

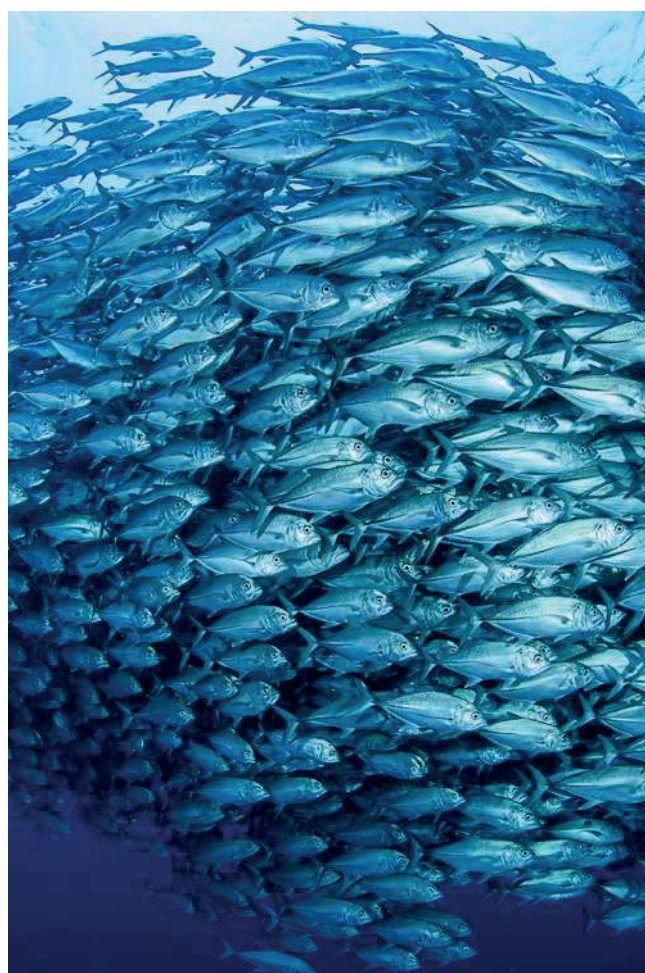


WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH

Protecting animals, preserving our future

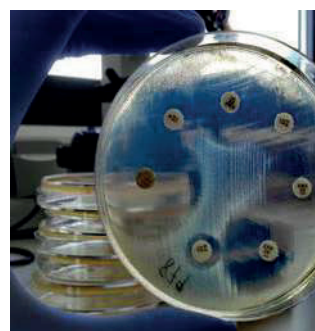
Руководство

по диагностическим тестам для водных животных



Седьмое издание

2016



Руководство по диагностическим тестам для водных животных
(2019)

Неофициальный перевод

Содержание

	Введение
	Предисловие
	Сокращения
ЧАСТЬ 1.	ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ
РАЗДЕЛ 1.1.	ВВОДНЫЕ ГЛАВЫ
Глава 1.1.1.	Управление качеством в ветеринарных испытательных лабораториях
Глава 1.1.2.	Принципы и методы валидации диагностических исследований на наличие инфекционных заболеваний
ЧАСТЬ 2.	РЕКОМЕНДАЦИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ОТНОШЕНИИ ОТДЕЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ
	Общая информация
РАЗДЕЛ 2.1.	БОЛЕЗНИ АМФИБИЙ
Глава 2.1.0.	Общее введение
Глава 2.1.1.	Инфекция <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
Глава 2.1.2.	Инфекция ранавирусом
РАЗДЕЛ 2.2.	БОЛЕЗНИ РАКООБРАЗНЫХ
Глава 2.2.0.	Общая информация
Глава 2.2.1.	Острый гепатопанкреатический некроз
Глава 2.2.2.	Инфекция <i>Aphanomyces astaci</i> (чума раков)
Глава 2.2.3.	Инфекция <i>Hepatobacter penaei</i> (некротизирующий гепатопанкреатит)
Глава 2.2.4.	Инфицирование инфекционным вирусом гиподермального и гематопозитического некроза
Глава 2.2.5.	Инфекция вирусом инфекционного мионекроза
Глава 2.2.6.	Инфицирование нодавирусом <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (болезнь белого хвоста)
Глава 2.2.7.	Инфекция вирусом синдрома Таура
Глава 2.2.8.	Инфекция вирусом, вызывающим болезнь белых пятен
Глава 2.2.9.	Инфицирование вирусом синдрома желтой головы генотипа 1
Глава 2.2.10.	Сферический бакуловироз (бакуловироз типа <i>Penaeus monodon</i>)
Глава 2.2.11.	Тетраэдрический бакуловироз (<i>Baculovirus penaei</i>)
РАЗДЕЛ 2.3.	БОЛЕЗНИ РЫБ
Глава 2.3.0.	Общая информация

Глава 2.3.1.	Инфекция вирусом эпизоотического гематопозитического некроза
Глава 2.3.2.	Инфекция <i>Aphanomyces invadans</i> (эпизоотический язвенный синдром)
Глава 2.3.3.	Инфекция <i>Gyrodactylus salaris</i>
Глава 2.3.4.	Инфекция вирусом инфекционного некроза гемопоэтической ткани
Глава 2.3.5.	Инфицирование HPR-делетированным или HPR0 вариантами вируса инфекционной анемии лососевых
Глава 2.3.6.	Инфекция альфавирусом лососевых
Глава 2.3.7.	Инфекция герпесвирусом карпа кои
Глава 2.3.8.	Иридовирусная болезнь красного морского карася
Глава 2.3.9.	Весенняя виремия карпов
Глава 2.3.10.	Вирусная геморрагическая септицемия
Глава 2.3.11.	Болезнь, вызываемая вирусом <i>Oncorhynchus masou</i>
Глава 2.3.12.	Вирусная энцефалопатия и ретинопатия
РАЗДЕЛ 2.4.	БОЛЕЗНИ МОЛЛЮСКОВ
Глава.4.0.	Общая информация
Глава 2.4.1.	Заражение герпесвирусом морского ушка
Глава 2.4.2.	Инфекция <i>Bonamia exitiosa</i>
Глава 2.4.3.	Инфекция <i>Bonamia ostreae</i>
Глава 2.4.4.	Инфекция <i>Marteilia refringens</i>
Глава 2.4.5.	Инфицирование микровариантами герпесвируса устриц 1
Глава 2.4.6.	Инфекция <i>Perkinsus marinus</i>
Глава 2.4.7.	Инфекция <i>Perkinsus olseni</i>
Глава 2.4.8.	Инфекция <i>Xenohaliotis californiensis</i>
Глава 2.4.9.	Инфекция <i>Mikrocytos mackini</i>
ЧАСТЬ 3.	ЭКСПЕРТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЭБ
	Референтные лаборатории и эксперты по болезням водных животных
	Список центров по сотрудничеству по болезням водных животных

ВВЕДЕНИЕ

Достоверные результаты лабораторных исследований необходимы Службам охраны здоровья водных животных для реализации целого ряда программ по диагностике, надзору и торговле. Настоящее *Руководство по диагностическим тестам для водных животных (Водное Руководство)* используется Службами охраны здоровья водных животных в целях проведения эффективных лабораторных исследований на наличие патогенных возбудителей, которые могут негативно воздействовать на водных животных.

В Разделе 1 *Водного Руководства* приводятся рекомендации относительно общих положений, необходимых для проведения эффективных лабораторных исследований. В Главе 1.1 излагаются важные вопросы и соображения, которые лаборатория должна учитывать при разработке и поддержании своей системы управления качеством, независимо от того, была ли она официально аккредитована или нет. Рекомендации, содержащиеся в данной главе, охватывают технические, управленческие и оперативные элементы тестирования, а также интерпретацию результатов испытаний. Глава 1.2 содержит рекомендации по принципам и методам валидации диагностических анализов. Валидация необходима для того, чтобы убедиться, что анализ соответствует поставленной цели, например, подтверждение статуса свободы от болезни, подтверждение диагноза животных с клиническими признаками или оценка паттерна инфекции в популяции. В главе представлен поэтапный подход к валидации анализов, включающий в себя руководство по аналитическим характеристикам, диагностическим характеристикам, воспроизводимости, проведению анализа и постоянному мониторингу.

Раздел 2 *Водного Руководства* содержит рекомендации по диагностике конкретных болезней амфибий, ракообразных, рыб и моллюсков. Главы по конкретным болезням Раздела 2 охватывают все болезни водных животных, указанные в списке МЭБ. В *Руководстве* также включены дополнительные главы по болезням, которые больше не являются списочными болезнями МЭБ. Эти главы сохранены в *Водном Руководстве* по просьбе стран-членов МЭБ в связи с их важностью для торговли или продуктивности. В каждой главе, составленной согласно формату, по конкретной болезни представлена информация о болезни (информация о возбудителе, информация о хозяине, паттерн болезни, контроль и профилактика), отборе проб, методах диагностики, рейтингах рекомендуемых тестов в соответствии с целью их использования, рекомендуемых тестах для надзора с целью декларирования свободы, а также определения подозрительных и подтвержденных случаев.

Общие положения и рекомендации по конкретным болезням *Водного Руководства* в совокупности содержат техническую информацию для осуществления стандартов, содержащихся в *Кодексе МЭБ по охране здоровья водных животных (Водный Кодекс)*. Данные стандарты включают в себя обязательства стран-членов сообщать о возникновении перечисленных болезней; требования подтверждать статус свободы страны, зоны или компартамента; требования реагировать на возникновение заболевания; и требования

восстанавливать статус свободы после вспышки. Рекомендации *Водного Руководства* и *Водного Кодекса* призваны дополнять друг друга, и оба документа следует использовать вместе при разработке или осуществлении надзора в соответствии со стандартами МЭБ.

Методы обнаружения на основе нуклеиновых кислот описаны для всех болезней, включенных в *Водное Руководство*. Наблюдается быстрый рост использования молекулярных методов для обнаружения болезней водных животных, поскольку, по сравнению со многими традиционными методами, они более быстрые, чувствительные, экономичные и для них не является критичным наличие высококвалифицированного персонала. Молекулярные методы особенно важны в условиях, когда некоторые традиционные методы недоступны; например, изоляция вируса в культуре клеток недоступна для моллюсков и ракообразных из-за отсутствия подходящих линий клеток. Несмотря на очевидную важность молекулярных методов, важно понимать их ограничения и использовать их надлежащим образом в рамках полного диагностического исследования. В этой связи следует строго придерживаться определений случаев болезни, приведенных в Разделе 7 каждой главы по конкретной болезни, чтобы используемый диагностический подход соответствовал определениям подозреваемого или подтвержденного случая.

Все более широкое распространение получают коммерческие наборы для диагностики болезней водных животных. Использование коммерческих наборов приемлемо только в том случае, если они были валидированы на использование по назначению. МЭБ дает указания относительно пригодности конкретных коммерческих наборов через Реестр диагностических наборов, сертифицированных МЭБ в качестве пригодных для использования по назначению. Коммерческие наборы, включенные в реестр, были оценены в соответствии с Процедурой МЭБ. Реестр диагностических наборов доступен на веб-сайте: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/certification-of-diagnostic-tests/the-register-of-diagnostic-tests/>

Информация, представленная в *Водном Руководстве*, была подготовлена под руководством Комиссии по стандартам здоровья водных животных с использованием экспертных знаний Референтных лабораторий и Центров по сотрудничеству МЭБ. Все рекомендации настоящего *Водного Руководства* были приняты Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ и, таким образом, представляют собой согласованные на международном уровне стандарты. Окончательный вариант каждой принятой главы является результатом широких консультаций и комментариев со стороны стран-членов МЭБ. Список основных авторов каждой главы можно найти в следующем разделе настоящего *Водного Руководства*.

Методы диагностики болезней водных животных быстро развиваются. Отдельные главы *Водного Руководства* регулярно обновляются с учетом последних научных открытий и технологических достижений. Любые пересмотренные главы представляются Ассамблее для принятия в мае каждого года и, в случае их принятия, вскоре после этого будут опубликованы на веб-сайте МЭБ. Пользователям настоящего руководства рекомендуется посещать веб-сайт МЭБ для ознакомления с самыми последними утвержденными главами. Они обозначены годом их принятия.

**Руководство по
диагностическим тестам
для водных животных
(2019)**

ПРЕДИСЛОВИЕ

Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ) является межправительственной организацией, которая была создана с целью укрепления системы здравоохранения животных во всем мире. Основная деятельность организации, которая была создана в 1924 году и в 2016 году состояла из 180 стран-членов, заключается в нижеследующем:

1. Обеспечение прозрачности глобальной ситуации по болезням наземных и водных животных.
2. Сбор, анализ и распространение ветеринарной научной информации.
3. Предоставление экспертных знаний и продвижение международной солидарности в борьбе с болезнями животных.
4. В рамках своего мандата в соответствии с Соглашением ВТО (Всемирная торговая организация) по санитарным и фитосанитарным мерам (Соглашение СФС) обеспечение защиты мировой торговли путем публикации стандартов здравоохранения для международной торговли животными и продуктами животного происхождения.
5. Совершенствование правовой базы и ресурсов национальных ветеринарных служб и соответствующих компетентных органов.
6. Обеспечение более надежных гарантий безопасности пищевых продуктов животного происхождения и содействие благополучию наземных и водных животных с помощью научно-обоснованного подхода.

Цель настоящего *Руководства по диагностическим тестам для водных животных (Водное Руководство)* - обеспечить единый подход к выявлению болезней, перечисленных в *Водном Кодексе МЭБ*, в целях выполнения требований, предъявляемых к сертификации здоровья в связи с программами профилактики и контроля болезней, а также к торговле водными животными и продуктами из них.

Несмотря на наличие многочисленных публикаций по выявлению и контролю болезней водных животных, *Водное Руководство* является ключевым и уникальным документом, описывающим методы, которые должны применяться для выявления болезней, занесенных в список МЭБ, в лабораториях по охране здоровья водных животных, таким образом, повышая эффективность и способствуя повышению уровня здоровья водных животных во всем мире. Требования, указанные в настоящем *Водном Руководстве*, признаны ВТО в качестве международных стандартов.

Задача по составлению *Водного Руководства* была возложена на Комиссию МЭБ по стандартам здоровья водных животных (Комиссия по водным животным) Всемирной ассамблеей делегатов (стран-членов МЭБ). Комиссии по водным животным, избираемой раз в три года Всемирной ассамблеей, оказывали большую помощь ведущие эксперты и Референтные центры МЭБ. Все проекты глав были отправлены странам-членам МЭБ, а также отдельным экспертам для представления замечаний и внесения изменений. *Водное Руководство* будет постоянно пересматриваться и обновляться по мере поступления новой информации о болезнях водных животных в целом и о новых эмерджентных болезнях в

частности. Предполагается, что новое издание будет публиковаться каждые четыре года; ежегодные обновления, после их принятия Ассамблеей, будут в кратчайшие сроки размещаться на веб-сайте МЭБ.

Д-р Моник Элуа
Генеральный директор

сентябрь 2016 года

Д-р Инго Эрнст
Председатель, Комиссия по водным
животным

сентябрь 2016 года

СОКРАЩЕНИЯ

Ab	антитело
ABTS	2,2'-азино-ди- (3-этилбензтиазолин) -6-сульфоновая кислота
Ag	антиген
AS	атлантический лосось (клеточная линия)
ASK	почка атлантического лосося (клеточная линия)
BCIP	5-бром-4-хлор-3-индоилфосфат
BF-2	мальки синежаберного солнечника (клеточная линия)
BKD	бактериальная болезнь почек
BP	Vaculovirus renaei
BSS	сбалансированный солевой раствор
CCB	мозг сазана (Cyprinus carpio) (клеточная линия)
CCO	яичник канального сомика (клеточная линия)
CCV (D)	вирус канального сомика (болезнь)
CHSE-24	эмбрион чавычи (клеточная линия)
CIA	тельца Каудри типа А
CPE/ЦПЭ	цитопатический эффект
DEPC	диэтил пирокарбонат
DIG	дигоксигенин
DNA/ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
dNTP/дНТФ	дезоксирибонуклеозид трифосфат
ECV	вирус европейского сома
EDTA/ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
EHN (V)	эпизоотический гематопозитический некроз (вирус)
ELISA/ИФА	иммуноферментный анализ
EPC	папилезная эпителиома карповых (клеточная линия)
ESV	вирус сома Солдатова
EUS	эпизоотический язвенный синдром
FAT	флуоресцентный тест на антитела
FBS/ФБС	фетальная бычья сыворотка

FCS/ФТС	фетальная телячья сыворотка
FEV	вирус энцефалита рыб
FHM	толстоголовый гольян (клеточная линия)
FITC/ФИТЦ	флуоресцеин изотиоцианат
GAV	вирус, поражающий жабры
GF	плавник пристипомы (клеточная линия)
H&E	гематоксилин и эозин
HBSS	сбалансированный солевой раствор Хэнкса
HEPES	N-2-гидроксиэтилпиперазин, N-2-этансульфоновая кислота (буфер)
HP	гепатопанкреас
HRPO	пероксидаза хрена
IF/ИФ	иммунофлуоресценция
IFAT	непрямой иммунофлуоресцентный анализ
Ig	иммуноглобулин
IHN (V)	инфекционный гиподермальный и гематопозитический некроз (вирус)
IHN (V)	инфекционный гемопоэтический некроз (вирус)
IMN (V)	инфекционный мионекроз (вирус)
IPN (V)	инфекционный панкреонекроз (вирус)
ISA (V)	инфекционная анемия лосося (вирус)
ISH	Гибридизация in-situ
ITS	внутренний транскрибированный спейсер
KF-1	плавник карпа кои (клеточная линия)
LOS	сфероиды лимфоидных органов
LOV	вирус лимфоидных органов
Mab/MAT	моноклональные антитела
MDT	среднее время гибели
MEM	минимальная необходимая среда
MHC	главный комплекс гистосовместимости
MLV	модифицированный живой вирус (вакцина)
m.o.i./м.и.	множественность инфекции
MSV	исходный вакцинный вирус
NI	индекс нейтрализации
OGP	1-октил-бета-D-глюкопиранозид (буфер)

OPD	ортофенилдиамин (хромоген)
OPG	оксалаза-фенол-глицерин (раствор консерванта)
ORF	открытая рамка считывания
PAGE/ПААГ	электрофорез в полиакриламидном геле
PAP/ПАП	пероксидаза-антипероксидаза (процедура окрашивания)
PAS/ПАС	периодическая кислота- Schiff (реакция)
PBS/ФБР	забуференный фосфатом физиологический раствор
ПЦР	полимеразная цепная реакция
PD	защитная доза
PFGE	гель-электрофорез в пульсирующем поле
PFU/БОЕ	бляшкообразующая единица
РНА/РПГА	реакция пассивной гемагглютинации (тест)
PPD	очищенный белок производная
PLO	организмы, подобные возбудителю плевропневмонии
PRN	нейтрализация путем уменьшения бляшек
PSG	забуференный фосфатом физиологический раствор с глюкозой
RBC	эритроциты
RFLP/ПДРФ	полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
RK	кроличья почка
RPM/ об/мин	оборотов в минуту
RSA	ускоренная реакция агглютинации на стекле
RT-PCR/ ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
SAT	Реакция агглютинации с сывороткой крови
SDS	додецилсульфат натрия
SPF	свободный от специфических патогенов
SPG	смесь сахарозы, фосфата и глутаминовой кислоты
SRBC	овечьи эритроциты
TCID ₅₀	средняя инфекционная доза для культуры ткани
TMB/ТМБ	тетраметилбензидин
TSI	агар тройной сахарный железный (средний)

VB	верональный буфер
VBS	верональный забуференный физиологический раствор
Vero/Bero	почка африканской зеленой мартышки (клетки)
VN/PH	реакция нейтрализации вируса

ЧАСТЬ 1
ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

РАЗДЕЛ 1.1

ВВОДНЫЕ ГЛАВЫ

ГЛАВА 1.1.1.

УПРАВЛЕНИЕ КАЧЕСТВОМ В ВЕТЕРИНАРНЫХ ИСПЫТАТЕЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

РЕЗЮМЕ

Для диагностики, надзора и торговли необходимы достоверные результаты лабораторных тестов. Такие результаты можно получить при использовании в работе практик надлежащего управления, достоверных методов тестов и калибровки, надлежащих технологий, систем контроля и обеспечения качества в рамках системы управления качеством. Управление качеством в лаборатории включает технические, административные и операционные элементы тестирования и интерпретации результатов тестов. Система управления качеством дает лаборатории возможность продемонстрировать как компетентность, так и способность получать стабильные технически обоснованные результаты, отвечающие потребностям их клиентов. Необходимость взаимного признания результатов теста, что важно для международной торговли, а также необходимость принятия международных стандартов, таких как Международный стандарт ISO/IEC 17025:2005 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» (ISO/IEC, 2005) по аккредитации лаборатории требует наличия хороших систем управления качеством в лабораториях. Целью этой главы не является повторение требований ISO/IEC 17025, также глава не утверждалась органами аккредитации. Здесь в большей степени кратко изложены важные вопросы и понятия, которые должны быть приняты во внимание лабораторией при составлении и выполнении системы управления качеством, независимо от того была ли она официально аккредитована или нет. В Главе 1.1.1 Управление ветеринарными диагностическими лабораториями Наземного Руководства дан обзор компонентов руководства и менеджмента ветеринарных лабораторий, которые необходимы для эффективного оказания диагностических услуг, и освещены критические элементы, которые должны устанавливаться как минимальные требования.

КЛЮЧЕВЫЕ ПРИНЦИПЫ РАЗРАБОТКИ И ПОДДЕРЖАНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ УПРАВЛЕНИЯ КАЧЕСТВОМ

Для обеспечения гарантий того, что система управления качеством соответствует требованиям и эффективна, проект системы должен быть тщательно продуман, и в случае аккредитации необходимо рассмотреть все критерии соответствующего стандарта качества. Основные категории и ключевые вопросы, которые следует продумать в первую

1 ISO/IEC - Международная организация по стандартизации/Международная комиссия по электрохимическим процессам

очередь, а также мероприятия внутри каждой категории кратко изложены в следующих восьми разделах данной главы.

1. Деятельность, обязанности и цели деятельности лаборатории

Ряд факторов оказывает воздействие на элементы и требования системы управления качеством. К данным факторам относятся:

- i) Тип проводимого исследования: например, научные исследования или диагностика;
- ii) Цель и требования к результатам тестов, например, для импорта или экспорта, карантина;
- iii) Последствия при получении спорных и ошибочных результатов, например, острый гепатопанкреатический некроз (АНПНД) в благополучной по данной болезни стране;
- iv) Допустимый уровень риска и ответственность, например, вакцинация в противоположность отбраковке или убою;
- v) Требования заказчика (например, чувствительность и специфичность метода тестирования, стоимость, время между получением и исполнением заказа, описание штамма или генотипа), например, в целях надзора или признания благополучия после вспышки;
- vi) Роль лаборатории в правовой деятельности или регламентирующих программах, например, в целях искоренения болезни или декларирования благополучия по болезни в МЭБ;
- vii) Роль лаборатории в оказании поддержки, подтверждении результатов или контроле работы других лабораторий (например, в качестве Референтной лаборатории);
- viii) Коммерческие цели лаборатории, включая необходимость признания со стороны любой третьей организации или аккредитации.

2. Стандарты, руководства, рекомендации

При разработке систем управления качеством лабораториям рекомендуется выбирать заслуживающие доверия и признанные стандарты и руководства. Для лабораторий, добивающихся получения аккредитации тестирования, а также для всех Референтных лабораторий МЭБ применение стандарта ISO/IEC 17025 (ISO/IEC, 2005) или его эквивалента является обязательным. Данный стандарт включает в себя административные и технические требования, и отвечающие данным требованиям лаборатории считаются компетентными. Дополнительная информация по стандартам может быть получена в органах по национальным стандартам каждого государства, или в Международном сообществе по аккредитации лабораторий (ILAC)², в органах по аккредитации (например, в Национальной ассоциации служб анализа (NATA), Австралия; в Службе аккредитации Соединенного Королевства Великобритании и Северной Ирландии (UKAS); в Американской ассоциации по аккредитации лабораторий (A2LA) и т.д). Технические и международные организации, такие как AOAC International (Научная ассоциация аналитического мастерства, ранее известная как Ассоциация химиков-аналитиков, состоящих на государственной службе) и Международная организация по стандартизации

² ILAC: Секретариат ILAC, PO Box 7507, Silverwater, NSW 2128, Австралия; <http://ilac.org/>

(ISO) публикуют полезные рекомендации, руководства и стандарты, которые дополняют общие требования, изложенные в ISO/IEC 17025. Другие релевантные документы могут включать руководства и документацию по применению, предоставляющие интерпретационные данные и рекомендации по применению ISO/IEC 17025 в области ветеринарных исследований как для заявителя, так и для аккредитуемых объектов, например,

http://www.nata.com.au/nata/phocadownload/publications/Accreditation_criteria/ISO-IEC-17025/VET/Veterinary-Testing-ISO-IEC-17025-Application-Document.pdf.

