбыль (*Sciaenops ocellatus*), черная кефаль (*Mugil cephalus*), и групперы.

2.2.2. Восприимчивые стадии развития хозяина

От ювенильных до взрослых особей (восприимчивость ювенильных особей как правило выше, чем взрослых).

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность обнаружения)

В случае инфицирования RSIV рыба, принадлежащая роду *Oplegnathus*, является более чувствительной, чем другие.

2.2.4. Поражаемые органы и ткани

Инфицированные клетки наблюдаются в селезенке, почках, сердце, кишечнике и жабрах.

2.2.5. Хроническая инфекция и постоянные носители

Нет данных.

2.2.6. Переносчики

Нет данных.

2.2.7. Известные или подозреваемые носители среди диких гидробионтов

Нет данных.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Пути передачи

Основной путь передачи RSIV – горизонтальный, через воду. Вертикальная передача RSIV не была исследована.

2.3.2. Превалентность

Болезнь наблюдается у разводимых популяций.

2.3.3. Географическое распространение

RSIVD, вызываемая RSIV и ISKNV, была зарегистрирована не только в Японии, но и в странах Восточной и Юго-Восточной Азии (Китайский Тайпэй, Китай [Китайская Народная Республика], Гонконг, Республика Корея, Малайзия, Филиппины, Сингапур и Таиланд) (Chou с соавт., 1998; Do с соавт., 2004; Do с соавт., 2005; Gibson-Kueh с соавт., 2004; Jeong с соавт., 2003; Jeong с соавт., 2006; Jung с соавт., 1997; Jung & Oh, 2000; Kawakami & Nakajima, 2002; Kurita с соавт., 2004; Miyata с соавт., 1997; Oseko с соавт., 2004; Sudthongkong с соавт., 2002b).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

В зависимости от вида рыбы-хозяина, размера и возраста рыбы, температуры воды и других условий, уровень смертности варьируется между 0% и 100%. Уровень заболеваемости неизвестен.

2.3.5. Факторы окружающей среды

В основном вспышки регистрируются в летний сезон при температуре воды 25°C и выше.

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

В настоящее время доступна эффективная коммерческая вакцина, инактивированная формалином, против RSIVD для следующих видов: красный морской карась (*Pagrus major*), каранкс зубатый (*Pseudocaranx dentex*), малабарский групер (*Epinephelus malabaricus*), оранжево-пятнистый групер (*Epinephelus coioides*) и другие виды рыб, принадлежащие к роду *Seriola*, в Японии. Защита рыбы, принадлежащей к роду *Oplegnathus* с помощью вакцинации представляется сложной.

2.4.2. Химиотерапия

Нет данных.

2.4.3. Иммуностимуляция

Проводятся исследования.

2.4.4. Разведение с целью повышения устойчивости

Проводятся исследования.

2.4.5. Восполнение популяции с помощью устойчивых видов

Проводятся исследования.

2.4.6. Блокирующие агенты

Нет данных.

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Нет данных.

2.4.8. Общие практики разведения

Используется ряд общих практик разведения для уменьшения потерь, связанных с RSIVD. Они включают: введение рыбы, свободной от патогенных факторов; осуществление гигиенических практик в хозяйствах; и воздержание от практик, которые могут привести к ухудшению качества воды и/или росту стрессовых факторов, таких как чрезмерная плотность посадки или чрезмерное кормление.

3. Отбор проб

3.1. Выбор отдельных образцов

Отбор рыбы в предсмертном состоянии.

3.2. Хранение проб для анализа

Хранить рыбу при температуре 4°C, использовать в течение 24 часов (или при –80°C при использовании в течение более долгого периода [до нескольких лет]).

3.3. Объединение проб

Разрешается объединять пробы ткани (селезенка и почки) от не более, чем пяти ювенильных особей рыбы (менее 3 см).

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Могут использоваться жабры и такие внутренние органы, как селезенка, сердце, почки, печень и кишечник, также рекомендуется отбирать пробы тканей селезенки и/или почек; в частности, селезенка может быть наиболее подходящим органом для подготовки мазков для использования в IFAT.

3.5. Не подходящие для использования пробы/ткани

Тушки рыб с тяжелыми признаками разложения тканей не подходят для исследований какими-либо методами.

