

## ИНФИЦИРОВАНИЕ МИКРОВАРИАНТАМИ ГЕРПЕСВИРУСА УСТРИЦ 1 (OsHV-1)

---

### 1. Область применения<sup>1</sup>

Для целей настоящей главы, инфицирование микровариантами герпесвируса устриц 1 считается вирусной инфекцией двустворчатых моллюсков, вызываемой микровариантами герпесвируса 1. Микроварианты OsHV-1 (герпесвирус устриц 1) являются генотипами OsHV-1, которые имеют вариации последовательности в микросателлитном локусе против хода транскрипции от ORF4, а также в ORF4 и ORF42/43 при сравнении с референтной последовательностью (учетный номер AY509253). В настоящей главе используется термин «микроварианты» для обозначения микровариантов ( $\mu$ Var) и связанных вариантов. Термин  $\mu$ Var используется для обозначения одного варианта, представляющего все мутации, указанные Segarra с соавт., 2010.

Смертность, связанная с микровариантами OsHV-1, регистрируется у тихоокеанских устриц, *Crassostrea gigas*, а также у португальских устриц, *C. angulate*.

### 2. Сведения о болезни

#### 2.1. Характеристика возбудителя

OsHV-1 является этиологическим возбудителем заразной вирусной болезни тихоокеанских устриц, также поражающей другие двустворчатые виды моллюсков. Геном вируса был секвенирован от инфицированных личинок тихоокеанских устриц, отобранных во Франции в 1995 году (Davison с соавт., 2005). Поскольку это был впервые описанный образец (через полное секвенирование генома, учетный номер AY509253), его можно считать референтным типом.

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

Частицы OsHV-1, полученные от личинок тихоокеанских устриц во Франции, были очищены (Le Deuff & Renault, 1999) и исследованы с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Было обнаружено, что частицы имели форму икосаэдра, имели оболочку, электронно-плотную сердцевину и диаметр около 120 нм. Внутрядерное расположение вирусных частиц, их размер и ультраструктура являются характерными для *Herpesvirales*.

Структура и последовательность генома, а также морфология капсида (Davison с соавт., 2005) были в дальнейшем изучены с целью оценки филогенетического статуса OsHV-1 по отношению к герпесвирусам позвоночных. Была секвенирована полная ДНК вируса (учетный номер GenBank AY509253), и было обнаружено, что капсиды OsHV-1 структурно схожи с другими герпесвирусами, которые были изучены Davison с соавт., 2005. Вирус был классифицирован под названием *Ostreid herpesvirus 1* (OsHV-1).

Микроварианты регистрировались в Европе, Австралии, Новой Зеландии и Азии (Dundon с соавт., 2011; Hwang с соавт., 2013; Jenkins с соавт., 2013; Lynch с соавт., 2012; Martenot с соавт., 2011; Paul-Pont с соавт., 2013a; Paul-Pont с соавт., 2013b; Peeler с соавт., 2012; Renault с соавт., 2012; Segarra с соавт., 2010; Shimahara с соавт., 2012).

### **2.1.2. Выживаемость вне организма-хозяина**

Максимальное время выживания вне организма-хозяина неизвестно.

Schikorski с соавторами (Schikorski с соавт., 2011a; Schikorski с соавт., 2011b) представили данные по обнаружению ДНК OsHV-1 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени в морской воде после экспериментов с совместным содержанием. Количество копий ДНК вируса в воде в первые 48 часов после введения инфицированных спатов достигло  $1 \times 10^5$  мл<sup>-1</sup>, максимум в  $1 \times 10^6$  мл<sup>-1</sup> был достигнут после инфицирования совместно содержащихся устриц. Количество инфекционного вируса неизвестно.

### **2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)**

Наиболее длительный период обнаружения ДНК в OsHV-1, высвобождаемой из мацерированных личинок и засеиваемой в морскую воду, - 22 дня при 4°C и 12 дней при 20°C (Vigneron с соавт., 2004). Однако, взаимосвязь между обнаружением ДНК методом ПЦР и инфекционностью вируса неизвестна. Как правило, вирусы многих водных животных вне организма-хозяина лучше выживают при более низких температурах.

Как герпесвирус, OsHV-1 обладает низкой выживаемостью вне организма-хозяина. Высокая температура, химические вещества или солнечный свет (ультрафиолет) могут разрушить его липидсодержащую оболочку, капсид или ДНК. Однако, было продемонстрировано, что отдельные виды герпесвирусов могут иметь различные уровни устойчивости к инактивации. Неорганические соли такие, как Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, присутствующие в морской воде, могут стабилизировать герпесвирусы (Wallis & Melnick, 1965).

### **2.1.4. Жизненный цикл**

Передача осуществляется непосредственно от хозяина к хозяину (Le Deuff с соавт., 1994; Schikorski с соавт., 2011a; Schikorski с соавт., 2011b). Недавно была выдвинута гипотеза о том, что OsHV-1 передается векторными частицами в воде (Paul-Pont с соавт., 2013a).

## **2.2. Факторы, связанные с хозяином**

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

Смертность, обусловленная микровариантами (Renault с соавт., 2012; Segarra с соавт., 2010), регистрируется среди тихоокеанской устрицы и португальской устрицы (Arzul с соавт., 2013).

### **2.2.2. Восприимчивые стадии хозяина**

Несмотря на то, что вирус может быть обнаружен на всех стадиях развития устрицы, смертность, вызванная микровариантами, в основном наблюдается среди спатов и молоди.

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

Тихоокеанская устрица и португальская устрица естественным образом инфицированы микровариантами. Молодые стадии, в том числе личинки, спаты и молодь, более восприимчивы к инфекции. Вирус легче обнаружить у умирающих животных, чем у предположительно здоровых.

### **2.2.4. Поражаемые органы и инфицированные ткани**

Ассоциированные с инфекцией изменения у спатов/молоди в основном наблюдаются в соединительных тканях всех органов, в которых фибробластоподобные клетки могут иметь увеличенные ядра с перинуклеарным хроматином (Arzul с соавт., 2002; Lipart&Renault, 2002; Renault с соавт., 1995; Schikorski с соавт., 2011a)

### **2.2.5. Хроническая инфекция с пожизненными носителями**

Внешне здоровые устрицы, включая взрослых особи, являются ПЦР-положительными на OsHV-1 (Arzul с соавт., 2002; Moss с соавт., 2007; Sauvage с соавт., 2009). Perin с соавт. (Perin с соавт., 2008) продемонстрировали, что количество копий ДНК в  $1 \text{ мг}^{-1}$  ткани было высоким (до  $10^7$ ) у устриц из популяций с аномальной смертностью и низким (наименьшее обнаруженное число -  $10^1$ ) в популяциях, где не наблюдается аномальная смертность. Oden с соавт. (Oden с соавт., 2011) предположили, что пороговое количество вирусных копий -  $10^4$  в  $1 \text{ мг}^{-1}$  ткани устриц связано со смертностью, данное наблюдение поддержали Paul-Pont с соавт. (Paul-Pont с соавт., 2013b). Определение количества вирусной ДНК у устриц методом количественной ПЦР в реальном времени может быть одним из способов различать механическое вирусоносительство и низкий уровень инфекции.

