

## ВЕСЕННЯЯ ВИРЕМИЯ КАРПОВ

---

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

Весенняя виремия карпов (ВВК/SVC) - это рабдовирусная инфекция, способная вызвать острую геморрагическую и контагиозную виремию у некоторых видов карпа и некоторых других видов карповых и икталуровых. В контексте данной главы ВВК считается инфекцией вирусом весенней вiremии карпов (вирусом ВВК). Подробные ссылки можно найти в обзорах Wolf, 1988, Ahne с соавт., 2002 и Dixon, 2008.

### 2. Информация о болезни

#### 2.1. Характеристики возбудителя

##### 2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Этиологическим возбудителем ВВК является вирус весенней вiremии карпов (вирус ВВК), вида из рода *Vesiculovirus* семейства вирусов *Rhabdoviridae* (Carsten, 2010).

Геном вируса представляет собой несегментированную отрицательно-полярную одноцепочную РНК. Геном содержит 11 019 нуклеотидов, кодирующих пять белков в следующем порядке: нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P), матричный протеин (M), гликопротеин (G) и РНК-зависимая РНК-полимераза (L). Геном не содержит не-вирионный (NV) ген между генами G и L, как это обнаружено у рыбных рабдовирусов рода *Novirhabdovirus* (Ahne с соавт., 2002). Типовой штамм вируса ВВК получен из Американской коллекции типовых культур (ATCC VR-1390). Две полные последовательности генома этого типа штамма были представлены в Genbank (регистрационный номер Genbank U18101 Björklund с соавт., 1996 и регистрационный номер Genbank AJ318079 Hoffmann с соавт., 2002). Полная последовательность генома изолятов из Китая (Народная Республика) также депонирована в Genbank (регистрационный номер Genbank DQ097384, Teng с соавт., 2007 г. и регистрационный номер Genbank EU177782, Zhang с соавт., 2009 г.).

Stone с соавт., 2003 использовали анализ последовательности 550 нуклеотидной области G-гена, чтобы сравнить 36 изолятов из разных видов рыб и географических мест, ранее идентифицированных, как вирус ВВК или рабдовирус щуки (PFRV) с помощью серологических методов исследования. Анализ показал, что изоляты можно разделить на четыре отдельные геногруппы и что все изоляты вируса ВВК можно отнести к геногруппе I, разделяя нуклеотидную идентичность <61% с вирусами в трех других геногруппах. Геногруппа II содержала один изолят из карпа, ранее идентифицированный серологически как PFRV, геногруппа III содержала эталонный изолят PFRV, а геногруппа IV содержала большое количество не определенных изолятов и изолятов, ранее идентифицированных как PFRV. Последняя геногруппа была названа группой рабдовируса линия (TenRV) в честь вида, из которого был выделен самый ранний член. Дальнейший анализ также показал, что геногруппа I вируса ВВК может быть далее подразделена по крайней мере на четыре подгруппы. Ahne с соавт., 1998, показали, что два вируса также можно дифференцировать с помощью анализа рибонуклеазной защиты с

---

<sup>1</sup> NB: Версия адаптирована Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012.  
2019 © МЭБ – Руководство по диагностическим тестам для водных животных - 14/11/2019

использованием зонда G-гена, предполагая, что между этими двумя вирусами существуют генетические различия.

Антитела, направленные против вируса ВВК, в различной степени перекрестно реагируют с представителями трех других геногрупп, что указывает на то, что вирусы обладают общими антигенами, хотя и являются генетически различными. Было показано, что вирусы имеют общие антигенные детерминанты белков G, N и M, но могут быть дифференцированы с помощью реакций нейтрализации (Jørgensen с соавт., 1989).

### **2.1.2. Выживание вне хозяина**

Было показано, что вирус остается жизнеспособным вне хозяина в течение 5 недель в речной воде при 10°C, в течение более 6 недель в прудовой грязи при 4°C и до 4 дней в прудовой грязи при 10°C (Ahne, 1976).

### **2.1.3. Стабильность возбудителя**

Вирус инактивируется при 56°C в течение 30 минут, при pH 12 в течение 10 минут и pH 3 в течение 2 часов (Ahne, 1986). Окислители, додецилсульфат натрия, неионные детергенты и липидные растворители являются эффективными для инактивации вируса ВВК. Следующие дезинфицирующие средства также эффективны для инактивации: 3% формалин в течение 5 минут, 2% гидроксид натрия в течение 10 минут, 540 мг на литр<sup>-1</sup> хлора в течение 20 минут, 200-250 ч/млн (частей на миллион) соединения йода в течение 30 минут, 100 ч/млн бензалкония хлорида в течение 20 минут, 350 ч/млн алкилтолуола в течение 20 минут, 100 ч/млн хлоргексидина глюконата в течение 20 минут и 200 ч/млн крезола в течение 20 минут (Ahne, 1982; Ahne & Held, 1980; Kiryu с соавт., 2007). Вирус может храниться в течение нескольких месяцев при замораживании в среде, содержащей 2–5% сыворотки. Вирус наиболее стабилен при более низких температурах, с небольшой потерей титра при хранении в течение 1 месяца при -20°C или в течение 6 месяцев при -30 или -74°C (Ahne, 1976; Kinkelin & Le Berre, 1974). Вирус стабилен в течение четырех циклов замораживания (-30°C) в среде, содержащей 2% сыворотки (Kinkelin & Le Berre, 1974).

### **2.1.4. Жизненный цикл**

Вирус, по всей видимости, проникает в хозяина через жабру. Затем наблюдается виремия, и вирус быстро распространяется в печень, почки, селезенку и пищеварительный тракт. Вирус может быть обнаружен в фекалиях, а также попадает в воду через фекалии и мочу.

## **2.2. Характеристика хозяина**

### **2.2.1. Восприимчивые виды хозяев**

Встречающиеся в природе ВВК-инфекции были зарегистрированы у следующих видов карповых: карп обыкновенный (*Cyprinus carpio carpio*) и карп кои (*Cyprinus carpio koi*), золотой карась (*Carassius carassius*), толстолобик обыкновенный (*Hypophthalmichthys molitrix*), толстолобик пестрый (*Aristichthys nobilis*), карп (белый амур) (*Stenopharyngodon idella*), серебряный карась (*Carassius auratus*), язь (*Leuciscus idus*) и линь (*Tinca tinca*) и лещ (*Abramis brama*) (Basic с соавт., 2009; Dixon, 2008). Сообщалось, что три вида индийского карпа, меригал (*Cirrhinus merigala* [= *C. cirrhosus*]), роху (*Labeo rohita*) и катля (*Catla catla* [= *Gebelion catla*]),

являются хозяевами вируса ВВК (Haghighi Khiabanian Asl с соавт., 2008a), но данные нуклеотидной последовательности от подтверждающей обратной транскрипционной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР), депонированной в Genbank, не совпадают с известными данными нуклеотидной последовательности вируса ВВК (DM Stone, pers. comm.). Кроме того, выведенная аминокислотная последовательность имеет только ограниченное сходство с вирусом ВВК, и поэтому требуется дальнейшая работа, чтобы определить, имеет ли этот вирус происхождение вируса ВВК. Вирус также был выделен из не-карповых сомов (также известных как европейский сом или сом обыкновенный) (*Silurus glanis*) и из щуки (*Esox lucius*); вирусная нуклеиновая кислота также была обнаружена у щуки с помощью комбинированной ОТ-ПЦР и гнездовой ПЦР (Koutná с соавт., 2003).

Также сообщалось, что вирус ВВК был выделен из Нильской тилапии (*Sarotherodon niloticus*) (Soliman с соавт., 2008) и радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) (Jeremic с соавт., 2004; Haghighi Khiabanian Asl с соавт., 2008b). Иммуногистохимия составляла единственную основу идентификации вируса ВВК из Нильской тилапии; предполагается, что электронная микроскопия показывает вирус в ядре, что не является признаком инфекции вирусом ВВК. Haghighi Khiabanian Asl с соавт., 2008 использовали ту же ОТ-ПЦР для идентификации вируса в радужной форели, которая показала сомнительные результаты при использовании для типирования вируса у индийского карпа, описанного выше, и поэтому идентичность этого вируса в радужной форели ожидает подтверждения. Вирус, выделенный из радужной форели Jeremic с соавт., 2004, впоследствии был подтвержден как вирус ВВК с помощью анализа нуклеотидной последовательности, но попытки инфицировать радужную форель вирусом путем внутрибрюшинной инъекции оказались безуспешными, хотя вирус был вирулентным для карпа обыкновенного (PF Dixon, J. Munro и D.M. Stone, неопубликованные данные). Следовательно, статус радужной форели и тилапии как хозяев вируса ВВК остается нерешенным и ждет дальнейших подтверждающих данных. Некоторые серологические тесты не отличают вирус ВВК от представителей других геногрупп, описанных Stone с соавт., 2003, и важно, чтобы данные последовательности использовались для подтверждения идентичности предполагаемых изолятов вируса ВВК от новых хозяев.