4. Методы диагностики

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

У пораженной рыбы отмечается вялость, тяжелая анемия, петехии на жабрах и увеличение селезенки.

4.1.2. Изменения в поведении

Пораженная рыба плавает неактивно, частота дыхания становится аномальной, что

явно заметно и вызывается анемией.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

Бледные жабры и увеличенная селезенка.

4.2.2. Клиническая химия

Низкая гематокритная величина.

4.2.3. Микроскопическая патология

См. методы для мазков (Раздел 4.2.5) и электронной микроскопии/цитопатологии (Раздел 4.2.6). По результатам микроскопической патологии должно быть подтверждено наличие аномально увеличенных клеток в тканях таких органов, как: селезенка, сердце, почки, кишечник или жабры.

4.2.4. Влажные препараты

Нет.

4.2.5. Мазки

Подтвердить наличие аномально увеличенных клеток в окрашенных по Гимзе мазках-отпечатках селезенки.

4.2.6. Фиксированные срезы

Подтвердить наличие аномально увеличенных, как правило, базофильных клеток в срезе селезенки, окрашенном гематоксилин-эозином.

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Подтвердить наличие вирионов (200–240 нм в диаметре) в увеличенных клетках.

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Нет.

4.3.1.1.2. Мазки

По результатам исследования мазков-отпечатков, зафиксированных в ацетоне, от пораженной рыбы могут быть обнаружены аномально увеличенные клетки селезенки, сердца или почек. Такие увеличенные клетки реагируют на моноклональные антитела против RSIV (M10) в анализе на основе антител для обнаружения антигенов (IFAT) (Nakajima с соавт., 1999).

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

По результатам исследования гистологических срезов от пораженной рыбы могут быть обнаружены аномально увеличенные клетки селезенки, сердца, почек, печени, кишечника или жабр. Такие увеличенные клетки могут

реагировать на моноклональные антитела против RSIV в иммуногистохимическом анализе. Однако, данный метод еще полностью не валидирован.

4.3.1.2. Изоляция и идентификация возбудителя

Изоляция RSIV и ISKNV от морской рыбы осуществляется при использовании клеточной линии Grunt fin (GF) (Oseko с соавт., 2004); изоляция вирусов от пресноводной рыбы, такой как гурами, представляется сложно осуществимой. Ткани селезенки и/или почек от пораженной рыбы являются подходящими пробами. Клетки должны быть выращены в базальной среде Игла (BME) с 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) при температуре 25°C в инкубаторе с контролем температуры для обеспечения дальнейшей успешной изоляции RSIV. Вирусы для использования в качестве положительного контроля можно получить из Референтной лаборатории МЭБ по RSIVD. Неинфицированные клетки используются в качестве отрицательного контроля. После развития вирусного цитопатического эффекта (СРЕ/ЦПЭ) проводится идентификация вируса методом на основе антител для обнаружения антигенов (IFAT) и/или на основе нуклеиновых кислот (ПЦР).

4.3.1.2.1. Клеточная культура /искусственная среда

4.3.1.2.1.1. Инокуляция клеточных монослоев

i) После процедуры экстракции вируса, описанной в Главе 2.3.0. Раздел А.2.2.2, сделать дополнительное десятикратное разбавление 1/10 части супернатантов (надосадочная жидкость) гомогената селезенки и перенести соответствующий объем каждого из двух разбавлений на 24-часовые монослой клеток. Ввести не менее 2 см² осушенного клеточного монослоя вместе с 100 мкл каждого разбавления.

ii) Дать впиться в течение 0,5-1 часа при 25°C и, не извлекая инокулят, добавить среду с клеточной культурой, буферизованной при pH 7,6 и дополненную 2% фетальной бычьей сывороткой (1 мл на лунку для 24-луночных планшетов для клеточной культуры), и инкубировать при 25°C, используя инкубатор с контролируемой температурой.

4.3.1.2.1.2. Мониторинг процесса инкубации

i) Наблюдать за развитием инфекции в положительном контроле и других инокулированных культурах клеток с помощью ежедневного микроскопического исследования при увеличении ×40-100 в течение 10 дней. Рекомендуются использовать фазово-контрастный микроскоп.

ii) Если в данных клеточных культурах, в которые были внесены разбавления исследуемых гомогенатов, появляется ЦПЭ, необходимо немедленно провести процедуру идентификации (см. ниже).