Так как имеет место обнаружение вируса (ДНК, белок или частицы) в тканях взрослых устриц, включая гонады (Arzul с соавт., 2002; Lipart & Renault, 2002), взрослые особи могут быть источником инфекции для личинок или спатов, в частности, в стрессовых условиях, например, при высокой температуре (Le Deuff с соавт., 1996). Однако до сих пор неясно, происходит ли истинная вертикальная передача (передача в пределах гамет) или горизонтальная передача (Barbosa-Solomieu с соавт., 2005).

### **2.2.6. Переносчики**

Жизненный цикл прямой. В моделях контрольного заражения посредством совместного содержания с использованием отфильтрованной морской воды не требуется переносчик. (Schikorski с соавт., 2011a; Schikorski с соавт., 2011b). В недавно вышедшей работе выдвигается гипотеза о том, что микровариант также передается векторными частицами в водной толще (Paul-Pont с соавт., 2013a).

### **2.2.7. Известные или предполагаемые носители среди диких водных животных**

ДНК микроварианта OsHV-1 была обнаружена во Франции и Ирландии у голубой мидии, *Mytilus edulis*, и *Donax trunculus*. Однако, остается неизвестным, являются ли вышеупомянутые виды двустворчатых моллюсков восприимчивыми, устойчивыми или они могут быть переносчиками.

## **2.3. Информация о болезни**

### **2.3.1. Механизмы передачи**

ДНК OsHV-1 ( $\mu$ Var) обнаруживали методом ПЦР в реальном времени в воде, в которой находились умирающие тихоокеанские устрицы в полевых условиях.

Экспериментальная передача микроварианта описана Schikorski с соавторами (Schikorski с соавт., 2011a; Schikorski с соавт., 2011b). Спат может быть инфицирован при 22°C после внутримышечной инъекции отфильтрованного гомогената естественно инфицированных устриц, а также при совместном содержании инфицированных устриц со здоровыми устрицами. Согласно результатам ПЦР в реальном времени, вирус может попасть в пищеварительную железу и гемолимфатическую систему, после чего вирус распространяется на другие органы.

### **2.3.2. Превалентность**

Регистрируемая смертность и превалентность микровариантов OsHV-1 значительно варьируются в зависимости от объектов и стран и зависят от ряда факторов, включая возраст инфицированного поголовья (Lynch с соавт., 2012; Martenot с соавт., 2011; Peeler с соавт., 2012; Renault с соавт., 2012; Segarra с соавт., 2010).

### **2.3.3. Географическое распространение**

Микроварианты, связанные с массовой гибелью тихоокеанской устрицы, регистрировались в Европе (Франция, Ирландия, Италия, Нидерланды, Испания, Великобритания), Австралии, Новой Зеландии и Корее, но также их обнаруживали в других регионах при отсутствии смертности среди устриц (например, в Японии).

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

Инфекция часто смертельна для спатов и молоди тихоокеанской устрицы. Смерть обычно наступает через неделю после заражения, во время или вскоре после самой высокой годовой температуры воды (Friedman с соавт., 2005; Garcia с соавт., 2011; Renault с соавт., 1994b).

Инфицированные личинки демонстрируют снижение аппетита и активности, смертность может достигать 100% в течение нескольких дней.

### **2.3.5. Экологические факторы**

Вспышки смертности, связанные с обнаружением микровариантов, чаще возникают летом, на основании чего можно предположить наличие связи между температурой морской воды и вирусной инфекцией. Высокая температура морской воды, по видимому, является одним из потенциальных факторов, влияющих на инфицирование OsHV-1. Однако, микроварианты, связанные со смертностью, не возникают постоянно при соответствующей температуре воды. В Австралии

сезонные факторы риска более неопределённые, и влияние температуры отличается от наблюдаемого в Европе (Paul-Pont с соавт., 2013b).

Более того, стрессовые условия, особенно методы выращивания, способствуют распространению вирусной инфекции. Перемещение устриц летом может привести к распространению вируса.

## **2.4. Контроль и профилактика**

### **2.4.1. Вакцинация**

Нет данных, хотя известно, что тихоокеанские устрицы обладают индуцибельным противовирусным иммунным ответом. (Green & Montagnani, 2013; Renault с соавт., 2011).

### **2.4.2. Химиотерапия**

Химиотерапия не проводится.

### **2.4.3. Иммуностимулирование**

Нет данных.

### **2.4.4. Разведение резистентных популяций**

На основе последних данных было показано, что семейства тихоокеанской устрицы в меньшей степени подвержены воздействию OsHV-1, включая микроварианты ( $\mu$ Var) (Degremont, 2011; Sauvage с соавт., 2009).

### **2.4.5. Пополнение популяции резистентными видами**

Во Франции продолжается проект по пополнению поголовья отобранными тихоокеанскими устрицами, и первые результаты показали меньшую смертность, когда эти устрицы были помещены в полевые условия (Degremont с соавт., *com pers.*). В Австралии идет пополнение поголовья сиднейскими устрицами и плоскими устрицами.

### **2.4.6. Блокирующие агенты**

Отсутствуют.

### **2.4.7. Дезинфекция икры и личинок**

Не проводится.

### **2.4.8. Общие практики разведения**

Правила биобезопасности могут успешно применяться на закрытых и контролируемых объектах, таких как инкубаторы и питомники, в целях защиты объекта и прилегающей территории от проникновения вируса.

Таким образом, в условиях искусственного выращивания (инкубатор/питомник моллюсков) вспышки OsHV-1 можно контролировать с помощью карантинных и гигиенических мер, включая инактивацию вируса с помощью таких методов обработки, как фильтрация и ультрафиолетовая очистка воды (от 3 до 30 мДж см<sup>-2</sup>). Однако следует иметь в виду, что снижение вирусной нагрузки зависит от исходного титра и методов инактивации.