Было показано, что другие виды карповых подвержены вирусу ВВК при экспериментальном заражении в ванне, включая плотву (*Rutilus rutilus*) (Haenen & Davidse, 1993), в то время как рыба-зебра (*Danio rerio*) и золотистый синец (*Notemigonus crysoleucas*) были заражены вирусом ВВК посредством внутрибрюшинной инъекции (см. Dixon, 2008). Разумно предположить, что другие виды карповых в умеренных водах могут быть подвержены инфекции. Другие виды также могут быть заражены экспериментально, например, гуппи (*Lebistes reticulatus*). Сообщалось, что обыкновенная солнечная рыба (*Lepomis gibbosus*) была экспериментально инфицирована вирусом ВВК, но нет никаких подтверждающих данных.

Нуклеотидная последовательность гена G рабдовируса, выделенного из тихоокеанской белой креветки *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* на Гавайях, более чем на 99% идентична последовательности вируса ВВК (Johnson с соавт., 1999) и серологически связана с вирусом ВВК. Вирус вызвал смертность у молоди тихоокеанской голубой креветки *L. stylirostris*, получавшей пищевые гранулы, пропитанные вирусом (Lu & Loh, 1994).

### 2.2.2. Восприимчивые стадии хозяина

Как правило, молодь рыбы в возрасте до 1 года наиболее подвержена клиническим заболеваниям, но могут быть поражены все возрастные группы. Кроме того, существует высокая вариабельность степени восприимчивости к ВВК среди особей этих видов рыб. Помимо физиологического состояния рыбы, роль которого плохо изучена, возраст или возрастной статус врожденного иммунитета, по-видимому, чрезвычайно важны: чем моложе рыба, тем выше восприимчивость к явным болезням, хотя даже взрослые рыбы-производители могут быть подвержены инфекции.

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

Разновидности карпа обыкновенного являются основными хозяевами вируса ВВК и считаются наиболее восприимчивыми к инфекции вирусом ВВК, за которыми следуют, в порядке восприимчивости, другие виды карпа (включая гибриды), другие восприимчивые виды карповых рыб и, наконец, восприимчивые виды не карповых рыб. При отборе образцов в рамках программы эпиднадзора за ВВК преимущественно выбирают карпа или его разновидности, такие как карп кои или карп-альбинос (кои × обыкновенный) карп, за которым следуют гибриды карпа (например, карп обыкновенный × карась), а затем другие виды карпа, такие как карась, серебряный карась, белый амур, толстолобик пестрый и толстолобик обыкновенный. Если эти виды недоступны, то отбор образцов следует проводить от других известных восприимчивых видов в следующем предпочтительном порядке: линь, орфе, сом обыкновенный и, наконец, любые другие имеющиеся виды карповых. В целях наблюдения за болезнью все виды карповых должны рассматриваться как потенциальные скрытые носители вируса ВВК. Виды карповых обычно смешиваются в поликультурных системах, и риск передачи вируса ВВК между видами во время вспышек болезней высок.

### **2.2.4. Целевые органы и инфицированная ткань**

Высокие титры вируса наблюдаются в печени и почках инфицированной рыбы, но более низкие титры наблюдаются в селезенке, жабрах и мозге).

### **2.2.5. Стойкая инфекция у пожизненных носителей**

Резервуары вируса ВВК это клинически инфицированные рыбы и носители скрытого вируса среди культивируемых, одичавших или диких рыб. Факторы, влияющие на стойкость и продолжительность состояния носительства, не изучались

### **2.2.6. Векторы**

Среди живых организмов, беспозвоночные паразиты *Argulus foliaceus* (Crustacea, Branchiura) и *Piscicola geometra* (Annelida, Hirudinea) переносили вирус ВВК от больных к здоровым рыбам в экспериментальных условиях, и вирус был выделен из *A. foliaceus*, удаленного из зараженного карпа (Ahne с соавт., 2002; Dixon, 2008). Цаплю (*Ardea cinerea*) кормили карпом, инфицированным вирусом ВВК и заставляли ее срыгнуть рыбу через определенные промежутки времени после кормления. Вирус был выделен из рыб, которых срыгнули через 120 минут после кормления.

### **2.2.7. Дикие водные животные с известным статусом носительства или подозрением на него**

В большинстве случаев вирус ВВК был зарегистрирован в культивируемой рыбе, но вирус был выделен как из заболевших, так и, по-видимому, здоровых диких карпов в озерах.

Было высказано предположение, что возможный способ передачи вируса – перемещение приманки, но нет данных, подтверждающих это (Goodwin с соавт., 2004). Основным способом передачи вируса из одного района в другой является перемещение зараженной рыбы. Вирус часто встречается у декоративных рыб, таких как серебряный карась и карп кои, которых регулярно перевозят по всему миру.

## **2.3. Паттерн болезни**

### **2.3.1. Механизмы передачи**

Способ передачи вируса ВВК является горизонтальным, но передачу «ассоциированную с икринками» (обычно называемую «вертикальной» передачей) нельзя исключить после одного сообщения о выделении вируса ВВК из жидкости яичника карпа, хотя в дальнейшем таких сообщений не было. Горизонтальная передача может быть прямой или векторной, вода является основным абиотическим вектором (Fijan, 1988). Одушевленные векторы-переносчики (раздел 2.2.6) и фомиты также могут участвовать в передаче вируса (Fijan, 1988). Как только вирус ВВК будет обнаружен в поголовье рыбы в водоеме или прудовом хозяйстве, его может быть очень трудно уничтожить, не уничтожив все виды жизни на месте производства рыбы.

### **2.3.2. Превалентность**

Существует очень мало данных о распространенности ВВК, хотя было проведено небольшое количество исследований распространенности антител против вируса. В одном из таких исследований карпы в 19 из 20 обследованных инкубаториев показали положительные результаты в отношении антител против вируса. Данные, собранные за 10-летний период 1992–2002 гг. из Сербии, показали, что вирус был выделен из карпа в 12 из 38 инкубаториев. Вирус может возникать спорадически в разных прудах на одном участке и спорадически из года в год на разных участках.

### **2.3.3. Географическое распределение**

В течение длительного времени географический диапазон вируса ВВК был ограничен странами европейского континента, где зимой наблюдаются низкие температуры воды. Следовательно, заболевание было зарегистрировано в большинстве европейских стран и в некоторых западных независимых государствах бывшего Советского Союза (Беларусь, Грузия, Литва, Молдова, Россия и Украина) (см. Dixon, 2008 для ссылок на эти и следующие местоположения). Однако в 1998 году заболевание было зарегистрировано у серебристого карася в озере в Бразилии, в 2002 году оно впервые было зарегистрировано на двух отдельных участках в США, а в Канаде - в 2006 году. Обнаружение вируса у карпа в Китае (Народная Республика) было подтверждено в 2004 году. Подтверждение выделения вируса ВВК от радужной форели и индийского карпа в Иране и от тилапии в Ниле в Египте ожидает получения дополнительных данных, и поэтому для добавления этих стран в географический диапазон вируса, также необходимо дождаться этих данных.

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

На характер заболеваний влияют температура воды, возраст и состояние рыбы, плотность популяции и факторы стресса. Иммунный статус рыбы также является важным фактором, при котором важную роль играют как неспецифический (например, интерферон), так и специфический иммунитет (сывороточные антитела, клеточный иммунитет). Плохое физиологическое состояние перезимовавших рыб может быть фактором, способствующим восприимчивости к болезни. В европейской аквакультуре потери могут быть до 70% молодых особей карпа (Ahne с соавт., 2002), но обычно они составляют от 1 до 40%. Приблизительно 20% популяции карпа в озере в США умерли от ВВК во время вспышки болезни.

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

Вспышки болезни у карпа обычно происходят при температуре от 11°C до 17°C. Они редко встречаются при температуре ниже 10°C, и смертность, особенно у более взрослых особей рыб, снижается, когда температура превышает 22°C (Fijan, 1988). Вторичные и сопутствующие бактериальные и / или паразитарные инфекции могут влиять на уровень смертности и проявления признаков болезни. У карпа болезнь часто наблюдается весной (отсюда и общее название болезни), особенно в странах с холодными зимами. Считается, что плохое состояние перезимовавшей рыбы может способствовать возникновению болезни. Болезнь может возникать у рыб в карантине после стресса при транспортировке, хотя до транспортировки вируса в рыбе не было. Вирус был выделен из, по-видимому, здоровой рыбы из озера в Канаде, от которой были отобраны образцы в течение 13-дневного периода, в течение которого температура воды колебалась от 27,3°C до 24,2°C.

## **2.4. Контроль и профилактика**

Методы контроля болезни ВВК главным образом основаны на предотвращении воздействия вируса в сочетании с надлежащей гигиенической практикой. Это выполнимо на небольших фермах, снабжаемых родниковой или скважинной водой, и безопасной системой, предотвращающей попадание рыбы на ферму через сливную воду. Гигиенические меры должны включать дезинфекцию яиц с помощью обработки йодоформом (Ahne & Held, 1980), пока не будет однозначно подтверждено, что вертикальная передача не происходит, регулярную дезинфекцию прудов, химическую дезинфекцию сельскохозяйственного оборудования, бережное обращение с рыбой во избежание стресса и безопасное удаление мертвой рыбы. Уменьшение плотности популяции рыб зимой и ранней весной уменьшит распространение вируса. При выращивании в условиях контролируемой среды повышение температуры воды выше 19–20°C может остановить или предотвратить вспышки ВВК. Безопасная и эффективная вакцина в настоящее время недоступна. Тем не менее, ряд экспериментальных инактивированных препаратов, живых аттенуированных вакцин и ДНК-вакцин дали обнадеживающие результаты (Dixon, 2008).

