

ЗАРАЖЕНИЕ ГЕРПЕСВИРУСОМ МОРСКОГО УШКА (АБАЛОНОВ)

1. Сфера применения¹

Применительно к настоящей главе, вирусный ганглионеврит морского ушка (абалонов) (AVG) является заражением герпесвирусом морского ушка (абалонов) (AbHV).

2. Информация о болезни

2.1. Особенности возбудителя

Герпесвирус морского ушка (AbHV) является этиологическим агентом вирусного ганглионеврита морского ушка (AVG), контагиозного заболевания видов морского ушка в Австралии (Ellard *с соавт.*, 2009; Hooper *с соавт.*, 2007) и, возможно, видов морского ушка в других странах (Chang *с соавт.*, 2005; Wang *с соавт.*, 2004). Сравнение нуклеотидных последовательностей AbHV VIC и Ostreid Herpesvirus-1 (Davison *с соавт.*, 2009; Le Deuff & Renault, 1999) по общим кодирующим областям выявило сходство, которое составляет от 19% до 53%, что указывает на низкий уровень сходства последовательностей у данных вирусов (Savin *с соавт.*, 2010), и данный вирус был предположительно отнесен ко второму представителю семейства *Malacoherpesviridae*.

Очищенные частицы AbHV (Tan *с соавт.*, 2008), наблюдаемые с помощью просвечивающей электронной микроскопии, являются оболочечными и икосаэдрическими с электронно-плотными ядрами диаметром 100-110 нм. Внутриядерное расположение частиц AbHV, их размер и ультраструктура характерны для представителей *Herpesviridae*. Изопикническое центрифугирование (в градиенте плотности тартрата калия и хлористого цезия) продемонстрировало плавучую плотность вирусных частиц, равную 1,17-1,18 г/мл (Tan *с соавт.*, 2008).

2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

Герпесвирусы, вызывающие болезнь у морского ушка, регистрировались в Китайском Тайбэе и Австралии. Сравнение нуклеотидных последовательностей AbHV VIC и AbHV Taiwan по трем общим областям выявило сходство, которое составило 92,4, 96,4 и 96,6%, что указывает на то, что у данных вирусов имеется высокий уровень сходства последовательностей. Недавно проведенный анализ геномной последовательности продемонстрировал, что в Австралии имеется ряд генотипических вариантов (Cowley *с соавт.*, 2011). Различаются ли данные генотипы AbHV по фенотипу и вирулентности, еще предстоит определить.

2.1.2. Выживание вне хозяина

В стадии исследования.

2.1.3. Стабильность агента

В стадии исследования.

¹ Примечание: Версия утверждена Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 г.

2.1.4. Жизненный цикл

Не применимо.

2.2. Особенности хозяина

В настоящее время в Австралии известны виды, восприимчивые к AVG, такие как галиотис гладкий (*Haliotis laevis*), галиотис красный (*H. rubra*) и гибриды этих двух видов. Клинические признаки, характерные для AVG, не были зарегистрированы у других видов моллюсков в регионах, где AVG предположительно является энзоотическим. В Китайском Тайбэе сообщалось о ганглионеврите, ассоциированном с герпесвирусной инфекцией и высокой смертностью у морского ушка вида *H. diversicolor supertexta*. Заболевание было зарегистрировано только у *H. diversicolor supertexta*, в то время как у совместно обитающего с ним японского морского ушка (*H. discus*) болезнь не наблюдалась (Chang *с соавт.*, 2005).

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Галиотис гладкий – *Haliotis laevis*

Галиотис красный – *H. rubra*

Гибрид (гладкий × красный) – *H. laevis* × *H. rubra*

Галиотис разноцветный – *H. diversicolor*

2.2.2. Стадии развития хозяев, когда они наиболее восприимчивы к инфекции

Все стадии развития.

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Нет данных.

2.2.4. Органы-мишени и инфицируемые ткани

Основным гистопатологическим поражением, выявленным у морского ушка, зараженного AVG, является ганглионеврит: воспаление, затрагивающее только нервную ткань. Могут поражаться церебральные, плевро-педальные и буккальные ганглии, а также мозговая комиссура и связанные с ней периферические нервы (Hooper *с соавт.*, 2007).

2.2.5. Персистентная инфекция с пожизненным носительством

Нет данных.

2.2.6. Переносчики инфекции

Нет данных.

2.2.7. Известные или потенциальные носители среди диких водных животных

Нет данных.