Умиравшие и мертвые устрицы должны быть удалены и уничтожены, когда это возможно. Оборудование, используемое в пораженной зоне, не должно направляться в чистую зону и использоваться там без надлежащей очистки и дезинфекции.

### **3. Отбор проб**

#### **3.1. Отбор отдельных особей**

Необходимо отбирать пробы от живых или умирающих особей.

#### **3.2. Хранение образцов**

Для гистологии лучшим консервантом является АФА Дэвидсона, но также могут быть использованы: 10% буферный формалин, 10% формалин с морской водой или другие стандартные гистологические фиксаторы. Для ПЦР анализов пробы должны храниться в этаноле 95-100%, соответствующем реагенте для консервации нуклеиновых кислот или в замороженном виде (-80°C).

#### **3.3. Объединение проб**

Объединение проб может осуществляться при определенных обстоятельствах, однако, необходимо учитывать влияние на чувствительность и превалентность.

#### **3.4. Наиболее подходящие органы или ткани**

Для гистологии используются срезы через висцеральную массу, включающие пищеварительную железу, жабры и мантию. Для ПЦР рекомендуется использовать срез мантийной ткани или комбинированной жаберной и мантийной ткани.

#### **3.5. Пробы/ткани, которые не являются подходящими**

Ткани гонады могут быть ненадежны для ПЦР анализов из-за наличия ингибиторов.

### **4. Методы диагностики**

#### **4.1. Методы полевой диагностики**

##### **4.1.1. Клинические признаки**

Инфицирование микровариантами OsHV-1 может вызвать острое заболевание. Животные умирают в течение нескольких дней после появления клинических признаков болезни. Клиническими признаками могут быть мертвые двустворчатые моллюски или двустворчатые моллюски с раскрытыми раковинами, но такие признаки не являются специфичными для инфицирования микровариантами OsHV-1.

##### **4.1.2. Изменения поведения**

Инфицированные хозяева могут медленно закрывать свои створки при внешнем воздействии, но данные изменения поведения не являются специфичными для инфекции OsHV-1.

#### **4.2. Клинические методы**

##### **4.2.1. Макропатология**

Клиническими признаками могут быть мертвые двустворчатые моллюски или двустворчатые моллюски с раскрытыми раковинами, но такие признаки не являются специфичными для инфицирования микровариантами OsHV-1.

#### **4.2.2. Клиническая химия**

Нет.

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

См. Раздел 4.2.6.

#### **4.2.4. Влажные препараты**

Нет данных.

#### **4.2.5. Мазки**

Нет данных.

#### **4.2.6. Фиксированные срезы**

Наиболее характерными признаками заражения OsHV-1 являются ядерные изменения, включая гипертрофию, нуклеарную маргинацию и пикноз. Ассоциированные с инфекцией поражения у спатов в основном имеют место в соединительных тканях, где в фибробластоподобных клетках наблюдаются увеличенные ядра с перинуклеарным хроматином. Высококонденсированные ядра (признаки апоптоза) также наблюдались в других клетках, интерпретированных как гемоциты. Данные клеточные аномалии не связаны с массовой гемоцитарной инфильтрацией.

Гистологическое исследование животного является недостаточным для выявления герпесвируса. Несмотря на то, что включения Каудри типа А (эозинофильные внутриядерные включения с перинуклеарным хроматином) типичны для многих герпесвирусных инфекций, они не являются диагностическим признаком герпесвирусных инфекций устриц (Arzul с соавт., 2002). Включения Каудри типа А никогда не обнаруживались по результатам гистологических исследований инфицированных тихоокеанских устриц во Франции (Renault с соавт., 1994а; Renault с соавт., 1994b). Кроме того, тельца-внутриядерные включения не были обнаружены, хотя имела место и другая клеточная/ядерная патология, связанная с OsHV-1 у устриц в Мексике (Vasque-Yeomans с соавт., 2010) или США (Калифорния) (Friedman с соавт., 2005).

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

См. Раздел 4.3.1.1.4.

### **4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя**

#### **4.3.1. Методы прямого обнаружения**

##### **4.3.1.1. Микроскопические методы**

###### *4.3.1.1.1. Влажные препараты*

Нет данных.

#### *4.3.1.1.2. Мазки*

Нет данных.

#### *4.3.1.1.3. Фиксированные срезы*

##### *4.3.1.1.3.1. Пробы*

Живые или умирающие устрицы.

##### *4.3.1.1.3.2. Техническая процедура*

Срезы тканей, включающие мантию, пищеварительную железу, жабры и мускул-замыкатель, должны быть зафиксированы в течение 24 часов в 10% формальдегидных фиксаторах, таких как АФА Дэвидсона или другом подходящем фиксаторе с последующей нормальной обработкой в парафиновой среде для гистологии и окрашиванием гематоксилином и эозином. Наблюдения проводятся при увеличении до  $\times 400$ .

##### *4.3.1.1.3.3. Положительные пробы*

Являются рекомендованными и предоставлены лабораторией генетики и патологии, Ifremer, La Tremblade, Франция. Положительными пробами являются срезы тканей от устриц, инфицированных микровариантами.

##### *4.3.1.1.3.4. Уровни валидации*

###### *4.3.1.1.3.4.1. Специфичность и чувствительность*

Независимо от генотипа, специфичность низкая, и чувствительность достаточная для умеренных и высокоинтенсивных инфекций, низкая для низкоинтенсивных инфекций.

###### *4.3.1.1.3.4.2. Золотой стандарт*

Отсутствует.

##### *4.3.1.1.3.5. Интерпретация результатов*

Положительным результатом является появление клеточных патологий в срезах тканей: наличие фибробластоподобных клеток с увеличенными ядрами с перинуклеарным хроматином. Высококонденсированные ядра также обнаруживаются в других клетках, интерпретируемых как гемоциты. Эти клеточные патологические изменения не связаны с обширной гемоцитной инфильтрацией.

У восприимчивых видов-хозяев, в пределах соответствующего диапазона для микровариантов OsHV-1, положительный результат является предполагаемым доказательством только вирусной инфекции и должен быть подтвержден видоспецифичной ПЦР, гибридизацией in-situ (ISH) или секвенированием ДНК.

###### *4.3.1.1.3.6. Наличие коммерческих тестов*

Коммерчески доступные тесты отсутствуют.

#### *4.3.1.1.4. Электронная микроскопия/цитопатология*



Просвечивающая электронная микроскопия может быть использована для подтверждения наличия вирусных частиц у инфицированных животных.