### **2.4.1. Вакцинация**

В ряде исследований сообщается об эффективности вакцинации, а испытания вакцинации на местах были зарегистрированы в бывшей Югославии, Австрии и бывшей Чехословакии (Fijan, 1988); однажды вакцина была продана в бывшей Югославии, но она больше недоступна. Лабораторные испытания показали, что ДНК-вакцинация может защитить рыбу (Dixon, 2008; Emmenegger & Kurath, 2008), но требуется дальнейшая работа по разработке.

### **2.4.2. Химиотерапия**

Метизопринол ингибирует репликацию вируса ВВК *in vitro*, но он не тестировался в условиях выращивания карпа.

#### **2.4.3. Иммуностимуляция**

Инъекция в карпа одноцепочечной и двухцепочечной РНК (которая является индуктором интерферона) защищала карпа в течение более 3 недель, но лечение неэффективно при введении в ванне.

#### **2.4.4. Племенное разведения с елью повышения резистентности**

Линия «Краснодар» карпа обыкновенного была выращена с целью повышения резистентности к вирусу ВВК.

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

Сообщений нет. Широкий диапазон хозяев вируса означает, что строгие процедуры отбора должны быть применены к потенциальным альтернативным видам.

#### **2.4.6. Блокирующие агенты**

Не выявлены.

#### **2.4.7. Дезинфекция яиц и личинок**

Считается, что вирус не передается через икру, но если это необходимо, икру можно дезинфицировать с помощью обработки йодоформом (Ahne & Held, 1980).

#### **2.4.8. Общие практики ведения хозяйства**

Пруды следует регулярно дезинфицировать, и следует применять эффективные методы биологической защиты от болезней. Оборудование, особенно сети, не должны использоваться в разных прудах, если только не была проведена дезинфекция. Практики, которые могут вызвать стресс, должны быть сведены к минимуму, и следует избегать высокой плотности посадки.

### **3. Отбор образцов**

#### **3.1 Сбор особей для отбора образцов**

##### **3.1.1. Больная рыба**

Следует собирать умирающую рыбу или рыбу с клиническими признаками болезни; рыба должна быть живой на момент сбора. Тем не менее, в случаях внезапной смертности патогномичных грубых поражений не наблюдается и клинические признаки могут не проявляться (см. Раздел 4.1.1). К образцу должна быть прикреплена идентификационная бирка, которая включает информацию о месте, времени, дате, видах, количестве собранных образцов, состоянии, (мертвые/умирающие особи), а также имя и контактную информацию лица, отбирающего образцы. Общий подход к надзору и отбору проб представлен в главе

1.4. *Кодекса о здоровье водных животных*. См. Также *Руководство МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (2009 г.).

### **3.1.2. Внешне здоровая рыба**

Сбор рыбы должен охватывать статистически значимое количество особей, но очевидно, что неспособность обнаружить определенные патогенные организмы в образце не гарантирует отсутствие этих агентов в исследуемой особи или популяции. Это особенно верно в отношении свободно обитающей рыбы или популяции, из которых трудно отобрать репрезентативный или рандомизированный образец. Тем не менее, риск того, что патогенный организм выйдет из-под системы наблюдения, снижается на рыбоводческих фермах, где популяции рыб были проинспектированы и проверены на наличие патогенных микроорганизмов в течение нескольких лет (как минимум двух), поскольку они не подвергаются возможному повторному заражению дикими рыбами.

Образцы должны включать все восприимчивые виды на объекте, причем каждая партия вида представлена в группе образцов. Партия определяется как группа тех же видов рыб, которая обитает в том же водоеме и происходит из одной и той же популяции рыб или нерестого стада.

Любую умирающую рыбу, присутствующую в популяции рыб для отбора проб, необходимо собирать сначала для отбора образцов, а оставшаяся часть выборки должна включать случайно выбранную живую рыбу из всех единиц выращивания, которые представляют собой исследуемую партию.

Общий подход к надзору и отбору образцов представлен в Главе 1.4. *Кодекса МЭБ о здоровье водных животных*. См. Также *Руководство МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (2009 г.).

### **3.2. Консервация образцов для передачи в лабораторию**

Образцы для выделения вируса следует транспортировать в лабораторию при 4°C, используя контейнеры-холодильники или на льду, предпочтительно в среде для транспортировки вируса (Глава 2.3.0, раздел А.2.2.1.), и тестировать в течение 24 часов или, в исключительных обстоятельствах, 48 часов. Отгрузка образцов органов предпочтительна, но при необходимости живая или цельная мертвая рыба может быть передана в испытательную лабораторию. Если это невозможно, образцы могут быть заморожены, но при оттаивании образцов может наблюдаться потеря жизнеспособности вируса. Следует избегать повторного замораживания-оттаивания образца. Образцы для ОТ-ПЦР могут быть сохранены в коммерчески доступных растворах для консервации РНК в соответствии с рекомендациями производителей, или, как альтернатива, образцы могут быть зафиксированы в этаноле.

### **3.3. Создание пула образцов**

В пул можно объединить более пяти образцов от рыбы.

### **3.4. Лучшие органы или ткани**

Субклинически инфицированная рыба (по-видимому, здоровая рыба): почка, селезенка, жабра и головной мозг (рыба любого размера).



Клинически пораженная рыба: целые мальки (длина тушки  $\leq 4$  см), целые внутренние органы, включая почку и мозг ( $> 4$  см длины тушки  $\leq 6$  см) или, для рыб более крупных размеров - печень, почки, селезенка и головной мозг.

### **3.5. Неподходящие образцы/ткани**

Может быть трудно выделить вирус из субклинически инфицированной рыбы-носителя и, в частности, из рыбы, выжившей в результате вспышки болезни с увеличением периода времени после возникновения болезни. Аналогично, выделение вируса из таких рыб при температурах, выходящих за пределы клинического диапазона болезни, является проблематичным. Является возможным обнаружить антитело против вируса у такой рыбы (Dixon, 2008), но см. предупреждение в Разделе 4 ниже. Выделение вируса может быть невозможным из разложившихся клинических образцов, поэтому наличие признаков ВВК и положительных результатов реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) или твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) может считаться достаточным для инициирования мер контроля. Ряд исследований, в которых были предприняты попытки выделить вирус из репродуктивной жидкости, оказались безуспешными, хотя вирус был выделен с низкой частотой из яичниковой, но не семенной жидкости.

## **4. Методы диагностики**

Диагностика ВВК у клинически пораженных рыб может быть достигнута путем выделения вируса или, быстрее, с помощью РНИФ или ИФА на инфицированных тканях. В идеале, прямая диагностика с помощью РНИФ или ИФА должна быть подтверждена выделением вируса с последующим тестом на нейтрализацию вируса (РН) или ОТ-ПЦР и анализом последовательности.

Обнаружение антител рыб к вирусам до сих пор не было принято в качестве обычного метода скрининга для оценки вирусного статуса популяций рыб из-за недостаточного знания серологических реакций рыбы на вирусные инфекции. Однако в ближайшем будущем может появиться валидация некоторых серологических методов для определенных вирусных инфекций рыбы, что сделает использование серологических тестирований рыбы более широко приемлемым для исследования состояния здоровья. Поскольку вирус ВВК не может быть обнаружен в любое время года или, с большой долей уверенности, у всех рыб-носителей, бывают случаи, когда в результате обнаружения антител рыб можно получить полезную информацию для эпидемиологических исследований или оценки риска. Тем не менее, следует иметь в виду, что наличие специфического антитела указывает только на предыдущее воздействие вируса, а не на текущее присутствие вируса в рыбе. Исследования на антитела, в качестве показателя предыдущего воздействия вируса, лучше всего проводить на уровне популяции, а не на индивидуальном уровне.

### **4.1. Полевые методы диагностики**

#### **4.1.1 Клинические признаки**

Во время вспышки ВВК будет наблюдаться заметное увеличение смертности среди популяции. Больные особи рыб обычно выглядят более темными. Типичные клинические признаки включают экзофтальм, бледные жабры, кровоизлияния на коже, основании плавников и анальном отверстии, вздутие живота или водянку и

выпячивание (задний проход), часто со слизистыми фекалиями. Все эти клинические признаки могут отсутствовать у отдельных рыб, и не все они могут наблюдаться в пораженной популяции. Некоторые из этих признаков могут присутствовать при болезнях, вызванных другими патогенами. В случаях внезапной смертности возможно отсутствие клинических признаков.

#### **4.1.2. Поведенческие изменения**

Как правило, молодые особи рыбы в возрасте до 1 года наиболее подвержены клиническим заболеваниям, но могут быть поражены все возрастные группы. Рыбы становятся вялыми, отплывают от мелководья и собираются у мест впуска воды или по сторонам пруда, а некоторые могут потерять равновесие.