Международный стандарт ISO 9001 (ISO, 2015) является сертификационным стандартом по системам управления качеством и в связи с тем, что он является полезным дополнением к системе качества, выполнение его требований необязательно обеспечивает или предусматривает наличие технической компетенции (в областях, перечисленных в Разделе 3 ниже). Оценка соответствия стандарту ISO 9001 проводится органом по сертификации, который аккредитован национальным органом по аккредитации для проведения таких оценок. Если лаборатория отвечает требованиям стандарта ISO 9001, термин *регистрация* или *сертификация* используется для указания на соответствие, а не на аккредитацию.

С укреплением связей между медицинским и ветеринарным тестированием в рамках таких инициатив как «Одно здоровье», некоторые лаборатории могут выбирать другие стандарты ISO, например ISO 15189 (ISO/IEC, 2012), которые включают требования к тестированию проб от человека, например, для диагностики зоонозов.

3. Аккредитация

Если лаборатория решает обратиться за официальным признанием своей системы управления качеством и исследований, будет необходима верификация ее соответствия выбранным стандартам третьей стороной. ILAC опубликовала особые требования и руководства для лабораторий и органов по аккредитации. Согласно системе ILAC для аккредитации деятельности лаборатории в области исследований и калибровки следует использовать ISO/IEC 17025. Определения, относящиеся к аккредитации лаборатории, можно найти в Международном стандарте ISO/IEC 17000: Оценка соответствия – Словарь и общие принципы (ISO/IEC, 2004a). Аккредитация связана с демонстрируемой компетентностью, которая определяется шире, чем наличие и выполнение документально оформленных процедур. Предоставление квалифицированных и клиентоориентированных услуг также означает, что лаборатория:

- i) Имеет технически достоверные и валидированные методы, процедуры и технические условия тестирования, которые документально оформлены в соответствии с требованиями соответствующих стандартов и/или руководств, например, Глава 1.1.2 *Принципы и методы валидации диагностических анализов на выявление инфекционных болезней*, и Главы 3.6.1-3.6.8 *Наземного Руководства Рекомендации по валидации диагностических тестов*;
- ii) Имеет квалифицированный и обученный персонал, обладающий основательными техническими познаниями соответственно уровню полномочий;
- iii) Имеет соответствующее оборудование, а также график его технического обслуживания/калибровки;
- iv) Имеет соответствующие помещения и осуществляет контроль окружающей среды;

- v) Имеет процедуры и технические характеристики, которые гарантируют точные и надежные результаты;
- vi) Проводит постоянную модернизацию тестирования и системы управления качеством;
- vii) Может определять необходимость проведения и осуществлять корректирующие или профилактические действия, например, в целях достижения удовлетворенности клиента;
- viii) Точно оценивает и контролирует неточности при проведении исследований; и
- ix) Демонстрирует соответствующий уровень квалификации в ходе применения различных методов тестирования (например, посредством участия в квалификационных испытаниях на регулярной основе).
- x) Имеет очевидную компетентность при получении технически обоснованных результатов.

4. Выбор органа по аккредитации

Для того, чтобы результаты исследований, проведенных в лаборатории, были приняты для целей торговли, используемый стандарт аккредитации должен быть признан международным сообществом и органом по аккредитации, признанным компетентным в области аккредитации лабораторий. Программы признания аккредитационных органов в схеме ILAC основаны на требованиях международного стандарта ISO/IEC 17011: Общие требования к аккредитационным органам, аккредитующим органы по оценке соответствия (ISO/IEC, 2004b). Информацию о признанных органах по аккредитации можно получить от организаций, которые их признают, таких как Азиатско-Тихоокеанское сотрудничество по аккредитации лабораторий (APLAC), Межамериканское сотрудничество по аккредитации (IAAC) и Европейское сотрудничество по аккредитации (EA).

Органы по аккредитации могут быть также участниками ILAC или региональных соглашений о взаимном признании (MRA) (например, с APLAC). Данные MRA разработаны для снижения технических барьеров в торговле и дальнейшего продвижения использования результатов тестирования какой-либо лаборатории на международных рынках. Дополнительную информацию о MRA см.: www.ilac.org

5. Определение области действия системы управления качеством и/или области аккредитации лаборатории

Система управления качеством должна включать все сферы деятельности, влияющие на все виды исследований, которые проводятся в лаборатории. Поскольку аккредитованные лаборатории обязаны отвечать требованиям стандарта, указанным ниже, данные принципы значимы для всех испытательных лабораторий.

Лаборатории, аккредитованные по ISO/IEC 17025, имеют специальный список тестов, на которые они были аккредитованы, который называется программа или область аккредитации. Ветеринарные испытательные лаборатории включают государственные и частные лаборатории, ветеринарные учреждения, ветеринарные факультеты университетов и другие лаборатории, осуществляющие исследования животных и продуктов животного происхождения в целях диагностики, мониторинга и лечения болезней. В принципе, при внедрении новых методов исследования, они должны пройти оценку и аккредитацию до того, как они будут добавлены в область аккредитации, однако может быть использована

гибкая область, согласно которой лаборатория определяется как компетентная для добавления тестов в область аккредитации, которые затем официально добавляются для оценки в ходе следующего посещения органа по аккредитации. Система управления качеством должна охватывать все области действия, касающиеся всех исследований, проводимых в лаборатории. Однако лаборатория сама решает, какие тесты подлежат аккредитации и включению в область аккредитации. Если аккредитованная лаборатория также проводит неаккредитованные тесты, они должны быть четко указаны как таковые во всех отчетах, подтверждающих или ссылающихся на аккредитацию. К факторам, которые могут повлиять на выбор лабораторией области аккредитации, относятся:

- i) Влияние первоначальной аккредитации на ресурсы и возможности в рамках данных сроков;
- ii) Договорное требование по аккредитованным исследованиям (например, по международной торговле, научно-исследовательским проектам);
- iii) Значимость теста и влияние неправильного результата;
- iv) Стоимость поддержания необходимого уровня аккредитованного теста;
- v) Наличие персонала, материально-технической базы и оборудования;
- vi) Наличие референтных стандартов (например, стандартизированных реактивов, образцов для внутреннего контроля качества, референтных культур), а также схемы квалификационных испытаний;
- vii) Обеспечения качества материалов, реактивов и сред;
- viii) Валидация, техническая сложность и надежность метода тестирования;
- ix) Возможность субподряда для проведения аккредитованных тестов;

6. Обеспечение качества, контроль качества и квалификационные испытания

Обеспечение качества – это часть системы управления качеством, нацеленная на обеспечение выполнения требований к качеству, это систематический и запланированный процесс обеспечения того, что предоставляемая услуга отвечает заявленным требованиям во всех областях. Требования могут быть внутренними или определенными в стандарте аккредитации или сертификации. Обеспечение качества ориентировано на процесс и обеспечивает выполнение соответствующих процедур правильным образом.

Контроль качества – это систематический и запланированный мониторинг результатов с тем, чтобы гарантировать выполнение минимальных уровней качества. Что касается испытательных лабораторий, контроль качества призван гарантировать, что процессы тестирования работают правильно, а результаты находятся в пределах предполагаемых параметров и пределов. Контроль качества ориентирован на тестирование и гарантирует, что результаты соответствуют ожиданиям.

Квалификационное тестирование, иногда именуемое Внешним обеспечением качества – это определение эффективности лаборатории посредством исследования проб скрытого содержания. В оптимальном варианте схемы квалификационного тестирования должны выполняться сторонними независимыми организациями. Участие в квалификационных испытаниях позволяет лаборатории оценить и продемонстрировать достоверность результатов посредством сравнения с результатами других участвующих лабораторий.

Все лаборатории должны по возможности принимать участие в предлагаемых сторонними организациями схемах квалификационного тестирования в соответствии с проводимыми в лаборатории исследованиями. Участие в таких схемах – это необходимое требование для аккредитованных лабораторий. Они обеспечивают независимую оценку используемых методов исследований и уровня компетентности персонала. При отсутствии данных схем можно использовать альтернативы, например, кольцевые испытания, организуемые Референтными лабораториями, межлабораторные исследования, использование сертифицированных референтных материалов или контрольных проб для внутреннего контроля качества, повторных исследований с использованием того же или отличного метода, повторное тестирование архивных материалов и соотнесение результатов исследования по различным характеристикам пробы.

Провайдеры и исполнители программ квалификационных испытаний должны быть аккредитованы по ISO/IEC 17043 – Оценка соответствия – Общие требования для квалификационного тестирования (ISO/IEC, 2010).

Материалы для квалификационных тестов от аккредитованных провайдеров должны быть описаны, и все оставшиеся материалы после окончания квалификационных тестов могут быть полезны для демонстрации компетентности сотрудников или для валидации тестов. Информация о выборе и использовании референтных проб представлена в *Главе 3.6.6. Наземного Руководства - Выбор и использование референтных образцов и панелей*.

7. Методы тестирования

Согласно ISO/IEC 17025, необходимо использовать соответствующие методы тестирования и соблюдать требования к отбору, разработке и валидации.

В данном *Руководстве по водным животным* представлены рекомендации по выбору методов тестирования для торговли, диагностических целей и надзора, указанные в главах по отдельным болезням. Тот факт, что тест рекомендован, необязательно означает, что лаборатория компетентна в его проведении. Система обеспечения качества лаборатории должна включать обеспечение гарантий компетентности.

В ветеринарии может быть предпочтительно использовать другие стандартные методы (опубликованные в международных, региональных или национальных стандартах) или полностью валидированные методы (подвергавшиеся всеобъемлющему совместному исследованию и опубликованные или изданные авторитетным техническим органом, например AOAC International), однако, такие методы могут быть недоступными. Многие ветеринарные лаборатории разрабатывают или модифицируют методы, и большинство таких лабораторий имеет тест-системы, в которых используются нестандартные методы, или комбинация стандартных и нестандартных методов. В ветеринарных лабораториях, где используются стандартные методы, также необходимо проводить внутреннюю оценку, оптимизацию или валидацию с тем, чтобы гарантировать получение достоверных результатов.

Заказчики и персонал лабораторий должны понимать рабочие характеристики теста, и заказчика необходимо предупредить, если метод не является стандартным. Следовательно, многие ветеринарные испытательные лаборатории должны продемонстрировать компетентность в области разработки, адаптации и валидации методов тестирования.

В данном *Руководстве по водным животным* изложены более подробные и специфические инструкции по выбору, оптимизации, стандартизации и валидации тестов, а именно в главе 1.1.2 – *Принципы и методы валидации диагностических исследований на инфекционные болезни*. В Главе 1.1.2 даны ссылки на главы 3.6.1-3.6.8 *Руководства по наземным животным - Рекомендации по валидации диагностических тестов*, в которой рассмотрена разработка и оптимизация фундаментально отличных анализов, таких как тесты для выявления антител, антигенов и нуклеиновых кислот, измерение погрешности, статистические подходы к валидации тестов, выбор и использование референтных образцов и панелей, валидация диагностических тестов для диких животных и сравнительные эксперименты после внесения изменений в валидированные методы исследований.

Следующие аспекты являются ключевыми аспектами по методам исследований, используемых в рамках системы управления качеством лаборатории.

7.1. Выбор метода тестирования

Достоверные результаты начинаются с выбора метода тестирования, отвечающего нуждам заказчиков лаборатории и соответствующего их особым требованиям (соответствие назначению). Некоторые вопросы относятся непосредственно к лаборатории, некоторые – к заказчику. Принципы отбора метода тестирования:

- i) Международное признание метода;
- ii) Признание метода среди ученых;
- iii) Соответствующая или действующая технология.
- iv) Подходящие рабочие характеристики (например, аналитическая и диагностическая чувствительность и специфичность, воспроизводимость, повторяемость, процент выделения, пределы обнаружения, прецизионность, достоверность и неопределенность);
- v) Пригодность теста для рассматриваемых видов и популяций;
- vi) Тип образца (например, сыворотка, ткань, молоко) и предполагаемое качество или состояние по прибытии в лабораторию;
- vii) Цель теста (например, антитела, антиген, живой патоген, последовательность нуклеиновой кислоты);
- viii) Длительность цикла теста;
- ix) Ресурсы и время, доступные для разработки, адаптации, оценки;
- x) Предполагаемое применение (например, экспорт, импорт, надзор, скрининг, диагностика, подтверждение)
- xi) Факторы безопасности;
- xii) Ожидания заказчиков;
- xiii) Необходимое количество тестовых образцов;
- xiv) Стоимость теста, на каждую пробу;
- xv) Существующие справочные стандарты, включая референтные материалы и схемы квалификационного тестирования (см. также *Руководство по наземным животным* Глава 3.6.6).

7.2. Оптимизация и стандартизация метода тестирования

После выбора метода необходимо внедрить метод в лаборатории. Независимо от того, был ли метод разработан в лаборатории или получен из внешнего источника, требуется дополнительная оптимизация. В ходе оптимизации устанавливаются ключевые спецификации и стандарты рабочих показателей для процедур тестирования, используемых в данной лаборатории. Оптимизацией определяется нижеследующее:

- i) Ключевые спецификации для оборудования и инструментов;
- ii) Ключевые спецификации для реактивов (например, химические вещества, биологические препараты), референтные стандарты, референтные материалы и внутренние контрольные пробы;
- iii) Робастность – критические контрольные точки и приемлемые диапазоны, отличительные свойства или поведение в критических контрольных точках, использование статистически приемлемых процедур;
- iv) Деятельность по контролю качества, необходимая для мониторинга критических контрольных точек;
- v) Тип, количество, диапазон, частота и подготовка контролей циклов теста;
- vi) Критерии принятия несубъективных результатов или непринятия результатов тестирования партии;
- vii) Критерий интерпретации и отчетности по результатам тестов;
- viii) Документально оформленный метод тестирования и процедура отчетности для использования сотрудниками лаборатории;
- ix) Доказательство технической компетентности, необходимый для тех, кто проводит тестирование или интерпретирует результаты.

7.3. Валидация метода тестирования

С помощью валидации тест оценивается с точки зрения его пригодности для данного назначения посредством установления рабочих характеристик, таких как чувствительность, специфичность, процент выделения; и диагностических параметров, таких как положительные или отрицательные точки разделения и представляющий интерес титр или значимый титр. Валидация должна проводиться с использованием оптимизированной, документально оформленной и фиксированной процедуры. Масштаб и глубина процесса валидации будет зависеть от логистических факторов и факторов риска. Она может включать любое количество действий и данных с последующим анализом данных с использованием соответствующих статистических методов. Действия по проведению валидации могут включать:

- i) Полевые и/или эпидемиологические исследования, включая расследования вспышек болезни;
- ii) Разработка алгоритмов тестирования для специальных целей, например, надзор, расследование вспышки и т.д.
- iii) Повторное тестирование для установления влияния переменных, таких как оператор, реактивы, оборудование;

- iv) Сравнение с другими методами, предпочтительно, со стандартными методами и с референтными стандартами (при наличии);
- v) Совместные исследования с другими лабораториями, использующими тот же документально оформленный метод. Желательно, чтобы они были организованы референтной лабораторией и включали тестирование панели проб с неуказанным составом или титром, а также экспертную оценку результатов и комментарии для участников;
- vi) Воспроизведение данных из принятого стандартного метода, или из признанной публикации;
- vii) Экспериментальное заражение или исследование вспышек болезни;
- viii) Анализ данных внутреннего контроля качества.

Валидация – это всегда баланс между затратами, риском и техническими возможностями. Могут быть случаи, когда количественные данные, такие как точность и прецизионность, могут быть представлены только упрощенным способом. Следует разработать критерии и процедуры корреляции результатов теста для диагностики статуса болезни или для принятия регуляторных мер. Эти разработанные критерии и методы должны учитывать скрининговые методы, повторное тестирование и подтверждающее тестирование.

Валидация тестов рассмотрена в Главе 1.1.2.

7.4. Неопределенность метода тестирования

Измерение неопределенности (MU) – это «параметр, ассоциированный с результатом измерения, который характеризует разброс значений, что может быть объективно связано с измерением» (Eurachem, 2012). Неопределенность измерения не означает, что существуют сомнения относительно результата, но данный параметр дополнительно подтверждает достоверность результата. Неопределенность измерения не является эквивалентом ошибки, т.к. данный параметр может быть применен ко всем результатам теста, полученным в ходе определенной процедуры.

Лаборатории должны оценивать неопределенность всех используемых методов тестирования, результатом которых становится измерение, включаемое в область их аккредитации, а также всех методов, используемых для калибровки оборудования (ISO/IEC, 2005).

Тесты могут быть ориентировочно поделены на две группы: количественные (биохимические анализы, иммуноферментные анализы (ИФА), титрование, полимеразные цепные реакции в режиме реального времени (ПЦР), определение количества патогена, и т.д.); и качественные (идентификация бактериальной культуры, патогена, выделение вируса, ПЦР с детекцией по конечной точке, иммунофлуоресценция и т.д.)

Определение измерения неопределенности (MU) не ново для некоторых областей измерительных наук (ANSI, 1997). Его можно рассматривать как *количественное* выражение надежности, и оно, как правило, выражается как установленный диапазон. Стандартное отклонение (SD) и интервал достоверности (CI) являются примерами

выражения измерения неопределенности: например, результат оптической плотности ИФА, выраженный как $\pm n$ SD, где n обычно равно 1, 2 или 3. Интервал достоверности (обычно 95%) представляет предполагаемый диапазон, в который попадет результат при расчете с данным набором тестовых данных.

Применение принципов MU в *качественном* тестировании в меньшей степени определено. Определение и выражение MU не стандартизировано для ветеринарных (медицинских, пищевых, или экологических) испытательных лабораторий, но имеются хорошие руководства и по мере роста значимости аккредитации, разрабатываются методики. Стандарт ISO/IEC 17025 признает, что некоторые методы тестирования могут заранее исключать метрологически и статистически значимый расчет неопределенности измерений. В таких случаях лаборатория должна идентифицировать и оценивать все компоненты неопределенности, основываясь на знании рабочих характеристик метода и используя предыдущий опыт, данные валидации, результаты внутреннего контроля и т.д.

Многие технические организации и органы по аккредитации (например, AOAC International, ISO, NATA, A2LA, Канадский совет по стандартам, UKAS, Eurachem, Международное сотрудничество по метрологическому обеспечению единства измерений в аналитической химии) проводят обучение или предоставляют руководства по MU для лабораторий, находящихся в процессе получения аккредитации.

Требование ISO/IEC 17025 «процедуры контроля качества для мониторинга достоверности тестов» подразумевает, что лаборатория должна использовать процедуры по контролю качества, которые охватывают все основные источники неопределенности. Не требуется рассматривать каждый компонент отдельно. Лаборатории могут установить приемлемые спецификации, критерии, пределы и т.д. в критических контрольных точках для каждого компонента процесса тестирования. Затем лаборатории могут выполнять соответствующие меры по контролю качества в этих критических точках или могут попытаться сократить или устранить воздействие неопределенности на каждый компонент. Измерение неопределенности описано в Главе 3.6.4 *Руководства по наземным животным*.

7.4.1. Компоненты тестов с источниками неопределенности:

- i) Отбор проб;
- ii) Контаминация;
- iii) Условия транспортировки и хранения проб;
- iv) Переработка проб;
- v) Качество, подготовка и хранение реактивов;
- vi) Тип референтного материала;
- vii) Манипуляции с объемами и весом;
- viii) Условия окружающей среды;
- ix) Воздействие оборудования;
- x) Ошибки сотрудников лабораторий - аналитика или оператора;

- xi) Биологическая вариабельность;
- xii) Неизвестное или случайное воздействие.

Систематические ошибки или погрешности, определенные в ходе валидации, необходимо исправлять, внося изменения в метод, математические поправки или указывая эти ошибки в отчете.

Если в процедуру или тест вносится корректировка в целях снижения неопределенности, вводится новый источник неопределенности (неопределенность исправления). Оценка этого должна проводиться в рамках оценки MU

Дополнительную информацию об анализе неопределенности можно найти в Руководствах Eurachem по количественному определению неопределенности измерений (Eurachem, 2012) и использованию информации о неопределенности при оценке соответствия (Eurachem, 2007).

7.5. Осуществление и использование метода тестирования

Обучение должно быть запланированной и организованной деятельностью с необходимыми этапами для обеспечения надлежащего контроля обучения сотрудников. Сотрудники лабораторий должны подтверждать свою квалификацию при использовании методов тестирования до получения подлежащих регистрации результатов и на постоянной основе.

Лаборатория должна иметь возможность продемонстрировать прослеживаемость всех аккредитованных тестов, и данный принцип должен применяться ко всем тестам, как аккредитованным, так и неаккредитованным. Сюда входят все действия, связанные с выбором теста, разработкой, оптимизацией, стандартизацией, валидацией, выполнением, отчетностью, работой с персоналом, контролем качества и обеспечением качества. Прослеживаемость достигается посредством использования соответствующего документально оформленного управления проектом, отчетности, управления данными и систем архивирования.

8. Стратегическое планирование

Лаборатории должны иметь доказательство непрерывного совершенствования своей деятельности, что является обязательным требованием для аккредитованных лабораторий. Лаборатория должна обладать знаниями относительно актуальных стандартов управления качеством и технических стандартов, а также методов, используемых для демонстрации компетентности лаборатории, а также для установления и поддержания технической валидности. Доказательство этого может быть предоставлено посредством нижеследующего:

- i) Посещение конференций, организация внутренних или сторонних заседаний по диагностике и обеспечению качества;
- ii) Участие в работе местных и международных организаций;
- iii) Участие в составлении национальных и международных стандартов (например, участие в комитетах ILAC и ISO);
- iv) Осведомленность об актуальных публикациях, написание и обзор публикаций о методах диагностики;

- v) Программы обучения, включая посещение других лабораторий;
- vi) Проведение исследований;
- vii) Участие в совместных программах (например, Межамериканский институт по кооперации в области сельского хозяйства);
- viii) Обмен процедурами, методами, реактивами, пробами, персоналом и идеями;
- ix) Запланированное, непрерывное профессиональное развитие и техническое обучение;
- x) Обзор системы управления;
- xi) Анализ отзывов клиентов;
- xii) Анализ первопричин отклонений от нормы и выполнение корректирующих и профилактических мер, а также мер по усовершенствованию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ANSI (AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE) (1997). ANSI/NCSL (The National Conference of Standards Laboratories) Z540-2-1997, US Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, First Edition. American National Standards Institute. www.ansi.org.

EURACHEM (2007). Eurachem/CITAC Guide: Use of Uncertainty Information in Compliance Assessment, First Edition. Eurachem Secretariat. www.eurachem.org.

EURACHEM (2012). Eurachem/CITAC (The Cooperation of International Traceability in Analytical Chemistry) Guide (CG4): Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third Edition. Eurachem Secretariat. www.eurachem.org.

ISO/IEC (2004a). ISO/IEC 17000:2004. Conformity Assessment – Vocabulary and General Principles. International Organization for Standardization (ISO). www.iso.org.

ISO/IEC (2004b). ISO/IEC 17011:2004. Conformity Assessment – General requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies. International Organization for Standardization (ISO). www.iso.org.

ISO/IEC (2005). ISO/IEC 17025:2005. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. International Organization for Standardization (ISO). www.iso.org.

ISO/IEC (2010). ISO/IEC 17043:2010. Conformity Assessment - General Requirements for Proficiency Testing.

International Organization for Standardization (ISO). www.iso.org.

ISO/IEC (2012). ISO/IEC 15189:2012. Medical laboratories - Requirements for Quality and Competence. International Organization for Standardization (ISO), www.iso.org.

ISO (2015). ISO 9001:2015. Quality Management Systems – Requirements. International Organization for Standardization (ISO). www.iso.org.

*

* *

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 1996 ГОДУ ПОД ЗАГЛАВИЕМ НАДЛЕЖАЩИЕ
ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРАКТИКИ, КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И ОБЕСПЕЧЕНИЕ
КАЧЕСТВА; ПОСЛЕДНИЕ ПОПРАВКИ ВНЕСЕНЫ В 2017 ГОДУ.

ГЛАВА 1.1.2.

ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ВАЛИДАЦИИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА НАЛИЧИЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ВВЕДЕНИЕ¹

Валидация – это процесс определения пригодности анализа², разработанного, оптимизированного и стандартизированного надлежащим образом для предусмотренного назначения. Все диагностические анализы (лабораторные и в полевых условиях) должны быть валидированы для видов, в отношении которых они будут использоваться. Валидация включает оценку аналитических и диагностических характеристик теста. В контексте данной главы анализ, который прошел все три стадии пути валидации (см. Рисунок 1 ниже), включая характеристику рабочих свойств, может считаться «валидированным для первоначального предназначения»³. Для сохранения статуса валидированного анализа, однако, необходимо проводить тщательный мониторинг эффективности анализа в условиях рутинного использования, часто путем отслеживания поведения контролей анализа со временем. Это гарантирует, что анализ, валидированный первоначально, будет постоянно сохранять свои рабочие характеристики. В случае если данный анализ показывает результаты, не соответствующие первоначальным данным валидации, анализ может быть признан непригодным для своего предусмотренного назначения. Таким образом, валидированный анализ необходимо постоянно оценивать, чтобы обеспечить сохранение его пригодности для цели путем оценки результатов контроля анализа в каждом цикле и посредством оценки во время рутинного использования в целевой популяции.

Анализ, применяемый в отношении отдельных особей или популяций, имеет множество целей, например, помощь при: документальном подтверждении статуса благополучия по определенной болезни в стране или регионе, предотвращение распространения болезни во время торговли, искоренение инфекции в регионе или стране, подтверждение диагноза клинических случаев, оценка превалентности инфекции для содействия проведению анализа риска, выявление инфицированных животных для осуществления мер борьбы с болезнями

1 Версия, принята Всемирной Ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2013 г.

2 «Анализ», «метод исследования» и «тест» это синонимичные термины в контексте данной главы и, соответственно, заменяют друг друга.

3 Доступно на:
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.0_INTRODUCTION.pdf

и классификация животных для оценки состояния здоровья стада или иммунного статуса после вакцинации. Один анализ можно валидировать для одного или нескольких предусмотренных целей путем оптимизации его рабочих характеристик для каждой цели, например, установления высокой диагностической чувствительности (*DSe*) наряду с более низкой диагностической специфичностью (*DSp*) для скринингового анализа или наоборот – установление высокой диагностической специфичности с более низкой диагностической чувствительностью для подтверждающего анализа.

В результате постоянного появления новых уникальных диагностических реагентов, совмещенных с множеством новых аналитических платформ и протоколов, возникают постоянные дискуссии о том, как правильно валидировать эти анализы. Уже недостаточно предложить простые примеры из серологических анализов, например, иммуноферментный анализ, чтобы разработчики анализов могли понять, как валидировать более сложные тесты, такие как тесты на выявление нуклеиновых кислот. Чтобы внести согласованность в процесс валидации всех видов анализов, в этой главе будут описаны критерии, которые необходимо выполнять во время разработки анализа и валидации всех видов анализа. Включение разработки анализа в процесс его валидации, возможно, противоречит логике, но в реальности, три критерия валидации (определение предусмотренного назначения, оптимизация, стандартизация), которые нужно оценивать для получения валидированного анализа, включают этапы процесса его разработки. Таким же образом, процесс разработки анализа органично переходит к процессу его валидации, при этом оба этих процесса включают критерии валидации, обязательные для соблюдения. Кроме того, более подробные рекомендации представлены в Руководстве МЭБ по валидации⁴, специально разработанном для нескольких фундаментально разных типов анализа (например, обнаружение нуклеиновых кислот, антител или антигенов) и обеспечивает большей информацией по особым вопросам, относящимся к валидации диагностических анализов. Для получения специальной информации по диким видам, смотрите Руководство МЭБ по валидации 3.6.7 ⁵ Принципы и методы валидации диагностических тестов на инфекционные болезни, применимых к диким животным. Информация, представленная в Руководстве МЭБ по валидации 3.6.7, по диким животным может также быть полезной в отношении валидации тестов, проводимых на домашних животных, например, в тех случаях, когда количество и доступность проб являются ограниченным.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ СООБРАЖЕНИЯ ПРИ РАЗРАБОТКЕ И ВАЛИДАЦИИ АНАЛИЗОВ

⁵ : http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.07_WILDLIFE.pdf

Все лаборатории должны соответствовать требованиям Главы 1.1.1 (*Руководство по водным животным*) или 1.1.5 (*Руководство по наземным животным*) по Управлению качеством в ветеринарных исследовательских лабораториях. Это минимизирует влияние факторов, которые не зависят от самого теста, таких как оборудование, ошибка оператора, выбор реактива (как химического, так и биологического) и калибровка, сосуды и платформы для проведения реакции, качество воды, pH и степень ионизации буферных растворов и разбавителей, температура инкубации и ее длительность, ошибки в технических характеристиках анализа.

Первый этап в разработке анализа – определить цель анализа, поскольку она будет направлять все последующие этапы процесса валидации. Критерии валидации анализа являются характерными чертами анализа, представляющими собой решающие факторы, параметры или стандарты, на основании которых делаются выводы или принимается решение. После рассмотрения переменных, которые влияют на характеристики анализа, критерии, которые необходимо оценить в процессе валидации, становятся более понятными. Переменные можно разделить на категории: (а) образец – индивидуальный или объединенный, состав матрицы и взаимодействия хозяин/организм, количественным или качественным образом влияющие на целевой аналит; (b) система анализа – физические, химические, биологические или человеческие факторы, влияющие на способность анализа обнаруживать специфичный аналит в образце; и (с) интерпретация результатов теста – способность результата теста, полученного с помощью системы анализа, точно предсказывать статус отдельной особи или популяции в отношении цели, для которой он применяется.

Отбор, сбор, подготовка, консервирование и контроль образцов являются критическими переменными при планировании и разработке анализа с целью обеспечения обоснованных результатов исследования. Другие переменные, такие как транспортировка, передача и хранение, прослеживание образцов и система управления информацией в лаборатории являются основными источниками отклонений/ошибок, что является особенно важным, когда анализ применяется для проведения рутинного исследования. Целостность результатов эксперимента во время разработки и валидации анализа зависит от качества используемых образцов. Предвидение факторов, которые могут отрицательно сказываться на качестве образца, должно предшествовать деятельности по валидации анализа. Референтные образцы, используемые в разработке и валидации анализа, должны быть той же матрицы, что и матрица, используемая в анализе (например, сыворотка, ткани, цельная кровь), и представлять виды животных, исследуемые с использованием анализа. Референтные материалы должны соответственно представлять диапазон концентрации аналита, который должен быть обнаружен посредством анализа. Информация о сборе, подготовке, консервации, управлении и транспортировке доступна в главах 1.1.2 и 1.1.3 *Руководства по наземным животным*.

Матрица, в которой может находиться целевой аналит (сыворотка, фекалии, ткань и т.д.) может содержать эндогенные или экзогенные ингибиторы, которые могут мешать работе

некоторых анализов. Это особенно касается таких фермент-зависимых тестов, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) или иммуноферментный анализ (ИФА). Другие факторы, которые влияют на концентрацию и состав целевого анализата (особенно антитела) в образце, могут быть преимущественно связаны с хозяином и являются либо присутствующими изначально (например, возраст, пол, порода, упитанность, беременность, иммунологическая реактивность) или приобретенными (например, пассивно приобретенные антитела, активный иммунитет в результате вакцинации или инфекции). Факторы, не связанные с хозяином, такие как контаминация или порча образца, также потенциально влияют на способность анализа обнаруживать специфичный целевой анализат в образце. Также важно, чтобы биологические реактивы были свободны от чужеродных агентов, иначе это может привести к ошибочным результатам.

КРИТЕРИИ РАЗРАБОТКИ И ВАЛИДАЦИИ АНАЛИЗА

На рабочие характеристики анализа влияют множество факторов, начиная с оптимизации анализа. После первоначальной оптимизации для предусмотренного назначения проводят тестирование рабочих характеристик. На основании результатов валидации для анализа может потребоваться дополнительная оптимизация анализа или же он может быть признан, как соответствующий целевому назначению.

Критерии валидации и разработки анализа

- i) Определение предусмотренного назначения
- ii) Оптимизация
- iii) Стандартизация
- iv) Повторяемость
- v) Аналитическая чувствительность
- vi) Аналитическая специфичность
- vii) Пороговые значения (точки раздела)
- viii) Диагностическая чувствительность
- ix) Диагностическая специфичность
- x) Воспроизводимость
- xi) Соответствие предусмотренному назначению

1. ПУТЬ РАЗРАБОТКИ АНАЛИЗА

1.1. Определение предусмотренного назначения анализа

В Стандарте МЭБ по управлению и техническим требованиям для лабораторий, осуществляющих исследования на инфекционные болезни (Всемирная организация по

охране здоровья животных, 2008)⁶ указано, что методы тестирования и связанные с этим процедуры должны соответствовать определенным сферам применения для диагностики, чтобы результаты тестов имели значение. Другими словами, анализ должен «быть пригоден для цели». Качественная или количественная оценка способности положительного или отрицательного результата теста точно прогнозировать статус инфицирования или заражения животного или популяции животных является окончательным фактором, который учитывают при валидации анализа. Эта способность зависит от разработки тщательно оптимизированного и стандартизированного (Раздел А.2.3) анализа, который путем накопления данных валидации обеспечивает уверенность в том, что анализ можно провести в соответствии с предусмотренной целью. Чтобы гарантировать, что результаты тестов представляют полезные диагностические выводы о животных и популяциях в отношении предусмотренной цели, процесс валидации должен распространяться на документацию по первоначальной разработке и рабочим характеристикам анализа, а также на непрерывную оценку программ контроля и обеспечения качества. На Рисунке 1 показан процесс валидации анализа с момента проектирования анализа посредством разработки и валидации до применения, внедрения и материально-технического обеспечения анализа.

Первым этапом в разработке анализа является выбор типа анализа, который соответствует и который, по-видимому, можно валидировать для определенной цели (соответствие цели).

Самыми распространенными задачами анализа являются:

- 1) Дополнительные данные для демонстрации отсутствия инфекции в определенной популяции (стране/зоне/компарimente/стаде) (превалентность очевидно нулевая):
 - а) «Благополучие» с применением и/или без применения вакцинации,
 - б) Восстановление благополучия по инфекции после вспышек,
- 2) Подтверждение отсутствия инфекции или наличия возбудителя у отдельных животных или продуктов для целей торговли/перемещения.
- 3) Содействие искоренению болезни или инфекции из определенных популяций.

⁶ Это специфическая интерпретация наиболее общих требований ISO/IEC 17025:2005 международного стандарта качества для исследовательских лабораторий (2005). В данной публикации указано, что для того, чтобы метод считался подходящим, он должен быть должным образом валидирован и данная валидация должна соответствовать принципам, указанным в данном документе, Стандарт МЭБ по валидации.

- 4) Подтверждение диагноза случаев с подозрением или с клиническими признаками (включает подтверждение положительного скринингового теста).
- 5) Оценка превалентности инфекции или заражения для анализа риска (наблюдения, статус здоровья стада, меры контроля болезни).
- 6) Определение иммунного статуса отдельных животных или популяций (пост-вакцинальный).

Эти цели включают более узкие и более специфичные области применения анализов (см. Рекомендации Руководства МЭБ по валидации диагностических тестов: сноска 3) для каждого типа анализа). Такие особые области применения и их уникальные цели нужно четко определять в контексте полностью валидированного анализа.

Для предусмотренного назначения анализ должен быть определен относительно видов целевых животных, целевых патогенов или условий и матрицы пробоотбора.

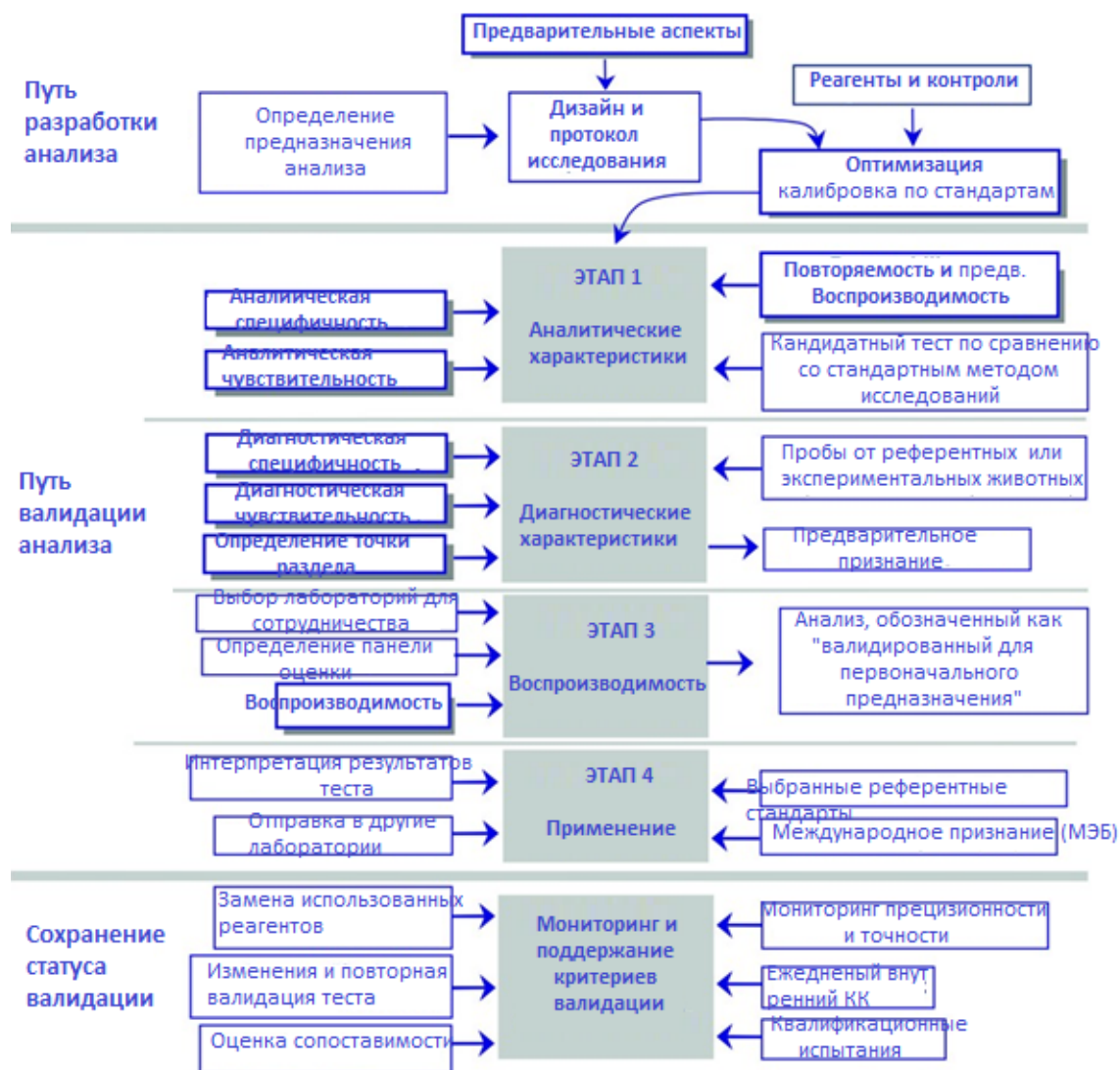


Рисунок 1. Пути разработки и валидации анализа. Критерии валидации анализа выделены жирным шрифтом в затененных прямоугольниках.

1. 2. Разработка анализа – экспериментальные исследования

1.2.1. Дизайн метода тестирования и доказательство правильности концепции

Первоначальные знания, соображения и планирование должны быть направлены на проектирование всех этапов нового анализа, предназначенного для валидации, или модификации существующего анализа. Помощь предлагается в Руководстве по валидации диагностических тестов (смотри сноску 3), в котором описаны наилучшие практики разработки и валидации анализов для обнаружения различных аналитов (например, обнаружение антител, антигенов и нуклеиновых кислот).

Разработка любого анализа зависит от референтных образцов, которые отражают целевой аналит и матрицу, в которой данный аналит обнаруживают и популяцию, для которой данный анализ предназначен. Референтными образцами могут быть сыворотки, жидкости (включая мясные соки) или ткани которые содержат указанный аналит или геномную конструкцию, совпадающую с целевым аналитом. Эти референтные материалы используются в эксперименте на протяжении всего процесса разработки и переносятся на этап валидации анализа.

1.2.2. Рабочий диапазон анализа

Рабочий диапазон анализа - интервал концентраций аналита или титров, в котором метод обеспечивает нужную точность и прецизионность. Точность это близость исследуемой величины к предполагаемой (достоверной) величине (средней или срединной) для референтного стандарта реактива известной концентрации или титра. Прецизионность⁷ - это степень дисперсии (вариация, стандартное отклонение или коэффициент вариаций) в рамках серии измерений того же самого тестируемого образца при указанных условиях. Во время разработки анализа устанавливают нижние и верхние пределы рабочего диапазона. Для формального определения данного диапазона выбирают сильно положительный референтный образец. (В идеале этот образец должен быть в то же время одним из трех образцов, описанных в разделе А.2.3 ниже). Данный сильно положительный образец серийно разводят до исчезновения ответа анализа в аналит - отрицательной матрице того же состава, что и матрица проб от животных в популяции, для которой предназначен анализ. Результаты представляют в виде кривой реакции, при этом ответ (например, оптическая плотность, пороговое значение цикла и т.д.) является функцией концентрации (количества) аналита. Кривая определяет рабочий диапазон анализа. Если обнаружено, что диапазон является неприемлемым для предусмотренного назначения, то может понадобиться дополнительная оптимизация. Типичная калибровочная кривая для большинства анализов имеет сигмоидальную форму. Данные трансформируются в аппроксимируемую линейную зависимость между ответом и концентрацией с использованием подходящего алгоритма (Findlay & Dillard, 2007).

1.2.3. Стандартизация и оптимизация

Оптимизация – это процесс, с использованием которого оценивают наиболее важные физические, химические и биологические параметры анализа и корректируют их для

⁷ Лабораторные источники вариации, которые влияют на прецизионность анализа, включают: 1) в течение одного цикла теста, 2) между циклами, 3а) между циклами анализа в разное время в тот же день или в разные дни при тех же условиях, 3б) между циклами анализа в разные дни с участием разных операторов, 4) между лабораториями. В данной главе категории 1-3 являются оценками повторяемости и категория 4 синонимична воспроизводимости.

обеспечения того, чтобы рабочие характеристики анализа наилучшим образом подходили для предусмотренного применения. Полезно выбрать минимум три хорошо определенных референтных образца, представляющих аналит в диапазоне от сильно положительного до отрицательного (например, отрицательный, слабо и сильно положительный). Эти образцы в идеале должны представлять животных с известным заражением и незараженных животных в популяции, которые в результате будут целью анализа. Однако не всегда возможно получить такие референтные образцы, особенно для анализов на обнаружение нуклеиновых кислот и антигенов. Альтернативой является подготовка референтных образцов с добавлением возбудителей, выращенных методом культивирования, или положительных сывороток, но такой способ хуже, так как эти образцы недостоверно представляют естественное взаимодействие матрицы и возбудителя (см. Руководство МЭБ по валидации 3.6.68 *Отбор и использование референтных образцов и панелей*). Но если других вариантов нет, добавление к пробе известного количества аналита или агента, полученного в результате культивирования, или разведение сильно положительной сыворотки в отрицательной сыворотке того же вида может быть единственной альтернативой. В любом случае, обязательно, чтобы матрица, в которую вносят аналит или в которой его разводят, была идентична или как можно больше походила на пробы, для которых, в конечном счете, будет предназначен анализ. В идеале, референтные образцы должны быть хорошо охарактеризованы одним или лучше как минимум двумя альтернативными методами. Эти образцы можно использовать в экспериментах для определения того, может ли анализ дифференцировать разное количество аналита, различать целевой и близкородственные аналиты и для оптимизации концентрации реактивов и усовершенствования протокола. В принципе для всех типов анализа желательно подготовить и хранить достаточное количество каждого референтного образца в аликвотах для использования в каждом цикле анализа-кандидата, так как его оценивают на протяжении всего процесса разработки и валидации. При смене референтных образцов во время процесса валидации возникает неустраняемая переменная, которая может сильно осложнить интерпретацию экспериментальных данных и, следовательно, подорвать надежность процесса разработки и валидации.

Трудоемкий процесс оптимизации анализа является определяющим и важным этапом для достижения надежного и предсказуемого проведения анализа. Научные суждения и использование наилучших научных практик, представленных в Разделе 3.6 *Наземного кодекса* (сноска 3), рекомендуются для руководства процессом оптимизации всех элементов разработки и валидации анализа. Такой подход является надежным основанием для разработки надежного анализа. Часто прототипные анализы разрабатывают с использованием реактивов и оборудования, имеющихся в лаборатории. Однако если анализ предназначен для проведения рутинных лабораторных тестов в

нескольких лабораториях, стандартизация становится особенно важной. Состав каждого химического реактива и буферного раствора должен быть полностью описан. Все реактивы должны быть определены в отношении чистоты и классификации (включая воду). Для таких параметров, как pH, молярность и т.д., должны быть установлены и задокументированы приемлемые рабочие диапазоны. Для биологических препаратов необходимо определить стандарты для качества, чистоты, концентрации и реактивности. Также необходимо учесть сроки годности и условия хранения химических и биологических препаратов. Обязательно нужно установить приемлемые диапазоны для времени реакции и температуры. Оборудование, необходимое для эффективного проведения анализа, должно быть подробно описано, включая рабочие спецификации и калибровку. Технологический контроль (контроль качества) должен стать неотъемлемой частью процесса оптимизации с самого начала, а не при завершении разработки анализа, как обычно происходит. Кроме вышеуказанных аспектов, стандартизация и оптимизация также могут потребоваться для последующих действий, таких как сбор, обработка и интерпретация данных. И наконец, после оптимизации все эти параметры должны быть полностью описаны в протоколе метода тестирования.

Во время осуществления оптимизации анализа важно делать записи об этапах процедуры и параметрах с узким диапазоном, в котором они оптимально работают, так как это и есть критические точки, которые могут повлиять на надежность анализа (см. Раздел 1.2.7). В некоторых типах анализа определенные этапы процедуры могут в большей степени влиять на окончательное проведение анализа, чем другие этапы (См. Раздел 2.5 ниже и Главу 3.6.8 *Сопоставимость анализов после минимальных изменений в валидированном методе тестирования Руководства по наземным животным*⁹ для получения дополнительной информации по определению сопоставимости при смене реактивов или процессов).

В следующих разделах описаны несколько референтных образцов аналита и другие методы контроля процесса, которые обычно используются в тест-системах. Они обеспечивают важные функции мониторинга анализа, которые требуют особого внимания во время оптимизации анализа. Кроме этого, необходимо обеспечить правильное приготовление и хранение всех биологических реактивов и референтных материалов для поддержания их стабильности (см. Главу 1.1.2 *Руководства по наземным животным*).

1.2.4. Ингибирующие факторы в матрице пробы

9

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.08_COMPARABILITY_AS_SAYS_AFTER_CHANGES.pdf

Каждая матрица, которая должна использоваться в анализе должна применяться в процессе валидации. Некоторые матрицы пробы включают ингибирующие факторы, которые мешают выполнению некоторых типов анализов. Сыворотка, особенно гомогенизированная, может содержать факторы, токсичные к клеткам, используемым в реакции вирус нейтрализации, в то время как эндогенные вещества, обнаруженные в некоторых тканях и жидкостях, могут мешать или ингибировать анализы связывания с лигандом или анализы, основанные на ферментативной реакции, такие как ИФА. Пробы фекалий, автолизированных тканей и спермы содержат больше интерферирующих веществ и, таким образом, являются более проблематичными для проведения анализа, чем сыворотка, кровь или свежие ткани.

1.2.5. Устойчивость

Устойчивость относится к способности анализа оставаться неизменным под влиянием небольших вариаций в ситуации тестирования, которые могут происходить во время тестирования в одной лаборатории. Оценка устойчивости должна начинаться во время разработки анализа и этапов оптимизации. Намеренное изменение параметров метода может производиться в экспериментах после определения оптимальных условий анализа. Однако если для оптимизации анализа используется титрация реактивов по нескольким факторам, могут появиться признаки нарушения устойчивости. Если небольшие различия в условиях или концентрации реактивов приводят к неприемлемым вариациям, вероятно, анализ не будет устойчивым. Своевременное выявление таких ситуаций становится важным моментом для принятия решения о том, целесообразно ли продолжать валидацию анализа, поскольку если анализ не будет устойчивым в одной лаборатории при сравнительно идеальных условиях, он вряд ли будет обладать должной воспроизводимостью при передаче в другие лаборатории.