Пробы тканей (содержащие соединительную ткань, например, мантию) для исследования методом электронной микроскопии должны быть зафиксированы с использованием 2,5% (v/v) глутаральдегида в 0,1 М буфере какодилата и постфиксированы в 1% (w/v) тетраоксида осмия, промыты в 0,1 М буфера какодилата (3 × 10 мин), дегидрированы в серии разведений этанола (70%, 1 × 10 мин; 95%, 2 × 15 мин; 100%, 3 × 20 мин), промыты в окиси пропилена (2 × 15 мин), предварительно отфильтрованы в 50% окиси пропилена/50% смолы эпон (1 час), инфильтрованы в 100% смолы эпон (1 час), а затем помещены в смолы эпон.

Репликация вируса происходит в основном в фибробластоподобных клетках по всей соединительной ткани, особенно в мантии, ротовых лопастях, жабрах и пищеварительной железе (Renault с соавт., 1994b; Renault с соавт., 1995; Schikorski с соавт., 2011a). Вирогенез начинается в ядре инфицированных клеток, где наблюдаются капсиды и нуклеокапсиды. Затем вирусные частицы проходят через ядерную мембрану в цитоплазму и на поверхность клетки высвобождаются оболочечные частицы. Внутрядерные и цитоплазматические капсиды представляют собой различные морфологические типы, включая электронно-светлые капсиды, тороидальные капсиды, содержащие сердцевину, и капсиды, содержащие сердцевину, в форме параллелепипеда.

#### **4.3.1.2. Изоляция и идентификация возбудителя**

##### *4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственная среда*

Попытки культивирования вируса в клеточных линиях, как позвоночных, так и беспозвоночных, а также в первичной клеточной линии устриц не были успешными.

##### *4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигенов на основе антител*

Разработаны специфические антитела (Arzul с соавт., 2002). Однако в настоящее время они недоступны для диагностических целей.

##### *4.3.1.2.3. Молекулярные методы*

В настоящее время существует ряд различных методов ПЦР для обнаружения OsHV-1. Эти методы включают как конвенциональную/обычную ПЦР, так и ПЦР в реальном времени (Martenot с соавт., 2010; Pepin с соавт., 2008; Renault с соавт., 2000).

*Отбираемые образцы:* Живые или умирающие моллюски. Личинки (100-200 мг), спаты (100-200 мг) или кусочки ткани размером 2-3 мм<sup>2</sup> вырезаются в асептических условиях из мантии, помещаются в пробирки объемом 1,5 мл, хранятся в спирте 95% или в замороженном состоянии (-80°C). Посуда для препарирования должна быть фламбирована перед использованием новых проб в целях предотвращения перекрестной контаминации.

##### *4.3.1.2.3.1. Пробы для отбора*

Живые или умирающие моллюски. Личинки (100-200 мг), спаты (100-200 мг) или кусочки ткани размером 2-3 мм<sup>2</sup> вырезаются в асептических условиях из мантии, помещаются в пробирки объемом 1,5 мл, хранятся в спирте 95% или в замороженном состоянии (-80°C). Посуда для препарирования должна быть фламбирована перед использованием новых проб в целях предотвращения перекрестной контаминации.

#### *4.3.1.2.3.1. Конвенциональная ПЦР*

Исследования методом конвенциональной ПЦР успешно используются для обнаружения ДНК OsHV-1 у двустворчатых моллюсков. Были разработаны различные пары праймеров (см. обзор Batista с соавт., 2007).

Две пары праймеров (A3/A4 и A5/A6) были разработаны и использованы для обнаружения вирусной ДНК у личинки и спата тихоокеанской устрицы с помощью вложенной ПЦР (Renault с соавт., 2000). Специфичность данных пар праймеров была оценена с помощью ДНК тихоокеанских устриц, а также ДНК герпесвирусов позвоночных; 500 фг ДНК вируса, экстрагированные из очищенных частиц, обнаруживались регулярно. Одноэтапный анализ методом ПЦР с помощью A3/A4 пары праймеров позволил не только амплифицировать ДНК OsHV-1, но и обнаружить вариант данного вируса у личинок тихоокеанских устриц и японского морского петушка (*R. philippinarum*) (Arzul с соавт., 2002).

Затем были разработаны другие праймеры, в том числе C2/C6. При использовании комбинации пар праймеров A3/A4 и A5/A6 наблюдался более низкий уровень амплификации в ПЦР по сравнению с C2/C6 (21,4% и 32,4% соответственно) при анализе одних и тех же проб личинок (Renault & Arzul, 2001). Пара праймеров C2/C6 систематически позволяла обнаружить 1 фг очищенной вирусной ДНК (Renault с соавт., 2004). Регистрировался предел обнаружения 10 фг очищенной вирусной ДНК для обеих пар праймеров C13/C5 и Gr3/Gr4 (Vigneron с соавт., 2004). С помощью пар праймеров C9/C10 и OsHVDPFor/OHVDPRev удалось обнаружить всего 1 пг и 10 пг соответственно для видимой амплификации конкретного продукта (Webb с соавт., 2007).

Несмотря на то, что специфичность ПЦР была оценена для некоторых пар праймеров, используемых для обнаружения ДНК вируса (см. выше), оценка специфичности не была проведена для всех разработанных пар праймеров. Более того, условия амплификации, которые были использованы при исследовании методом ПЦР с использованием различных пар праймеров, были основаны на условиях, оптимизированных для A3/A4 и A5/A6 (Renault с соавт., 2000). Экспериментальная схема процедуры, используемая для обнаружения ДНК OsHV-1 методом конвенциональной ПЦР, была предложена Batista с соавт., 2007.

#### *4.3.1.2.3.3. ПЦР с SYBR® Green<sup>2</sup>, специфичная для OsHV-1 (Pepin с соавт., 2008)*

---

<sup>2</sup> Упоминание конкретных коммерческих продуктов в качестве примеров не означает, что они были утверждены МЭБ. Данная оговорка относится ко всем коммерческим продуктам, упоминаемым в настоящем Водном Руководстве.