2.3. Модель болезни

Вспышки AVG как в популяциях как разводимого, так дикого морского ушка в Австралии характеризуются быстрым нарастанием смертности (до 90%) во всех возрастных группах (Corbeil *с соавт.*, 2010). Аналогичным образом, в Китайском Тайбэе во время эпизоотии в популяции разводимого морского ушка (температура воды составляла 16-19°C) заболевание поражало как взрослых, так и молодых особей морского ушка с кумулятивной смертностью, составляющей 70-80%. Сообщалось, что гибель всех особей морского ушка в

пруду может произойти в течение 3 дней после появления клинических признаков (Chang *с соавт.*, 2005). Сходная картина болезни наблюдалась при экспериментальном заражении (Chang *с соавт.*, 2005; Crane *с соавт.*, 2009).

2.3.1. Механизмы передачи

Горизонтальная передача инфекции (Chang *с соавт.*, 2005; Crane *с соавт.*, 2009) была экспериментально продемонстрирована следующим образом:

1. помещение здорового морского ушка в емкость с водой, где содержится зараженная особь морского ушка, без прямого контакта между больной и здоровой особью морского ушка;
2. помещение здоровой особи морского ушка в воду, в которой ранее находилась больная особь морского ушка;
3. внутримышечное введение здоровой особи морского ушка отфильтрованного гомогената ткани, полученного от больной особи морского ушка.

Во всех случаях наблюдалась 100%-ная смертность с доклиническим периодом, составляющим 1-2 дня после заражения. Гибель продолжалась до тех пор, пока не наступала 100%-ная смертность в течение 2-5 дней после заражения.

2.3.2. Превалентность

В Австралии, а также в Китайском Тайбэе вспышка AVG характеризуется быстрым ростом смертности (до 90% и более). Зараженные особи морского ушка, демонстрирующие клинические признаки (например, скручивание ноги), с большой вероятностью погибают в течение 1 дня после появления данных признаков. Ганглионеврит наблюдается в срезах нервной ткани с помощью световой микроскопии, а наличие AbHV подтверждается с помощью количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) и/или гибридизации *in situ* (Crane *с соавт.*, 2009). При использовании этих методов было получено очень малое количество ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Точная превалентность AVG в популяциях дикого морского ушка в водах Австралии неизвестна.

2.3.3. Географическое распределение

Австралия (Виктория и Тасмания), Китайский Тайбэй.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

В случае эпизоотий на фермах в Австралии, кумулятивная смертность во всех возрастных группах может достигать >90%. В условиях экспериментальных исследований 100% смертность может наступить в течение 5 дней после заражения. Большинство особей морского ушка с макроскопическими признаками погибает в течение 1-2 дней.

2.3.5. Факторы окружающей среды

В Австралии первоначальная вспышка AVG произошла на ферме летом 2005/2006 гг., а затем, по-видимому, инфекция распространилась на дикие популяции, где смертность наблюдалась в течение следующего года, то есть в течение всех сезонов. До настоящего времени все опыты по экспериментальному заражению проводились при диапазоне температур от 15 до 18°C. В Китайском Тайбэе во время зарегистрированной эпизоотии температура воды составляла 16-19°C, а экспериментальное заражение проводилось при 17-20°C. Еще предстоит определить, как температура влияет на репликацию вируса и начало

болезни. Неизвестно, какое влияние могут оказать изменения других факторов окружающей среды, таких как соленость и растворенный кислород.

2.4. Профилактика и борьба с болезнью

При отсутствии эффективных противовирусных методов лечения рекомендуется обеспечить высокий уровень биобезопасности на ферме и предприятии по разведению живых абалонов и региональные ограничения на перемещение. После вспышки на ферме уничтожение зараженного поголовья, дезинфекция воды и оборудования и процедуры опустошения фермы, по-видимому, являются эффективными для предотвращения повторного заражения. Для проверки статуса ранее зараженного объекта (до его повторного заселения) можно использовать индикаторных абалонов.

2.4.1. Вакцинация

Вакцины отсутствуют.

2.4.2. Лекарственное лечение

Нет данных.

2.4.3. Иммуностимуляция

Нет данных.

2.4.4. Разведение для получения резистентной популяции

Нет данных.

2.4.5. Повторное заселение резистентными видами

Нет данных.

2.4.6. Блокирующие агенты

Нет данных.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Нет данных.

2.4.8. Общие практики разведения

На сегодняшний день экспериментальные данные свидетельствуют о высокой вирулентности AbHV. Практики, которые можно было бы использовать для снижения тяжести заболевания, не установлены. Интересно отметить, что, в отличие от ситуации в Виктории, клиническое заболевание не было зарегистрировано в популяциях дикого морского ушка в Тасмании. Вспышки заболевания на перерабатывающих предприятиях в Тасмании позволяют предположить, что стрессовые факторы могут влиять на проявление субклинической инфекции.