Если осуществляется программа надзора/контроля за здоровьем рыбы, может возникнуть необходимость принять меры по приостановлению утвержденного статуса здоровья производственного объекта и/или зоны (если она была утверждена ранее), из которой был взят образец, предположительно

позитивный на наличие вируса. Приостановление утвержденного статуса будет продолжаться до тех пор, пока не будет доказано, что данный вирус не является RSIV или ISKNV.

iii) Если после 10 дней инкубации в инокулированных культурах (несмотря на нормальное развитие ЦПЭ в контрольных образцах) не будет развиваться ЦПЭ, то инокулированные культуры должны быть пересеяны еще на 7 дней. Если в контрольном образце вируса не развивается ЦПЭ, этот процесс следует повторить со свежими восприимчивыми клетками и новыми партиями образцов.

4.3.1.2.1.3. Процедуры пересева

i) Собрать аликвоты клеточной культуральной среды из всех монослоев, инокулированных с разбавлениями каждого супернатанта тестового гомогената.

ii) Инокулировать монослои клеток, как описано выше (Инокуляция монослоев клеток, этапы i и ii).

iii) Инкубировать и наблюдать, как описано выше (Инкубация монослоев клеток, этапы i и ii и Мониторинг этапов инкубации i и ii).

В случае отсутствия ЦПЭ тест может быть объявлен отрицательным.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов (IFAT) в мазках-отпечатках

Пробы, подлежащие тестированию, включают мазки-отпечатки селезенки поражённой рыбы.

В качестве отрицательного контроля использовать мазки-отпечатки селезенки неинфицированной рыбы, а в качестве положительного - мазки-отпечатки селезенки рыбы, инфицированной RSIV, согласно официальному подтверждению.

Положительный контроль (высушенный воздухом и фиксированный мазок-отпечаток селезенки инфицированной рыбы) может быть получен в Референтной лаборатории МЭБ. В качестве отрицательного контроля использовать отпечатки селезенки здоровой рыбы.

4.3.1.2.2.1. Процедура проведения исследования

i) Тщательно обескровить рыбу.

ii) Сделать отпечатки селезенки на очищенных стеклянных предметных стеклах микроскопа.

iii) Хранить образцы селезенки при температуре 4°C вместе с другими органами, необходимыми для изоляции вируса, в случае, если это понадобится позднее.

iv) Дать отпечаткам высохнуть на воздухе в течение 20 минут.

v) Зафиксировать отпечатки холодным ацетоном.

vi) Обработать отпечатки раствором моноклональных антител (M10) в течение 30 минут при температуре 37°C во влажной камере.

vii) Промыть три раза фосфатно-буферным солевым раствором (PBS).

viii) Инкубировать отпечатки в течение 30 минут при 37°C во влажной камере с раствором специфического антимышиного антитела, конъюгированного флуоресцеиновым изотиоцианатом (FITC), подготовленного в соответствии с инструкциями поставщика. Эти антитела ФИТЦ чаще всего являются антителами кролика или козы.

ix) Промыть три раза с помощью фосфатно-буферного солевого раствора.

x) Перед микроскопическим наблюдением установить предметные стекла микроскопа с покровными стеклами, используя глицероловый солевой раствор.

xi) Исследовать под непрямым ультрафиолетовым светом с помощью микроскопа с $\times 10$ окулярами и $\times 20-40$ линзами объектива. Положительный и отрицательный контроль должны дать ожидаемые результаты до начала любого другого наблюдения.

4.3.1.2.2.2. Уровни валидации

- Специфичность и чувствительность: моноклональные антитела M10 могут обнаруживать как RSIV, так и ISKNV (31), но не обнаруживают ранавирусы. Реактивность моноклональных антител против TRBIV еще не подтверждена.

- «Золотой» стандарт: аномально увеличенная клетка с сильной флуоресценцией подтверждается с помощью IFAT.

4.3.1.2.2.3. Интерпретация результатов

- Если тест положительный, то рыба, от которой были получены образцы, считается инфицированной RSIV или ISKNV, а болезнью является RSIVD. Если тест отрицательный, необходимо обработать пробы органов, хранящиеся при температуре 4°C, для выделения вируса в клеточных культурах, как описано выше.