Пятьдесят мг ткани личинки/спата/мантии измельчаются в 50 мкл бидистиллированной воды с помощью одноразового плунжера. Измельченные ткани разводят в шесть раз и очищают при 10 000 g в течение 5 минут. Сто мкл восстановленного супернатанта обрабатывается с помощью коммерческого диагностического набора для выделения ДНК из тканей (QIAgen - Qiamp tissue mini kit®) в соответствии с протоколом производителя. Окончательное элюирование ДНК осуществляется с помощью 100 мкл TE буфера. ДНК хранится при температуре -20°C. Перед проведением ПЦР концентрация ДНК может быть измерена путем абсорбции при 260 нм. В соответствии с общей концентрацией ДНК, измеренной в образцах, их разбавляют, чтобы получить 20 нг суммарной ДНК на одну реакцию ПЦР.

Можно использовать три набора праймеров, нацеленных на три региона вирусной ДНК: (ORF4, ORF88 и ORF99). Пары праймеров B4/B3 (Arzul с соавт., 2001; ORF99, кодирующий белок В1R) и C9/C10 (Barbosa-Solomieu с соавт., 2004; ORF4) были ранее разработаны для одиночной ПЦР, тогда как пара праймеров Gp4/Gp7 (ORF88, кодирующая мембранный белок класса I) может быть использована для количественной ПЦР. С помощью пар праймеров B4/B3, C9/C10 и Gp4/Gp7 можно получить ПЦР-продукты 207, 197 и 85 п.о. соответственно.

B4: 5'-ACT-GGG-ATC-CGA-CTG-ACA-AC-3'

B3: 5'-GTG-GAG-GTG-GCT-GTT-GAA-AT-3'

C9: 5'-GAG-GGA-AAT-TTG-CGA-GAG-AA-3'

C10: 5'-ATC-ACC-GGC-AGA-CGT-AGG-3'

Gp4: 5'-GGC-GTC-CAA-ACT-CGA-TTA-AA-3'

Gp7: 5'-TTA-CAC-CTT-TGC-CGG-TGA-AT-3'

С помощью пары праймеров C9/C10 можно получить надежные параметры по количественной ПЦР с ДНК OsHV-1, также пары праймеров B3/B4, которые показывают близкие параметры с чуть меньшим значением E (96,3%). Пара праймеров Gp4/Gp7 менее эффективна (E = 91,3%) и менее чувствительна ( $\geq 50$  копий мкл<sup>-1</sup>). Наиболее чувствительной и эффективной является пара праймеров C9/C10.

Дополнительная пара праймеров DPFor/DPrev также может быть использована для производства продукта a197 п.о. (ORF100, ДНК-полимераза).

DPFor: 5'-ATT-GAT-GAT-GTG-GAT-AAT-CTG-TG-3'

DPrev: 5'-GGT-AAA-TAC-CAT-TGG-TCT-TGT-TCC-3'

Для более точного определения вирусных генотипов важно направленное воздействие на различные сегменты ДНК OsHV-1. Хотя ORF4 является интересным вариантом для описания разнообразия, так как в этой области уже сообщалось о вирусном полиморфизме, ORF100 (ДНК-полимераза) является менее полиморфным.

Все амплификационные реакции проводятся в общем объеме 25 мкл в 96-микролуночных планшетах. Каждая лунка (25 мкл) содержит 5 мкл

экстрагированной ДНК (образец) или ДНК OsHV-1 (положительный контроль), 12.5 мкл Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix или FullVelocity® Master Mix (Stratagene), 2.5 мкл каждого разбавленного праймера (конечная концентрация 200 нмоль) и 2,5 мкл дистиллированной воды. Условия термического цикла: 1 цикл преинкубации при 95°C в течение 10 минут; 40 циклов амплификации при 95°C в течение 30 секунд (15 секунд с FullVelocity® Master Mix), 60°C в течение 45 секунд (30 секунд с FullVelocity® Master Mix) и 72°C в течение 45 секунд с Brilliant® Master Mix; анализ кривой температуры плавления при 95°C в течение 60 секунд, 60°C в течение 30 секунд и 95°C в течение 30 секунд. Анализ ПЦР в реальном времени должен быть выполнен в трех повторностях с разбавлением проб 5 мкл в качестве матричной ДНК или контроля вирусной ДНК.

Абсолютное количественное определение копий ДНК OsHV-1 (копии мкл<sup>-1</sup>) осуществляется путем сравнения значений СТ (пороговый цикл), полученных с помощью стандартной кривой и программного обеспечения Thermocycler. Каждый эксперимент включает положительный контроль ДНК (геномная ДНК OsHV-1 для абсолютного количественного определения) и пустую пробу (NTC, контроль без матрицы, состоящий из деионизированной стерильной воды). Эффективность ПЦР (*E*) рассчитывается по стандартным кривым как процент молекул-шаблонов, который удваивается во время каждого цикла ( $[10^{-1/\text{наклон}} - 1] \times 100$ ), с нижеследующими требованиями: попадание в диапазон 95-105%, коэффициент детерминации (*R*<sup>2</sup>) - >0,98. Для обнаружения неспецифических продуктов после каждого цикла амплификации проводится процедура диссоциации (кривая плавления). Регистрируется температура, при которой появляется SYBR® Green флуоресценция в результате диссоциации двухцепочечного ампликона.

Что касается чувствительности теста, считается, что с его помощью можно систематически обнаруживать 4 копии ДНК мкл<sup>-1</sup>. Динамический диапазон для количественной ПЦР был оценен по нескольким анализам стандартных кривых, а линейная взаимосвязь была получена между количеством копий вводимой матричной вирусной ДНК и значением СТ для более 10 разбавлений 5 log. Можно было проводить количественную оценку копий ДНК OsHV-1 как минимум от 10 до  $5 \times 10^6$  копий мкл<sup>-1</sup>.

#### 4.3.1.2.3.4. *OsHV-1* специфичная TaqMan® ПЦР (Martenot с соавт., 2010)

Мишенью был В-регион генома OsHV-1, кодирующий предполагаемый ингибитор апоптоза (Arzul с соавт., 2001). Пары праймеров и два зонда TaqMan® были разработаны для одновременного обнаружения гена-мишени и внутреннего контроля (IC). IC представлял собой синтезированную последовательность, содержащую на каждом конце прямые OsHV1BF (5'-GTC-GCA-TCT-TTG-GAT-TTA-ACA-A-3') и обратные В4 (5'-ACT-GGG-ATCCGA-CTG-ACA-AC-3') праймеры. Праймер В4, используемый для ПЦР TaqMan, идентичен праймеру, упомянутому в публикации Perin с соавт., 2008.