3. Отбор образцов

3.1. Отбор отдельных особей

При первых признаках увеличения числа особей морского ушка, которые выглядят слабыми или ведут себя необычно, или в случаях внезапной необъяснимой гибели, в качестве образцов следует отбирать живых умирающих особей. Если отсутствуют

умирающие или недавно погибшие особи морского ушка, в качестве образцов следует отбирать явно здоровых особей всех возрастных групп со всех частей фермы.

3.2. Консервирование образцов

Образцы следует отбирать для исследования с помощью: i) гистологии, и их следует фиксировать в 10% формалине в отфильтрованной морской воде; ii) электронной микроскопии (образцы фиксируют в 2,5% глутаральдегиде в отфильтрованной морской воде); iii) ПЦР (образцы фиксируют в консерванте для ПЦР, таком как 95% этанол). Если фиксаторов нет в наличии, образцы следует хранить охлажденными (на льду) и доставлять в лабораторию в течение 24 часов. Кроме того, образцы могут быть отправлены в замороженном виде. Замороженные образцы не подходят для гистологии или электронной микроскопии, но их можно анализировать с помощью ПЦР.

3.3. Объединение образцов в пулы

Ткани от умирающих или недавно погибших особей морского ушка следует отбирать по возрастной группе и водоему/ферме/географическому местоположению. Для сравнения результатов различных тестов, ткани, отобранные у морского ушка, не следует объединять в пулы.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Нервная ткань, включающая церебральные, плевро-педальные и буккальные ганглии.

3.5. Неподходящие образцы/ткани

На сегодняшний день в ненеуральных тканях поражения не обнаруживались.

4. Методы диагностики

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Вспышки AVG вызывали высокую смертность (до 90% на ферме) как в разводимой на ферме, так и в дикой популяции морского ушка. Клинически у морского ушка может присутствовать один или несколько из следующих симптомов: нетипичное изогнутое приподнятое положение края ноги; опухшие и выпуклые части рта; эверсия радулы; минимальное движение педальных мышц; чрезмерная выработка слизи; отсутствие выраженного вытягивания ноги, которое проявляется при рефлексе переворачивания, если здоровую особь морского ушка повернуть на спину; слабое присасывание к субстрату при помощи ноги. В Тасмании на перерабатывающих заводах у зараженного AVG морского ушка наблюдалась «жесткая нога» или тетания, чрезмерная выработка слизи, аномальное икрометание и «разбухание» (Ellard *с соавт.*, 2009). На данных заводах также отмечен гораздо более низкий уровень заболеваемости и смертности, чем на фермах или в диких популяциях морского ушка в Виктории. Аналогичные признаки были зарегистрированы при эпизоотии болезни морского ушка в Китайском Тайбэе (Chang *с соавт.*, 2005).

4.1.2. Изменение поведения

AVG, как правило, является острым заболеванием, при котором морское ушко погибает в течение 1-2 дней после проявления макроскопических признаков заболевания. Ранее у абалонов, выловленных в дикой природе, содержащихся на предприятиях в Тасмании, наблюдалось более медленное проявление клинических признаков и наступление гибели. В отношении некоторых абалонов, выловленных в дикой природе Тасмании, ранее был

получен положительный результат кПЦР на AVG, при отсутствии явных клинических или гистологических признаков.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Для отбора образцов следует выбирать абалонов, которые слабо присасываются к субстрату из-за слабости или патологических изменений в pedalных мышцах. Если данная макроскопическая патология вызвана острым AVG, вполне вероятно, что данные абалоны погибнут в течение 1-2 дней.

4.2.2. Клиническая химия

Нет данных.

4.2.3. Микроскопическая патология

У абалонов, зараженных AVG, наблюдается воспаление (повышенная инфильтрация гемоцитами) и некроз, затрагивающий только нервную ткань (церебральные, плевро- pedalные и буккальные ганглии, ветви pedalного нерва и периферические нервы). Данные признаки наблюдаются в гистологических срезах нервной ткани, окрашенных гематоксилином и эозином, и их изучают с помощью световой микроскопии (Ellard *с соавт.*, 2009; Hooper *с соавт.*, 2007).

4.2.4. Влажные препараты

Не применимо.

4.2.5. Мазки

Не применимо.

4.2.6. Фиксированные срезы ткани

Гибридизация *in situ* локализует клетки, инфицированные AbHV, в нервной ткани, в которой при гистологическом исследовании наблюдается ганглионеврит, характеризующийся воспалительными изменениями с повышенной клеточностью, включающей главным образом гемоциты и глиальные клетки, и некроз клеток в пораженных нервах (Mohammad *с соавт.*, 2011).

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Просвечивающая электронная микроскопия может использоваться для подтверждения наличия вирусных частиц в инфицированных ганглиях. Частицы AbHV являются икосаэдрическими с электронно-плотными ядрами диаметром 100-110 нм. Внутрядерное расположение частиц и их ультраструктура характерны для представителей *Herpesviridae* (Tan *с соавт.*, 2008).