4.3.1.2.2.4. Доступность проведения исследования

Реагенты и биологические материалы можно получить в Референтной лаборатории МЭБ или из коммерческих источников. Моноклональные антитела M10 можно получить в Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3. Методы обнаружения антигенов на основе антител (IFAT, ИФА и т.д.) в клеточной культуре

RSIV (возможно, ISKNV также) не может быть идентифицирован с помощью реакций нейтрализации, так как антисыворотки, генерируемые при иммунизации кроликов, имеют мало нейтрализующих антител.

4.3.1.2.3.1. Непрямая реакция флуоресцирующих антител

Образцы, которые необходимо отобрать для исследования, включают фиксированные в ацетоне инфицированные клеточные монослои с развитым

ЦПЭ.

Использовать незараженный клеточный монослой в качестве отрицательного контроля и зараженный RSIV клеточный монослой в качестве положительного контроля.

IFAT проводится непосредственно после выделения вируса в клеточной культуре.

4.3.1.2.3.1.1. Процедура проведения исследования

- i) Приготовить монослой клеток на покровном стекле, чтобы достичь примерно 80% конфлюенции, которая обычно достигается в течение 24 часов после инкубации при 25°C. Содержание FBS в среде клеточной культуры снижается до 2%.
- ii) Когда монослой клеток будут готовы, засеять вирусную суспензию, которая должна быть идентифицирована при разведении с шагом десять путем добавления непосредственно в лунки или колбы клеточных культур.
- iii) Инкубировать при температуре 25°C в течение 24-72 часов.
- iv) При появлении ЦПЭ удалить среду клеточной культуры, трижды промыть фосфатно-буферным солевым раствором (PBS). Инфицированные клетки высушить на воздухе и зафиксировать холодным ацетоном (хранить при температуре -20°C) в течение 10 минут.
- v) Дать монослоям клеток высохнуть на воздухе в течение не менее 30 минут и немедленно обработать или заморозить при -20°C.
- vi) Приготовить раствор моноклональных антител M10 при предварительно определенном разбавлении.
- vii) Обработать монослой клеток раствором моноклональных антител в течение 30 минут при температуре 37°C во влажной камере.
- viii) Промыть клетки три раза в течение 5 минут с помощью PBS.
- ix) Инкубировать со специальным антимышиными антителами, конъюгированными флуоресцеиновым изотиоцианатом (FITC) (подготовленными в соответствии с инструкциями поставщика) в течение 30 минут при 37°C во влажной камере в темноте.
- x) Промыть три раза в течение 5 минут с помощью PBS.
- xi) Немедленно осмотреть обработанные монослой клеток на пластиковых планшетах или установить покровное стекло с использованием глицеринового соляного раствора при pH 8,5 до микроскопического наблюдения.
- i) Исследовать под падающим ультрафиолетовым светом с помощью микроскопа с $\times 10$ окулярами и $\times 20-40$ линзами объектива. Положительный и отрицательный контроль должны дать ожидаемые результаты до проведения любого другого наблюдения. Положительные результаты показываются диффузной флуоресценцией по всей цитоплазме.

4.3.1.2.3.1.2. Уровни валидации

- Специфичность и чувствительность: моноклональные антитела M10 способны обнаруживать как RSIV, так и ISKNV (Oseko и др., 2004); не обнаруживает ранавирусов. Реактивность моноклональных антител против TRBIV еще не подтверждена.

- «Золотой» стандарт: ЦПЭ характеризуется большим количеством увеличенных клеток, а наличие вируса подтверждается с помощью обнаружения ЦПЭ в IFAT.

4.3.1.2.3.1.2. Интерпретация результатов

- Изолированным вирусом является RSIV или ISKNV, а болезнью - RSIVD.

4.3.1.2.3.1.3. Доступность проведения исследования

Реагенты и биологические материалы можно получить в Референтной лаборатории МЭБ по RSIVD или из коммерческих источников. Моноклональные антитела M10 можно получить в Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.4.1. Полимеразная цепная реакция

Исследуемые образцы включают селезенку пораженной рыбы или надосадочную жидкость из клеточных культур, в которых развился ЦПЭ.