Амплификация региона-мишени и IC осуществлялась с помощью праймеров OsHV1BF и В4. Зонды В (5'-TGC-CCC-TGT-CAT-CTT-GAG-GTA-TAG-ACA-

АТС-3') и IC (5'-АТС-GGGGG-GGT-TTT-TTT-АТС-G-3') были помечены на 5' конце флуоресцентным репортерным красителем - ТхR и FAM соответственно, а на 3' конце - соответствующим гасителем (ВНQI или ВНQII).

Реакционная смесь содержала 12,5 мкл премикса ExTaq® 2× Takara® (Lonza, Verviers, Бельгия), 0,5 мкл каждого праймера (20 мкМ), 0,5 мкл зондов TaqMan® (10 мкМ) и 9 мкл воды. К 23 мкл реакционной смеси добавлены два образца ДНК. Амплификацию проводили в два этапа при следующих условиях: 1 цикл при 95°C в течение 10 секунд, затем 40 циклов амплификации при 95°C в течение 5 секунд, 60°C в течение 20 секунд. Количественное определение вируса проводилось путем сравнения со стандартными значениями кривых.

Впервые был разработан протокол определения количества OsHV-1 у тихоокеанских устриц на основе ПЦР в реальном времени с использованием SYBR® Green (Perin с соавт., 2008). Martenot с соавторами (Martenot с соавт., 2010) разработали альтернативный протокол на основе химического анализа TaqMan®. Пределы количественного определения составляли 1000 и 18 UG мг<sup>-1</sup> тканей для метода на основе SYBR® Green и TaqMan®, соответственно, и последний протокол имеет предел обнаружения 6 UG мг<sup>-1</sup> тканей. При сравнении двух протоколов с образцами ДНК, полученными от 210 спатов индекс каппа (0,41) показал умеренное совпадение между протоколами, согласно измерениям Ландиса и Коха. Все пробы, которые были положительными по референтному протоколу, также были положительными по альтернативному протоколу. Из 76 проб, которые были отрицательными по референтному протоколу, 49 были положительными по альтернативному протоколу. Хотя эти результаты могут свидетельствовать о том, что альтернативный протокол может быть более чувствительным, чем референтный протокол, необходима официальная валидация. В настоящее время разрабатывается и проверяется протокол на основе химического анализа TaqMan® для обнаружения образцов вирусов или вариантов, представляющих делецию, наблюдаемую в микросателлите, расположенном выше области ORF4 для микровариантов (Perin с соавт., pers. comm.).

#### 4.3.1.2.3.5. Специфичная *in-situ* гибридизация OsHV-1

В описываемой здесь процедуре *in-situ* гибридизации (ISH) используется ДНК-зонд, меченный дигоксигенином (DIG), для обнаружения OsHV-1 в формалин-фиксированной парафиновоосажденной ткани (Arzul с соавт., 2002; Lipart & Renault, 2002). С помощью данного анализа можно выявить видовые варианты и микроварианты, но невозможно провести идентификацию различных генотипов.

Срезы ткани, включающие мантию, пищеварительную железу, жабры и мускул-замыкатель, должны быть зафиксированы в течение 24 часов в АФА Дэвидсона или другом подходящем фиксаторе и обработаны с использованием стандартных процедур гистологического исследования.

Толстые срезы ткани на предметных стеклах Silane-prep™ депарафинируют в ксилене (2 × 5 минут), обрабатывают абсолютным этанолом (2 × 5 минут) и высушивают на воздухе при комнатной температуре (15 минут). Затем срезы

пермебезализируют с протеиназой К (100 мкг мл<sup>-1</sup> в дистиллированной воде) в течение 30 минут при 37°C во влажной камере. Протеолиз останавливают одной 3-минутной промывкой в 0,1 М Tris, 0,1 М NaCl буфере (pH 7,5) при комнатной температуре. Срезы дегидрируют в 95° этаноле в течение 1 минуты, абсолютном этаноле в течение 1 минуты и высушивают на воздухе (15 минут).

Этап прегибридизации проводится с помощью буфера прегибридизации (50% формамид, 10% декстран сульфат, 4 × SSC [0,06 М Na<sub>3</sub>citrate, 0,6 NaCl, pH 7], 250 мкг мл<sup>-1</sup> дрожжевой tPHK и 10% Denhart) в течение 30 минут при 42°C во влажной камере. Буферный раствор прегибридизации заменяется 100 мкл буферного раствора для гибридизации, содержащим 50 мкл зонда, меченного дигоксигенином (5 нг мкл<sup>-1</sup>) и 50 мкл буфера для гибридизации (50% формамид, 10% декстран сульфат, 4× SSC, 250 мкг мл<sup>-1</sup> дрожжевой tPHK и 10% Denhart) в течение 30 минут при 42°C во влажной камере. Микропрепараты покрывают пластиковыми покровными стеклами (Polylabo, Франция). Зонды, меченные DIG, синтезируют из геномной ДНК OsHV-1 (100 пг на реакцию) путем инкорпорации дигоксигенина-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Германия) в ходе обычной ПЦР. Используется пара праймеров C1/C6:

C1: 5'-TTC-CCC-TCG-AGG-TAG-CTT-TT-3'

C6: 5'-GTG-CAC-GGC-TTA-CCA-TTT-TT-3'

Денатуризация ДНК-мишени и зонда, меченного дигоксигенином, проводится при 95°C в течение 5 минут, гибридизация осуществляется в ночное время при 42°C во влажной камере.

После гибридизации покровные стекла снимают и микропрепараты промывают в течение 10 минут в 1 × SSC (0,2% BSA) при 42°C. Специально связанный зонд был обнаружен с помощью мышинных антител IgG, конъюгированных с пероксидазой, дигоксигенина (Boehringer Mannheim, Германия), разбавленного 1:250 в 1 × ФБР (1 час при комнатной температуре). Несвязанные конъюгированные с пероксидазой антитела были удалены с помощью шестикратной промывки 1 × ФБР (5 минут). Тетрагидрохлорид диаминобензидина разводили в 1× ФБР (0,7 мг мл<sup>-1</sup>). Цветной раствор добавляли в срезы тканей (500 мкл) и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 20 минут. Реакцию останавливали двумя промывками 1× ФБР. Микропрепараты окрашивали в течение 20 секунд с помощью Unna Blue (RAL, Франция), затем дегидрировали этанолом и устанавливали в Eukitt с помощью ксилола.

Специфическое внутриклеточное окрашивание в темно-коричневый цвет свидетельствует о наличии вирусной ДНК.