4.3. Методы обнаружения и идентификации агента

4.3.1. Методы прямого обнаружения

Методы прямого обнаружения, разработанные на сегодняшний день для обнаружения и идентификации AbHV, включают микроскопические методы (исследование срезов тканей на наличие типичных поражений, и электронную микроскопию для обнаружения частиц

герпесвируса), традиционную ПЦР и ПЦР в реальном времени, а также гибридизацию *in situ* (ISH).

4.3.1.1. Микроскопические методы

Нервная ткань (церебральные, плевро-педальные и буккальные ганглии, ветви педального нерва и периферические нервы) является основной целевой тканью. Ее образцы следует отбирать и фиксировать (используя 10% формалин), обрабатывать с использованием стандартных процедур и окрашивать гематоксилином и эозином для гистологического исследования.

Для исследования с помощью электронной микроскопии, образцы ткани (содержащие плевро-педальный ганглий) следует фиксировать с использованием 2,5% (об/об) глутаральдегида и 2-4% (об/об) параформальдегида в 0,1 М какодилатного буфера, с последующей фиксацией в 1% (масса/об) тетраоксида осмия, затем следует промывание в воде, очищенной обратным осмосом (3 × 5 минут), дегидратация в этаноле аналитической степени чистоты (70%, в течение ночи при 4°C; 95% в течение 20 минут; 100% в течение 3 × 20 минут) и инфильтрация в 100% смоле Сперра (в течение ночи). Затем образцы погружают в смолу Сперра.

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Не применимо.

4.3.1.1.2. Мазки

Не применимо.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы ткани

Нервная ткань (церебральные, плевро-педальные и буккальные ганглии, ветви педального нерва и периферические нервы) является основной целевой тканью, и при исследовании гистологических срезов выявляется ганглионеврит - повышенная клеточность, включающая в основном гемоциты и глиальные клетки, и некроз клеток.

4.3.1.2. Выделение и идентификация агента

AbHV идентифицируют с использованием методов, которые специфически обнаруживают нуклеиновую кислоту AbHV (ПЦР, секвенирование, кПЦР и гибридизация *in-situ*).

4.3.1.2.1. Культура клеток /искусственные среды

На сегодняшний день, попытки культивирования вируса в клеточных линиях позвоночных и беспозвоночных оказались безуспешными.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

Отсутствуют.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

Образцы нервной ткани для традиционной ПЦР или ПЦР в реальном времени должны быть зафиксированы в консерванте (80% этанол аналитической степени чистоты; 19,75% глицерин; 0,25% β-меркаптоэтанол) или 95% этанол.

Плевро-педальный ганглий и/или педальные нервные стволы вырезают из фиксированной ткани и помещают в пробирки емкостью 2,0 мл для выделения ДНК. Нуклеиновую кислоту

из инфицированных и неинфицированных герпесвирусом тканей абалонов (приблизительно 20 мг мышечной и нервной ткани) экстрагируют с использованием коммерческого набора, например, «QIAamp DNA Mini Kit» (QIAGEN) или с использованием аналогичного набора в соответствии с инструкциями производителя. Нуклеиновую кислоту, связанную с миниколонками, элюируют и ресуспендируют в финальном объеме 100 мкл буфера (~ 100 нг/мкл), который входит в набор. При большом количестве образцов, альтернативным вариантом является следующее: расщепление ткани согласно соответствующему протоколу QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) и экстракция нуклеиновой кислоты с использованием набора для выделения вирусной РНК «MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit» (который экстрагирует общую нуклеиновую кислоту из образцов) и AB MagMAX Express-96 Magnetic Particle Processor (Applied Biosystems)².

4.3.1.2.3.1. кПЦР (TaqMan)

После валидации теста кПЦР, нацеленного на ORF49 (Corbeil *с соавт.*, 2010), обнаружение генотипических вариантов в Австралии, не распознаваемых данным тестом, потребовало разработки других тестов кПЦР на основе более консервативных областей вирусного генома. Тесты кПЦР, нацеленные на ORF66 и ORF77 (см. Таблицу 4.1.), широко использовались в исследованиях болезни, и хотя формальная валидация не проводилась, они обладали достаточной чувствительностью для обнаружения всех вариантов AbHV, выявленных на сегодняшний день, включая изолят из Китайского Тайбэя.