К факторам, которые с наибольшей вероятностью будут влиять на устойчивость анализа, относятся pH, температура, партия реактивов, торговая марка титрационных микропланшетов и факторы водных и органических матриц (Dejaegher & Vander Heyden, 2006). Когда оптимизация завершена, устойчивость анализа становится частью оценки повторяемости.

1.2.6. Калибровка анализа по стандартным реактивам

1.2.6.1 Международные и национальные эталонные стандарты

В идеале, эталонные стандарты МЭБ и другие международные стандарты, содержащие известную концентрацию или титр аналита, это реактивы, по которым

стандартизируют все анализы (смотри Руководство МЭБ 310а также главу 3.6.6.). Такие стандарты готовят и распространяют референтные лаборатории МЭБ или другие международные референтные лаборатории. Национальные эталонные образцы калибруют путем сравнения с международным эталонным стандартом, если возможно; их готовит и распространяет национальная референтная лаборатория. В случае если международный эталонный образец отсутствует, национальный эталонный образец становится образцом сравнения для анализа-кандидата. Такие стандарты тщательно характеризуют с применением комплексного анализа, и, желательно, чтобы методы для их характеристики, подготовки и хранения были опубликованы в рецензируемых журналах.

1.2.6.2. Внутрिलाбораторный стандарт

Внутрिलाбораторный референтный стандарт обычно калибруют относительно международного или национального стандарта. В отсутствие одного из этих калибровочных стандартов и по возможности внутренний стандарт характеризуют тем же способом, что и международные и национальные стандарты (смотри главу 3.6.6.). Местный внутрिलाбораторный стандарт, следовательно, становится наилучшим из имеющихся стандартов и должен храниться в достаточном количестве в виде аликвот для периодического использования в качестве стандарта, по которому калибруются рабочие стандарты.

1.2.6.3. Рабочий стандарт

Один или более рабочих стандартов, обычно известных как контроли аналитов или контроли процесса, калибруют по международному, национальному или внутреннему стандарту и готовят в больших количествах, делят на аликвоты и хранят для рутинного использования при каждом проведении диагностического анализа.

1.2.7. «Нормализация» результатов тестов по рабочему стандарту

Из-за внутренних вариаций в необработанных результатах тестов, которые часто наблюдаются между разными проведениями одного и того же анализа или между лабораториями при использовании одного и того же анализа и похожих анализов, практически невозможно напрямую сравнить (полу-)количественные данные. Чтобы заметно улучшить сопоставимость результатов тестов как внутри одной лаборатории,

так и между лабораториями, в каждый цикл анализа включают один или более рабочих стандартов. Необработанные тестовые значения по каждой исследуемой пробе затем можно будет конвертировать в единицы активности относительно рабочего стандарта(ов) с помощью процесса, который называется «нормализацией». «Нормализованные» значения можно выражать разными способами, например, в виде процента положительного контроля (например, в ИФА) или в виде оцененной концентрации или титра аналита, полученных по стандартной кривой. Это является хорошей практикой включать рабочие стандарты во все циклы анализа во время разработки и валидации анализа, так как это позволяет «нормализовать» данные для получения валидного средства непосредственного сравнения результатов между циклами анализа. Обязательно осуществлять контроль (абсолютной) вариации нормализованных стандартов, так как иначе нормализация может быть причиной отклонений.

Дополнительную информацию см. в главах 3.6.111 *Разработка и оптимизация анализа по обнаружению антител*, 3.6.212 *Разработка и оптимизация анализа по обнаружению антигенов* и 3.6.313 *Разработка и оптимизация анализов по обнаружению нуклеиновой кислоты*.

1.2.8. Предварительное изучение повторяемости

Оценка повторяемости должна начинаться во время этапов разработки и оптимизации. Своевременное выявление таких ситуаций становится важным моментом для принятия решения о том, целесообразно ли продолжать валидацию анализа.

Повторяемость далее верифицируют на этапе 1 валидации анализа (Раздел 2.1.1.). Когда оптимизированный тест проводится в рутинных лабораторных или полевых условиях (Этап 4 валидации анализа), то повторяемость постоянно контролируют как часть процедуры контроля в течение всего срока использования анализа (смотри Раздел 2.5.1).

2. ПУТЬ ВАЛИДАЦИИ АНАЛИЗА

Валидация — это процесс определения пригодности анализа, разработанного, оптимизированного и стандартизированного надлежащим образом для предусмотренного

11 Доступно на: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.01_ANTIBODY_DETECT.pdf

12 Доступно на: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.02_ANTIGEN_DETECT.pdf

13 Доступно на: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.03_NAD_ASSAYS.pdf

назначения. Валидация включает оценку аналитических и диагностических характеристик метода. В контексте данного документа, анализ который завершил все три стадии пути валидации (Рисунок 1), включая характеристику рабочих свойств, может считаться «валидированным для первоначального предназначения».

2.1. Этап 1 – Аналитические характеристики

В идеале, дизайн исследований, указанных в следующих разделах, должен состояться с помощью статистика и эксперта по болезням, чтобы размер образца и экспериментальный подход были валидными. Есть возможность спланировать эксперименты, которые эффективно предоставляют информацию о вероятных внутри- и межлабораторных источниках вариации в прецизионности анализа (см. сноску 4 в Разделе А.2.2, выше), в которой дано определение рабочих характеристик анализа. Выбор организмов, штаммов или серотипов для оценки аналитической специфичности должен отражать имеющиеся знания и, следовательно, сообщать наилучший из возможных экспериментальных дизайнов для нацеливания на определенные аналиты.

2.1.1. Повторяемость

Повторяемость – это уровень согласованности между результатами дублирующих проб как внутри, так и между циклами одного метода тестирования в данной лаборатории.

Повторяемость определяют путем оценки вариаций по результатам дублирующих проб. Количество дублирующих проб предпочтительно определять вместе со статистиком. Рекомендуются как минимум три дублирующие пробы, представляющие активность аналита в рамках рабочего диапазона анализа. Аликвоты каждого из этих образцов помещают в соответствующее количество отдельных сосудов в виде трех одинаковых копий первоначальной пробы, содержащей оригинальный аналит и концентрацию матрицы (См. Руководство МЭБ по валидации 3.6.6 (сноска 8). Затем каждую копию прогоняют по всем этапам анализа, включая приготовление рабочего разведения, как если бы это была исследуемая проба, полученная из популяции, для которой предназначен анализ. Нельзя готовить конечное рабочее разведение пробы в одной пробирке, из которой разведенные аликвоты помещают с помощью пипетки в реакционные сосуды или делать дублирующие пробы из одной экстракции нуклеиновой кислоты, вместо экстракции каждой дублирующей пробы до разведения в реакционных сосудах. Такие «пробы» не считаются валидными дубликатами для изучения повторяемости. Вариацию между циклами определяют с использованием одних и тех же проб в нескольких циклах с участием двух или более операторов в разные дни. Вариации по результатам дублирующих проб могут выражаться в виде стандартных отклонений, коэффициентов вариантов (стандартное отклонение+среднее значение дублирующих проб) или других возможных вариантов (См.

2.1.2. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность (ASp) – это способность анализа дифференцировать целевой аналит (например, антитело, организм или геномную последовательность) от нецелевых аналитов, включая компоненты матрицы. Оценка является качественной и выбор и источники типов, организмов и последовательностей для оценки Asp должен отражать цель теста и тип анализа. В главах 3.6.1., 3.6.2. и 3.6.3 *Руководства по наземным животным* (сноски 11, 12 и 13) можно найти информацию по анализам на обнаружение антитела, антигена и нуклеиновой кислоты соответственно. Asp документируют во время Этапа 1 валидации и идентифицируют перекрестные реакции. Допустима кросс-реактивность (ASp менее 100%) в зависимости от целевого назначения анализа. Влияние кросс-реактивности далее документируют на этапе 2 (Обнаружение диагностической специфичности) и оценивается во время выполнения Этапа 4.

2.1.2.1. Селективность

Селективность относится к степени, в которой метод может точно определить количество целевого аналита в присутствии: 1) интерферирующих веществ, таких как компоненты матрицы (например, ингибиторов ферментов в реакционной смеси); 2) дегрантов (например, токсических факторов); 3) неспецифического связывания реагирующих веществ с твердой фазой (например, конъюгата ИФА, абсорбированного к лунке титрационного микропланшета); 4) антител к вакцинации, которые можно перепутать с антителами к активному заражению. Такие интерферирующие вещества могут вызывать ложно пониженный или ложно повышенный ответ в анализе, который отрицательно влияет на его аналитическую специфичность. Vessman *et al.* (2001) представили полезный обзор по селективности для аналитической химии, из которого взято изменение, описанное в данном разделе, для применения в отношении диагностических тестов.

2.1.2.2. Эксклюзивность

Эксклюзивность – это способность анализа обнаруживать аналит или геномную последовательность, уникальную для данного целевого организма, и исключать все другие известные организмы, которые могут перекрестно реагировать. Это определение также относится к подтверждающему анализу.

2.1.2.3. Инклюзивность

Инклюзивность – это способность анализа обнаруживать несколько штаммов или сероваров вида, нескольких видов рода или похожей группы близкородственных организмов или антител к ним. Инклюзивность характеризует область действия для скринингового анализа.

2.1.3. Аналитическая чувствительность

Предел обнаружения (ПО) – это измерение аналитической чувствительности (ASe) анализа. ПО является оцененным количеством аналита в указанной матрице, которое будет давать положительный результат, по крайней мере, в течение указанного процента времени. Обычно оцененный ПО будет основан на обогащении целевой матрицы аналитом. Выбор аналита (например, видов, штаммов) является частью определения ASe. Он должен быть зарегистрирован должным образом. Данные эксперименты могут быть разработаны для прецизионной и точной оценке вероятности (например, 50% или 100%), но при некоторых обстоятельствах приемлема консервативная оценка ПО (например, 100%). Например, при титрации с использованием 10-кратных разведений все копии во всех разведениях могут показывать как 100%, так и 0% ответ. На данном этапе выбор состоит из двух опций. Последующее разведение, показывающее 100% ответ, может быть принято в качестве консервативной оценки нижнего предела обнаружения. Более точная оценка может быть получена на втором этапе эксперимента с использованием более узких интервалов в схеме разведения с фокусом на области от 100% до 0%. Методы статистической оценки данных ПО находятся в Главе Руководства по наземным животным 3.6.515 *Статистические подходы к валидации*.

2.1.4. Аналитическая точность вспомогательных тестов или процедур

Некоторые методы или процедуры тестирования можно квалифицировать для использования в качестве аналитических инструментов в диагностической лаборатории. Это обычно вторичные вспомогательные тесты или процедуры, которые применяются к аналиту, обнаруженному в первичном анализе. Цель таких аналитических инструментов – дополнительная характеристика аналита, обнаруженного в первичном анализе. Примеры таких вспомогательных тестов включают нейтрализацию вируса для типирования выделенного вируса и молекулярное секвенирование.

Такие вспомогательные тесты нужно валидировать для определения аналитических характеристик (Разделы А.2 – В.1.3 выше). Однако они отличаются от диагностических тестов, потому что для них не требуется валидация для определения диагностических характеристик (Разделы В.2 – В.4 ниже), если их результаты не используются для проведения окончательной диагностики в отношении предусмотренного назначения. Аналитическую точность таких методик можно установить путем сравнения с эталонным стандартом реактива или по характеристикам, присущим самому методу (например, титрация в конечной точке). Во всех этих примерах целевой аналит должен подвергаться дальнейшей количественной или качественной характеристике с помощью аналитического метода.

2.2. Этап 2 – диагностические характеристики анализа

Оценка диагностической чувствительности (доля проб от известных инфицированных эталонных животных с положительным результатом в анализе) и диагностической специфичности (доля эталонных точно не зараженных животных с отрицательным результатом в анализе) – это первичные показатели рабочих характеристик, установленные во время валидации анализа. Эти оценки – основа расчета других параметров, из которых делают выводы о результатах теста (например, прогнозируемые показатели положительных или отрицательных результатов тестов). Следовательно, обязательно, чтобы оценки диагностической чувствительности и диагностической специфичности были точными насколько возможно. В идеале, их получают в результате тестирования панели проб от эталонных животных с известной историей и статусом инфекции относительно данной болезни/инфекции, и имеющих значение для страны или региона, в которых будет использоваться тест. Анализ области под рабочей характеристической кривой – это полезное дополнение к оценке диагностической чувствительности и специфичности, так как он оценивает общую точность всех тестов по возможным показателям анализа (Greiner et al., 2000; Zweig & Campbell, 1993). Этот подход подробно описан в главе 3.6.5 (сноска 15).

Обозначенное количество известных положительных и известных отрицательных проб будет зависеть от вероятных значений диагностической чувствительности и диагностической специфичности анализов-кандидатов и желаемого уровня достоверности показателей (Таблица 1 и Jacobson, 1998). В таблице 1 представлены две панели теоретического количества необходимых проб, когда при оценке диагностической чувствительности и специфичности допускается 5% или 2% ошибок. Достаточно большое количество проб необходимо для достижения высокой степени уверенности (обычно 95%) в оценке диагностической чувствительности и специфичности, если желательно минимальное количество ошибок при оценке. Например, сравнение 2% ошибок против 5% ошибок для 90% и 95% уверенности в диагностической чувствительности и диагностической специфичности показывает значительное увеличение (864 против 138) в количестве требуемых образцов.

Ввиду логистических и финансовых ограничений может оказаться, что для оценки потребуется количество проб ниже оптимального, и в этом случае доверительный интервал, рассчитанный для диагностической чувствительности и диагностической специфичности, будет означать меньший диагностический доверительный уровень результатов. Объем выборки также может быть ограниченным ввиду возможного отсутствия эталонных популяций и эталонных стандартов МЭБ (смотри главу 3.6.5 *Руководства по наземным животным* для более подробной информации) (сноска 15). Следовательно, возможно сначала придется использовать количество проб ниже оптимального. Однако желательно повысить доверительный уровень и снизить допустимый уровень ошибок при оценке диагностической чувствительности и диагностической специфичности путем добавления дополнительного количества проб (эквивалентного статуса в исходную панель) по мере их поступления.

Таблица 2.1. Теоретическое количество проб от животных с известным статусом заражения, необходимое для определения диагностической чувствительности и диагностической специфичности в зависимости от вероятного значения диагностической чувствительности, диагностической специфичности, допустимой погрешности и доверительном уровне

Оценка диагностической чувствительности или диагностической специфичности	2% ошибка, допустимая при оценке диагностической чувствительности или диагностической специфичности			5% ошибка, допустимая при оценке диагностической чувствительности или диагностической специфичности		
	Доверительный уровень			Доверительный уровень		
	90%	95%	99%	90%	95%	99%
90%	610	864	1493	98	138	239
92%	466	707	1221	75	113	195
94%	382	542	935	61	87	150
95%	372	456	788	60	73	126
96%	260	369	637	42	59	102
97%	197	279	483	32	45	77
98%	133	188	325	21	30	52
99%	67	95	164	11	15	26

Ниже приведены примеры эталонных популяций и методов, которые могут помочь при определении рабочих характеристик валидируемого теста.

2.2.1. Популяции эталонных животных

В идеале, при выборе эталонных животных необходимо, чтобы важные переменные факторы хозяев в целевой популяции представлены животными, выбранными для заражения или подвергания воздействию целевым возбудителем, или животными, которые никогда не инфицировались или никогда не подвергались воздействию. Такие переменные факторы включают вид, возраст, пол, породу, стадию инфекции, историю вакцинации и историю болезни стада (для дальнейшей информации см. главу 3.6.6 *Руководства по наземным животным* МЭБ [сноска ⁸])

2.2.1.1. Отрицательные эталонные образцы

Истинные отрицательные образцы от животных, которые не подвергались заражению или воздействию возбудителем, вряд ли легко найти. Часто есть возможность получить такие образцы из стран, в которых болезнь была искоренена или никогда не регистрировалась. Такие образцы будут полезны, пока целевая популяция для анализа будет достаточно похожей на популяцию-источник образцов.

2.2.1.2. Положительные эталонные образцы

Обычно трудно найти достаточное количество действительно положительных животных, статус которых определен по результатам выделения патогенного организма. Возможно, потребуются образцы от животных, которые были протестированы с использованием других тестов, например, с использованием системы обнаружения нуклеиновых кислот. Кандидатный тест применяется с использованием эталонных образцов и результаты (положительные и отрицательные) классифицированы перекрестным образом в таблице 2x2. Это называется «моделью золотого стандарта», так как она предполагает, что эталонный стандарт является совершенным. Расчет пробы продемонстрирован в таблице 2, Разделе 2.2.5).

2.2.2. Образцы, отобранные от животных с неизвестным статусом

Когда так называемый эталонный стандарт является несовершенным, как обычно бывает с любым диагностическим тестом, оценка диагностической чувствительности и диагностической специфичности кандидатного теста, основанного на данном стандарте, может быть ошибочной. Эту проблему можно частично решить путем проведения анализа латентных классов совокупных результатов двух тестов, предполагая, что ни один из тестов не является совершенным.

В моделях латентных классов не предполагается, что эталонный тест является совершенным, а проводится оценка точности кандидатного теста и эталонного стандарта с использованием совокупных результатов тестов (Branscum et al., 2005; Enoe et al., 2000; Georgiadis et al., 2003; Hui & Walter, 1980). Если используется байесовский анализ латентного класса, то в анализ должны быть включены предыдущие знания об эффективности эталонного теста и кандидатного теста.

Поскольку такие статистические модели достаточно сложны и требуют критических допущений, необходимо обратиться к помощи специалистов по статистике для проведения анализа и описания формы отбора проб из целевой популяции(й), характеристик других тестов, включенных в анализ, надлежащего выбора модели и методов оценки на основании рецензируемой литературы (см. главу 3.6.5 *Руководства по наземным животным* МЭБ [сноска ¹⁵] для получения подробной информации).

2.2.3. Экспериментально зараженные или вакцинированные эталонные животные

Пробы, полученные последовательно от экспериментально инфицированных или вакцинированных животных, полезны для определения кинетики гуморального ответа или присутствия/отсутствия антигена или организмов в пробах от таких животных. Однако множество серийных результатов, полученных до и после заражения от отдельных животных, не подходят для оценки диагностической чувствительности и специфичности, потому что это нарушает статистические требования независимых наблюдений. Для этой цели подходит только отбор проб в определенные моменты времени от отдельных животных (например, одна проба, произвольно отобранная от каждого животного). Тем не менее, необходимо отметить, что, непрямые методы обнаружения аналита, подвержение воздействию организмов в экспериментальных условиях или вакцинация могут стимулировать выработку гуморального ответа, который с качественной или количественной точки зрения может отличаться от естественной инфекции в целевой популяции (Jacobson, 1998). Штамм организма, доза и способ введения экспериментальным животным это переменные, которые могут внести ошибку, когда показатели диагностической чувствительности и специфичности будут экстраполироваться на целевую популяцию. В тех случаях, когда из-за невозможности получить подходящие эталонные пробы от животных, подвергнувшихся инфицированию в естественных условиях, приходится использовать пробы от экспериментальных животных для исследований по валидации, полученные показатели диагностической чувствительности и диагностической специфичности нужно считать менее совершенной оценкой истинной диагностической чувствительности и специфичности.

2.4. Определение точки раздела (порогового значения)

Для получения показателей диагностической чувствительности и специфичности кандидатного теста, который измеряется с использованием непрерывной шкалы,

результаты теста сначала нужно свести к двум (положительной и отрицательной) или трем (положительной, промежуточной [сомнительной] или отрицательной) категориям результатов тестирования. Это завершается размещением одной или двух точек раздела (пороговое значение или точка принятия решения) на непрерывной шкале результатов теста. Выбор точки (ек) раздела должен отражать предусмотренное назначение анализа и его применение, а также поддерживать необходимую диагностическую чувствительность и специфичность анализа. Существуют разные варианты и описательные методы для определения наилучшего способа выражения диагностической чувствительности и специфичности (Branscum *et al.*, 2005; Georgiades *et al.*, 2003; Greiner *et al.*, 1995; Greiner *et al.*, 2000; Jacobson, 1998; Zweig & Campbell, 1993; и глава 3.6.5). Если в распределении показателей тестов животных с известным заражением или точно не инфицированных животных наблюдается существенное перекрывание, невозможно выбрать одну точку раздела, которая точно поможет классифицировать этих животных в соответствии с их инфекционным статусом. Вместо одной лучше выбрать две точки раздела, определяющих высокую диагностическую чувствительность (например, включение 99% значений от инфицированных животных) и высокую диагностическую специфичность (например, 99% значений от неинфицированных животных), чем одну (Greiner *et al.*, 1995).

Основную сложность при установке точек раздела на основании диагностических характеристик представляет отсутствие необходимого количества хорошо охарактеризованных проб. Альтернативы обсуждаются в Разделе 2.2.6 о предварительном принятии анализа во время получения данных для подкрепления оценки диагностической чувствительности и специфичности».

2.5. Расчет диагностической чувствительности и специфичности на основании результатов тестирования эталонных сывороток

Типичным методом для определения значений диагностической чувствительности и специфичности является тестирование эталонных образцов с помощью нового анализа и составление комбинированной 2×2 таблицы категориальных результатов тестов. В гипотетическом примере разработчик теста может сделать допущение, что показатели диагностической чувствительности и специфичности должны быть 97% и 99%, соответственно, с желаемым доверительным уровнем 95% для обоих показателей. Допустимая ошибка в оценках составляет 2%. В таблице 2.1. показано, что для оценки диагностической чувствительности нужно 279 проб от животных с известным заражением, а для оценки диагностической специфичности – 95 известно отрицательных проб. Затем пробы тестируют в новом анализе. Таблица 2 представляет собой гипотетический набор результатов, на основании которых были получены показатели диагностической чувствительности и специфичности.

В данном примере получены ожидаемые показатели диагностической чувствительности, но диагностическая специфичность оказалась намного ниже (92%)

ожидаемого значения 99%. Как следствие, ширина доверительного интервала для диагностической специфичности получилась больше, чем ожидалась. Повторный просмотр Таблицы 2.1. показывает, что для получения границы ошибки $\pm 2\%$ при диагностической специфичности 92% нужно 707 проб, но такое увеличение объема выборки может быть невозможным (см. главу 3.6.5 *Руководства по наземным животным* МЭБ [сноска ¹⁵] для получения дальнейшей информации).

Таблица 2.2. Показатели диагностической чувствительности и специфичности, рассчитанные по гипотетическому набору результатов протестированных проб от животных с известным заражением и неинфицированных животных

		Необходимое количество эталонных проб*		
		Известные положительные (279)	Известные отрицательные (95)	
Результаты теста	Положительные	270	ИП	ЛП
	Отрицательные	9	ЛО	ИО
		Диагностическая чувствительность*		Диагностическая специфичность*
		ИП/(ИП + ЛО)		ИО/(ИО + ЛП)
		96,8% (94,0 – 98,5%)**		92,6% (85,4 – 97,0%)**

* На основании таблицы 2.1. для анализа со следующими параметрами:

- 1) перед тестированием, показатель диагностической чувствительности 97%, а специфичности – 99%
- 2) 95% = требуемый доверительный уровень для показателей диагностической чувствительности и специфичности
- 3) 2% = допустимый предел ошибки при оценке диагностической чувствительности и специфичности

ИП и ЛП = истинно положительные и ложноположительные результаты, соответственно

ИО и ЛО = истинно отрицательные и ложноотрицательные результаты, соответственно

** 95% точный биномиальный доверительный уровень для рассчитанных показателей диагностической чувствительности и специфичности (информацию о доверительных уровнях смотрите главу 3.6.5 *Руководства по наземным животным* МЭБ [сноска¹⁵])

2.6. Предварительное признание анализа¹⁶

Существуют ситуации, когда невозможно или нежелательно выполнить Этап 2 программы валидации, вследствие недостаточного количества соответствующих проб от целевых животных и трудностей доступа к животным (например, трансграничные инфекционные болезни или болезни диких животных).

Опыт показал, что наибольшим препятствием при прохождении Этапа 2 программы валидации является количество определенных образцов, требуемых для подсчета диагностической специфичности и диагностической чувствительности. Формула является хорошо известной и существуют таблицы для определения количества образцов, требуемых для оценки различных уровней диагностической специфичности и диагностической чувствительности, в зависимости от желаемого предела ошибки и доверительного уровня показателей (Таблица 1 Jacobson, 1998). Формула предполагает, что учитываются мириады факторов хозяина/организма, которые могут повлиять на результаты тестирования. Так как данное предположение может быть под вопросом, предполагаемые размеры образца являются, мягко говоря, минимальными. Что касается болезни, которая не является эндемичной или широко распространенной, возможно будет невозможным первоначально получить требуемое количество образцов, но с течением времени получение дополнительной информации позволит скорректировать точку раздела (пороговое значение) или если такая корректировка не требуется, повысить доверительный уровень показателей.