### **4.2. Методы клинических исследований**

#### **4.2.1. Серьезные патологии**

Серьезных патогномичных поражений не наблюдается. Окончательный диагноз может быть поставлен после прямого обнаружения вирусного антигена или нуклеиновой кислоты в тканях или выделения и идентификации вируса. Повреждения могут отсутствовать в случаях внезапной смертности. Общие патологии в основном регистрируются для обыкновенного карпа и могут включать избыточную асцитическую жидкость в брюшной полости, обычно содержащей кровь, дегенерацию жаберных пластин и воспаление кишечника, которое содержит слизь вместо пищи. Обычно наблюдаются отек и кровоизлияние внутренних органов. Очаговые кровоизлияния могут наблюдаться в мышечной и жировой ткани, а также в плавательном пузыре.

#### **4.2.2. Клиническая химия**

В отсутствие крупномасштабных исследований клиническая химия является ненадежным средством выявления ВВК. Данные, представленные ниже, свидетельствуют только о неспецифических болезнях.

Некоторые группы сома обыкновенного, экспериментально зараженные вирусом, показали пониженные значения гематокрита, но в других группах значения оставались неизменными. Трансаминазная активность увеличилась во всех группах.

В течение 3 месяцев после вспышки ВВК у карпа в прудах наблюдалось увеличение нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и базофилов. Количество лимфоцитов уменьшилось, а затем вернулось к исходным уровням. За тот же период у рыб с признаками ВВК наблюдалось увеличение уровней  $Ca^{2+}$  в плазме, уровней неорганических фосфатов, общего билирубина, активности аланинаминотрансферазы, активности дегидрогеназы молочной кислоты и активности  $\alpha$ -гидроксibuтирилдегидрогеназы. Уровни общего белка, холестерина и активности щелочной фосфатазы снизились.

#### **4.2.3. Микроскопическая патология**

Гистопатологические изменения могут наблюдаться во всех основных органах. В кровеносных сосудах печени наблюдается отечный периваскулит, прогрессирующий до некроза. В печеночной паренхиме наблюдается гиперемия с множественными очаговыми некрозами и дегенерацией. В сердце наблюдается перикардит и

инфильтрация миокарда, прогрессирующая до очаговой дегенерации и некроза. Селезенка демонстрирует гиперемию с гиперплазией клеток ретикулоэндотелиальной системы и увеличенными мелано-макрофагальными центрами, а в поджелудочной железе наблюдается воспаление, вызванное мультифокальным некрозом. В почках наблюдается повреждение выделительной и кроветворной ткани. Почечные каналы забиты мочевыми цилиндрами, а клетки подвергаются гиалиновой дегенерации и вакуолизации. В кишечнике наблюдается периваскулярное воспаление, десквамация эпителия и атрофия ворсинок. Брюшина воспалена, лимфатические сосуды заполнены детритом и макрофагами. В плавательном пузыре эпителиальная пластинка меняется, превращаясь из монослоя в прерывистую многослойную структуру, и сосуды в подслизистой оболочке расширяются из-за инфильтрации лимфоцитами.

#### **4.2.4. Влажный препарат**

Не применимо.

#### **4.2.5. Мазки**

Имеет значение только в том случае, если используется иммуногистологическая процедура, такая как реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) (см. Раздел 4.3.1.2.2.1) или процедура иммунопероксидазного анализа, но см. Предостережения в разделе 4.3.1.2.

#### **4.2.6. Фиксированные срезы**

См. Раздел 4.2.3. Фиксированные срезы также можно использовать для иммуногистохимических процедур, как в 4.2.5, но см. Предостережения в разделе 4.3.1.2.

#### **4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология**

Вирус имеет типичную форму пули как у рабдовируса и имеет ширину около 60–90 нм и длину 90–180 нм после негативного окрашивания. Вирус содержит нуклеокапсид, окруженный оболочкой.

### **4.3. Обнаружение агента и методы идентификации**

См. следующие разделы в Главе 2.3.0.:

- Раздел А.2.2.1. – информация по транспортировке.
- Раздел А.2.2.2. – выделение вируса и получение гомогенатов органов.

#### **4.3.1. Прямые методы обнаружения**

Вирус может быть обнаружен непосредственно с помощью электронной микроскопии, но это будет указывать только на наличие рабдовируса, и потребуются дальнейшая идентификация. Вирусный антиген и нуклеиновая кислота потенциально могут быть идентифицированы в экстрактах тканей клинически зараженной рыбы, и обычно вирус может быть выделен из этой рыбы. Однако гораздо менее вероятно, что вирусный антиген или нуклеиновая кислота будут

обнаружены непосредственно в тканях субклинически инфицированных рыб-носителей. Выделение вируса является предпочтительным методом обнаружения такой рыбы, но не является эффективным на 100%.

#### **4.3.1.1. Методы микроскопических исследований**

Микроскопические методы сами по себе не рекомендуются для диагностики ВВК, так как гистопатологическая картина не является специфической для болезни. Однако они могут предоставить подтверждающие доказательства, в частности, когда используются иммуногистологические методы, но см. Предостережения в разделе 4.3.1.2.

##### *4.3.1.1.1. Влажные препараты*

Не применимо

##### *4.3.1.1.2 Мазки/тканевые отпечатки*

Имеет значение только в том случае, если используется иммуногистологическая процедура, такая как РНИФ (см. Раздел 4.3.1.2.2.1) или процедура иммунопероксидазного анализа, но см. Предостережения в разделе 4.3.1.2.

##### *4.3.1.1.3. Фиксированные срезы*

Имеет значение только в том случае, если используется иммуногистологическая процедура, такая как РНИФ (см. Раздел 4.3.1.2.1.2) или процедура иммунопероксидазного анализа, но см. Предостережения в разделе 4.3.1.2, см. Главу 2.3.0., Раздел В.3.3.1. для информации о фиксации образцов.

#### **4.3.1.2. Выделение и идентификация агента**

После выделения вирус должен быть идентифицирован, и это может быть достигнуто методами обнаружения антигена, нейтрализацией вируса или методами идентификации нуклеиновых кислот. Первые два метода должны рассматриваться как предполагаемые, если не используются полностью проверенные моноклональные или поликлональные антитела, поскольку происходят перекрестные реакции с другими вирусами (Раздел 2.1.1 и Раздел 5). Коммерчески доступные наборы с использованием поликлональных антител могут не обладать специфичностью, а наборы, использующие моноклональные антитела, могут не обнаруживать все подгруппы вируса ВВК (Dixon & Longshaw, 2005). Методы обнаружения нуклеиновой кислоты всегда должны сопровождаться секвенированием или использованием метода, такого как обратная гибридизация (Sheppard с соавт., 2007), чтобы подтвердить идентичность вируса.

##### *4.3.1.2.1. Клеточная культура/искусственная среда*

###### *4.3.1.2.1.1. Используемая клеточная линия*

ЕРС или FHM (Глава 2.3.0., Раздел В.1.1.).

###### *4.3.1.2.1.2. Выделение вируса*

Используйте процедуру, описанную в Главе 2.3.0, Раздел А.2.2.2.

#### *4.3.1.2.1.3. Инокуляция клеточных монослоев*

Приготовить два последовательных десятикратных разведения супернатантов гомогената органа (1/10) в среде для культивирования клеток (т.е. супернатанты гомогената составят 1/100 и 1/1000 разведения исходного материала органа) и перенести соответствующий объем каждого из этих двух разведений на 24-часовые клеточные монослои, с удаленной культуральной средой. В качестве альтернативы, приготовить однократное разведение гомогената органа 1/10 (т.е. разведение исходного материала органа 1/100) и добавить соответствующий объем обоих разведений 1/10, и 1/100 прямо в 24-часовые клеточные монослои с не удаленной культуральной средой чтобы получить конечные разведения гомогената органа (1/100 и 1/1000). Если токсичность образца вызывает проблемы, сделать два последовательных десятикратных разведения супернатантов гомогената органа (1/10) в среде для культивирования клеток, как описано выше, и инокулировать 100 мкл каждого разведения в не менее 2 см<sup>2</sup> монослоя клеток с удаленной культуральной средой. Оставить для адсорбции на 0,5-1 часа при 10-15°C, удалить инокулят и добавить среду для культивирования клеток, забуференную при рН 7,6 и обогащенную 2% фетальной телячьей сывороткой (FCS) (1 мл/лунка для 24-луночных планшетов для культивирования клеток). Инкубировать при 20 °С.

#### *4.3.1.2.1.4. Мониторинг инкубации*

Наблюдать течение инфекции в положительном контроле и других инокулированных клеточных культурах при микроскопическом исследовании с увеличением × 40-100 в течение 7 дней. Рекомендуется использовать фазово-контрастный микроскоп.

Поддерживать рН среды для культивирования клеток на уровне от 7,3 до 7,6 во время инкубации. Это может быть достигнуто путем добавления в инокулированную среду стерильного бикарбонатного буфера (для плотно закрытых колб для культивирования клеток) или среды с буфером HEPES (HEPES = N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфо кислота) или 2 М трис (Трис [гидроксиметил] аминотетран /буферный раствор HCl (для планшетов для культивирования клеток).