Таблица 4.1. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов для кПЦР для обнаружения AbHV

Праймеры ORF66 (300 нМ)	Последовательность
AbHV ORF66F1	5'-TCC-CGG-ACA-CCA-GTA-AGA-AC-3'
AbHV ORF66R1	5'-CAA-GGC-TGC-TAT-GCG-TAT-GA-3'
Зонд ORF66 (100 нМ)	
AbHV 66Prb1	5'- 6FAM -TGG-CCG-TCG-AGA-TGT-CCA-TG- TAMRA -3'
Праймеры ORF77 (300 нМ)	
AbHV ORF77F1	5'-CAA-CCA-CTT-GTT-CGG-GTT-CT-3
AbHV ORF77R1	5'-CAG-GGT-GAT-TAA-TGC-GGA-GT-3'
Зонд ORF77 (100 нМ)	
AbHV 77Prb1	5'- 6FAM -TCC-GTA-CGC-GGG-ATC-TTC-GT- TAMRA -3'
Праймеры для гена 18S рРНК (100 нМ)	
18SF1	5'-CGG-CTA-CCA-CAT-CCA-AGG-AA-3'
18SR1	5'-GCT-GGA-ATT-ACC-GCG-GCT-3'
Зонд для гена 18S рРНК (100 нМ)	5'- 6VIC -TGC-TGG-CAC-CAG-ACT-TGC-CCT-C- TAMRA -3'

кПЦР-тестирование экстрагированной ДНК проводят с использованием 96-луночных планшетов. Используют 12,5 мкл реакционной смеси для ПЦР TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2×), 2 мкл (~ 100 нг/мкл) образца экстрагированной ДНК, и реакционную смесь доводят до объема 25 мкл с использованием деионизированной воды, после добавления

² Ссылка на конкретные коммерческие продукты в качестве примеров не означает, что они одобрены МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, указанным в данном *Руководстве по водным животным*.

праймеров и зондов при соответствующих концентрациях (см. Таблицу 4.1.). Используются следующие условия термического циклирования: 59 секунд при 95°C, затем 45 циклов при 95°C по 3 секунды, и 30 секунд при 60°C.

Тесты кПЦР, нацеленные на ORF66 и/или ORF77 мультиплексируются с тестом кПЦР с использованием праймеров, и зонд, специфичный для гена 18S рРНК (Applied Biosystems), используется для валидации процедуры экстракции нуклеиновой кислоты и отсутствия ингибиторов ПЦР (см. Таблицу 4.1). ,

Все образцы (включая положительные и отрицательные контроли) тестируются в двух или трех повторностях. Результаты кПЦР с использованием технологии TaqMan выражены в виде программно-генерируемых характерных кривых амплификации. Кривые амплификации для положительных и отрицательных контролей (безматричных контролей) следует сравнивать с тестируемым образцом. Образец считается выше уровня шума теста, когда интенсивность флуоресценции (ΔR_n) FAM или VIC по отношению к ROX (внутренний референсный краситель) превышает пороговое значение, установленное на верхнем конце линейного участка кривой амплификации (обычно это значение составляет 0,1, но оно может зависеть от различных факторов, таких как оборудование, реагенты, виды хозяев). Результаты анализа TaqMan также могут выражаться в виде значений порогового цикла (C_T). Значение порогового цикла (C_T) определяется как номер цикла, на котором обнаруживается статистически значимое поднятие уровня флуоресценции над уровнем шума.

По завершении кПЦР с использованием технологии TaqMan, наличие ДНК AbHV демонстрируется наличием специфических ампликонов, идентифицированных при помощи программно-генерируемых характерных кривых амплификации и значений порогового цикла (C_T). Безматричные контроли не должны иметь признаков специфических ампликонов.

Если тест считается достоверным, результаты для лунок с образцами могут быть интерпретированы с использованием следующих критериев:

- Положительные результаты теста определяются как наличие специфических ампликонов, что выражается в виде характерной кривой амплификации.
- Отрицательные результаты теста определяются как отсутствие специфических ампликонов, что выражается в виде характерной кривой амплификации.

В дополнение к безматричному контролю, отрицательные контроли должны включать нуклеиновую кислоту, экстрагированную из заведомо здорового морского ушка, чтобы определить, что они не выдают значения C_T .

Положительные контроли могут включать нуклеиновую кислоту, экстрагированную из заведомо инфицированного морского ушка и/или эталонную плазмидную ДНК (Corbeil *с соавт.*, 2010).

4.3.1.2.3.2. Традиционная ПЦР

Традиционная ПЦР также может использоваться для обнаружения AbHV в образцах тканей. Нуклеиновую кислоту экстрагируют как описано выше. Было продемонстрировано, что ПЦР для AbHV1617 генерирует ампликоны различной длины (от 522 до 588 пар оснований) в зависимости от изолята AbHV. Таким образом, данный метод является

потенциально полезным для эпидемиологических исследований и для подтверждения положительных результатов кПЦР. Последовательности праймеров подробно описаны ниже.