Предварительное признание определяет анализ, который был оценен на Этапе 1 на основные критические параметры анализа (чувствительность анализа, специфичность анализа, повторяемость), а также на предварительные показатели диагностической специфичности и диагностической чувствительности, на основании панели хорошо охарактеризованных образцов малого выбора, содержащей целевой аналит и предварительные показатели воспроизводимости. Это представляет собой частичное завершение Этапа 2. Предварительные показатели воспроизводимости кандидатного анализа могут быть получены с использованием панели выбора хорошо охарактеризованных образцов для усиления предварительного статуса принятия анализа. Кандидатный метод тестирования обычно дублируют в лабораториях, по крайней мере, в двух институтах и панель образцов оценивают с использованием кандидатного анализа в каждой из лабораторий с использованием того же протокола, тех же реагентов, которые указаны в протоколе и сопоставимого оборудования.

¹⁶ Предварительное признание не подразумевает утверждение МЭБ. Однако это является признанием решение органов на местном, государственном или международном уровнях об условном разрешении частично валидированного анализа

Это уменьшенный вариант изучения воспроизводимости на Этапе 3 валидации анализа. При соблюдении данной процедуры предварительного признания протокол тестирования не должен быть изменен.

Предварительное признание анализа государственными или национальными органами означает, что анализ не проходил оценку на диагностические характеристики. По существу для удовлетворения этого требования лаборатория должна разработать протокол добавления и оценки образцов, как только они становятся доступными, и следовать ему. В идеале данный процесс должен быть ограничен определенными временными рамками. В течение этого времени такое накопление должно быть направлено на выполнение Этапов 2 и 3 программы валидации и определенные ситуации (чрезвычайные ситуации, мелкие виды, отсутствие других тестов и т.д.).

2.3. Этап 3 – Воспроизводимость и повышенные показатели повторяемости

2.3.1. Воспроизводимость

Воспроизводимость – это способность метода тестирования показывать постоянные результаты, определяемые по оценке прецизионности, в отношении аликвот одних и тех же проб, протестированных в разных лабораториях, предпочтительно расположенных в определенных или разных регионах или странах, с использованием одного и того же анализа (протокол, реагенты и контролей). Для оценки воспроизводимости анализа, каждая из, по крайней мере, трех лабораторий проводит тестирование одной и той же панели проб (вслепую), содержащих минимум 20 проб с одинаковыми аликвотами, которые поступили в каждую лабораторию (см. главу 3.6.6 *Руководства по наземным животным* МЭБ [сноска ⁸]). Такое испытание также позволяет получить предварительные данные по неслучайным эффектам, связанным с применением анализа в других лабораториях. Кроме этого, показатели внутрилабораторной повторяемости возрастают с дублирующими пробами, используемыми в исследованиях воспроизводимости. Показатели прецизионности можно оценить как для данных воспроизводимости, так и повторяемости (см. главу 3.6.4 *Руководства по наземным животным* МЭБ [сноска ¹⁴]) для дальнейших пояснений и по применению).

Для полевых испытаний воспроизводимость нужно оценивать в условиях назначенной цели.

2.3.2. Назначение валидированного анализа

По завершении Этапа 3 валидации при условии, что предварительные этапы были полностью завершены с удовлетворительными результатами, анализ может быть определен как «валидированный для первоначального целевого назначения». Сохранение данного

определения зависит от постоянного мониторинга характеристик анализа, как описано в Разделе 2.5.1.

2.4. Этап 4 – Осуществление программы

Успешное применение анализа обеспечивает дополнительными и ценными доказательствами его рабочих характеристик в соответствии с прогнозами. Более того, (истинная) превалентность диагностической особенности целевой популяции является важным фактором, который необходимо учитывать в соответствии с нижеуказанным.

2.4.1. Соответствие назначению

Вместе с тем, что глава посвящена валидации и соответствию назначению с научной точки зрения, необходимо также отметить, что другие практические факторы влияют на использование анализа с точки зрения его предполагаемого назначения. Эти факторы включают не только диагностическое соответствие анализа, но и его приемлемость для научных и регламентирующих сообществ, клиентов и осуществимость при наличии доступных ресурсов лаборатории. В отношении некоторых болезней многочисленные анализы могут быть доступны для использования в комбинации с контролем болезней и программами надзора и таким образом, применение анализа, возможно, требуется оценить посредством оценки изменений в диагностической специфичности, диагностической чувствительности и прогностических значениях комбинированных тестов.

Из-за неспособности соответствовать операционным требованиям к анализу он так же может быть непригодным для предусмотренного назначения. Такие требования могут включать: затраты на обеспечение результативности, доступность оборудования, уровень технических знаний и умений интерпретирования, доступность набор/реагента, срок годности, требования к транспорту, безопасность, биобезопасность, пропускная способность по исследованиям образцов, время цикла получения результатов, аспекты контроля качества и обеспечения качества, а также возможность использования анализа другими лабораториями. Тест-наборы, используемые в полевых условиях очень востребованы с точки зрения простоты использования, но из-за того, что их применяют за пределами контролируемой лабораторной среды, необходимо соблюдать дополнительные меры предосторожности для сохранения соответствия предусмотренному назначению (Crowther et al., 2006).

2.4.2. Интерпретация результатов

Прогнозируемые показатели результатов теста: Положительное прогнозируемое значение (PPV)— это вероятность того, что животное, результаты тестирования

которого были положительными, действительно является положительным с точки зрения фактического диагностического статуса. Отрицательное прогнозируемое значение (NPV) это вероятность того, что животное, результаты тестирования которого были отрицательными, действительно является отрицательным с точки зрения фактического диагностического статуса.

Прогнозируемые показатели результатов теста рассчитываются при помощи теоремы Байеса указанным ниже способом:

$$PPV = \frac{P \times DSe}{P \times DSe + (1 - P) \times (1 - DSp)}$$

and

$$NPV = \frac{(1 - P) \times DSp}{P \times (1 - DSe) + (1 - P) \times DSp}$$

где,

PPV – прогнозируемые показатели положительных результатов теста

NPV – прогнозируемые показатели отрицательных результатов тестирования

P – превалентность инфекции

DSe – диагностическая чувствительность

DSp – диагностическая специфичность

По сравнению с диагностической чувствительностью и диагностической специфичностью на прогнозируемые показатели влияет фактическая превалентность фактического диагностического статуса целевой популяции. Другими словами прогнозируемые показатели не являются присущими характеристиками определенного диагностического теста, но являются функцией его диагностической чувствительности и диагностической специфичности и местной превалентностью инфекции в определенной популяции в определенный отрезок времени.

Прогнозируемые показатели представляют важность для ветеринаров, работающих в полевых условиях для интерпретации результатов. Например, PPV равно 0,9 означает, что животное, у которого наблюдается положительная реакция на тест, имеет 90% шанс того, что оно действительно является инфицированным и 10% вероятность быть ложноположительным.

Прогнозируемые показатели положительных результатов теста имеют огромную важность для ветеринарных служб, ответственных за управление контролем или программы по искоренению. Если мы будем учитывать обратное значение прогнозируемых показателей положительных результатов теста (например, $1/PPV$), то это даст информацию о количестве денег, потраченных на отбраковку фактически и ложноположительных животных на каждое фактически положительное животное, обнаруженное в ходе надзора. Другими словами если PPV равно 0,67, это означает, что два положительных животных из трех являются фактически положительными, а остальные ложноположительными. Так как во время применения программы контроля превалентность инфекции постоянно меняется, мониторинг PPV является способом оценки затрат программы.

Более того, во время применения программы по контролю обычно предпочтительно изменять чувствительность теста, на основании вариации превалентности инфекции в целевой популяции и задачи программы, PPV может быть использован для внесения изменений в диагностическую чувствительность или диагностическую превалентность из экономических соображений. Другими словами, когда возникает необходимость внесения изменений в диагностическую чувствительность и в диагностическую специфичность, вдоль кривой ROC валидации теста могут быть установлены предполагаемые точки раздела и соответствующие величины диагностической чувствительности и диагностической специфичности для каждой точки раздела могут быть использованы для оценки предполагаемых затрат на отбраковку каждого инфицированного животного.

Если задачей является установление доказательств свободы от болезни, NPV является наиболее важной мерой. NPV в значительной мере зависит от диагностической чувствительности.

2.4.3. Признание на международном уровне

Традиционно, за признание анализов на международном уровне отвечает МЭБ, который назначает их в качестве предписанных или альтернативных тестов для международной торговли. Часто это происходит на основании данных их полезности на национальном, региональном или международном уровне. Для коммерческих тест-наборов, которые уже были подвергнуты валидации и сертификации диагностических анализов, заключительным этапом является включение в список тестов в Реестре МЭБ. Тесты, указанные в Реестре, сертифицированы как пригодные для специальной цели, если они завершили этапы валидации 1, 2 и 3. Цель Реестра – предоставить потенциальным пользователям информативный и объективный источник информации о тест-наборе и его рабочих характеристиках для предусмотренного назначения. Реестр доступен на веб-сайте МЭБ: www.oie.int/en/our-scientific-expertise/certification-of-diagnostic-tests/the-register-of-diagnostic-tests.

2.4.4. Внедрение анализа

Последнее доказательство полезности анализа – это его успешное применение в других лабораториях и включение в национальные, региональные и/или международные программы. Референтные лаборатории играют важную роль в этом процессе. Естественный прогресс в области диагностических и технологических разработок способствует тому, что новые анализы становятся новыми стандартными методами, с которыми сравнивают другие анализы. Как следствие, они могут постепенно получать признание на национальном, региональном и международном уровне. В качестве признанного стандарта эти анализы также можно использовать для разработки эталонных реактивов для целей контроля качества, повышения квалификации и гармонизации. Такие эталонные реактивы могут также стать международными стандартами.

Оценку воспроизводимости следует проводить повторно, когда тест переносят из лаборатории-разработчика в полевые условия, относится ли это к использованию в местных лабораториях или к анализу проб в полевых условиях. Предсказуемые изменения, например, крайние температуры и уровень опыта оператора, нужно оценивать как дополнительные источники вариации в результатах анализа, которые могут повлиять на показатели воспроизводимости.

2.5. Мониторинг характеристик анализа после первоначальной валидации

2.5.1. Мониторинг анализа

Для сохранения статуса валидированного анализа необходимо обеспечить, чтобы первоначально валидированный анализ постоянно поддерживал рабочие характеристики, определенные во время валидации анализа. Это может быть определено в программах по обеспечению качества посредством мониторинга ежедневных результатов анализа первоначально посредством показателей прецизионности и точности для внутренних контролей, а также других тенденций статистического выброса. Мониторинг результативности можно осуществлять графическим способом посредством составления графика контрольных параметров на контрольных картах¹⁷. Отклонения от ожидаемых характеристик следует анализировать, чтобы принять корректирующие меры при необходимости. Такой мониторинг позволяет получить критические доказательства, что анализ сохраняет свое

¹⁷ Контрольная карта: Графическое представление данных повторного измерения контрольных образцов, исследуемых в различных циклах анализа в течение периода времени.

«валидированное» назначение во время фазы внедрения анализа. Воспроизводимость оценивают с использованием программ внешнего контроля качества, таких как квалификационные испытания. Если анализ прекращает демонстрировать результаты, которые соответствуют первоначальным данным по валидации, то анализ должен считаться непригодным для предусмотренного назначения. Так, валидированный анализ может быть подвержен постоянной оценке для обеспечения его пригодности предусмотренному назначению.

2.5.2. Модификации и улучшения – соображения по поводу изменений в анализе

Со временем может возникнуть необходимость в модификации анализа в связи с изменениями в предусмотренном назначении (т.е. модификации анализа для корректировки диагностической результативности) или технических модификациях для улучшения эффективности или рентабельности анализа. Для изменения предусмотренного назначения анализа обязательно проведение пересмотренной валидации начиная со 2 этапа.

Если анализ будет применяться в другом географическом регионе и/или популяции, рекомендуется провести повторную валидацию при новых условиях. Линии или сублинии инфекционного агента, выделенного от животных в разных географических регионах, отличаются и требуют повторной валидации анализа для указанной целевой популяции.

Особенно это относится к системам обнаружения нуклеиновых кислот (NAD), поскольку у многих возбудителей инфекционных болезней (например, в РНК вирусах) происходят точечные мутации. Мутации, которые могут происходить в сайтах праймеров или зондов, могут влиять на эффективность анализа и даже делать недействительными рабочие характеристики. Также рекомендуется регулярно подтверждать целевую последовательность в выбранных областях генома для национальных или региональных изолятов возбудителей инфекционных болезней. Особенно это касается сайтов праймеров или зондов: необходимо обеспечить, чтобы они оставались стабильными, а показателям диагностической чувствительности и специфичности анализа ничего не угрожало.

Похожая ситуация может произойти с появлением новых подтипов существующих патогенных организмов. В данных обстоятельствах, возможно, потребуются модифицировать существующие анализы.

2.5.2.1. Технические модификации и оценки сопоставимости

Технические модификации валидированного анализа, например, изменения в приборах, протоколах экстрагирования и конверсии анализа в полуавтоматическую или автоматическую систему с использованием робототехники обычно не требуют

проведения полной повторной валидации анализа. Скорее, сравнительное исследование методов проводится для определения того, могут ли относительно незначительные модификации анализа повлиять на ранее задокументированные рабочие характеристики анализа. Сопоставимость можно установить путем одновременного проведения модифицированной процедуры и оригинальной процедуры с такой же панелью образцов в обоих тестах в нескольких циклах. Панель, выбранная для этого сравнения должна представлять весь рабочий диапазон обоих анализов. Если результаты модифицированной процедуры и изначально валидированного метода признаны сопоставимыми в эксперименте на основании ранее определенного критерия, модифицированный анализ остается валидным для своего предусмотренного назначения. Описание экспериментов, которые подходят для тестирования сопоставимости см. в главе 3.6.8. *Руководства по наземным животным* МЭБ [сноска ⁹], а информацию о панелях проб см. в главе 3.6.6. *Руководства по наземным животным* МЭБ [сноска ⁸].

2.5.2.2. Биологические модификации и оценка сопоставимости

Могут возникать ситуации, когда необходимо или оправданно внести изменения в какие-либо биологические препараты, используемые в анализе. Это может включать изменения в саму образец исследования (напр. изменения в ткани, подлежащей исследованию или, возможно, исследование в параллели другого вида животного). Это может включать изменения в реагенты (напр. замена рекомбинантного антигена на антиген, полученный из культуры ткани или замена одного конъюгата антитела на другой со схожей иммунологической специфичностью в ИФА). Трудности при осуществлении любого изменения лежат в определении того, требует ли изменение полной ревалидации анализа, как на документарном уровне, так и на уровне применения. По меньшей мере, любое изменение требует оценки соответствующих «аналитических предпосылок» Этапа 1. Более трудное решение относится к «диагностическим характеристикам» Этапа 2. Чтобы помочь в этом, исходный (эталонный) анализ следует сначала сравнить с модифицированным (кандидатным) анализом в контролируемом исследовании с использованием определенной панели положительных и отрицательных диагностических образцов. См. Раздел 3.6.8 *Руководства по наземным животным* (сноска ⁹) для описания оценки сопоставимости. Если оценка сопоставимости не предполагает изменения диагностических характеристик, модифицированный анализ можно ввести в повседневное использование. Если, с другой стороны, наблюдаются различия в диагностической чувствительности и диагностической специфичности, для применения модифицированного анализа потребуется дополнительный Этап 2 или проверка в полевых условиях.

2.5.2.3. Замена истраченных реактивов

Если реактив, например контрольный образец или рабочий стандарт, подходит к концу, нужно приготовить и повторно протестировать замену до того, как этот контрольный образец закончится. Будущий контрольный образец необходимо включить в несколько циклов анализа параллельно с оригинальным контролем для определения их пропорциональной связи. По возможности нужно менять только один реактив за раз, чтобы избежать сложностей с оценкой более чем одной переменной.

2.5.3. Укрепление уверенности в критериях валидации

Так как большинство переменных, связанных с хозяевами, оказывают влияние на диагностические характеристики анализов, желательно со временем увеличивать количество эталонных проб или проб подходящих для анализа латентных классов. План пробоотбора, сбор, транспортировка и среда проведения теста в отношении новых проб должны быть теми же самыми, что и использованные для первоначальной валидации. Увеличение количества проб повышает прецизионность общих показателей диагностической чувствительности и диагностической специфичности и позволяет рассчитывать показатели диагностической чувствительности по таким факторам, как возраст, стадия болезни и нагрузка организма. Ежегодно в соответствующие досье теста нужно включать новые данные.

2.5.4. Верификация существующих анализов (внутренняя валидация)

Если лаборатория рассматривает использование валидированного коммерческого набора или кандидатного анализа на основании опубликованной литературы с данными по валидации то потребуется проведение верификации для определения соответствия анализа заявлениям производителя набора или автора, применительно к критериям валидации Этапа 1, в контексте предусмотренного применения. Это может потребовать проведения ограниченной верификации Asp и ASe с использованием доступных референтных материалов независимо от того, являются ли они внешними и/или приобретенными на местном уровне из целевой популяции. Когда лаборатория уверена, что анализ выполняется в соответствии с описанием с аналитической точки зрения, то при переходе на ограниченный Этап 2 валидация должна рассматриваться в контексте предусмотренного применения и целевой популяции, перед тем как анализ внедряется в рутинное диагностическое использование.

2.3. ЛИТЕРАТУРНЫЕ ИСТОЧНИКИ

BRANSCUM A.J, GARDNER I.A. & JOHNSON W.O. (2005). Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modelling. *Prev. Vet. Med.*, **68**, 145–163.

CROWTHER J.R., UNGER H. & VILJOEN G.J. (2006). Aspects of kit validation for tests used for the diagnosis and surveillance of livestock diseases: producer and end-user responsibilities. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **25** (3), 913–935.

DEJAEGHER B. & VANDER HEYDEN Y. (2006). Robustness tests. *LCGC Europe*, **19** (7), online at <http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/content/printContentPopup.jsp?id=357956>.

ENØE C., GEORGIADIS M.P. & JOHNSON W.O. (2000). Estimating the sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Prev. Vet. Med.*, **45**, 61–81.

FINDLAY J.W.A. & DILLARD R.F. (2007). Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *AAPS J.*, **9** (2), E260-E267. (Also on-line as AAPS Journal [2007]; 9 [2], Article 29 [<http://www.aapsj.org>]).

GEORGIADIS M., JOHNSON, W., GARDNER I. & SINGH R. (2003). Correlation-adjusted estimation of sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Appl. Statist.*, **52** (Part 1), 63–76.

GREINER M., SOHR D. & GÖBEL P. (1995). A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J. Immunol. Methods*, **185**, 123–132.

GREINER M., PFEIFFER D. & SMITH R.D. (2000). Principles and practical application of the receiver operating characteristic (ROC) analysis for diagnostic tests. *Vet. Prev. Med.*, **45**, 23–41.

HUI S.L. & WALTER S.D. (1980). Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics*, **36**, 167–171.

JACOBSON R.H. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17**, 469–486.

VESSMAN J., STEFAN R., VAN STADEN J., DANZER K., LINDNER W., BURNS D., FAJGELJ A. & MULLER H. (2001). Selectivity in analytical chemistry. *Pure Appl. Chem.*, **73** (8), 1381–1386.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2008). OIE Standard for Management and Technical Requirements for Laboratories Conducting Tests for Infectious Diseases. OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. OIE, Paris, France, 1–31.

ZWEIG M.H. & CAMPBELL G. (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.*, **39**, 561–577.

*
* *

ЧАСТЬ 2

РЕКОМЕНДАЦИИ, ПРИМЕНИМЫЕ В ОТНОШЕНИИ КОНКРЕТНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

1. КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ОРГАНИЗАЦИИ И ОСУЩЕСТВЛЕНИЮ ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ¹⁸

Для всестороннего подхода к контролю здоровья водных животных в культуре водных животных необходимы:

- **Оценка статуса по здоровью водных животных с использованием методов, основанных на руководящих указаниях, изложенных в *Ветеринарно-санитарном кодексе по водным животным* (Всемирная организация по охране здоровья животных, 2014 г.), и соответствующих задачах систем надзора, изложенных в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Всемирная организация по охране здоровья животных, 2009 г.).**
- **Ограничение пополнения поголовья в открытых водах и на объектах по разведению только водными животными, имеющими более высокий или равный статус по здоровью по сравнению со статусом по здоровью водных животных, уже живущих в рассматриваемых местах.**
- **Искоренение болезни на аквакультурных объектах в тех случаях, когда это возможно, путем убоя инфицированных популяций, проведения дезинфекции объектов и пополнения поголовья водными животными из проверенных источников, свободных от специфических болезней.**
- **Реализация мер по обеспечению биозащиты на уровне производственной площадки; это имеет важное значение при организации и осуществлении охраны здоровья и является необходимым для предотвращения проникновения и распространения болезней водных животных.**
- **Уведомление каждой Страной-Членом по запросу со стороны ее торговых партнеров о своих особых требованиях, помимо требований, предусмотренных *Кодексом по водным животным*, относительно импортирования водных животных и продуктов, полученных из водных животных.**

В случае соблюдения описанных выше процедур становится возможным обеспечение надлежащих гарантий статуса по здоровью продуктов аквакультуры в отношении указанных болезней в зависимости от их страны, зоны или компартмента происхождения.

Выдача сертификата здоровья соответствующим должностным лицом на основании отчета о статусе по здоровью и исследований в отношении водных животных обеспечивает надлежащие гарантии того, что продукты аквакультуры в определенном грузе происходят из всей страны целиком, зоны или компартмента, свободных от одной или нескольких из указанных болезней, перечисленных в *Кодексе по водным животным* и, возможно, от других указанных болезней (смотрите образец международного сертификата в *Кодексе по водным животным*, Часть 5).

Надзор также направлен на определение присутствия или распространения эндемичной болезни или инфекции, включая изменения, касающиеся их инцидентности или

¹⁸ NB: Версия, принятая Всемирной ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2012 года.

превалентности (или обуславливающих ее факторов), для того, чтобы предоставить информацию для внутренних программ по контролю болезней, а также предоставить релевантную информацию о присутствии болезней для использования торговыми партнерами с целью качественной и/или количественной оценки рисков. Применяемый вид надзора зависит от желаемых результатов, необходимых для обеспечения поддержки процессу принятия решений.

Оценка статуса по здоровью популяций водных животных основывается на инспектировании производственных площадок и последующем лабораторном исследовании образцов, полученных от экземпляров, отобранных среди поголовья определенной популяции водных животных. Для данной работы требуется, чтобы отбор и обработка образца производились в соответствии с принятыми методами. Размеры выборок на основании статистической методологии для надзора или выдачи сертификатов здоровья следует рассчитывать с использованием руководящих указаний, изложенных в *Кодексе по водным животным* и *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Всемирная организация по охране здоровья животных, 2009 г.).

Среди ряда методов, применимых в отношении патогенов водных животных, *Руководством по водным животным* установлены два вида процедур исследования, которые будут приемлемы для такой работы: 1) Скрининговые методы и 2) Диагностические методы. Принятые методы перечислены в рамках каждой главы, посвященной болезни. Требуемый размер выборки варьирует в зависимости от намеченной цели метода диагностики болезни или обнаружения патогена. Следует принимать во внимание чувствительность и специфичность принятых методов, перечисленных в каждой главе, посвященной конкретной болезни, особенно, когда какой-либо тест используется для демонстрации свободы от болезни.

Руководящие указания, изложенные в главах, посвященных конкретным болезням, могут применяться в отношении всех болезней водных животных, их возбудителей и восприимчивых видов, перечисленных в *Руководстве по водным животным*, и предназначены для того, оказать помощь в разработке методологий осуществления надзора. Данные руководящие указания также применимы в отношении других болезней водных животных, которые не включены в *Руководство по водным животным*, но которые могут иметь важное значение для какой-либо страны или региона, как, например, новые или эмерджентные болезни. В тех случаях, когда это возможно, разработка систем надзора с использованием данных руководящих указаний должна основываться на соответствующей информации, приведенной в главах, посвященных отдельным болезням.

Иногда в какой-либо стране/зоне/компарimente присутствует более чем один восприимчивый вид. Если иное не указано в главе, посвященной отдельной болезни, в настоящем *Руководстве по водным животным*, то в отношении отбора образцов следует рассматривать все восприимчивые виды.

Оценка статуса по здоровью популяций водных животных основывается на надзоре, который включает в себя отбор образцов и тестирование эпизоотологических единиц. Эта работа предусматривает разработку и реализацию систем надзора согласно описанному в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Всемирная организация по охране здоровья водных животных, 2009 г.), отбор образцов и проведение оценки статуса по здоровью эпизоотологических единиц, согласно описанному в данной главе, а также

тестирование образцов, в соответствии с методами, описанными в главах, посвященных отдельным болезням.