Если цитопатическое действие (ЦПД) проявляется в тех клеточных культурах, которые были инокулированы разведениями протестированных супернатантов гомогенатов, необходимо немедленно провести процедуры идентификации (см. Разделы 4.3.1.2.1.1, 4.3.1.2.1.2, 4.3.1.2.1.3 и 4.3.1.2.3.1 ниже).

Если ЦПД не развивается в инокулированных культурах (несмотря на нормальное прогрессирование ЦПД в вирусном контроле), инокулированные культуры следует пересевать в течение еще 7 дней. Если в вирусном контроле ЦПД не развивается, процесс должен быть повторен со свежими восприимчивыми клетками и новыми партиями образцов.

#### *4.3.1.2.1.5. Процедуры субкультивирования*

Используя пипетку, попытаться перенести клетки из сосудов для культивирования клеток и собрать аликвоты среды для культивирования

клеток плюс клетки из всех инокулированных монослоев, при этом манипуляции с разными группами должны проводиться отдельно. Аликвоты разведений 1/100 и 1/000 объединяют и инокулируют в свежие 24-часовые клеточные культуры для получения конечных разведений 1/10 и 1/100 собранных в пул аликвот. Инкубировать и контролировать, как описано выше. Если ЦПД не наблюдается, тест может быть признан отрицательным.

#### *4.3.1.2.1.6. Подтверждение идентичности вируса посредством нейтрализации*

- i) Отобрать культуральную среду из монослоев клеток, демонстрирующих ЦПД, и центрифугировать при 2000 g в течение 15 минут при 4°C или фильтровать через пористую мембрану (0,45 мкм) для удаления клеточного дебриса.
- ii) Развести вирус-содержащую среду от  $10^{-2}$  до  $10^{-4}$ .
- iii) Смешать аликвоты каждого разведения с равными объемами раствора антител против ВВК и аналогичным образом обработать аликвоты каждого разведения вируса средой для культивирования клеток. Раствор нейтрализующих антител (NAb) должен иметь 50% титр уменьшения образования бляшек не менее 2000 на основе нейтрализации 50-100 бляшко-образующих единиц (БОЕ), вируса ВВК.
- iv) Параллельно, должны быть проведены другие реакции нейтрализации против:
  - Гомологичного вирусного штамма (положительная реакция нейтрализации),
  - Гетерологичного вирусного штамма (отрицательная реакция нейтрализации).
- v) Инкубировать все смеси при температуре 20°C в течение одного часа.
- vi) Перенести аликвоты каждой из вышеуказанных смесей на клеточные монослои (инокулируют две клеточные культуры на разведение) и оставить для адсорбции на 0,5-1 часа при 15-20°C; Для этой цели подходят 24- или 12-луночные планшеты для культивирования клеток с использованием 50 мкл инокулята.
- vii) По завершении адсорбции, добавить среду для культивирования клеток, дополненную 2% FCS и забуференную при pH 7,4-7,6, в каждую лунку и инкубировать при 20°C.
- viii) Проверить клеточные культуры на наличие ЦПД и считать результаты, как только это произойдет в ненейтрализованных контролях (клеточные монослои защищены в положительных контролях нейтрализации). Результаты записывают либо после простого микроскопического исследования (предпочтительно фазового контраста), либо после отбрасывания среды для культивирования клеток и окрашивания монослоев клеток раствором 1% кристаллического фиолетового в 20% этаноле.
- ix) Тестируемый вирус идентифицируется как вирус ВВК когда ЦПД предотвращается или заметно задерживается в клеточных культурах, которые получали суспензию вируса, обработанную антителом, специфичным к вирусу ВВК, тогда как ЦПД проявляется во всех других

клеточных культурах.

**Примечание:** Предполагаемые изоляты вируса ВВК, идентифицированные с помощью ИФА или РНИФ, не могут быть нейтрализованы NAb против вируса ВВК. Кроме того, некоторые подгруппы генов вируса ВВК могут быть не полностью нейтрализованы NAb, приготовленными против изолята из другой подгруппы. Если нейтрализация NAb к вирусу ВВК отсутствует или не завершена, рекомендуется подтверждение посредством ОТ-ПЦР и анализа нуклеотидной последовательности продуктов ОТ-ПЦР, для подтверждения присутствия вируса ВВК.

#### *4.3.1.2.1.7. Подтверждение идентичности вируса с помощью реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ)*

- i) Подготовить монослои клеток в лунках (2 см<sup>2</sup>) пластиковых планшетов для культивирования клеток, колб или на покровных стеклах или предметных стеклах, чтобы достичь приблизительно 80% слияния в течение 24 часов инкубации при 25°C (посеять шесть монослоев клеток на изолят вируса, для идентификации, плюс два для положительного и два для отрицательного контроля). Содержание FCS в среде для культивирования клеток может быть снижено до 2-4%. Если необходимо идентифицировать многочисленные изоляты вируса, настоятельно рекомендуется использовать планшеты Terasaki
- ii) Когда клеточные монослои готовы к инфицированию, то есть в тот же день или на следующий день после посева, инокулировать вирусные суспензии, которые необходимо идентифицировать, выполняя этапы десятикратного разведения непосредственно в лунках или колбах для культивирования клеток. Для испытаний с использованием клеток, культивируемых на стеклянных покровных стеклах или предметных стеклах, разведения делаются в стерильных контейнерах и затем используются для инокуляции клеток.
- iii) Развести контрольную вирусную суспензию вируса ВВК аналогичным образом, чтобы получить титр вируса примерно 5000-10000 БОЕ мл<sup>-1</sup> в среде для культивирования клеток.
- iv) Инкубировать при температуре 20°C в течение 24 часов.
- v) Удалить среду для культивирования клеток, промыть один раз 0,01 М фосфатно-буферным раствором (ФБР), рН 7,2, затем три раза быстро холодным ацетоном (хранится при -20 °C) для предметных стекол или покровных стекол или 80% ацетоном в воде или 30% ацетоном в этаноле, также при -20°C, для клеток на пластиковых подложках. Оставить фиксатор на 15 минут. Объем 0,5 мл является достаточным для 2 см<sup>2</sup> клеточного монослоя.
- vi) Дать клеточным монослоям высохнуть на воздухе в течение не менее 30 минут и немедленно обработать их или заморозить при -20°C.
- vii) Регидратировать высушенные клеточные монослои, если они хранились замороженными, с помощью четырех стадий промывания в ФБР, содержащим 0,05% Твин 20 (ФБРТ), и полностью удалить этот буфер после последнего споласкивания. Блокировать 5% обезжиренным

молоком или 1% бычьим сывороточным альбумином, в ФБРТ в течение 30 минут при 37°C.

- viii) Промыть четыре раза с использованием ФБРТ, по 5 минут на каждое промывание. Предметные стекла или пластиковые планшеты для культивирования можно осторожно потрясти во время промывания.
- ix) Приготовить раствор очищенного антитела или сыворотки к вирусу ВВК в ФБРТ, в соответствующем разведении (которое было установлено ранее или в соответствии с указаниями поставщика реагента).
- x) Инкубировать клеточные монослои с раствором антитела в течение 1 часа при 37°C во влажной камере и не допускать испарения.
- xi) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- xii) Инкубировать клеточные монослои с раствором антитела, конъюгированного с флуоресцеин-изотиоцианатом (ФИТС), к иммуноглобулину, используемому в первом слое и приготовленном в соответствии с инструкциями поставщика. Эти антитела против ФИТС чаще всего являются антителами кролика или козы.
- xiii) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- xiv) Немедленно просмотреть обработанные клеточные монослои на пластиковых подложках или установить слайды или покровные стекла, используя физиологический раствор глицерина с рН 8,5 или имеющийся в продаже держатель.
- xv) Изучить под ультрафиолетовыми (УФ) лучами, используя микроскоп с линзами  $\times 10$  и объективами  $\times 20$  или  $\times 40$ , имеющими числовую апертуру  $> 0,65$  и  $> 1,3$  соответственно. Должны быть обнаружены положительные и отрицательные контроли, чтобы дать ожидаемые результаты до любого другого наблюдения.

#### *4.3.1.2.1.8. Подтверждение идентичности вируса с использованием иммуноферментного анализа (ИФА)*

- i) Покрыть лунки микропланшетов, разработанных для ИФА, соответствующими разведениями очищенных иммуноглобулинов (Ig), специфичных для вируса ВВК, в 0,02 М карбонатном буфере, рН 9,5 (200 мкл / лунка). Ig может быть поликлональным или моноклональным Ig, происходящим чаще всего от кролика или мыши, соответственно. Для идентификации вируса ВВК подходят моноклональные антитела (MAb), специфичные для определенных доменов белка нуклеокапсида (N). Инкубировать в течение ночи при температуре 4°C.
- ii) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- iii) Блокировать обезжиренным молоком (5% в карбонатном буфере) или другим блокирующим раствором в течение 1 часа при 37°C (300 мкл/лунка).
- iv) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- v) Добавить 2% неионогенное моющее средство (Triton X-100 или Nonidet P-40) к суспензии вируса, которую необходимо идентифицировать.
- vi) Внести 100 мкл/лунку двух- или четырехкратных разведений вируса, который необходимо идентифицировать, и собранные неинфицированные



клеточные культуры (отрицательный контроль). Также включить положительный контроль вируса ВВК. Инкубировать в течение 1 часа при 37 °С.