Использовать извлеченную ДНК из селезенки неинфицированной рыбы или извлеченную ДНК из супернатанта неинфицированной культуры клеток в качестве отрицательного контроля. Использовать извлеченную ДНК из селезенки подтвержденных RSIV-инфицированных рыб или извлеченную ДНК из супернатанта инфицированных клеточных культур как положительный контроль. Выбирать меры контроля в зависимости от типа исследуемых образцов.

4.3.1.2.4.1.1. Извлечение ДНК из образца органа или супернатанта клеточной культуры изолированного вируса

Образцы рыб или надосадочные жидкости клеточных культур готовятся, как описано в работе Kurita с соавт., 1998 для выделения ДНК. В качестве положительного контроля использовать предварительно подтвержденный орган или супернатант, пораженный RSIV (или ISKNV), из клеточных культур, пораженных RSIV (или ISKNV). Использовать органы здоровой рыбы или супернатанты незараженных клеточных культур в качестве отрицательного контроля.

4.3.1.2.4.1.2. Амплификация полимеразной цепной реакции

RSIV и ISKNV имеют большие геномы двухцепочечной ДНК. Для амплификации последовательности генов (570 оснований) ДНК обоих вирусов - RSIV и ISKNV методом ПЦР используется набор праймеров, прямой праймер

1-F (5'-CTC-AAA-CAC-TCT-GGC-TCA-TC-3') и обратный праймер 1-R (5'-GCA-CCA-ACA-CAT-CTC-CTA-TC-3') (Kurita с соавт., 1998). (Следует обратить внимание, что предыдущие праймеры МЭБ, специфичные RSIV, 4-F [5'-CGG-GGG-CAA-TGA-CGA-CTA-CA-3'] и 4-R [5'-CCG-CCT-GTG-CCT-TTT-CTG-GA-3']; ожидаемый размер продукта - 568 п.о.] не амплифицируют ДНК ISKNV [Oseko с соавт., 2004]). Оба набора праймеров описаны Kurita с соавт., 1998.

Экстрагированную ДНК (1 мкл) добавляют в Таq-полимеразный буфер, содержащий 1 мМ каждого праймера, 200 мМ дезоксинуклеотидного трифосфата и 1,25 Ед ДНК-полимеразы ExTaq в 20 мМ Mg²⁺ ПЦР-буфера. Смесь инкубируется в автоматическом термоциклере, запрограммированном на 30 циклов при 94°C в течение 30 секунд, 58°C в течение 60 секунд и 72°C в течение 60 секунд, и, наконец, выдерживается при 72°C в течение 5 минут. Амплифицированная ДНК (570 п.о.) анализируется электрофорезом в агарозном геле.

4.3.1.2.4.1.3. Уровни валидации

Специфичность и чувствительность: набор праймеров 1-F и 1-R может амплифицировать как ДНК RSIV, так и ДНК ISKNV с достаточной чувствительностью. Предыдущий набор праймеров 4-F и 4-R также обладает достаточной чувствительностью для RSIV, но не может быть использован для амплификации ДНК ISKNV. Реактивность этих наборов праймеров по отношению к TRBIV еще не подтверждена.

«Золотой» стандарт: продукт ПЦР ожидаемого размера подтверждается электрофорезом при использовании наборов праймеров 1-F и 1-R.

4.3.1.2.4.1.4. Интерпретация результатов

Положительный результат в ПЦР с использованием набора праймеров 1-F и 1-R, а также подтвержденная специфичность с помощью секвенирования, свидетельствуют о наличии RSIV или ISKNV и о том, что болезнь является RSIVD. Положительный результат дополнительной ПЦР с использованием предыдущего набора праймеров 4-F и 4-R и в сочетании с предыдущей ПЦР свидетельствует о том, что вирус является RSIV и что болезнь является RSIVD, вызванная RSIV. Отрицательный результат при использовании этого опционального вторичного ПЦР указывает на то, что вирус - ISKNV, а болезнь - RSIVD, вызванная ISKNV.

4.3.1.2.4.1.5. Доступность проведения исследования

Реагенты можно получить в Референтной лаборатории МЭБ или из коммерческих источников.