2. ЦЕЛЕВЫЕ ПАТОГЕНЫ И БОЛЕЗНИ

Целевые патогены и болезни водных животных включены в *Кодекс по водным животным* по следующим основным соображениям: было показано, что данная болезнь вызывает значительные производственные потери на национальном или многонациональном (зональном или региональном) уровне, или было показано, что болезнь, или научные данные показывают, что она, по всей вероятности, оказывает негативное воздействие на популяции водных животных, или возбудитель представляет собой угрозу здоровью населения, и доказана инфекционная этиология болезни, или инфекционный возбудитель тесно ассоциирован с болезнью, но этиология пока еще неизвестна, и существует вероятность международного распространения, в том числе через живых животных, полученные из них продукты или фомиты, и несколько стран или стран с зонами могут быть объявлены свободными от данной болезни на основании общих принципов надзора, описанных в Главе 1.4 *Надзор за здоровьем водных животных Кодекса по водным животным*, и существует воспроизводимое и робастное (устойчивое) средство обнаружения/диагностики. Что касается действующего списка болезней МЭБ, пожалуйста, обратитесь к текущей редакции *Водного кодекса*. Настоящее *Руководство по водным животным* включает в себя главы по конкретным болезням, включая все болезни, перечисленные в *Водном кодексе*.

Надзор также может быть разработан и в отношении болезней, не включенных в список, в особенности, в отношении эмерджентных болезней.

Было бы нецелесообразно попытаться разработать систему надзора в отношении всех известных болезней водных животных в какой-либо стране. В этой связи следует определить порядок приоритетности болезней, которые необходимо включить в систему надзора, путем рассмотрения:

- **необходимости предоставления гарантий в отношении статуса по болезни для целей торговли,**
- **ресурсов страны, принимая во внимание, что, даже если страна располагает весьма небольшими ресурсами, стандарты тестирования не должны отличаться. Соответствие стандартам в целях поддержки торговли должно являться одним из торговых требований, отступление от которого возможно только при согласовании импортирующей страной,**
- **риска, который различные болезни представляют для внешней торговли (страны назначения) и внутренних перемещений (различных регионов/зон в стране происхождения).**

Понятие риска включает в себя вероятность возникновения болезни, способность распространяться и тяжесть ее последствий. Данные аспекты более подробно рассматриваются в Главе 2.1 Анализ рисков, связанных с импортом *Водного кодекса*.

3. ОТБОР ОБРАЗЦОВ

3.1. Цели отбора образцов

Существует по меньшей мере три цели, для которых может производиться отбор образцов в популяциях водных животных. Это:

- 1) надзор;
- 2) выдача сертификатов здоровья, а также
- 3) расследование вспышек болезней.

Количество и вид образцов, которые необходимо отобрать для анализа, а также процедура отбора образцов в значительной степени варьирует в зависимости от того, для какой из данных целей применяется.

3.2. Количество эпизоотологических единиц, подлежащих отбору образцов

Размеры выборок на основании статистической методологии для надзора или для выдачи сертификатов здоровья следует рассчитывать с использованием руководящих указаний, изложенных в главе 1.4. *Кодекса по водным животным* (и в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Всемирная организация по охране здоровья животных, 2009 г.).

При проведении исследований вспышек болезней, количество и статус единиц, подлежащих отбору образцов, следует определять, руководствуясь соответствующей главой *Руководства по водным животным*, где рассматривается дефиниция случая.

Отбор водных животных должен охватывать статистически адекватное количество экземпляров, хотя очевидно, что необнаружение определенных патогенов в образце не гарантирует отсутствия данных возбудителей в исследуемом экземпляре или в популяции. Это особенно справедливо в отношении вольных или одичавших популяций, из которых сложно отобрать репрезентативную или рандомизированную (случайную) выборку. Тем не менее, риск того, что какой-либо патоген «ускользнет» от системы надзора, сокращается на производственных объектах, поголовье которых инспектировали и проверяли на наличие патогенов на протяжении периода продолжительностью в несколько лет (по меньшей мере, двух), в том случае, если они не подвергаются воздействию возможной реконтаминации со стороны одичавших популяций.

Для всех болезней настоятельно рекомендуется планировать составление графика отбора образцов (например, на основе графика фермы, сезона и т.д.) таким образом, чтобы отбор образцов конкретной стадии (стадий) жизни производился в период времени, когда вероятность обнаружения патогена, о котором идет речь, наиболее велика. Это имеет особенно важное значение в случаях, когда имеющиеся в распоряжении диагностические методы полагаются на простую микроскопию или гистологические методы и не включают в себя молекулярные методы.

Любые вопросы, связанные с кластеризацией инфекции, характеристиками тестов и многочисленными источниками информации, а также с обеспечением качества отражены в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Всемирная организация по охране здоровья животных, 2009 г.).

3.2.1. Отбор образцов для демонстрации свободы от болезни

Для демонстрации свободы от болезни следует выбирать водных животных таким образом, который повышает вероятность обнаружения патогена в случае его присутствия, соответственно повышая чувствительность принятого диагностического метода. Например, отбор в качестве образцов ракообразных или рыб, которые являются вялыми или приближаются к краям прудов, резервуаров или выростных каналов, повышает шансы выявления инфицированных особей. Поэтому следует преимущественно выбирать умирающих животных с клиническими признаками, сообразными с рассматриваемой болезнью, а остальная часть выборки должна состоять из выбранных в произвольном порядке животных из интересующей популяции. Подобным же образом, в тех случаях, когда известна информация о факторах риска в отношении болезни/инфекции, о которой идет речь, отбор образцов следует проводить среди единиц наиболее высокого риска, чтобы повысить шансы обнаружения патогена.

Цель данной стратегии целевого отбора образцов состоит в том, чтобы повысить предтестовую вероятность выборок, имеющих в своем составе инфицированных особей. Эффект заключается в том, чтобы «вызвать смещение» в сторону обнаружения болезни. Важно помнить, что в случаях, когда выборка является смещенной, положительные результаты тестирования на наличие какого-либо патогена нельзя использовать для получения точной оценки превалентности болезни в интересующей популяции. Например, результат в виде единственной положительной особи, полученный для выборки, состоящей из 100 умирающих животных, не обязательно говорит о превалентности на уровне 1% для популяции в целом.

Чувствительность и специфичность теста имеют важное значения для расчета размера выборки, для анализа результатов и для формулирования выводов. Чувствительность теста особенно важна при демонстрации свободы от болезни.

3.2.2. Отбор образцов для оценки уровня присутствия и распространения болезни

Чтобы оценить уровень присутствия болезни (например, оценить превалентность или инцидентность), выбранные эпизоотологические единицы должны составить репрезентативную выборку интересующей популяции в отношении оцениваемого параметра. Такая репрезентативная выборка может быть получена только путем вероятностной выборки. Отбор выборки среди единиц из соображений удобства или попытка целенаправленно создать репрезентативную выборку путем отбора единиц не позволит получить репрезентативные выборки.

В то время как отбор репрезентативной выборки ферм является более осуществимым при использовании методов рандомизированной (случайной) выборки или географической выборки, возможности для отбора истинно случайной выборки в условиях аквакультуры представляются редко. Например, простой случайный отбор выборки можно использовать в случае, если водное животное может быть идентифицировано в индивидуальном порядке и пронумеровано (иногда это возможно для некоторых животных маточного поголовья).

При любой возможности следует изыскивать инновационные методы, чтобы добиться randomness (случайности). Такие методы могут быть возможны в тех случаях, когда имеется доступ ко всем особям/единицам в популяции. Например, во время переработки манипуляции с каждым животным могут, в некоторых случаях, производиться в индивидуальном порядке, и можно разработать схему систематического случайного отбора выборки.

Хотя в аквакультуре, как правило, используются неслучайные выборки, технически невозможно использовать их в статистическом анализе. В тех случаях, когда невозможно отобрать истинную случайную выборку, можно произвести удобную или бессистемную выборку, хотя она и не позволит получить истинно репрезентативную выборку, и, следовательно, оценки показателей будут смещены, часто неизвестно, в каком направлении. Методы для отбора неслучайной выборки, которые могут дать относительно более репрезентативные результаты, к примеру, включают отбор выборки с использованием накидной сети (cast-net sampling) в случае ракообразных. Использование кормовых лотков или гранул следует избегать, поскольку выбранные животные были бы относительно более здоровыми, вследствие чего нередко получают заниженную оценку уровня присутствия и превалентности болезни или патогена, о которых идет речь. Учитывая смещение результатов, рекомендуемое процедурами отбора образцов, описанными в данном тексте, важно отметить, что эти результаты нельзя использовать для определения риска вспышки или показателей вспышки, поскольку данные сильно смещены в сторону превалентности болезни. Для оценки рисков требуется истинная случайная схема отбора выборки.

В случаях, когда задача будет заключаться в том, чтобы оценить превалентность инфицированных ферм в какой-либо стране, работа будет проводиться в два этапа. На первом этапе будет отобрана репрезентативная выборка ферм с использованием методов, таких как методы, описанные в Survey Toolbox¹⁹. На втором этапе будет проводиться исследование в отношении каждой выбранной фермы для того, чтобы оценить, является ли ферма свободной от данной болезни или нет, с использованием методов, которые были описаны в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (2009 г.). Доля инфицированных ферм в данном исследовании может быть использована для того, чтобы оценить превалентность инфицированных ферм в стране.

3.2.3. Отбор образцов для расследования вспышек подозреваемой болезни

Расследование клинической вспышки требует логического и систематического подхода, основанного на клиническом опыте, для того, чтобы выбрать особей и правильные диагностические тесты. Для диагностического тестирования следует

¹⁹ Survey Toolbox for Aquatic Animal Diseases - A Practical Manual and Software Package [Исследовательский инструментарий для болезней водных животных - Практическое руководство и пакет программного обеспечения]. Cameron A.R. (2002). Australian Centre for International Agricultural Research [Австралийский центр международных научных исследований в области сельского хозяйства] (ACIAR), Monograph No. 94, 375 pp. ISBN 1 86320 350 8.) Печатную версию можно получить от ACIAR (<http://www.aciar.gov.au>) Электронную версию можно загрузить бесплатно с <http://www.ausvet.com.au>.

выбрать достаточное количество умирающих (или с высокой степенью риска) особей на основании клинических признаков, свидетельствующих о присутствии вероятных болезненных процессов. Необходимо помнить, что многим болезням требуется множество факторов для создания условий, достаточных для того, чтобы вызвать клиническую форму болезни, и идентификация какого-либо патогена у умирающих особей, как таковая, не служит подтверждением того, что данный патоген стал побудительной причиной вспышки. Кроме того, это не означает, что неумирающие особи в той же популяции являются свободными от данного патогена.

В случаях клинической болезни следует получить тщательно выбранные экземпляры с репрезентативными поражениями из числа живых или умирающих животных. Необходимо приложить все усилия для того, чтобы отобрать образцы для диагностики в виде таких экземпляров, которые являются репрезентативными в отношении болезни (болезней), поражающей (поражающих) представляющие интерес популяции, и которые являются умирающими или клинически больными. Отбора павших экземпляров следует избегать. Когда культивируемые или дикие популяции демонстрируют клинические признаки активной формы болезни, которые являются сообразными или позволяют предположить наличие любой болезни из включенных в список МЭБ, следует принять меры для того, чтобы обеспечить, что отобранные образцы надлежащим образом сохраняются для ожидаемых диагностических тестов (смотрите Раздел 4 Диагностические методы в главах, посвященных конкретным болезням).

Вне зависимости от целей надзора, методы отбора образцов, используемые на всех уровнях, должны быть полностью задокументированы и обоснованы.

Чувствительность теста важна для расследования вспышки болезни, даже если количество ложно положительных результатов является повышенным, так как идентификация случаев имеет крайне важное значение. Как сказано выше, чувствительность и специфичность теста также важны для расчета размера выборки, для анализа результатов и для формулирования выводов.

3.3. Процедура отбора образцов

3.3.1. Выбор эпизоотологических единиц и методы отбора образцов

Данные надзора могут происходить из ряда различных источников.

Как правило, имеются учетно-регистрационные данные по смертности для объектов, связанных с культивируемыми водными животными. Тем не менее, если речь идет о местах, связанных с моллюсками, они либо редко имеются, либо имеются при более низкой периодичности наблюдения (например, кумулятивная смертность, наблюдавшаяся за двухнедельный период). Наличие регистрационно-учетных данных можно использовать для идентификации периодов неожиданно высокой смертности или необъяснимых событий, что направило бы отбор образцов к имеющим более высокую степень вероятности компонентам популяции или периодам времени, если задача состояла в том, чтобы обнаружить конкретную болезнь или инфекцию.

У многих болезней водных животных имеются общие факторы риска, связанные с заносом или передачей болезней, такие как подвергание воздействию среди возрастных классов в каком-либо регионе. Известное распределение возрастных

паттернов в пределах производственных зон помогает при разработке схем исследований.

Значение отдельных единиц на объектах аквакультурного производства часто служит основанием для периодических визитов с целью мониторинга здоровья. Взаимодействие с обычным ветеринарным врачом фермы или специалистом в области здоровья водных животных представляет собой важный источник данных для идентификации вспышек, а также для проверки и подтверждения отсутствия необъяснимых клинических случаев, возникающих в какой-либо популяции.

Водные животные, отбираемые в качестве образцов, должны быть живыми в момент отбора, если иное не указано в главах, посвященных отдельным болезням.

В ходе расследований вспышек болезней, если в популяции, подлежащей отбору образцов, присутствуют умирающие животные, их следует выбирать в первую очередь, а остальную часть выборки должны составлять выбранные в случайном порядке живые водные животные со всех участков по выращиванию, которые являются репрезентативными для исследуемой партии. Если речь идет о диких популяциях sessильных (прикрепленных) животных (например, моллюсков), компонент популяции с более высокой степенью подозрения может состоять из особей, находящихся в непосредственной близости от смертельных случаев.

3.3.2. Процедуры, осуществляемые после отбора образцов

Образцы органов, тканей и жидкостей водных животных следует отбирать и подвергать обработке так быстро после отбора экземпляров, насколько это возможно. Следует избегать замораживания образцов, если требуется провести гистологическое исследование. Однако, замораживание образцов является одним из вариантов для целей ряда специфических исследований, как, например, исследования методом биопробы, тестирование методом ПЦР, токсикологическое тестирование и даже некоторых бактериологических целей. Следовательно, наиболее подходящие образцы необходимо сохранять наиболее подходящим способом для предполагаемого диагностического теста (тестов).

Образцы следует отправлять в лабораторию, упаковав по отдельности в опечатанные асептические охлаждаемые контейнеры или на льду, однако, в тех случаях, когда они не должны быть заморожены (смотрите выше), следует избегать прямого контакта со льдом или хладагентами. При этом является весьма предпочтительным и настоятельно рекомендуется отбирать образцы от водных животных сразу же после того, как они были выбраны в месте аквакультурного производства, и хранить и обрабатывать образцы так, как описано в отдельных главах или во вводных главах для каждого вида. К образцу (образцам) должна быть прикреплена идентификационная этикетка, содержащая информацию о месте, времени, дате, виде животных, количестве отобранных образцов, состоянии (павший/умирающий) на момент отбора, а также имя и контактную информацию лица, осуществляющего отбор образца (образцов). Для этикетирования образцов следует применять нерастворимый (водостойкий или спиртоустойчивый) маркер или карандаш номер 2 при использовании прочной водостойчивой или пластиковой бумаги.

4. КЛЮЧЕВЫЕ БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО

ЧТЕНИЯ

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2014). Chapter 1.4. Aquatic animal health surveillance [ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО ОХРАНЕ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ (МЭБ) (2014 г.). Глава 1.4 Надзор за здоровьем водных животных].*In*: Aquatic Animal Health Code, seventeenth edition. OIE, Paris, France.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2009). OIE Guide for Aquatic Animal Health Surveillance [ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО ОХРАНЕ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ (МЭБ) (2009 г.). Руководство МЭБ по надзору за здоровьем водных животных]. OIE, Paris, France.

*

* *

ГЛАВА 2.1.1.

ИНФЕКЦИЯ

BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS

1. Предмет рассмотрения²⁰

В контексте данной главы, хитридиомикоз – это болезнь, возникающая в результате инфекции зооспорическим грибом *Batrachochytrium dendrobatidis* (Грибы (Fungi), Хитридиомикоты (Chytridiomycota), Ризофидиевые (Rhizophydiales)). Рекомендации в данной главе относятся ко всем видам Бесхвостых земноводных (Anura) (лягушки и жабы), Хвостатых земноводных (Caudata) (саламандры, тритоны и сирены) и Безногих земноводных (Gymnophiona) (червяги).

Все процедуры и реактивы, описываемые в данной главе, можно получить из Референтной лаборатории МЭБ. Все методы отбора образцов, гистологии, гистохимии и TaqMan-методы были валидированы (Nyatt с соавт., 2007).

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) был впервые описан в 1998 и 1999 годах (Berger с соавт., 1998; Longcore et al., 1999) и в настоящее время является признанной причиной потенциально смертельной болезни – хитридиомикоза (смотрите План Австралии по снижению угрозы хитридиомикоза, который размещен по ссылке: <http://www.environment.gov.au/resource/infection-amphibians-chytrid-fungus-resulting-chytridiomycosis>).

Болезнь привела к массовой смертности, сокращению популяций и исчезновению (вплоть до восьми видов на территории Австралии) популяций и видов земноводных по всему миру (Fisher с соавт., 2009). В настоящее время признана способность Bd быстро распространяться по популяциям земноводных (Lips с соавт., 2006; Skerratt с соавт., 2007), обуславливать высокие показатели смертности (Lips с соавт., 2006) и сохраняться при низких уровнях плотности хозяев (Woodhams & Alford, 2005). На сегодняшний день Bd был идентифицирован на всех континентах (36 стран), где существует популяция земноводных. Bd поражает свыше 350 видов амфибий и был причастен в качестве движущего фактора к сокращению более чем 200 из этих видов (Skerratt с соавт., 2007).

²⁰ NB: Версия, принятая Всемирной ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2011 года.

Было сложно определить патогенез данной кожной болезни, поскольку не было обнаружено никаких сообразных патологических изменений во внутренних органах. Две, не исключающие друг друга, гипотезы были опубликованы с целью объяснения причины гибели. Первая состоит в том, что *Bd* вырабатывает протеолитические ферменты или другие активные соединения, которые впитываются через проницаемую кожу лягушки. Вторая предполагает, что повреждение функции кожи приводит к нарушению водного и электролитного баланса (осморегуляции) воды или электролитного баланса, что приводит к смерти (Berger с соавт., 1998). В недавнем сообщении (Voyles с соавт., 2009) приводятся данные в поддержку второй гипотезы.

2.1.2. Выживание вне хозяина

Предполагалось, но не было подтверждено, что *Bd* существует вне хозяина. ДНК выделяли с камней (Lips с соавт., 2006), а также *Bd* можно выращивать в лабораторных условиях на перьях птиц и влажной почве (Johnson & Speare, 2003; Johnson & Speare, 2005; Lips с соавт., 2006). *Bd* был обнаружен в лабораторных мезокосмах, из которых были удалены *Bd*-инфицированные *Rana sphenoccephala*.

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Bd чувствителен к широкому спектру химических и физических методов обработки (Phillott с соавт., 2010). Эффективные растворы включают четвертичное аммониевое соединение, дидецилдиметиламмония хлорид (например, Path X, разведение 1 к 500 в течение 30 секунд) или бензалкония хлорид (например, F10, разведение 1 к 1500 в течение 1 минуты). Гипохлорит натрия (натрий хлорноватистокислый) эффективен при концентрациях 1% и выше. Также эффективно воздействие 70% этилового спирта и 1 мг мл⁻¹ Виркона (Virkon) в течение 20 секунд. Данные химические средства можно использовать для проведения дезинфекции в лаборатории, в хозяйстве по разведению лягушек и в полевой работе. Например, спиртовые салфетки можно использовать для дезинфекции ножниц, штангенциркулей и других инструментов в промежутках между животными. Культуры *Bd* не выживают при полном высушивании, однако на практике сохранение воды в каплях обеспечивает возможность выживания патогена в течение до 3 часов после «высыхания» (Johnson с соавт., 2003). Нагревание до температуры выше 37°C в течение 4 часов приводит к гибели спорангиев. Ультрафиолетовое излучение, которое в рутинном порядке используется для уничтожения бактерий, грибов и вирусов, неэффективно.

Bd способен расти, но при этом может не разрастаться обильно, на многих различных источниках азота (Piotrowski с соавт., 2004) и в стерильной озерной воде (Johnson & Speare, 2003; Johnson & Speare, 2005; Piotrowski с соавт., 2004). Дополнительные отдельные наблюдения позволяют предположить, что он может выживать и расти как сапробионт при отсутствии лягушек. Зооспоры могут сохранять подвижность в течение более чем 24 часа, при этом приблизительно 50% и 5% остаются подвижными по прошествии 18 часов и 24 часов, соответственно (Piotrowski с соавт., 2004).

2.1.4. Жизненный цикл

Жизненный цикл *Vd* имеет две основные стадии: подвижная, переносимая водой, недолго живущая зооспора для распространения и стационарный, моноцентрический таллом, который развивается в зооспорангий для бесполого размножения. *Vd* адаптирован к жизни в многослойном эпидермисе кожи. Талломы живут внутри эпидермальных клеток, поначалу паразитируя на клетках на глубине нескольких слоев, и имеют темп развития, который совпадает с созреванием клетки по мере того, как она перемещается в наружные слои и ороговевает. *Vd* изначально растет в живых клетках, но талломы завершают свое развитие как зооспорангии в мертвых поверхностных ороговевших клетках, лишенных органелл. Выводные трубочки обладают способностью соединяться с мембраной эпидермальной клетки и растворять ее, выходя на поверхность клетки, обычно это поверхность, которая является дистальной по отношению к телу. Распределение спорангиев во взрослых особях и головастиках показывает, что многослойный, кератинизирующийся эпидермис является необходимым условием для *Vd*, когда он встречается в качестве паразита (Berger с соавт., 1998; Marantelli с соавт., 2004). Незрелые спорангии также могут расти внутри более глубоко расположенных клеток, которые содержат кератин. Резистентные неподвижные споры обнаружены не были.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды-хозяева

Как уже говорилось выше, *Vd* был идентифицирован на шести континентах, у двух отрядов земноводных, 14 семейств и у более чем 350 видов. В обобщенном смысле можно сказать, что большинство, если не все бесхвостые и хвостатые земноводные являются восприимчивыми к инфекции *Vd*; смертность и заболеваемость варьируют от вида к виду. Смертность среди головастиков в большинстве случаев не регистрировалась (имеется одно сообщение, в котором утверждается иное) [Blaustein с соавт., 2005]) и, на сегодняшний день, жизнеспособный *Vd* не был обнаружен на икринках.

2.2.2. Восприимчивые стадии развития хозяина

Восприимчивыми стадиями развития хозяина являются все возрастные группы: личинки, метаморфы и взрослые особи (но не икринки).

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность обнаружения)

Виды значительно различаются по своей врожденной восприимчивости. Микросреда обитания и окружающая среда, в которой обитает какой-либо вид, также являются ключевыми определяющими факторами для инфекции и болезни, поскольку вирулентность снижается при более теплых температурах ($>26^{\circ}\text{C}$).

За исключением икринок, *Vd* можно обнаружить у всех возрастных категорий: личинок, метаморфов и взрослых особей посредством разнообразных методов – визуального осмотра головастиков, световой микроскопии, иммуногистохимии, электронной микроскопии, иммуноэлектронной микроскопии и количественной полимеразной цепной реакции.

2.2.4. Целевые органы и инфицируемая ткань

Целевым органом для отбора образцов является кожа (Hyatt с соавт., 2007). Одним зарегистрированным клиническим признаком хитридиомикоза является чрезмерное отслаивание кожи с поверхности эпидермиса. Отслоившаяся кожа часто происходит с вентральных поверхностей брюшка, конечностей и стоп и обычно идентифицируется (Berger с соавт., 2005a; Berger с соавт., 2005b; Pessier с соавт., 1999) по гиперкератозу и присутствию зооспорангиев. Отбор кожи на этих участках является очевидным способом максимально увеличить шансы обнаружения Bd.

2.2.5. Персистентная инфекция пожизненными носителями

Некоторые виды земноводных являются носителями длительно сохраняющихся инфекций в природных условиях при незначительном количестве или отсутствии фактических данных относительно заболеваемости или смертности. Неизвестно, являются ли такие виды пожизненными носителями.