Праймер	Последовательность
AbHV 16	5'-GGC-TCG-TTC-GGT-CGT-AGA-ATG-3'
AbHV 17	5'-TCA-GCG-TGT-ACA-GAT-CCA-TGT-C-3'

Используются следующие условия термического циклирования: один цикл при 95°C в течение 15 минут, 40 циклов при 94°C в течение 30 секунд / 52°C в течение 30 секунд / 74°C в течение 45 секунд, затем один цикл при 72°C в течение 7 минут; затем смесь можно хранить при 4°C.

4.3.1.2.3.3. Гибридизация *in situ*

Для описанной процедуры гибридизации *in-situ* (ISH) используется ДНК-зонд, меченный дигоксигенином (DIG), для обнаружения AbHV в срезах ткани, фиксированных формалином и залитых парафином (FFPE).

4.3.1.2.3.3.1. Реагенты

20 × стандартного цитратно-солевого буфера (SSC) pH7 (хранить при комнатной температуре)

175,32 г/л	NaCl
88,23 г/л	Цитрат натрия

100 × раствора Денхардта (хранить при -20°C)

2 г (100 мл) ⁻¹	Альбумин бычьей сыворотки (Фракция V)
2 г (100 мл) ⁻¹	Фиколл 400
2 г (100 мл) ⁻¹	Поливинилпирролидон

Буфер для гибридизации (хранить при -20°C)

25 мл	Формамид
10 мл	20 × SSC
2,5 мл	100 × раствора Денхардта
10 мл	50% декстрансульфат в дистиллированной воде
500 мкл	10 мг/мл ДНК спермы сельди

Довести до объема 50 мл водой MilliQ

10 × Трис-буферный солевой раствор (TBS) (хранить при комнатной температуре)

23,6 г/л	Трис-основание
127 г/л	Трис/HCl
87,66 г/л	NaCl

4.3.1.2.3.3.1.1. Подготовка ДНК-зондов, меченных дигоксигенином (DIG)

Следует выполнить ПЦР на очищенной ДНК AbHV или образце, который заведомо содержит AbHV, с использованием набора PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche кат. № 11 636 090 910) в соответствии с инструкциями производителя. Следует использовать праймеры:

Название праймера	Последовательность праймера	Размер ампликона (зонда)
AbHV ORF66F1	5'-TCC-CGG-ACA-CCA-GTA-AGA-AC-3'	
AbHV ORF66R2	5'-GCC-GGT-CTT-TGA-AGG-ATC-TA-3'	848 пар оснований

Используются следующие условия термического циклирования: 95°C в течение 5 минут, затем 30 циклов при 95°C в течение 30 секунд, 57°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 60 секунд. ПЦР завершается стадией финальной элонгации при 72°C в течение 10 минут.

4.3.1.2.3.3.2. Подготовка срезов

- i) Нарезать ткань, погруженную в парафин, на кусочки толщиной 3 мкм и поместить на предметные стекла Superfrost plus (Menzel, кат. № SF41296SP) и дать высохнуть.
- ii) Нагревать срезы при 65°C в течение 30 минут и депарафинировать в двух порциях ксилола.
- iii) Обезводить путем погружения предметных стекол в абсолютный этанол на 2 минуты, затем в 90% этанол на 2 минуты, 70% этанол на 2 минуты, и затем в дистиллированную воду.
- iv) Поместить предметные стекла в 0,2 н раствора HCl на 20 минут и промыть в дистиллированной воде в течение 5-10 минут.
- v) Нанести 50-100 мкл 100 мкг/мл протеиназы К в трис-буферный солевой раствор (TBS; 0,1 М Трис, 0,15 М NaCl, pH 7,5) и инкубировать при 37°C в течение 30 минут.
- vi) Промыть 0,2% глицином в течение 2 минут.
- vii) Промыть в проточной воде в течение 10 минут.
- viii) Обезводить в 70% этаноле в течение 2 минут, затем в 90% этаноле в течение 2 минут и в 100% этаноле в течение 2 минут.
- ix) Высушить предметные стекла на воздухе.

4.3.1.2.3.3.3. Процедура гибридизации

- i) Приготовить 100 мкл раствора для гибридизации на срез ткани (4 × SSC, 5 × раствора Денхардта, 10 мкг/мл ДНК спермы сельди, 10% декстрансульфата, 50% формамида, приблизительно 5 нг/мкл зонда).
- ii) Нагревать раствор для гибридизации до 95-100°C в течение 5 минут для денатурации зонда, и поместить на лед, пока не будет готов к использованию.
- iii) Нанести достаточное количество раствора для гибридизации, чтобы покрыть срез (приблизительно 50 мкл) и накрыть покровным стеклом.
- iv) Нагреть предметные стекла до 95°C в течение 5 минут, для денатурации нуклеиновой кислоты в образце. Для нагревания предметных стекол до 95°C можно использовать нагревательный блок для ПЦР или специальное устройство для гибридизации, такое как гибридизатор Invitrogen SPoT.
- v) Поместить предметные стекла во влажную камеру, предварительно нагретую до 37°C, и инкубировать при 37°C в течение ночи (12-16 часов).