- vii) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- viii) Добавить в лунки 200 мкл МАб, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO), или поликлональные антитела к вирусу ВВК; или поликлональные IgG к вирусу ВВК. Белок МАб к N белку, специфичному для домена, отличного от домена, сенсibiliзировавшего Mab, и ранее конъюгированного с биотином, также может использоваться. Инкубировать в течение 1 часа при 37 °С.
- ix) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- x) Если использовалось антитело, конъюгированное с HRPO, перейдите к этапу xiii. В противном случае добавьте 200 мкл HRPO-конъюгированного стрептавидина или ExtrAvidin (Sigma) в те лунки, в которые было добавлено поступило конъюгированное биотином антитело, и инкубировать в течение 1 часа при 37 °С.
- xi) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- xii) Добавить 200 мкл подходящего субстрата и хромогена, такого как диgidрохлорид тетраметилбензидина. Остановить тест, когда положительные контроли вступят в реакцию и считать результаты.

#### 4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигенов, основанные на антителах, непосредственно на тканях рыбы.

##### 4.3.1.2.2.1. Метод непрямой иммунофлуоресценции

- i) Тщательно обескровить рыбу.
- ii) Сделать отпечатки почек на очищенных предметных стеклах или на дне лунок пластикового планшета для культивирования клеток.
- iii) Хранить и транспортировать кусочки почек, как указано в главе 2.3.0, раздел А. 2.2.1.) вместе с другими органами, необходимыми для выделения вируса.
- iv) Оставьте отпечаток для просушивания на воздухе а течение 20 минут.
- v) Зафиксировать в холодном ацетоне (хранится при температуре около -20°С) для предметных стекол или в 80% ацетоне в воде или в 30% ацетоне в этаноле, также при температуре около -20°С, для пластиковых лунок. Оставить фиксатор на 15 минут для реакции. Оставить отпечатки для высыхания на воздухе не менее чем на 30 минут и немедленно обработать их или заморозить при температуре -20°С.
- vi) Повторно регидратировать отпечатки, если они были сохранены в замороженном виде посредством четырех стадий промывки с помощью ФБРТ, и полностью удалить этот буфер после последней промывки. Заблокировать 5% обезжиренным молоком или 1% бычьим сывороточным альбумином, в ФБРТ в течение 30 минут при 37°С.
- vii) Промыть четыре раза в ФБРТ, по 5 минут для каждой промывки. Предметные стекла или пластиковые планшеты для культивирования можно осторожно потряхивать во время промывки.
- viii) Приготовить раствор очищенного антитела или сыворотки к вирусу ВВК в

ФБРТ при соответствующем разведении (что было установлено ранее или как указано поставщиком реагентов).

- ix) Инкубировать отпечатки раствором антител в течение 1 часа при температуре 37°C во влажной камере и постарайтесь избежать испарения.
- x) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- xi) Инкубировать отпечатки с раствором FITC-меченых антител против иммуноглобулина, используемого в первом слое и приготовленным в соответствии с инструкциями поставщика. Эти FITC-меченые антитела чаще всего являются антителами кролика или козы.
- xii) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- xiii) Немедленно посмотреть обработанные отпечатки на пластиковых планшетах или заключить под покрывное стекло с использованием раствора глицерина, pH 8.5, или среды для заключения гистологических препаратов, имеющейся в продаже.
- xiv) Исследовать под падающим ультрафиолетовым (УФ) светом, используя микроскоп с линзами  $\times 10$  и объективы  $\times 20$  или  $\times 40$  с числовой апертурой  $> 0,65$  и  $> 1,3$  соответственно. Должны быть обнаружены положительные и отрицательные контроли, прежде чем получить ожидаемые результаты до любого другого наблюдения.

#### 4.3.1.2.2.2. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

Смотри Главу 2.3.0., Раздел А.2.2.2. о получении гомогенатов органов.

- i) Сенсибилизировать лунки микропланшетов, разработанных для ИФА, соответствующими разведениями очищенных иммуноглобулинов (Ig), специфичных к вирусу ВВК, в 0,02 М карбонатном буфере, pH 9,5 (200 мкл /лунку). Ig может быть поликлональным или моноклональным, происходящим чаще всего от кролика или мыши, соответственно. Для идентификации вируса ВВК подходят моноклональные антитела (MAb), специфичные для определенных доменов белка нуклеокапсида (N).
- ii) Инкубировать в течение ночи при температуре 4°C.
- iii) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- iv) Блокировать обезжиренным молоком (5% в карбонатном буфере) или другом блокирующем растворе в течение одного часа при температуре 37°C (300 мкл/лунка).
- v) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- vi) Хранить 1/4 аликвоту каждого гомогената при 4°C, если тест отрицательный и требуется выделение вируса в клеточной культуре.
- vii) Обработать оставшуюся часть гомогената 2% тритоном X-100 или нонидетом P-40 и 2 мМ фенилметилсульфонидфторида; аккуратно перемешать.
- viii) Внести 100 мкл/лунка двух- или четырехкратных разведений образца, который необходимо идентифицировать, и тканей отрицательного контроля. Также включить вирус положительного контроля на ВВК. Инкубировать в течение 1 часа при 37°C.
- ix) Промыть четыре раза в ФБРТ

- x) Добавить в лунки 200 мкл МАб, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO) или поликлональные антитела к вирусу ВВК; или поликлональные IgG к вирусу ВВК. Также может быть использован белок МАб-N, специфичный для домена, отличного от домена сенсibilизированного МАб и предварительно конъюгированного с биотином. Инкубировать в течение 1 часа при 37 °С.
- xi) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- xii) Если использовалось антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена, перейти к этапу xiv. В противном случае добавьте 200 мкл стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, или ExtrAvidin (Sigma) в те лунки, в которые было добавлено биотин-конъюгированное антитело, и инкубировать в течение 1 часа при 37°С.
- xiii) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- xiv) Добавить 200 мкл подходящего субстрата и хромогена, такого как диgidрохлорид тетраметилбензидина. Остановить реакцию, когда положительные контроли вступят в реакцию и считать результаты.
- xv) Если тест отрицательный, обработать образцы органов, хранящиеся при 4°С, для выделения вируса в клеточной культуре, как описано в разделе 4.3.1.2.1.

#### 4.3.1.2.3. Методы молекулярных исследований

##### 4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) (подтверждение идентичности вируса или непосредственно из экстрактов рыбных тканей)

Геном вируса ВВК состоит из одной цепи РНК размером приблизительно 11 т.п.н. с отрицательной полярностью. Амплификацию фрагмента кДНК вируса ВВК длиной 714 п.н. проводят с использованием праймеров, полученных из последовательностей области, кодирующей ген гликопротеина: 5'-ТСТ-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR \* -R \* TC-3 '( SVCV F1) и 5'-AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH \* -ACN \* -CAУ \* -3 'SVCV R2), используя модификацию метода Stone с соавт., 2003.

- i) Суммарную РНК извлекают из 100 мкл супернатанта из клеточных культур, демонстрирующих ЦПД или 100 мкл экстракта ткани рыбы, и растворяют в 40 мкл воды, не содержащей ДНКазы и РНКазы, имеющей молекулярную биологическую чистоту.

В продаже имеется ряд комплектов для экстракции суммарной РНК, которые будут производить высококачественную РНК, подходящую для ОТ-ПЦР. Примерами являются Trizol Reagent (RL, Life Technologies, Пейсли, Великобритания), SV Total RNA isolation system (Система выделения суммарной РНК) (Promega) и Nucleospin® RNA AB gene).

- ii) Для синтеза кДНК реакцию обратной транскрипции проводят при 37°С в течение 1 часа в объеме 20 мкл, состоящем из 1 × М-MLV ОТ-реакционного буфера (50 мМ Трис, рН 8,3, 75 мМ КСl, 10 мМ DTT, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>), содержащего 1 мМ dNTP, 100 пмоль праймера вируса ВВК R2, 20 единиц обратной транскриптазы М-MLV (Promega, Саутгемптон,

Великобритания) или эквивалентную обратную транскриптазу и 1/10 всей РНК, выделенной выше.

- iii) ПЦР проводят в 50 мкл реакционного объема 1 × ПЦР-буфера (50 mM KCl, 10 mM Трис / HCl, pH 9,0 и 0,1% Тритон X-100), содержащего 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dNTP, по 50 пмоль каждого из праймеров R2 и F1 вируса ВВК, 1,25 единиц ДНК-полимеразы Taq и 2,5 мкл реакционной смеси для обратной транскрипции. Реакционную смесь покрывают минеральным маслом и подвергают 35 температурным циклам:

1 минута при 95°C, 1 минута при 55°C и 1 минута при 72°C с последующей конечной стадией удлинения - 10 минут при 72°C. Амплифицированную ДНК (714 п.н.) анализируют электрофорезом в агарозном геле.