4.3.1.2.5. Очистка возбудителя

Путем ультрацентрифугирования в градиенте CsCl (10–35% в весовом соотношении). Плотность полученных вирионов составляет приблизительно 1,25–1,3 г/мл⁻¹.

4.3.2. Серологические методы

Серологические методы с использованием сыворотки пораженной рыбы еще не разработаны.

5. Рейтинг исследований по цели использования

В качестве примера, методы, доступные в настоящее время для целевого надзора и диагностики RSIVD, перечислены в таблице 5.1. Обозначения, используемые в таблице: a = метод является рекомендуемым методом из соображений доступности, полезности, диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод имеет применение в некоторых ситуациях, но стоимость, точность, или другие факторы сильно ограничивают его применение; и d = в настоящее время метод не рекомендуется для использования в данных целях. Рейтинг в некоторой степени является субъективным, поскольку пригодность включает в себя такие факторы, как надежность, чувствительность, специфичность и полезность. Хотя не все анализы, перечисленные в категории a или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они широко используются и дают надежные результаты, делает их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы целевого мониторинга и диагностики

| Метод | Целевое наблюдение | | | | Предположительный диагноз | Подтверждающий диагноз |
|--|--------------------|--------------|------------------|----------------|---------------------------|------------------------|
| | Личинки | Послеличинки | Ювенильные особи | Взрослые особи | | |
| Общие признаки | d | d | d | d | b | d |
| Биопроба (изоляция вируса в клеточной культуре) и идентификация методом IFAT или ПЦР | c | c | c | c | a | a |
| Прямая световая микроскопия | d | d | c | d | b | d |
| Гистопатология | d | d | d | d | b | d |
| Трансмиссионная электронная | d | d | d | d | b | d |

| | | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|-----|
| микроскопия | | | | | | |
| Анализы на основе антител (IFAT) изолированного вируса или мазка-отпечатка | c | c | c | c | a | a/b |
| ПЦР | c | c | c | c | a | a |
| Секвенирование | d | d | d | d | a | a |

IFAT = иммунофлуоресцентный анализ на основе антител; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Тест(ы), рекомендованный(ые) для целевого надзора в целях получения статуса свободы от природной вирусной болезни красного морского карася

Метод обнаружения в рамках надзора не установлен, поскольку носительство возбудителей еще не исследовано. Предварительными методами являются изоляция вируса, IFAT или вложенная ПЦР (Choi с соавт., 2006).

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Определение случая с подозрением на болезнь

Подозревается наличие RSIV или ISKNV при одном из нижеперечисленных критериев:

1. Наличие типичных клинических признаков и подтверждение наличия аномально расширенных клеток в мазке-отпечатке или срезах тканей.
2. Наличие типичных клинических признаков и подтверждение наличия вирионов в аномально увеличенных клетках с помощью электронной микроскопии.
3. Выделение вирусов с специфическим ЦПЭ.
4. Наличие клеток, положительных в IFAT, в мазках-отпечатках.

7.2. Определение случая с подтвержденным наличием болезни

Наличие RSIV или ISKNV считается подтвержденным, если в дополнение к критериям, указанным в 7.1, выполняется один или несколько из следующих критериев:

1. Выделение вируса с специфическим ЦПЭ и положительный результат в IFAT с использованием инфицированных клеточных культур.
2. Выделение вируса с специфическим ЦПЭ и положительный результат в ПЦР с использованием в качестве шаблона экстрактов ДНК изолированного вируса.
3. Положительный результат в ПЦР с использованием ДНК, экстрагированной из пораженных органов, в качестве шаблона.
4. Наличие типичных аномально увеличенных клеток с положительными результатами IFAT в мазках-отпечатках.