2.2.6. Переносчики

Представители земноводных могут выступать в качестве резервуаров Bd, не демонстрируя при этом признаков инфекции. Способность Bd к выживанию в окружающей среде или в симпатрических видах позволяет ему приводить к исчезновению некоторых видов. Bd представляет собой значимый фактор риска для приблизительно 97% находящихся под угрозой полного исчезновения земноводных (Smith с соавт., 2006) и, как уже говорилось выше, ему приписывают то, что он стал причиной исчезновения некоторых видов земноводных (Fisher с соавт., 2009).

2.2.7. Известные или подозреваемые водные животные-носители

Только амфибии идентифицированы в качестве источников и носителей Bd.

2.3. Картина болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Инфекция Bd может передаваться путем контакта одного животного с другим или через контакт с переносимыми водой подвижными зооспорами. Передача на большое расстояние, как это понимают, происходит иными путями, помимо воды; включая перемещение животных в процессе международной торговли (Rowley с соавт., 2007) и, возможно, посредством перемещения контаминированной воды или влажной почвы.

2.3.2. Превалентность

Превалентность значительно варьирует в зависимости от времени года, места и вида животных. В инфицированных популяциях превалентность, как правило, составляет по меньшей мере 5%, но нередко и 90%. В тропических регионах более высокие уровни превалентности регистрируются зимой и на больших высотах. Подробную информацию о его превалентности на основании интенсивного и глобального надзора (посредством полимеразной цепной реакции в реальном времени (кПЦР) можно найти по ссылке: <http://www.spatialepidemiology.net/bd-maps/>.

2.3.3. Географическое распространение

Случаи инфекции Bd были зарегистрированы на всех континентах (смотрите выше). Актуальная информация (страны, регионы, виды животных – количество протестированных, положительные/отрицательные, метод идентификации, год сообщения, статус согласно Международному союзу охраны природы [МСОП, IUCN] и места) указана на сайте <http://www.spatalepidemiology.net/bd-maps/>. На момент публикации данной главы Bd был зарегистрирован в 72 странах, за подробной информацией, пожалуйста, обращайтесь на указанный выше интернет-сайт.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Некоторые виды земноводных сосуществуют с Bd, в то время как другие становятся жертвами болезни (Davidson с соавт., 2003; Hanselmann с соавт., 2004; Retallick с соавт., 2004). Даже в пределах видов некоторые популяции могут сосуществовать с Bd, в то время как другие сокращаются вплоть до исчезновения (Briggs с соавт., 2005). Bd следует рассматривать как высоко инфекционный и потенциально смертельный патоген, который может привести к исчезновению вида.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Вспышки хитридиомикоза, главным образом, ассоциированы с временами года (более холодные месяцы), высотой (сокращение численности по большей части ограничивается популяциями, живущими на больших высотах) и среда размножения. Что касается последней, сокращение численности наиболее ярко выражено у видов, живущих в проточных водах. Тяжесть последствий болезни для популяции также коррелирует с небольшим распространением популяций, которые являются менее плодовитыми (Williams & Hero, 1998).

ПРИМЕЧАНИЕ: Действующими в рамках данных идентифицированных «факторов» являются более сложные взаимодействия и, очевидно, присущие различия в восприимчивости.

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Отсутствует.

2.4.2. Химиотерапия

Bd восприимчив к ряду противогрибковых средств и невысоким уровням тепла ($>30^{\circ}\text{C}$) при тестировании *in vitro*, однако, существует мало проверенных методов для освобождения земноводных от Bd (Berger с соавт., 2010). Воздействие теплом (32°C в течение 5 дней и 37°C в течение двух периодов продолжительностью 8 часов с интервалом в 24 часа), как было продемонстрировано, эффективно против хитридиомикоза у двух видов амфибий (Phyllott с соавт., 2010; Woodhams с соавт., 2003). Следует провести тестирование и оптимизацию воздействия теплом на целом ряде видов, а многие земноводные умеренных широт не выдержали бы температуру 37°C . Хотя ванны как с итраконазолом (0,01% в течение 5 минут в день в течение 11 дней), так и формалином/малахитовым зеленым представляются эффективными

методами лечения для лягушек на постметаморфозной стадии развития (Forzan с соавт., 2008; Hohreiter & Rigg, 2001; Nichols & Lamirande, 2009; Parker et al., 2002), данные испытания были не настолько тщательными, при этом одной из проблем является токсичность, в особенности в случае формалина/малахитового зеленого. Тем не менее, ванны с итраконазолом широко использовались в программах по спасению и сохранению земноводных, а отдельные данные позволяют предположить, что он эффективен для взрослых и подвзрослых особей. Сообщалось об успешном лечении инфицированных головастиков одного вида в ходе контролируемого испытания с использованием низкой дозы итраконазола ($1,5 \text{ мг литр}^{-1}$), что, однако, могло сопровождаться депигментацией (Garner с соавт., 2009).

ПРИМЕЧАНИЕ: Водно-растворимая форма итраконазола доступна далеко не везде. Имелись сообщения о безопасном и эффективном способе обработки против инфекций Bd (взрослые особи и головастики) относительно вориконазола. Обработка заключается в опрыскивании один раз в день в течение 7 дней из расчета $1,25 \text{ мг литр}^{-1}$ (Martel с соавт., 2010).

2.4.3. Иммуностимуляция

Тестирование не проводилось.

2.4.4. Выведение резистентных особей

Никаких программ по выведению резистентных особей не инициировалось; однако некоторые страны разрабатывают национальные планы по контролю хитридиомикоза. Эти планы предусматривают применение санитарно-гигиенических процедур для лиц, имеющих дело с дикими земноводными, и признание того, что изолированные районы девственной природы с высокоуязвимыми видами нуждаются в защите от Bd. Еще одно направление деятельности заключается в создании содержащихся в неволе популяций для высоковосприимчивых видов, находящихся под угрозой со стороны распространяющихся эпидемических волн, или уже инфицированных популяций, претерпевающих медленное, устойчивое сокращение (Проект «Ковчег земноводных» (Amphibian Ark): <http://www.amphibianark.org/>).

2.4.5. Пополнение поголовья резистентными видами

Присутствие резистентных видов, как считают, повышает передачу угрожаяемым видам. Были организованы программы по выведению в условиях неволи с целью пополнения диких популяций угрожаяемых лягушек.

2.4.6. Блокирующие агенты

Тестирование не проводилось.

2.4.7. Дезинфекция

Сводная информация о процедурах дезинфекции обобщена в недавней статье (Phyllott с соавт., 2010), где детально описаны процедуры, касающиеся ловли диких земноводных, обращения с ними и их содержания; дезинфекции кожи до и после инвазивных процедур; маркировки лягушек; дезинфекции кожи, закрытия ран и обработки вспомогательного оборудования (Таблица 2.1.). Данные процедуры

предназначены для обеспечения мер гигиены в пределах одного места, чтобы свести к минимуму риск передачи Vd между особями. В статье также подробно описаны процедуры по мерам гигиены при входе, выходе и перемещению между местами для предотвращения повышенного риска распространения Vd выше фоновых уровней.

Таблица 2.1. Стратегии дезинфекции, которые подходят для уничтожения Vd (Retallick с соавт., 2004)

Назначение	Дезинфицирующее средство	Концентрация	Время
Дезинфицирование хирургических принадлежностей и других инструментов (например, весов, штангенциркулей)	Гипохлорит натрия	г мл ⁻¹	1 минута
	70% этиловый спирт	%	1 минута
Дезинфицирование оборудования для сбора и контейнеров	Гипохлорит натрия	1000	1 минута
	4% Х или Четвертичное аммониевое соединение 128 (Quaternary ammonium compound 128)	разведение 1 к 500	10 минут
	70% этанол	разведение 1 к 5000	1 минута
	10% формалин	разведение 1 к 5000	1 минута
	5% перекись водорода	г мл ⁻¹	1 минута
	0,1% перманганат калия	1000	10 минут
	Тепловое просушивание	70°C	1 час
	Химическая обработка	С	10 минут
	Химическая обработка	С	1 час
Дезинфицирование обуви	Гипохлорит натрия	1000	1 минута
	4% Х или Четвертичное аммониевое соединение 128 (Quaternary ammonium compound 128)	разведение 1 к 500	10 минут
	70% этанол	разведение 1 к 5000	1 минута
	10% формалин	разведение 1 к 5000	1 минута
	Тепловое просушивание	70°C	1 час
Дезинфицирование ткани/одежды	Полоскание в горячей воде	С или выше	10 минут

2.4.8. Общие практики ведения хозяйства

В случаях, когда объекты по разведению в неволе представляют угрозу для диких популяций, следует соблюдать следующие требования:

- i) Воду, отходы и другие материалы необходимо подвергать обработке с целью уничтожения *Vd* или хранить, уничтожать или удалять в место, где они не будут представлять угрозы. Например, инфицированные воды можно спускать в закрытые канализационные системы, сброс из которых осуществляется напрямую в морскую среду.
- ii) Сельскохозяйственных животных, в том числе животных, которых используют для получения продуктов питания, необходимо огородить/закрыть таким образом, чтобы предотвратить их уход во внешнюю среду.
- iii) Лица, оборудование и материалы, покидающие территорию объекта, должны проходить очистку, достаточную для того, чтобы предотвратить перенос *Vd*.
- iv) Земноводных, выпускаемых в дикую природу, необходимо содержать в условиях строгой изоляции и тестировать на наличие *Vd* перед тем, как выпустить. Если при тестировании для каких-либо экземпляров будет получен положительный результат, следует проводить обработку и повторное тестирование всех животных до тех пор, пока они не будут чистыми от инфекции.
- v) При планировании объектов, рассматривая место расположения и проектное решение, следует принимать во внимание местный статус по *Vd*, а также доступность безопасного снабжения водой и расходными материалами и безопасного уничтожения отходов. Например, деятельность по разведению лучше всего осуществлять в тропических низменных районах, где *Vd* представляет меньшую угрозу для местных видов и где легче получить доступ к более безопасному уничтожению отходов.
- vi) Там, где *Vd* присутствует на локальном уровне, необходимо принять меры для того, чтобы не увеличить уровень его содержания или не занести новые штаммы в местную окружающую среду. При осуществлении деятельности по разведению следует обеспечивать, чтобы уровень содержания в сточных водах и других материалах был снижен до фоновых уровней перед сбросом в окружающую среду и чтобы вновь прибывшие животные были обработаны и очищены перед подсаживанием к другим земноводным.

В тех случаях, когда внешние источники представляют угрозу для содержащихся в неволе коллекций, следует соблюдать следующие требования:

- i) Вода, а также другие прибывающие лица и поступающие материалы должны быть подвергнуты обработке для удаления *Vd*, за исключением тех случаев, когда известно, что они поступили из безопасных источников.
- ii) Поступающих земноводных следует изолировать и протестировать. Если при тестировании для каких-либо экземпляров будет получен положительный результат, необходимо проводить обработку и повторное тестирование всей группы до тех пор, пока они не будут чистыми от инфекции.

3. Отбор образцов

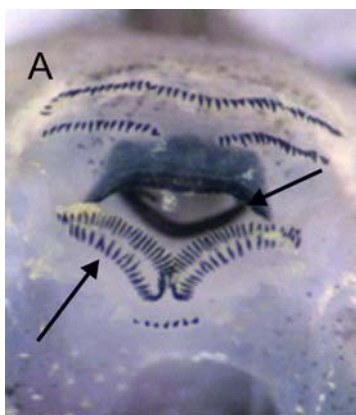
3.1. Выбор отдельных образцов

Bd реплицируется в ороговевших (кератинизированных) частях ротового аппарата головастика и, в большинстве случаев, на вентральных поверхностях и пальцах ног взрослых земноводных. Целевыми органами являются ампутированные пальцы ног («toe-clips») (не рекомендуется по этическим причинам), мазки с кожи (взрослые особи) и ротовых частей (головастики), а также метод ванн для целых животных (взрослые особи и головастики) (Huatt с соавт., 2007).

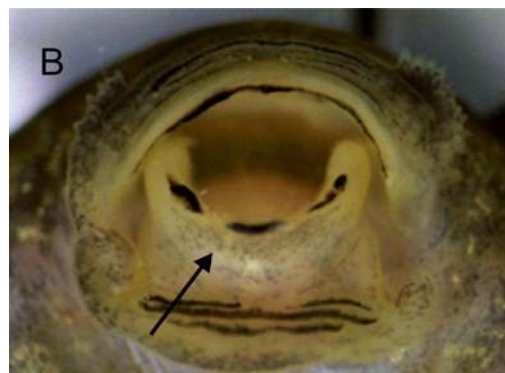
3.1.1. Ампутированные пальцы ног (взрослые особи), ротовые диски (головастики/личинки) и мазки (взрослые особи и головастики)

Иссечение пальцев ног для использования в ПЦР в реальном времени с использованием технологии TaqMan (TaqMan-ПЦР) можно произвести в полевых условиях и хранить их в сухом виде или в 70% спирте. В качестве альтернативы их можно собрать в пробирки объемом 1,5 мл и хранить при температуре -80°C до экстракции ДНК. Ампутированные пальцы ног, подлежащие обработке для гистологии, следует зафиксировать в 10% нейтральном забуференном формалине.

В полевых условиях мазки из ротовой полости головастика (с ротовых дисков – смотрите фотографии ниже) можно взять при помощи тампонов с тонким наконечником²¹. Ротовые диски также можно рассечь и высушить воздухом на фильтровальной бумаге. Инфицированных животных можно идентифицировать по депигментации (стрелочка на фотографии В) челюстных чехликов («клювика»), укороченным зубам или отсутствию зубов (Изображения предоставлены доктором D. Obbendorf; Кафедра патологии, Университет Тасмании).



Нормальный ротовой диск
(пигментированные ткани)
западной кринии, *Crinia signifera*



Восточная жаба-банджо,
Limnodystes dumerilii, пораженная
Bd

При взятии мазков у лягушек, обратную сторону ног, стопы и участок на брюшке, через который происходит всасывание воды («drink patch») следует всесторонне

²¹ Medical Wire & Equipment Co. MW100-100.

обработать тампоном (3-5 раз), а затем отломить тампон в пробирку объемом 1,5 мл. Взятие мазков с ротового аппарата головастика следует осуществлять путем введения тампона в ротовую полость и совершения несколько раз вращательных движений тампоном.

3.1.2. Водяная ванна и фильтры

Поскольку кожа инфицированных лягушек отслаивается в окружающую их среду, земноводных можно поместить в контейнеры, содержащие свободные от Vd растворы (например, раствор DS – подробная информация указана ниже). Воду «ванны» можно подвергнуть анализу непосредственно (смотрите ниже) после 15-минутного погружения. В качестве альтернативы, воду ванны можно профильтровать, а фильтры (например, фильтр 0,45 мкм22) хранить в высушенном виде (при комнатной температуре или 4°C) до момента анализа.

3.1.2.1. Реактивы

3.1.2.1.1. Приготовление слабого солевого раствора (DS)

KH_2PO_4	0,001 M
MgCl_2	0,0001 M
CaCl_2	0,00002 M

3.1.2.1.1.1. Стоковый раствор № 1 (фосфатный стоковый раствор)

KH_2PO_4	136,0 г
K_2HPO_4	174,18 г
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	132,07 г

Дистиллированная вода до объема 1000 мл

3.1.2.1.1.2. Стоковый раствор № 2 (кальций-магниевый стоковый раствор)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36,76 г
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	50,83 мг

Дистиллированная вода до объема 500 мл

Довести до pH 7 с помощью KOH (слабый раствор).

Для приготовления DS используйте 0,1 мл кальций-магниевого стокового раствора с 0,5 мл фосфатного стокового раствора в 1000 мл дистиллированной воды.

3.2. Сохранение образцов в целях предоставления на исследование

Тампоны и иссеченные ротовые диски можно хранить в сухом виде при комнатной температуре (не более 23°C).

ПРИМЕЧАНИЕ: Подвергание продолжительному воздействию высокой температуры (как, например, в оставленных без присмотра автомобилях) может сократить извлечение нуклеиновой кислоты.

Для исследования методом световой и электронной микроскопии зафиксируйте ткани в 10% нейтральном забуференном формалине и 2,5% забуференном глутаральдегиде, соответственно. Образцы следует обрабатывать так, как это описано для Эпизоотического гематопозитического некроза и Инфекции ранавирусом.

3.3. Объединение образцов в пул

Можно объединять в пул не более пяти образцов (хотя можно пропустить слабоположительные).

ПРИМЕЧАНИЕ: Рекомендуются объединять образцы в пул только, если речь идет о популяционном исследовании для получения данных о присутствии/отсутствии (Hyatt с соавт., 2007).

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Кожа – вентральная (взрослые особи), пальцы ног (взрослые особи) и ротовой аппарат (головастики).

3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

Внутренние органы и икринки.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

У большинства инфицированных животных клинические признаки отсутствуют. Период демонстрации признаков, как правило, короткий и ограничивается теми земноводными, которые погибли.

4.1.2. Изменения в поведении

Преобладают признаки со стороны центральной нервной системы. Изменения в поведении включают медленные и неkoordinированные движения, несоответствующее норме сидячее положение, тетанические судороги, потерю выпрямительного рефлекса и паралич.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

При тяжелой форме инфекции могут быть отмечены макроскопические изменения кожи, которые включают чрезмерное слущивание кожи (чаще и более мелкими

частичками) и эритему. Данные клинические признаки не являются специфическими для хитридиомикоза.

4.2.2. Клиническая химия

У больных коралловопалых литорий (коралловопалых квакш) (*Litoria caerulea*) концентрации натрия и калия в плазме снижаются на –20% и –50%, соответственно (Voyles с соавт., 2009).

4.2.3. Микроскопическая патология

Микроскопия включает исследование влажных препаратов кожи (соскобы, мазки или кожа в целом виде), гистологических срезов кожи, окрашенных гематоксилином и эозином, а также иммуногистохимию срезов кожи. Данные рутинные тесты обладают высокой прогностичностью положительного результата. Подробная информация о данных методах, а также то, каким образом следует интерпретировать результаты, представлено ниже.

4.2.4. Влажные препараты

Можно исследовать образцы кожи в целом виде, с перепонки или каких-либо других мест; при данном методе сохраняется анатомия кожи и можно исследовать большой участок поверхности. Преимущество данного метода заключается в том, что образец может быть ориентированным, и расположение подозреваемого возбудителя может оказать помощь в идентификации. Например, можно установить, располагаются ли предполагаемые грибные профили внутри поверхностных клеток, указывая, таким образом, на наличие *Vd*, или же они расположены в более глубоких слоях и, таким образом, являются профилями нормальной морфологии земноводных. Данный метод является быстрым, недорогим и, при использовании квалифицированными наблюдателями, эквивалентным по чувствительности окрашиванию гематоксилином и эозином (Longcore с соавт., 2007). Он полезен при изучении здоровых лягушек, от которых невозможно получить пластинки слущивающейся кожи.

В полевых условиях инфицированных головастиков нередко можно идентифицировать по утрате окраски на челюстных чехликах, что можно увидеть при помощи ручной лупы ($\times 10$). Части ротового аппарата головастиков также можно исследовать, отрезав фрагменты зубных рядов или челюстных чехликов и размяв их под покровным стеклом, при этом можно наблюдать кластеры спорангиев.

Во влажных срезах и мазках (смотрите ниже) круглые-овальные внутриклеточные спорангии обычно встречаются в виде скоплений (комочков). Старые пустые спорангии являются стадией, наиболее преобладающей в слущивающейся коже, хотя нередко обнаруживаются и спорангии, содержащие зооспоры. Выводные трубочки (ассоциируемые с зооспорангиями), из которых выходят зооспоры, обычно направлены перпендикулярно к поверхности кожи и, таким образом, выглядят как маленькие кружочки, которые могут быть с трудом различимы. Наблюдение внутренних септ внутри спорангиев повышает степень уверенности в результатах диагностики. Ядра клеток эпидермиса имеют похожий размер со спорангиями, но их можно отличить по их неправильной формы, нечетким мембранам и внешнему виду (плоские, зернистые, серые).

4.2.5. Мазки

Исследование соскобов или мазков кожи посредством световой микроскопии представляет собой быстрый и простой метод идентификации *Vd* и может быть проведено на нефиксированных, замороженных или фиксированных образцах (Berger с соавт., 2009a). Слущивающуюся кожу снимают или соскабливают с лягушки (используя скальпель или стерильную пластиковую ложечку) и расправляют на предметном стекле с каплей воды, накрывают покровным стеклом, и исследуют препарат с помощью составного светового микроскопа. В идеале получается ровный монослой кератинизированных эпидермальных клеток. На начальном этапе используется увеличение $\times 100$ для сканирования среза, а затем используется увеличение $\times 400$ для того, чтобы подтвердить присутствие спорангиев. Круглые-овальные внутриклеточные спорангии (5–13 мкм) встречаются в виде комочков внутри хозяйских клеток. Старые пустые спорангии являются стадией, наиболее преобладающей в слущивающейся коже, хотя нередко обнаруживаются и спорангии, содержащие зооспоры.

4.2.5.1. Образцы, подготовленные согласно описанному выше, могут быть окрашены путем применения следующих процедур

4.2.5.1.1. Лактофенол хлопковый голубой

4.2.5.1.1.1. Реактивы (выход 1 литр)

Фенол	200,0 г
Хлопковый голубой	0,5 г
Глицерол	400 мл
Молочная кислота	200 мл
Деионизированная вода	200 мл

- i) Поместите каплю 70% спирта на предметное стекло микроскопа.
- ii) Погрузите образец/материал в каплю спирта.
- iii) Добавьте одну или две капли лактофенола/хлопокового голубого прежде, чем спирт испарится.
- iv) Держа покровное стекло между указательным и большим пальцами, коснитесь одного края капли монтирующей среды краем покровного стекла и мягко опустите, избегая образования воздушных пузырьков. Теперь препарат готов для исследования.

4.2.5.1.2. Конго-красный

4.2.5.1.2.1. Реактивы

Стоковый раствор	насыщенный
Конго-красный (краситель)	1,0 г

Стоковый NaCl	500 мл
(Стоковый NaCl 30,0 г + 200 мл дистиллированной воды)	200 мл
Рабочий раствор (Конго красный)	
Стоковый раствор Конго красного	50,0 мл
1% натрий NaOH	0,5 мл

Свежеприготовленным (и отфильтрованным) раствором красителя «Конго красный» окрасьте соскобы кожи или мазки в течение 45–60 минут. Хитиновые стенки пустых спорангиев (стенки) и выходящие на поверхность выводные трубочки окрасятся в кирпично-красный цвет. Стенки наиболее незрелых, зрелых и пустых спорангиев также окрашиваются.

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании данной процедуры зооспоры не окрашиваются. Ядра эпидермальных клеток окрашиваются Конго-красным в бледно-оранжевый цвет, если клетки повреждены. Отфильтруйте через стекловату, раствор должен быть прозрачным, не замутненным, сразу же используйте.

Можно использовать DipQuick23 для окрашивания для общей диагностической цитологии. Для обнаружения Vd используйте данный краситель, чтобы идентифицировать зооспоры и стенки спорангиев; цитоплазма и ядра хозяйских клеток также будут окрашены. Это запатентованный краситель и необходимо следовать процедуре производителя.

ПРИМЕЧАНИЕ: Данные красители могут улучшить точность и облегчить диагностику, однако сравнительные испытания не проводились.

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы помимо влажных препаратов и мазков

4.3.1.1.1. Световая микроскопия: фиксированные срезы

Подготовьте ткани в соответствии с традиционными процедурами. Изготовьте срезы блоков (5 мкм) и окрасьте гематоксилином и эозином (Drury & Wallington, 1980). Изготавливайте срезы таким образом, чтобы получить вертикальный срез через всю кожу.

Исследование пальцев осуществляют, изготавливая срезы целой стопы (вентральной поверхностью вниз) или срезы отдельно взятого пальца ноги. Если речь идет о пальцах ног, максимальную длину *stratum corneum* получают в результате продольного, а не поперечного среза. Пальцы декальцифицируют в ЭДТА (EDTA) в течение 48 часов при температуре 37°C или в 10% муравьиной

23 http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/diff_quick_ellis.htm

кислоте в течение 3–5 дней перед обработкой. В качестве альтернативы, при использовании более крупных пальцев, например, от земноводных с длиной туловища вместе с головой («snout-vent length») >60 мм, возможно отделить кожу от подлежащей фаланги и изготовить срез кожи без кости.