- iv) Если ЦПД в культуре не сильное, возможно, что продукт не будет получен с использованием одного цикла амплификации. Чтобы избежать таких проблем, используйте полугнездовой анализ с использованием праймеров: 5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR \* -R \* TC-3 '(SVCV F1) и 5'-CTG-GGG- TTT-CCN \* -CCT-CAA-AGY \* -TGY \* -3 '(SVC R4) в соответствии с Stone с соавт., 2003.
- v) Второй цикл ПЦР проводят в реакционном объеме 50 мкл 1 × ПЦР-буфера (50 mM KCl, 10 mM Трис / HCl, pH 9,0 и 0,1% Тритон X-100), содержащего 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dNTPs, 50 пмоль каждый из праймеров R4 и F1 вируса ВВК, 1,25 единиц ДНК-полимеразы Taq и 2,5 мкл продукта первого цикла. Реакционную смесь покрывают минеральным маслом и подвергают 35 температурным циклам: 1 минута при 95 °C, 1 минута при 55°C и 1 минута при 72°C с последующей конечной стадией удлинения - 10 минут при 72 ° C. Амплифицированную ДНК (606 п.н.) анализируют электрофорезом в агарозном геле.
- vi) Все амплифицированные продукты подтверждаются как имеющие происхождение вируса ВВК посредством секвенирования, а подтип вируса ВВК (Ia-Id) идентифицируется с помощью программы поиска BLAST (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>) или посредством филогенетического анализа с использованием последовательностей вируса ВВК, доступных в открытых базах данных последовательностей. Филогенетический анализ проводится с использованием области размером 426 п.н., соответствующей нуклеотидам 429-855 гена гликопротеина.
- vii) В некоторых случаях, когда ЦПД является сильным и вирус размножается до высокого титра, для прямого секвенирования достаточно ампликона ПЦР . Если амплифицированный продукт является слабым, рекомендуется вставить продукт в соответствующий вектор секвенирования (например, pGEM-T, pCR® 4-TOPO®) до проведения секвенирования. По меньшей мере нужно применить два независимых процесса амплификации и секвенирования для устранения потенциальных ошибок последовательности, допущенных полимеразой Taq.

**Примечание:** Сайты отжига праймеров вируса ВВК идентифицировали путем выравнивания опубликованных аминокислотных последовательностей для гликопротеина вируса ВВК (Björklund с соавт., 1996; регистрационный номер Genbank U18101) и вируса везикулярного стоматита (VSV), Нью-Джерси (Gallione & Rose, 1983; регистрационный номер Genbank V01214)

и штаммы Pigu (инвентарный номер Genbank D26175). Затем были разработаны праймеры для отжига областей, кодирующих консервативные аминокислоты, с использованием опубликованной последовательности для вируса ВВК (Björklund с соавт., 1996) в качестве скелета и введения дегенеративных оснований на 3'-концах, чтобы учесть потенциальные различия в использовании кодонов. При необходимости использовались соответствующие коды IUB, и они отмечены звездочкой (\*).

#### 4.3.1.2.4. Очистка агента

Вирус может быть очищен, как описано Hill с соавт., 1975.

- i) Собрать среду из инфицированных клеточных культур.
- ii) Осветлить центрифугированием при 2000 g в течение 15 минут при 4°C. Удалить супернатант.
- iii) Осадить вирус центрифугированием супернатанта при 40000 g в течение 1 часа.
- iv) Удалить и выбросить супернатант. Ресуспендировать осадок в небольшом объеме ФБР или TNE (0,01 M Трис, 0,1 M NaCl, 1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты, pH 7,2). Объем будет зависеть от исходного количества среды для культивирования клеток и размера пробирки, используемой для создания градиента. Если надосадочные жидкости были центрифугированы в нескольких пробирках, объединить ресуспендированные гранулы.
- v) Подготовить градиент 15-45% - ой сахарозы, приготовленный в буфере, использованном на этапе iv.
- vi) Аккуратно наложить ресуспендированные гранулы и центрифугировать при 40000 g в течение 2 часов при 4°C.
- vii) Опалесцирующая полоса вируса должна быть видна в градиенте. Собрать кольцо и разбавить, по крайней мере, в десять раз используемым буфером. Центрифугировать при 40,000 g в течение 2 часов при температуре 4°C.
- viii) Ресуспендировать гранулу в используемом буфере.

#### 4.3.2. Методы серологического исследования

Рыба продуцирует иммунный ответ после заражения вирусом ВВК, и это было изучено, главным образом, после образования антител. Гуморальный иммунный ответ зависит от температуры воды. После заражения вирусом ВВК при низких температурах, таких как 1 °C, антитело может не обнаруживаться или может присутствовать в низком титре и его образование может занять несколько недель, в то время как при 20°C антитело образуется раньше (через 1 неделю), и могут наблюдаться высокие титры (Dixon, 2008). Длительность гуморального ответа не известна, но антитело было обнаружено через 1 год после естественной инфекции при промысле и спустя более 2 лет после экспериментальной инфекции (неопубликованные наблюдения). Обнаружение нейтрализующего антитела использовалось во многих исследованиях на вирус, но методы ИФА более чувствительны. Dixon с соавт., 1994 разработали конкурентный ИФА, который применим для выявления антител у широкого круга хозяев.

Приемлемость обнаружения антител обсуждалась в разделах 3.5 и 4

## 5. Рейтинг исследований по цели использования

Методы, доступные в настоящее время для целевого наблюдения и диагностики ВВК, перечислены в таблице 5.1. Обозначения, используемые в таблице: a = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы серьезно ограничивают его применение; и d = метод в настоящее время не рекомендуется для этой цели. Это несколько субъективно, поскольку приемлемость включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и полезности. Хотя не все тесты, перечисленные в категории «a» или «b», прошли официальную стандартизацию и валидацию, наличие установившейся практики их применения и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

*Таблица 5.1. Методы целевого надзора и диагностика*

Метод	Целевой надзор		Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Молодь	Взрослые особи		
Исследования по макроscopicким признакам	d	d	b	d
Гистопатология	d	d	b	c
Просвечивающая электронная микроскопия (ЕМ)	d	d	d	d
Выделение в клеточной культуре	a	a	a	a
Тест на вирусный антиген	d	d	a	c
Тест на антитела рыбы против вируса	c	c	c	d
От-ПЦР	c	c	a	a
Последовательность	na	na	a	a

ЕМ = электронная микроскопия; От ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой; na = неприменимо.

**Примечание:** Выделение в клеточной культуре можно рассматривать только как предполагаемое, пока идентичность выделенного вируса не будет подтверждена подходящим методом.

Описаны четыре генетических группы рабдовирусов рыб (Stone с соавт., 2003): геногруппа I (вирус ВВК), геногруппа II (рабдовирус карпа), геногруппа III (рабдовирус щуки) и геногруппа IV (рабдовирус линя). Дальнейший анализ также показал, что геногруппа вируса ВВК может быть дополнительно подразделена по крайней мере на четыре подгруппы. Антитела, направленные против вируса ВВК, в различной степени перекрестно реагируют со всеми рабдовирусами в трех других геногруппах. Способность подтверждать вирус ВВК на основании результатов серологических тестов, таких как ИФА, РНИФ и нейтрализация сыворотки, зависит от специфичности антител, используемых в тестах. Результаты этих серологических тестов могут быть приняты в качестве подтверждения наличия вируса ВВК, только если использованная антисыворотка была валидирована как обнаруживающая вирусы во всех четырех подгруппах геногруппы I и не вступает в перекрестную реакцию с

изолятами из других трех геногрупп.

Многие диагностические лаборатории столкнулись с трудностями в получении антител против вируса ВВК, пригодных для использования в серологических тестах и обратились к коммерчески доступным тест-наборам. Для идентификации вируса ВВК доступны два коммерческих тест-набора, набор TestLine ELISA (TestLine, Брно, Чешская Республика) и набор Bio-X IFAT (Bio-X Diagnostics, Jemelle, Бельгия). Недавно Dixon & Longshaw, 2005, оценили тесты на предмет их специфичности в отношении изолятов вируса из геногрупп I, II, III и IV, обнаружившие, что тест-система Testline ELISA, в которой используется поликлональное антитело кролика, была неспецифической и не могла отличить вирус ВВК от вирусов в остальных трех геногруппах. И наоборот, тест-система Bio-X IFAT, в которой используются моноклональные мышинные антитела, была слишком специфичной и была способной обнаруживать только изоляты вируса ВВК из одной из четырех субгеногрупп вируса ВВК. Эти коммерческие тестовые наборы могут применяться для предполагаемой диагностики ВВК, но проблемы специфичности сильно ограничивают их применение для подтверждающего диагноза.

Рекомендуется использовать ОТ-ПЦР и анализ нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР для подтверждающей идентификации вируса ВВК.

## **6. Тесты, рекомендованные для целевого надзора с целью провозглашения свободы от весенней виремии карпов**

Методом надзора за популяциями восприимчивых рыб для провозглашения свободы от ВВК является инокуляция культуры клеток экстрактами ткани (как описано в разделе «Культура клеток / искусственная среда выше») для демонстрации отсутствия вируса.