8. Список литературы

- CHOI S.K., KWON S.R., NAM Y.K., KIM S.K. & KIM K.H. (2006). Organ distribution of red sea bream iridovirus (RSIV) DNA in asymptomatic yearling and fingerling rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and effects of water temperature on transition of RSIV into acute phase. *Aquaculture*, 256, 23–26.
- CHOU H.Y., HSU C.C. & PENG T.Y. (1998). Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. *Fish Pathol.*, 33, 201–206.
- DO J.W., CHA S.J., KIM J.S., AN E.J., PARK M.S., KIM J.W., KIM Y.C., PARK M.A. & PARK J.W. (2005). Sequence variation in the gene encoding the major capsid protein of Korean fish iridoviruses. *Arch. Virol.*, 150, 351–359.
- DO J.W., MOON C.H., KIM H.J., KO M.S., KIM S.B., SON J.H., KIM J.S., AN E.J., KIM M.K., LEE S.K., HAN M.S., CHA S.J., PARK M.S., PARK M.A., KIM Y.C., KIM J.W. & PARK J.W. (2004). Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. *Virology*, 325, 351–363.
- GIBSON-KUEH S., NGOH-LIM G.H., NETTO P., KURITA J., NAKAJIMA K. & NG M.L. (2004). A systematic iridoviral disease in mullet, *Mugil cephalus* L. and tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal: a first report and study. *J. Fish Dis.*, 27, 693–699.
- HE J.G., DENG M.S., WENG P., LI Z., ZHOU S.Y., LONG Q.X., WANG X.Z. & CHANG S.M. (2001). Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, 291, 126–139.
- INOUE K., YAMANO K., MAENO Y., NAKAJIMA K., MATSUOKA M., WADA Y. & SORIMACHI M. (1992). Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 27, 19–27.
- JEONG J.B., JUN J.L., YOO M.H., KIM M.S., KOMISAR J.L. & JEONG H.D. (2003). Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, 220, 119–133.
- JEONG J.B., KIM H.Y., KIM H.K., CHUNG J.K., KOMISAR J.L. & JEONG H.D. (2006). Molecular comparison of iridoviruses isolated from marine fish cultured in Korea and imported from China. *Aquaculture*, 255, 105–116.
- JEONG J.B., PARK K.H., KIM H.Y., HONG S.H., CHUNG J.K., KOMISAR J.L. & JEONG H.D. (2004). Multiplex PCR for the diagnosis of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, 235, 139–152.
- JUNG S., MIYAZAKI T., MIYATA M., DANAYADOL Y. & TANAKA S. (1997). Pathogenicity of iridovirus from Japan and Thailand for the red sea bream *Pagrus major* in Japan, and histopathology of experimentally infected fish. *Fisheries Sci.*, 63, 735–740.
- JUNG S.J. & OH M.J. (2000). Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. *J. Fish Dis.*, 23, 223–226.
- KASORNCHANDRA J. & KHONGPRADIT R. (1997). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic iridovirus in nursing grouper, *Epinephelus marabarcus*. In:

- Diseases in Asian Aquaculture III. Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 61–66.
- KAWAKAMI H. & NAKAJIMA K. (2002). Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1996 to 2000. *Fish Pathol.*, 37, 45–47.
- KIM Y.J., JUNG S.J., CHOI T.J., KIM H.R., RAJENDRAN K.V. & OH M.J. (2002). PCR amplification and sequence analysis of irido-like virus infecting fish in Korea. *J. Fish Dis.*, 25, 121–124.
- KURITA J., NAKAJIMA K., HIRONO I. & AOKI T. (1998). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.*, 33, 17–23.
- KURITA J., NAKAJIMA K., HIRONO I. & AOKI T. (2002). Complete genome sequencing of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fisheries Sci.*, 68 (suppl. II), 1113–1115.
- KURITA J., NGOH-LIM G.H., GIBSON-KUEH S., DE LA PENA L., CHUAH T.T., PALAMISAMY V., SANO M., OSEKO N., MAENO Y. & NAKAJIMA K. (2004). Phylogenetic analysis of red sea bream iridovirus-like viruses in Southeast Asia. In: 7th Asian Fisheries Forum 04 Abstracts, Penang, Malaysia, 381.
- KUSUDA R., NAGATO K. & KAWAI K. (1994). Characteristics of an iridovirus isolated from red sea bream, *Pagrus major*. *Suisanzoshoku*, 42, 151–156.
- MATSUOKA S., INOUE K. & NAKAJIMA K. (1996). Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1991 to 1995. *Fish Pathol.*, 31, 233–234.
- MIYATA M., MATSUNO K., JUNG S.J., DANAYADOL Y. & MIYAZAKI T. (1997). Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. *J. Fish Dis.*, 20, 127–134.
- MURALI S., WU M.F., GUO I.C., CHEN S.C., YANG H.W. & CHANG C.Y. (2002). Molecular characterization and pathogenicity of a grouper iridovirus (GIV) isolated from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, 25, 91–100.
- NAKAJIMA K. & KURITA J. (2005). Red sea bream iridoviral disease. *Uirusu.*, 55, 115–126.
- NAKAJIMA K. & MAENO Y. (1998). Pathogenicity of red sea bream iridovirus and other fish iridoviruses to red sea bream. *Fish Pathol.*, 33, 143–144.
- NAKAJIMA K., MAENO Y., FUKUDOME M., FUKUDA Y., TANAKA S., MATSUOKA S. & SORIMACHI M. (1995). Immunofluorescence test for the rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using monoclonal antibody. *Fish Pathol.*, 30, 115–119.
- NAKAJIMA K., MAENO Y., HONDA A., YOKOYAMA K., TOORIYAMA T. & MANABE S. (1999). Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. *Dis. Aquat. Org.*, 36, 73–75.
- NAKAJIMA K., MAENO Y., KURITA J. & INUI Y. (1997). Vaccination against red sea bream iridoviral disease in red sea bream. *Fish Pathol.*, 32, 205–209.
- NAKAJIMA K., MAENO Y., YOKOYAMA K., KAJI C. & MANABE S. (1998). Antigen analysis of red sea bream iridovirus and comparison with other fish iridoviruses. *Fish Pathol.*, 33, 73–78.