Тридцать взрослых тихоокеанских устриц были исследованы с использованием трех различных методов: ПЦР, ISH (гибридизация in situ) и иммунохимии с целью обнаружения OsHV-1 у бессимптомных особей (Arzul с соавт., 2002). ПЦР и ISH позволили выявить ДНК герпесвируса устриц у 93,3% и 86,6% исследованных устриц, соответственно, поликлональные антитела позволили выявить вирусные белки у 76,6% исследованных взрослых устриц.

#### 4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

OsHV-1 может быть получен и очищен от инфицированных животных с помощью ранее разработанного метода (Le Deuff & Renault, 1999).

#### 4.3.2. Серологические методы

Нет данных.

### 5. Рейтинг тестов по цели использования

Если перинуклеарный хроматин наблюдается с помощью гистологических исследований, то необходимо как минимум провести электронную микроскопию для идентификации любых присутствующих вирусоподобных частиц и определения их расположения внутри клеток. Вирусы, наблюдаемые с помощью ЭМ, следует описывать как, например, герпесвирусные, пока не будут проведены исследования для дальнейшей идентификации вируса. Поскольку различные герпесвирусы морфологически схожи, вирус следует описывать как OsHV-1 только в том случае, если он был идентифицирован как таковой с помощью OsHV-1 специфичных праймеров или зондов.

Для OsHV-1 демонстрация наличия внутриклеточных структурных и неструктурных вирусных белков, специфичной иРНК OsHV-1 и вирионов является доказательством репликации, однако, обнаружение вирусной ДНК только с помощью ПЦР не является таким доказательством.

В качестве примера методы, доступные в настоящее время для целевого надзора и диагностики, перечислены в таблице 5.1. Обозначения, используемые в таблице: a = метод является рекомендуемым по причинам доступности, полезности, диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод применяется в некоторых случаях, но стоимость, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение; и d = метод в настоящее время не рекомендуется для этой цели.

**Таблица 5.1. Методы надзора и диагностики**

	Целевое наблюдение			Предполагаемый диагноз			Подтверждающий диагноз		
	Личинки	Молодь	Взрослые особи	Личинки	Молодь	Взрослые особи	Личинки	Молодь	Взрослые особи
<b>Макропатология</b>	d	d	d	d	d	d	d	d	d
<b>Биопробы</b>	d	d	d	d	d	d	c	c	d
<b>Гистопатология</b>	d	d	d	d	d	d	d	d	d
<b>Просвечивающая</b>	d	d	d	d	d	d	b	b	b

<b>ЭМ</b>									
<b>Исследования на основе антител</b>	d	d	d	d	d	d	d	d	d
<b>ДНК-зонды <i>in-situ</i></b>	c	c	c	c	c	c	b	b	b
<b>ПЦР</b>	a	a	a	a	a	a	b	b	b
<b>Количественная ПЦР</b>	a	a	a	a	a	a	b	b	b
<b>Секвенирование</b>	d	d	d	d	d	d	a	a	a
ЭМ = электронная микроскопия; ПЦР – полимеразная цепная реакция; количественная ПЦР = ПЦР в реальном времени									

## **6. Тест(ы), рекомендуемый(ые) для целевого надзора с целью декларирования свободы от OsHV-1**

Рекомендуются ПЦР и ПЦР в реальном времени.

## **7. Критерии подтверждающей диагностики**

### **7.1. Определение случая с подозрением на болезнь**

Случаем с подозрением на инфицирование микровариантами является случай смерти среди восприимчивых видов, связанный с обнаружением OsHV-1 методом ПЦР или количественной ПЦР. Наличие инфекции может не сопровождаться смертностью.

### **7.2. Определение случая с подтвержденным наличием болезни**

Случай инфицирования микровариантами герпесвируса устриц 1 подтверждается при обнаружении с помощью гистологических исследований, просвечивающей электронной микроскопии, или после исследования методом ПЦР проводится секвенирование с получением последовательностей, соответствующих определению микровариантов.

## **8. Список литературы**

ARZUL I., GARCIA C., JOLY J.-P., LUPO C., TRAVERS M.-A., FRANCOIS C. & CHOLLET B. (2013). Report of the Annual Meeting and 9th Combined Technical Workshop of the National Reference Laboratories for Mollusc Diseases. Rochefort and La Tremblade, 18–21 March 2013.

ARZUL I., RENAULT T., LIPART C. & DAVISON A.J. (2001). Evidence for inter species transmission of oyster herpesvirus in marines bivalves. J. Gen. Virol., 82, 865–870.



- ARZUL I., RENAULT T., THEBAULT A. & GERARD A. (2002). Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res.*, 84, 151–160.
- BARBOSA-SOLOMIEU V., DEGREMONT L., VAZQUEZ-JUAREZ R., ASCENCIO-VALLE F., BOUDRY P. & RENAULT T. (2005). Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) detection among three successive generations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Virus Res.*, 107, 47–56.
- BARBOSA-SOLOMIEU V., MIOSSEC L., VAZQUEZ-JUAREZ R., ASCENCIO-VALLE F. & RENAULT T. (2004). Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and in situ hybridisation. *J. Virol. Methods*, 119, 65–72.
- BATISTA F.M., ARZUL I., PEPIN J.F., RUANO F., FRIEDMAN C.S., BOUDRY P. & RENAULT T. (2007). Detection of ostreid herpesvirus-1 DNA in bivalve molluscs: a critical review. *J. Virol. Methods*, 139 (1), 1–11.
- DAVISON A.J., TRUS B.L., CHENG N., STEVEN A.C., WATSON M.S., CUNNINGHAM C., LE DEUFF R.M. & RENAULT T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.*, 86, 41–53.
- DEGREMONT L. (2011). Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture*, 317 (1–4), 94–98.
- DUNDON W.G., ARZUL I., OMNES E., ROBERT M., MAGNABOSCO C., ZAMBON M., GENNARI L., TOFFAN A., TERREGINO C., CAPUA I. & ARCANGELI G. (2011). Detection of Type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1 mu var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. *Aquaculture*, 314, (1–4), 49–52.
- FRIEDMAN C.S., ESTES R.M., STOKES N.A., BURGE C.A., HARGOVE J.S., BARBER B.J., ELSTON R.A., BURRESON E.M. & REECE K.S. (2005). Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis. Aquat. Org.*, 63 (1), 33–41.
- GARCIA C., THEBAULT A., DEGREMONT L., ARZUL I., MIOSSEC L., ROBERT M., CHOLLET B., FRANÇOIS C., JOLY J.-P., FERRAND S., KERDUDOU N. & RENAULT T. (2011). OsHV-1 detection and relationship with *C. gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vet. Res.*, 42, 73–84.
- GREEN T.J. & MONTAGNANI C. (2013). Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with ostreid herpesvirus (OsHV-1 mvar). *Fish & Shellfish Immunol.*, 35 (2), 382–388.
- HWANG J.Y., PARK J.J., YU H.J., HUR Y.B., ARZUL I., COURALEAU Y. & PARK M.A. (2013). Ostreid herpesvirus 1 infection in farmed Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Korea. *J. Fish Dis.*, 36 (11), 969–972.
- JENKINS C., HICK P., GABOR M., SPIERS Z., FELL S.A., GU X.N., READ A., GO J., DOVE M., O'CONNOR W., KIRKLAND P. D. & FRANCES J. (2013).

- Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 mu-var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, 105, 109–126.
- LE DEUFF R.M., NICOLAS J.L., RENAULT T. & COCHENNEC N. (1994). Experimental transmission of a herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 14, 69–72.
- 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.
- LE DEUFF R.M., RENAULT T. & GERARD A. (1996). Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*, 24, 149–157.
- LIPART C. & RENAULT T. (2002). Herpes-like virus detection in *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *J. Virol. Methods*, 101, 1–10.
- LYNCH S.A., CARLSON J., REILLY A.O., COTTER E. & CULLOTY S.C. (2012). A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitol.*, 139, 1526–1532.
- MARTENOT C., ODEN E., TRAVAILLE E., MALAS J.P. & HOUSSIN M. (2010). Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Virol. Methods*, 70 (1–2), 86–99.
- MARTENOT C., ODEN E., TRAVAILLE E., MALAS J.P. & HOUSSIN M. (2011). Detection of different variants of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Virus Res.*, 160, 25–31.
- MOSS J.A., BURRESON E.M., CORDES J.F., DUNGAN C.F., BROWN G.D., WANG A., WU X. & REECE K.S. (2007). Pathogens in *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction to Chesapeake Bay. *Dis. Aquat. Org.*, 77, 207–223.
- ODEN E., MARTENOT C., TRAVAILLÉ E., MALAS J.P. & HOUSSIN M. (2011). Quantification of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) in *Crassostrea gigas* by real-time PCR: Determination of a viral load threshold to prevent summer mortalities. *Aquaculture*, 317, 27–31.
- PAUL-PONT I., DHAND N.K. & WHITTINGTON R.J. (2013a). Influence of husbandry practices on OsHV-1 associated mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 412–413, 202–214.
- PAUL-PONT I., DHAND N.K. & WHITTINGTON R.J. (2013b). Spatial distribution of mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: reflection on mechanisms of OsHV-1  $\mu$ Var transmission. *Dis. Aquat. Org.*, 105, 127–138.
- PEELER J.E., REESE R.A., CHESLETT D.L., GEOGHEGAN F., POWER A. & TRUSH M.A. (2012). Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid herpesvirus-1  $\mu$ Var in the Republic of Ireland in 2009. *Preventive Vet. Med.*, 105, 136–143.

- PEPIN J.F., RIOU A. & RENAULT T. (2008). Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J. Virol. Methods*, 149, 269–276.
- RENAULT T. & ARZUL I. (2001). Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. *J. Fish Dis.*, 24 (3), 161.
- RENAULT T., ARZUL I. & LIPART C. (2004). Development and use of an internal standard for oyster herpesvirus 1 detection by PCR. *J. Virol. Method*, 121, 17–23.
- RENAULT T., COCHENNEC N., LE DEUFF R.M. & CHOLLET B. (1994a). Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 14, 64–66.
- RENAULT T., FAURY N., BARBOSA-SOLOMIEU V. & MOREAU K. (2011). Suppression subtractive hybridization (SSH) and real-time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with ostreid herpesvirus 1. *Dev. Comp. Immunol.*, 35, 725–735.
- RENAULT T., LE DEUFF R.M., COCHENNEC N., CHOLLET B. & MAFFART P. (1995). Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: A comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet. Res.*, 26, 539–543.
- RENAULT T., LE DEUFF R.M., COCHENNEC N. & MAFFART P. (1994b). Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France – comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 145, 735–742.
- RENAULT T., LE DEUFF R.M., LIPART C. & DELSERT C. (2000). Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Methods*, 88, 41–50.
- RENAULT T., MOREAU P., FAURY N., PEPIN J.-F., SEGARRA A. & WEBB S. (2012). Analysis of clinical ostreidherpesvirus 1 (*Malacoherpesviridae*) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *J. Virol.*, 86 (10), 5942–5947.
- SAUVAGE C., PEPIN J.F., LAPEGUE S., BOUDRY P. & RENAULT T. (2009). Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: difference in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res.*, 142, 181–187.
- SCHIKORSKI D., FAURY N., PEPIN J.F., SAULNIER D., TOURBIEZ D. & RENAULT T. (2011a). Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res.*, 155 (1), 28–34.
- SCHIKORSKI D., RENAULT T., SAULNIER D., FAURY N., MOREAU P. & PEPIN J.F. (2011b). Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet. Res.*, 42, 1–13.
- SEGARRA A., PEPIN J.F., ARZUL I., MORGA B., FAURY N. & RENAULT T. (2010). Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype

associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.*, 153, 92–95.

SHIMAHARA Y., KURITA J., KIRYU I., NISHIOKA T., YUASA K., KAWANA M., KAMAISHI T. & OSEKO N. (2012). Surveillance of type 1 ostreid herpesvirus (OsHV-1) variants in Japan. *Fish Pathol.*, 47 (4), 129–136.

VASQUE-YEOMANS R., GARCIA-ORTEGA M. & CACERES-MARTINEZ J. (2010). Gill erosion and herpesvirus in *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, Mexico. *Dis. Aquat. Org.*, 89, 137–144.

VIGNERON V., SOLLIEC G., MONTANIE H. & RENAULT T. (2004). Detection of ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) DNA in seawater by PCR: influence of water parameters in bioassays. *Dis. Aquat. Org.*, 62, 35–44.

WALLIS C. & MELNICK J. (1965). Thermostabilization and thermosensitization of herpesvirus. *J. Bacteriol.*, 90, 1632–1637.

WEBB S.C., FIDLER A. & RENAULT T. (2007). Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture*, 272, 126–139.

\*

\* \*

**NB:** В настоящее время не существует Референтной лаборатории МЭБ по микровариантам герпесвирусной инфекции устриц 1

(см. Таблицу в конце настоящего Руководства или веб-сайт МЭБ, где публикуется обновляемый список:

<http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).