## **7. Подтверждающие диагностические критерии**

### **7.1. Определение подозрительного случая**

ВВК следует рассматривать как причину заболевания, когда быстрая смертность и значительное количество смертей происходят в популяции восприимчивых видов рыб, особенно если они сопровождаются клиническими признаками ВВК.

Подозрительный случай ВВК определяется как наличие типичных клинических признаков заболевания в популяции восприимчивых рыб, ИЛИ характерной гистопатологии в срезах тканей, ИЛИ характерного ЦПД в клеточных культурах без идентификации возбудителя, ИЛИ единственного положительного результата одного из диагностических тестов, описанных выше.

### **7.2. Определение подтвержденных случаев**

Первый случай болезни на новой территории или на территории, где ВВК встречался ранее, но не был идентифицирован в течение двухлетнего периода наблюдения, описывается как индексный случай. Подтвержденный индексный случай определяется как подозрительный случай, в результате которого в культуре клеток было получено характерное ЦПД с последующей идентификацией возбудителя с помощью одного из серологических тестов с использованием валидированной антисыворотки или ОТ-ПЦР плюс секвенирование, описанное выше, ИЛИ второго положительного результата отдельного и другого диагностического анализа описанного выше. Если используется серологический тест, антисыворотка должна быть «пригодной для цели», как указано в разделе 5. Если используется ОТ-ПЦР, полученный продукт должен быть секвенирован

для подтверждения вируса ВВК; если нет, то это подозрительный случай по ВВК.

В ходе последующих расследований после подтвержденного индексного случая, случай может быть подтвержден только на основе ОТ-ПЦР и секвенирования.

## 8. Библиография

AHNE W. (1976). Untersuchungen über die Stabilität des karpfenpathogenen Virusstammes 10/3. *Fisch und Umwelt*, **2**, 121–127.

AHNE W. (1982). Vergleichende Untersuchungen über die Stabilität von vier fischpathogenen Viren (VHSV, PFR, SVCV, IPNV). *Zbl. Vet. Med. B*, **29**, 457–476.

AHNE W. (1986). Unterschiedliche biologische Eigenschaften 4 cyprinidenpathogener Rhabdovirusisolate. *J. Vet. Med. B*, **33**, 253–259.

AHNE W., BJÖRKLUND H.V., ESSBAUER S., FIJAN N., KURATH G. & WINTON J.R. (2002). Spring viremia of carp (SVC). *Dis. aquat. Org.*, **52**, 261–272.

AHNE W. & HELD C. (1980). Untersuchungen über die viruzide Wirkung von Actomar<sup>®</sup> K30 auf fischpathogene Viren. *Tierärztl. Umsch.*, **35**, 308–318.

AHNE W., KURATH G. & WINTON J. (1998). A ribonuclease protection assay can distinguish spring viremia of carp virus from pike fry rhabdovirus. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **18**, 220–224.

BASIC A., SCHACHNER O., BILIC I. & HESS M. (2009). Phylogenetic analysis of spring viraemia of carp virus isolates from Austria indicates the existence of at least two subgroups within genogroup Id. *Dis. aquat. Org.*, **85**, 31–40.

BJÖRKLUND H.V., HIGMAN K.H. & KURATH G. (1996). The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hirame rhabdovirus - analysis of relationships with other rhabdoviruses. *Virus Res.*, **42**, 65–80.

CARSTEN E.B. (2010). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch. Virol.*, **155**, 133–146.

DIXON P.F. (2008). Virus diseases of cyprinids. *In: Fish Diseases*, Vol. 1. Eiras J.C., Segner H., Wahli T. & Kapoor B.G. eds. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, 87–184.

DIXON P.F., HATTENBERGER-BAUDOY A.-M. & WAY K. (1994). Detection of carp antibodies to spring viraemia of carp virus by a competitive immunoassay. *Dis. Aquat. Org.*, **19**, 181–186.

DIXON P.F. & LONGSHAW C.B. (2005). Assessment of commercial test kits for identification of spring viraemia of carp virus. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 25–29.

EMMENEGGER E.J. & KURATH G. (2008). DNA vaccine protects ornamental koi (*Cyprinus carpio koi*) against North American spring viremia of carp virus. *Vaccine*, **26**, 6415–6421.

FIJAN N. (1988). Vaccination against spring viraemia of carp. *In: Fish Vaccination*. Ellis A.E., ed.



Academic Press, London, UK, 204–215.

GALLIONE C.J. & ROSE J.K. (1983). Nucleotide sequence of a clone encoding the entire glycoprotein from the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, **46**, 162–169.

GOODWIN A.E., PETERSON J.E., MEYERS T.R. & MONEY D.J. (2004). Transmission of exotic fish viruses: The relative risks of wild and cultured bait. *Fisheries*, **29**, 19–23.

HAENEN O.L.M. & DAVIDSE A. (1993). Comparative pathogenicity of two strains of pike fry rhabdovirus and spring viremia of carp virus for young roach, common carp, grass carp and rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 87–92.

HAGHIGHI KHIABANIAN ASL A., AZIZZADEH M., BANDEHPOUR M., SHARIFNIA Z. & KAZEMI B. (2008a). The first report of SVC from Indian carp species by PCR and histopathologic methods in Iran. *Pakistan J. Biol. Sci.*, **11**, 2675–2678.

HAGHIGHI KHIABANIAN ASL A., BANDEHPOUR M., SHARIFNIA Z. & KAZEMI B. (2008b). The first report of spring viraemia of carp in some rainbow trout propagation and breeding by pathology and molecular techniques in Iran. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, **3**, 263–268.

HILL B.J., UNDERWOOD B.O., SMALE C.J. & BROWN F. (1975). Physico-chemical and serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish. *J. Gen. Virol.*, **27**, 369–378.

HOFFMANN B., SCHÜTZE H. & METTENLEITER T.C. (2002). Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of Spring Viremia of Carp, a fish rhabdovirus. *Virus Res.*, **84**, 89–100.

JEREMIC S., DOBRILA J.-D. & RADOSAVLJEVIC V. (2004). Dissemination of spring viraemia of carp (SVC) in Serbia during the period 1992-2002. *Acta Vet. (Beograd)*, **54**, 289–299.

JOHNSON M.C., MAXWELL J.M., LOH P.C. & LEONG J.-A.C. (1999). Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses: snakehead rhabdovirus (SHRV) and rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)/spring viremia of carp virus (SVCV). *Virus Res.*, **64**, 95–106.

JØRGENSEN P.E.V., OLESEN N.J., AHNE W. & LORENZEN N. (1989). SVCV and PFR viruses: Serological examination of 22 isolates indicates close relationship between the two fish rhabdoviruses. *In: Viruses of Lower Vertebrates*. Ahne W. & Kurstak E., eds. Springer, Berlin, Germany, 349–366.

KINKELIN P. DE & LE BERRE M. (1974). Rhabdovirus des poissons II. Propriétés *in vitro* du virus de la virémie printanière de la carpe. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **125 A**, 113–124.

KIRYU I., SAKAI T., KURITA J. & IIDA T. (2007). Virucidal effect of disinfectants on spring viremia of carp virus. *Fish Pathol.*, **42**, 111–113.

KOUTNÁ M., VESELY T., PSIKAL I. & HULOVÁ J. (2003). Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 229–235.

LU Y. & LOH P.C. (1994). Infectivity studies of rhabdovirus in the penaeid blue shrimp. *Aquacult. Int.*, **2**, 123–127. SHEPPARD A.M., LE DEUFF R.-M., MARTIN P.D., WOOLFORD G., WAY K. & STONE D.M. (2007). Genotyping

spring viraemia of carp virus and other piscine vesiculo-like viruses using reverse hybridisation. *Dis. Aquat. Org.*, **76**, 163–168.

SOLIMAN M.K., ABOEISA M.M., MOHAMED S.G. & SALEH W.D. (2008). First record of isolation and identification of spring viraemia of carp virus from *Oreochromis niloticus* in Egypt. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008, 1287–1306.

STONE D.M., AHNE W., DENHAM K.D., DIXON P.F., LIU C.T.Y., SHEPPARD A.M., TAYLOR G.R. & WAY K. (2003). Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 203–210.

TENG Y., LIU H., LV J.Q., FAN W.H., ZHANG Q.Y. & QIN Q.W. (2007). Characterization of complete genome sequence of the spring viraemia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China. *Arch. Virol.*, **152**, 1457–1465.

WOLF K. (1988). Spring viraemia of carp. *In*: Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press, Ithaca, USA, 191–216.

ZHANG N.Z., ZHANG L.F., JIANG Y.N., ZHANG T. & XIA C. (2009). Molecular analysis of spring viraemia of carp virus in China: A fatal aquatic viral disease that might spread in East Asian. *PLoS ONE*, **4**, 1–9.

\*

\* \*

**NB:** Существуют референтные лаборатории МЭБ по весенней виремии карпа (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/> )

Пожалуйста, свяжитесь с референтной лабораторией МЭБ для получения дополнительной информации о весенней виремии карпов.