- NAKAJIMA K. & SORIMACHI M. (1994). Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 29, 29–33.
- NAKAJIMA K. & SORIMACHI M. (1995). Production of monoclonal antibodies against red sea bream iridovirus. *Fish Pathol.*, 30, 47–52.
- OSEKO N., CHUAH T.T., PALAMISAMY V., MAENO Y. & KURITA J. (2004). Iridovirus isolated from diseased sea bass *Lateolabrax niloticus* and red drum *Sciaenops ocellatus* causing mass mortality in Malaysia. In: 7th Asian Fisheries Forum 04 Abstracts, Penang, Malaysia, 127.
- OSHIMA S., HATA J., HIRASAWA N., OHTAKA T., HIRONO I., AOKI T. & YAMASHITA S. (1998). Rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using the polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, 32, 87–90.
- OSHIMA S., HATA J., SEGAWA C., HIRASAWA N. & YAMASHITA S. (1996). A method for direct DNA amplification of uncharacterized DNA viruses and for development of a viral polymerase chain reaction assay: Application to the red sea bream iridovirus. *Anal. Biochem.*, 242, 15–19.
- QIN Q.W., CHANG S.F., NGOH-LIM G.H., GIBSON-KUEH S., SHI C. & LAM T.J. (2003). Characterization of a novel ranavirus isolated from grouper *Epinephelus tauvina*. *Dis. Aquat. Org.*, 53, 1–9.
- QIN Q.W., LAM T.J., SHEN H., CHANG S.F., NGOH G.H. & CHEN C.L. (2001). Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*. *J. Virol. Methods*, 98, 17–24.
- SHI C.Y., JIA K.T., YANG B. & HUANG J. (2010). Complete genome sequence analysis of a Megalocytivirus (family Iridoviridae) associated with turbot mortality in China. *Virol. J.*, 7, 159.
- SHI C.Y., WANG Y.G., YANG S.L., HUANG J. & WANG Q.Y. (2004). The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China. *Aquaculture*, 236, 11–25.
- SONG W.J., QIN Q.W., QIU J., HUANG C.H., WANG F. & HEW C.L. (2004). Functional genomic analysis of Singapore grouper iridovirus: Complete sequence determination and proteomic analysis. *J. Virol.*, 78, 12576–12590.
- SUDTHONGKONG C., MIYATA M. & MIYAZAKI T. (2002a). Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. *Dis. Aquat. Org.*, 48, 163–173.
- SUDTHONGKONG C., MIYATA M. & MIYAZAKI T. (2002b). Viral DNA sequences of genes encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South China Sea and Southeast Asian countries. *Arch. Virol.*, 147, 2089–2109.

*

* *

NB: Назначена Референтная лаборатория МЭБ по придовirusной болезни красного морского карася

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

Для получения более подробной информации об иридовirusной болезни красного морского карася можно обратиться в Референтные лаборатории МЭБ