4.3.1.2.3.3.4. Процедура после гибридизации

- i) Удалить покровные стекла, погрузив предметные стекла в $2 \times \text{SSC}$ при комнатной температуре.
- ii) Поместить предметные стекла в подставку и погрузить в $2 \times \text{SSC}$ при комнатной температуре.
- iii) Промыть при легком покачивании/встряхивании в $0,5 \times \text{SSC}$ (предварительно нагретом до 37°C) при температуре 37°C в течение 15 минут.
- iv) Быстро промыть предметные стекла в буфере TBS при комнатной температуре.
- v) Инкубировать предметные стекла в блокирующем растворе (0,5% сухого обезжиренного молока в TBS) в течение 30 минут при комнатной температуре.
- vi) Нанести на срезы 100-200 мкл овечьих антител к дигоксигенину, конъюгированных с щелочной фосфатазой (Roche кат. № 1093274), разведенных 1 к 100 в блокирующем растворе, и инкубировать при комнатной температуре в течение 1 часа.
- vii) Промыть в буфере TBS три раза по 3 минуты.
- viii) Дать отстояться в растворе II (0,1 М Трис pH 8, 0,5 М NaCl, 0,1 М MgCl₂, pH 9 или 0,1 М Трис pH 8, 0,05 М MgSO₄·7H₂O, pH 9,5) в течение 3 минут при комнатной температуре.

4.3.1.2.3.3.5. Проявление окрашивания

- i) Инкубировать предметные стекла в темноте в NBT/BCIP, разведенном в растворе II (25 мкл/мл).
- ii) Нанести на срезы окрашивающий раствор и поместить сверху покровное стекло. Инкубировать в темноте в течение 3-4 часов во влажном контейнере, следя за тем, чтобы предметные стекла не высохли.
- iii) Контролировать проявление окрашивания, периодически проверяя предметные стекла под световым микроскопом.
- iv) При необходимости предметные стекла можно инкубировать в темноте при комнатной температуре в течение ночи.
- v) Остановить реакцию и снять покровное стекло, погрузив предметные стекла в дистиллированную воду.
- vi) Промыть предметные стекла в проточной воде в течение 5 минут.
- vii) Предметные стекла можно контрокрашивать в течение 1 минуты с использованием 0,5% раствора бисмарка коричневого или аналогичного раствора.
- viii) ЗаклЮчить предметные стекла в заливочную среду (ДАКО, кат. № S3023) и покрыть покровным стеклом.

4.3.1.2.3.3.6. Интерпретация результатов

Специфическое темное сине-черное внутриклеточное окрашивание свидетельствует о наличии вирусной ДНК.

4.3.1.2.4. Выделение агента

Нет данных.

4.3.2. Серологические методы

Не применимо.

5. Категории тестов в зависимости от их назначения

Методы, имеющиеся в настоящее время для целевого надзора и диагностики AVG, 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 может применяться в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы строго ограничивают его применение; и d = метод в настоящее время не рекомендуется для данной цели. Это несколько субъективное разделение на категории, поскольку пригодность включает в себя надежность, чувствительность, специфичность и полезность. Хотя не все тесты, относящиеся к категории a или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и факт того, что они широко применялись без сомнительных результатов, делает их подходящими.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	Послеличинки (PL)	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	d	c	c	c	d
Биопроба	d	d	d	d	d	c
Прямая световая микроскопия	d	d	d	d	d	d
Гистопатология	d	d	b	b	a	a*
Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	d	d	d	d	d	c
Методы на основе антител	d	d	d	d	d	d
ДНК зонды <i>in situ</i>	d	d	c	c	d	a*
ПЦР	d	d	a	a	a	a
ПЦР и секвенирование	d	d	d	d	d	a

ПЦР = полимеразная цепная реакция; *Гистопатологию можно подтвердить при помощи гибридизации *in-situ* (ISH).

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от заражения герпесвирусом морского ушка

Тестом, рекомендованным для целевого надзора, является кПЦР с использованием нуклеиновых кислот, экстрагированных из нервной ткани абалонов.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение случая подозрения на болезнь

Подозрение на AbHV возникает, если выполняется как минимум одно из следующих условий:

- i) Высокие показатели смертности (до 90%), ассоциированные с клиническими признаками AVG, как описано в данной главе.

- ii) Гистопатология (ганглионеврит), наблюдаемая в срезах нервной ткани, полученной из одного образца абалона.
- iii) Положительный результат кПЦР или традиционной ПЦР в отношении как минимум одного образца абалона.

7.2. Определение подтвержденного случая болезни

Случай AbHV следует рассматривать как подтвержденный, если в дополнение к критериям, указанным в Разделе 7.1, выполняется одно или несколько из нижеуказанных условий:

- i) Положительный результат кПЦР в отношении одного или нескольких образцов абалонов, если также получены положительные результаты по гистопатологии (7.1i) и/или имеет место высокая смертность с клиническими признаками, характерными для AVG (7.1ii).
- ii) Положительный результат, полученный при гибридизации *in situ* на срезах нервной ткани.
- iii) Положительный результат традиционной ПЦР на срезах нервной ткани с последующим секвенированием ампликона для подтверждения последовательности нуклеиновой кислоты AbHV.

8. Список литературы

CHANG P.H., KUO S.T., LAI S.H., YANG H.S., TING Y.Y., HSU C.L. & CHEN H.C. (2005). Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 23–27.

CORBEIL S., COLLING A., WILLIAMS L.M., WONG F.Y.K., SAVIN K., WARNER S., MURDOCH B., COGAN N.O.I., SAWBRIDGE T.I., FEGAN M., MOHAMMAD I., SUNARTO A., HANDLINGER J., PYECROFT S., DOUGLAS M., CHANG P.H. & CRANE M.ST.J. (2010). Development and validation of a TaqMan® PCR assay for the Australian abalone herpes-like virus. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 1–10.

COWLEY J.A., CORBEIL S., CHEN H., WONG F., MOODY N.J., ELLARD K., FEGAN M., SAVIN K., WARNER S. & CRANE M.ST.J. (2011). Sequence variations amongst abalone herpes-like virus (AbHV) strains provide insights into its origins in Victoria and Tasmania. Proceedings of the First FRDC Australasian Scientific Conference on Aquatic Animal Health, Cairns, Australia, 5–8 July 2011.

CRANE M.ST.J., CORBEIL S., FEGAN M. & WARNER S. (2009). Aquatic Animal Health Subprogram: Development of molecular diagnostic procedures for the detection and identification of herpes-like virus of abalone (*Haliotis* spp.). ISBN 978 0 643 09835 0., 79 pp.

DAVISON A.J., EBERLE R., EHLERS B., HAYWARD G.S., MCGEOCH D.J., MINSON A.C., PELLETT P.E., ROIZMAN B., STUDDERT M.J. & THIRY E. (2009). The order Herpesvirales. *Arch. Virol.*, **154**, 171–177.

ELLARD K., PYECROFT S., HANDLINGER J. & ANDREWARTHA R. (2009). Findings of disease investigations following the recent detection of AVG in Tasmania. Proceedings of the Fourth National FRDC Aquatic Animal Health Scientific Conference, Cairns, Australia, 22–24 July 2009.

HOOPER C., HARDY-SMITH P. & HANDLINGER J. (2007). Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Aus. Vet. J.*, **85**, 188–193.

LE DEUFF R.M. & RENAULT T. (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *J. Gen. Virol.*, **80**, 1317–1322.

MOHAMMAD I.M., WARNER S., KVALHEIM N., CRANE M.ST.J. & FEGAN M. (2011). Development of an *in situ* hybridisation assay for the detection and identification of the abalone herpes-like virus. Proceedings of the First FRDC Australasian Scientific Conference on Aquatic Animal Health, Cairns, Australia, 5–8 July 2011.

SAVIN K.M., COCKS B.G., WONG F., SAWBRIDGE T., COGAN N., SAVAGE D. & WARNER S. (2010). A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Virol. J.*, **7**, 308. <http://www.virologyj.com/content/7/1/308>.

TAN J., LANCASTER M., HYATT A., VAN DRIEL R., WONG F. & WARNER S. (2008). Purification of a herpes-like virus from abalone (*Haliotis* spp.) with ganglioneuritis and detection by transmission electron microscopy. *J. Virol. Methods*, **149**, 338–341.

WANG J., GUO Z., FENG J., LIU G., XU L., CHEN B. & PAN J. (2004). Virus infection in cultured abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve in Guangdong Province, China. *J. Shellfish Res.*, **23**, 1163–1168.

*

**

NB: Имеется Референтная лаборатория МЭБ по герпесвирусной инфекции морского ушка (абалонов) (AbHV) (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/>).

Для получения дальнейшей информации по герпесвирусной инфекции морского ушка (абалонов) (AbHV) свяжитесь с Референтными лабораториями МЭБ.