В *stratum corneum* хитрид имеет сферическую или овальную форму с выводными сосочками, выступающими из поверхности. Выводные сосочки можно увидеть на гистологических срезах, но не часто. Зооспоры, которые развиваются в спорангии, выходят через открытую выводную трубочку. Стенка зооспорангия гладкая, однородная по толщине и обычно является эозинофильной при окрашивании. Содержимое зооспорангиев варьирует в зависимости от стадии развития хитрида; можно выделить четыре стадии: (1) Ранняя стадия содержит расположенную в центре базофильную, довольно однородную массу. (2) Зооспорангии становятся многоядерными, а затем происходит деление цитоплазмы для образования зооспор. Зооспоры являются базофильными и на поперечных срезах выглядят как тела круглой или овальной формы, их насчитывается примерно 4–10 в зависимости от плоскости среза. (3) После выхода зооспор через выводной сосочек остается пустой зооспорангий. На некоторых стадиях пустых колоний видны тонкие септы, разделяющие спорангий на внутренние ячейки. (4) Пустой спорангий может сжиматься, приобретая неправильную форму. Во время этой конечной стадии пустую оболочку иногда колонизируют бактерии, и их можно увидеть на срезе как базофильные палочки или кокки. Пустые спорангии являются наиболее распространенной стадией, которая присутствует на отслаивающемся поверхностном слое. В гистологических срезах диаметр зооспорангиев варьирует от 5 до 13 мкм. Они имеют сходный размер с ядрами эпидермальных клеток и различную длину, обычно от 2 до 4 мкм, но иногда достигают размера 10 мкм. Зооспоры имеют диаметр около 2 мкм. Инфекция, как правило, ассоциирована с кожной патологией, и эти изменения можно использовать для обнаружения, при малом увеличении, участков, которые, по всей видимости, инфицированы. Очаговый гиперкератоз и эрозии часто наблюдаются в области, прилегающей к организмам. Может иметь место неравномерное утолщение эпидермиса (гиперплазия). В некоторых смертельных случаях обширное отслаивание гиперкератотического слоя оставляет эпидермис с небольшим количеством организмов. В таких случаях, тем не менее, Vd может быть обнаружен в малых количествах в слегка кератинизированном поверхностном слое или может в больших количествах наблюдаться в отслоившейся коже. Спорангии не присутствуют на участках обширного изъязвления (Berger с соавт., 2009b).

4.3.1.1.2. Электронная микроскопия

Получение образцов (кожа и пальцы ног) описано в другом месте (Berger с соавт., 2005a). Изучение кожи инфицированной лягушки посредством электронной микроскопии показывает зону конденсированной хозяйской цитоплазмы, толщиной не более 2,5 мкм, вокруг некоторых спорангиев. Эта зона, по-видимому, в основном представляет собой фибриллы (без органелл).

Более поверхностные эпидермальные клетки содержат более крупные спорангии, а ядра и органеллы хозяйских клеток, как, например, митохондрии, расположены на одной стороне клетки. Рядом с поверхностью кожи эпидермальная цитоплазма конденсируется в тонкий слой вокруг грибных талломов, а органеллы хозяйских клеток исчезают, как это происходит во время нормального процесса созревания эпидермальных клеток. Ядра клеток становятся темными и уплотненными, но не настолько уплощенными, как в нормальном *stratum corneum*. Кератинизация, по-видимому, происходит раньше положенного времени в инфицированных клетках ниже поверхности кожи, по сравнению с неинфицированными клетками в том же эпидермальном слое. Межклеточные соединения инфицированных клеток обычно выглядят нормальными. Некоторые инфицированные клетки и неинфицированные клетки поблизости от очагов инфекции сильно вздуты, хотя митохондрии и другие органеллы в этих клетках интактны. Ядра некоторых инфицированных клеток в *stratum granulosum* сморщенные и хроматолитические. Патология в более глубоко расположенных эпидермальных клетках, находящихся настолько далеко, как в базальном слое, включает очаговое сморщивание, увеличенное межклеточное пространство, вакуолизацию и разжижение цитоплазмы. Гиперкератоз, по-видимому, был отчасти связан с повышенным оборотом эпидермальных клеток. Разбухание эпидермальных клеток рядом с очагами инфекции позволяет предположить наличие гиперпластической реакции. Спорангии, по-видимому, инициируют преждевременную гибель и кератинизацию хозяйских клеток. Утоньшение эпидермиса может происходить в тех случаях, когда развитие эпидермальных клеток не соответствует повышенному темпу отслаивания, обусловленному повышенной гибелью клеток. У других инфицированных лягушек может наблюдаться заметно утолщенный эпидермис из-за гиперплазии, превышающей отслаивание.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Выделение, культивирование и архивирование *Vd*

4.3.1.2.1.1. Выделение

Отберите животных (живых, умирающих или недавно павших) и держите их в охлажденном и влажном состоянии до момента исследования. Проведите идентификацию *Vd*, как описано выше.

- i) Исследуйте кожу при помощи препаровальной лупы ($\times 10$ или $\times 20$).
- ii) Используйте острую и стерильную иглу, для того чтобы удалить неплотно прикрепленную кожу из промежутков между пальцами стопы и других мест на вентральной поверхности животного. Если кожа не является неплотно прикрепленной, используйте пинцет с игловидными концами и отрывайте кусочки от переднего края кожи между задними пальцами или используйте лезвие бритвы с одной режущей кромкой для того, чтобы иссечь перепонку из промежутка между пальцами ног. Если у животных в стадии личинки наблюдается отсутствие зубов или

депигментация челюстного чехлика, удалите эти участки при помощи пинцета с игловидными концами.

- iii) Поместите кожу или челюстной чехлик на предметное стекло микроскопа в капле стерильной дистиллированной воды и накройте покровным стеклом. Наблюдайте при помощи составного микроскопа при увеличении $\times 100$ и $\times 400$.
- iv) Исследуйте на наличие спорангиев (имеющих стенки, сферических–овальных тел диаметром 10–30 мкм) внутри эпидермальных клеток.

ПРИМЕЧАНИЕ: Некоторые спорангии будут септированными (т.е. будут содержать перегородки клеточных стенок), которые делят тело гриба, или таллом, на два или более спорангиев. Некоторые спорангии могут содержать зооспоры, а некоторые окажутся пустыми.

- v) Поместите кожу, на которой наблюдался Bd, на культуральную чашку (9 см), содержащую питательный агар mTGh и антибиотики, которые добавляют после автоклавирования.
- vi) Используйте заостренную и стерилизованную иглу, чтобы оторвать и протолкнуть маленький ($<1 \times 1$ мм) кусочек инфицированной кожи ($\times 40$) сквозь питательный агар (культуральная чашка, 9 см). Если кусочки кожи толстые и не отрываются, нарежьте кожу на маленькие кусочки с помощью микроножниц или ножниц для кутикулы.
- vii) Через каждые несколько миллиметров отводите иглу от кусочка кожи и обтирайте ее, проводя сквозь агар (чтобы удалить контаминирующие бактерии, дрожжи и грибные споры).
- viii) Изменяйте направление кожи и очищайте ее, перемещая вперед и назад сквозь агар.

ПРИМЕЧАНИЕ: Бактериальная и грибная контаминация представляют собой меньшую проблему при работе с тканью головастика.

- ix) После очищения образца с помощью агара поместите очищенную кожу на свежую чашку с mTGh-агаром. Обязательно сделайте так, чтобы новая чашка была приоткрыта минимальным образом, и вотрите образец в толщу агара при помощи иглы. Повторите этот процесс для остальных кусочков кожи; для каждого подхода рекомендуется, чтобы по меньшей мере шесть кусочков очищенной кожи были размещены на каждой из двух чашек. Запечатайте чашку с питательным агаром при помощи Parafilm® или другой лабораторной пленки, обтянув ею чашку по периметру.
- x) Инкубируйте запечатанные чашки при температуре от 17 до 23°C. В течение последующих одной-трех недель проверяйте развитие, переворачивая культуральную чашку вверх дном на предметном столе

составного микроскопа ($\times 100$). Проверьте чашки на наличие контаминантов и удаляйте грибные и бактериальные колонии при помощи стерилизованного скальпеля. Исследуйте на наличие подвижных зооспор *Bd* (3–4 мкм) рядом с кожей (1–3 дня после инокуляции) или сферических очертаний растущих талломов (обычно в пределах от нескольких дней до 2 недель). Если видны гифы, растущие с очищенной кожи, асептически удалите колонию с гифами с чашки, используемой для выделения, при помощи стерильного ножа/скальпеля.

- xi) Когда на коже наблюдаются колонии *Bd*, часть колонии можно асептически удалить и поместить в каплю воды на предметном стекле микроскопа. Осуществляйте наблюдение при помощи составного микроскопа и идентифицируйте спорангии и зооспоры путем сравнения с опубликованными фотографиями (e.g. Berger с соавт., 2002; Longcore с соавт., 1999; и <http://umaine.edu/chytrids/batrachochytrium-dendrobatidis/photographs-of-development-in-amphibian-skin-and-in-pure-culture/>).
- xii) При положительной идентификации и достаточном росте (2 недели – 1 месяц) асептически перенесите колонию (или ее часть) на чашку с 1% триптонным агаром. Гриб лучше всего растет в группах, поэтому следите за тем, чтобы не разделить спорангии во время переноса. Инкубируйте в течение 1–2 недель; если культура свободна от контаминирующих микроорганизмов (например, бактерий и грибов), распределите колонию на чашке и перенесите часть колонии в питательный бульон во флаконе (матресе) с закручивающейся крышкой объемом 250 мл. Чтобы подстраховаться, также перенесите фрагменты колонии на свежие чашки и запечатайте при помощи Parafilm®.

ПРИМЕЧАНИЕ: По возможности, проводите работы в шкафах с ламинарным потоком.

- xiii) Для стоков храните два комплекта культур в 1% жидком триптоне при 5°C. Хранящиеся в холодильнике культуры в жидкой среде остаются жизнеспособными в течение примерно четырех месяцев.

Реактивы

mTGh

8 г триптона

2 г гидролизата желатина

10 г агара

1000 мл дистиллированной воды

Добавьте 200 мг литр^{-1} пенициллина G и 200–500 мг литр^{-1} сульфата стрептомицина после автоклавирования; если бактерии все еще представляют проблему, добавьте 1 мг литр^{-1} ципрофлоксациллина.

1% триптонный агар

10 г триптона

10 г агара

1000 мл дистиллированной воды

1% триптонный бульон

10 г триптона

1000 мл дистиллированной воды

4.3.1.2.1.2. Криоархивирование из бульонной культуры

4.3.1.2.1.2.1. Подготовка культур

- i) Возьмите 2 мл активно растущей бульонной культуры (в возрасте 1 недели).
- ii) Добавьте к 13 мл нового бульона во флаконе (матрасе) (25 см²).
- iii) Инкубируйте в течение 3–4 дней, следя за тем, чтобы флаконы (матрасы) лежали плашмя.
- iv) В культурах должны присутствовать многочисленные очень активные зооспоры, отдельные спорангии размером от маленького до среднего, прикрепленные к пластику, и несколько более крупных поблизости от выходящих зооспор. Должно быть также множество комочков спорангиев, плавающих в бульоне.
- v) Поскребите боковые поверхности флакона (матраса) и прокрутите содержимое в настольной центрифуге при 1700 *g* в течение 10 минут.
- vi) Слейте супернатант (обратите внимание: супернатант содержит большое количество активных зооспор).
- vii) Ресуспендируйте осадок после центрифугирования в 1 мл 10% ДМСО (DMSO), 10% ФТС (FCS) в бульоне и заморозьте в криоконтейнере. 10% ДМСО в бульоне или криопротектор (как описывается ниже) также оказывают необходимое действие, но комбинация ДМСО, ФТС обеспечивает извлечение наилучшим образом.
- viii) После оттаивания и высевания на чашки с TGhL добавьте 1 мл DS.

4.3.1.2.1.2.2. Замораживание культур

- i) В ламинарном боксе внесите криопротектор (приблизительно 1 мл) в пробирку объемом 3 мл.
- ii) Соскребите часть культивируемой Vd и поместите в криопротектор. Если имеются участки культуры с твердыми комочками, тогда

выберите несколько из них, с прикрепленным агаром и добавьте их к этой «порции».

ПРИМЕЧАНИЕ: Не добавляйте больше, чем приблизительно 0,5 см³ культуры.

- iii) Заморозьте, используя пластиковый криоконтейнер²⁴, содержащий изопропанол (изопропиловый спирт).
- iv) Поместите криоконтейнеры в морозильник с температурой –80°C на ночь, затем поместите криопробирки в жидкий азот для постоянного хранения.

4.3.1.3.1.2.3. Размораживание культур

- i) Наполните контейнер водой (43°C).
- ii) Поместите криопробирки непосредственно из жидкого азота в эту воду и проследите за тем, чтобы они находились под водой. Встряхивайте в течение приблизительно 30 секунд.
- iii) Проверьте криопробирки, вынимая их воды, проверьте, для того, чтобы определить, разморозился ли криопротектор. Если разморозился, тогда вылейте содержимое в стерильную чашку Петри; если нет, поместите их обратно в теплую воду. Принципиально важно, чтобы образец не перегрелся.

ПРИМЕЧАНИЕ: Продолжительное подвергание Bd воздействию при температуре 43°C уничтожит данный организм.

СОВЕТ: Когда содержимое начнет оттаивать, держите криопробирку в руке с тем, чтобы тепло руки способствовало размораживанию.

- iv) Поместите образец на агар (TGhL) в чашке Петри.
- v) При помощи пипетки добавьте немного жидкого криопротектора на образец (в чашке Петри).
- vi) Нанесите несколько капель (приблизительно 1 мл) DS на перенесенный образец и инкубируйте (смотрите выше). Исследуйте культуры на протяжении 7–10 дней на предмет движения зооспор. Если по прошествии 4–7 дней никакого движения не наблюдается, а агар выглядит сухим, нанесите несколько капель DS на культуру. Если никакого движения не происходит по прошествии 3 недель, культуры, по всей вероятности, погибли.

ПРИМЕЧАНИЕ: При наличии контаминации перенесите культуру на неконтаминированный участок. Если контаминация существенная, используйте TGhL с антибиотиками.

²⁴ Рекомендуем контейнеры Mr Frosty[®] containers (Nalgene)

4.3.1.2.1.2.4. Реактивы

4.3.1.2.1.2.4.1. DS

Смотрите Пункт 3.1.2.

4.3.1.2.1.2.3.2. Криосреда

Стоковый раствор обезжиренного молока.

Добавьте 90 мл (30,5 г) сухого порошкового обезжиренного молока к 200 мл дистиллированной воды комнатной температуры в бутылке объемом 500 мл. Тщательно смешайте, затем автоклавируйте в течение не более чем 15 минут при скорости сброса давления 5–8 минут. Обратите внимание на то, что молоко очень легко карамелизуется, и часто приходится выбрасывать то, что получается в результате, и повторять этот этап. Если на выходе из автоклава раствор выглядит слишком коричневым – удалите его и переделайте стоковый раствор. Он должен быть бледно-коричневого/сливочного цвета.

4.3.1.2.1.2.3.3. Раствор № 1

Приготовьте 100 мл 20% глицерола в дистиллированной воде двойной перегонки и автоклавируйте на нормальном цикле.

4.3.1.2.1.2.3.4. Раствор № 2

В шкафу приготовьте 17% стерильный раствор обезжиренного молока (смотрите выше) путем добавления 17 мл раствора обезжиренного молока к 83 мл стерильной воды.

4.3.1.2.1.2.3.5. Криопротектор

В шкафу приготовьте 200 мл криопротектора путем добавления равных объемов раствора № 1 к раствору № 2. Следует поддерживать стерильность путем фламбирования горлышка бутылки при использовании.

4.3.1.3. Методы обнаружения, основанные на использовании антител

Следует отметить, что антитела, используемые во всех соответствующих методах, перекрестно реагируют с целым рядом грибов (Berger et al., 2002). В связи с этим их следует использовать с осторожностью и в сочетании с классической световой и/или электронной микроскопией (смотрите Пункт 4.3.1.).

4.3.1.3.1. Совместная локализация Vd и кератина при помощи гистохимии и специализированного окрашивания

Срезы, полученные от инфицированных животных, обрабатывали посредством модифицированной версии процедуры (Berger с соавт., 2002). Срезы инкубировали с конъюгированным иммунопероксидазой (IPX) вторичным антителом, что в результате привело к красно-коричневому окрашиванию Vd,

расположенного посреди эпителиальных клеток (контрокрашенных гематоксилином Lillie-Mayer 25).

4.3.1.3.1.1. Процедура № 1: Иммунопероксидаза

- i) Освободите срезы от воска: 10 минут в печи с температурой 60°C, ксилен 1 минута (× 3), 100% этиловый спирт (технический) 1 минута × 2, 70% этиловый спирт 1 минута, проточная водопроводная вода 1 минута, дистиллированная вода.
- ii) Ополосните в буфере (ФБР) для удаления возможных воздушных пузырьков.
- iii) Нанесите первичное антитело в требуемом разбавлении (определите эмпирическим путем); используйте 0,1% порошковое обезжиренное молоко/раствор БСА в ФБР (PBSA) в качестве разбавителя.
- iv) Инкубируйте предметные стекла в течение 45 минут при 37°C.
- v) Ополосните предметные стекла в ФБР в течение 5 минут.
- vi) Блокируйте эндогенный пероксид: Нанесите 3% H₂O₂ в дистиллированной воде, 200 мкл слайд⁻¹, на 20 минут при комнатной температуре.
- vii) Ополосните предметные стекла в ФБР в течение 5 минут.
- viii) Добавьте систему визуализации «Envision +»²⁶ (антикроличью для поликлонального антитела, антимишиную – когда первичным является моноклональное антитело (MAb)), 3–4 капли в течение 20 минут, 37°C.
- ix) Ополосните предметные стекла в ФБР в течение 5 минут.
- x) Достаньте предметные стекла из кассет «sequenza» и поместите в подставку для окрашивания в емкость с буфером. Выложите слайды на горизонтальную подставку для окрашивания, протирая вокруг срезов салфеткой, и нанесите раствор субстрата из расчета 200 мкл на слайд.
- xi) Добавьте 200 мкл диметил формамида (ДМФА) к 200 мг порошка АЭК (3-амино-9-этилкарбазол, Sigma), убедитесь, что порошок полностью растворился, добавьте 10 мл 0,05 М ацетатного буфера pH 5,0, добавьте 5 мкл 30% H₂O₂.
- xii) Проверяйте срез, используемый в качестве положительного контроля, каждые 2 минуты, пока не будет получено оптимальное окрашивание, обычно в период от 2 до 5 минут.

25 Sigma

26 “ENVISION +”: Dako Peroxidase anti-mouse Code 4000 (15 мл) или 4001 (110 мл)

- xiii) Остановите реакцию, промыв предметные стекла в дистиллированной воде.
- xiv) Проведите контрокрашивание в гематоксилине Lillie-Mayer (Мод.) в течение 30–90 секунд, ополосните в водопроводной воде, окрасьте в синий цвет в растворе Scott's Solution, ополосните в проточной водопроводной воде.
- xv) Ополосните предметные стекла в дистиллированной воде и заключите препараты в водную монтирующую среду.

4.3.1.3.1.2. Процедура № 2: Окраска для выявления щелочной фосфатазы и кератина

Гистологическая и гистохимическая идентификация Bd может быть осложнена отслаиванием поверхностного кератинизированного слоя (*stratum corneum*), что приводит к ошибочной диагностике, так как спорангии утрачиваются вместе с отшелушившейся кожей. Сочетание иммуноокрашивания на наличие Bd с трехцветной окраской на кератин по Холланду (Hollande's Trichrome keratin stain) помогает определить, не мог ли отрицательный результат быть получен из-за утраты кератинового слоя (Olsen с соавт., 2004).

Хотя щелочная фосфатаза (ЩФ, AP) не более эффективна в качестве субстрата, чем иммунопероксидаза (IPX), ей отдается предпочтение из-за выбеливающего эффекта на IPX-субстрате под действием последующего окрашивания для выявления кератина. ЩФ имеет преимущество в виде усиленного контраста между окрашиванием субстрата и кератина.

- i) Освободите срезы от воска при помощи ксилена и гидратируйте посредством этилового спирта нисходящей концентрации и проточной водопроводной воды.
- ii) Поместите в дистиллированную воду.
- iii) Инкубируйте срезы с антихитридным поликлональным антителом Rabbit 667 (1/1000 в 1% [вес/объем] обезжиренном молоке/трис-буферном солевом растворе [ТБС, TBS]) в течение 45 минут при 37°C.
- iv) Промойте срезы в течение 5 минут с помощью ТБС.
- v) Инкубируйте со щелочной фосфатазой ENVISION anti-rabbit/mouse Alkaline Phosphatase²⁷ в течение 20 минут при 37°C.
- vi) Опять промойте (5 минут) с помощью ТБС.

vii) Добавьте ВСIP/NBT субстрат²⁸ непосредственно к срезам и инкубируйте в течение 10 минут.

viii) Ополосните предметные стекла дистиллированной водой.

На данной стадии, если дальнейшее окрашивание не требуется, предметные стекла следует заключить в гель на водной основе²⁹ и герметически закрыть покровным стеклом.

4.3.1.3.1.2.1. Окрашка для выявления кератина – Модифицированная трехцветная окрашка по Холланду

- i) Достаньте предметные стекла из дистиллированной воды (после иммуномечения) и инкубируйте с 1% (вес/объем) фосфорномолибденовой кислотой³⁰ (раствор C) в течение 5 минут при комнатной температуре.
- ii) Ополосните дистиллированной водой и инкубируйте с насыщенным (как минимум 11% [вес/объем]) раствором оранжевого G (Orange G)³¹ (раствор D) в течение 5 минут при комнатной температуре.
- iii) Большую часть раствора D следует слить и добавить 0,2% (вес/объем) светло-зеленый SF (Sigma) (раствор E) без ополаскивания на 2 минуты при комнатной температуре.
- iv) Поместите предметные стекла (без ополаскивания) в 100% этиловый спирт (×2), очистите в ксилене (×2) и заключите препараты в монтирующий гель на основе ксилена.
- v) Оставьте предметные стекла сохнуть до тех пор, пока монтирующая среда не застынет, затем рассмотрите при помощи светового микроскопа.

4.3.1.3.1.3. Интерпретация результатов окрашивания

В результате комбинированных методов окрашивания получают синий/фиолетовый цвет для Bd, оранжевый для кератина и прекератина и зеленый для коллагена и других субэпидермальных соединительных тканей.

Результат окрашивания		Интерпретация
кератин	Bd	
		ушка была Bd-отрицательной. Присутствие кератина обеспечивает

²⁸ DakoCytomation

²⁹ Например, ImmunonTM, Thermo Shandon

³⁰ Ajax/Univar

³¹ Gurr, Michrome #411

		уверенность в результатах диагностики
		ушка была инфицирована Bd
		ускает двоякую интерпретацию. Невозможна идентификация с отрицательным результатом, поскольку кератин отсутствует, а Bd может присутствовать в слущившейся коже

4.3.1.3.2. Обнаружение Bd с использованием ИФА с захватом антигена

Ввиду недостаточной чувствительности и специфичности, ИФА с захватом антигена не рекомендуется для обнаружения Bd.

4.3.1.3.3. Традиционная и иммуноэлектронная микроскопия

Принцип теста: кожу можно исследовать посредством электронной микроскопии. Традиционная электронная микроскопия (исследование ультратонких срезов) генерирует данные о структуре Bd. Использование Bd-специфических антител и меченых золотом антивидовых антител позволяет исследовать как ультраструктуру, так и антигенность (Berger с соавт., 2005a).

4.3.1.3.3.1. Традиционная трансмиссионная электронная микроскопия

Произведите фиксацию тканей, как описано у Berger с соавт., 2002. Если говорить коротко, то 2,5% (объем/объем) забуференный глутаральдегид (какодилат или фосфат) используется для фиксации клеток в течение 40 минут. Следом за первичной фиксацией клетки ополаскивают в том же буфере (3 × 20 минут), осуществляют постфиксацию в 1% (вес/объем) забуференном осмий тетраоксиде (1 час), промывают (3 × 5 минут) в воде, подвергнутой двойной дистилляции/обратному осмосу (RO), дегидратируют при помощи спирта восходящей концентрации (70–100%) и фильтруют и заливают в эпоксидную смолу (например, Spurr's или Epon).

4.3.1.3.3.2. Мечение срезов золотом

- i) Что касается мечения золотом ультратонких срезов залитого в смолу материала (Nyatt, 1991), следует обратить внимание на режимы фиксации и заливки. Например, клетки следует фиксировать в 0,25% (объем/объем) глутаральдегиде с 2–4% параформальдегидом. Вторичная фиксация не применяется, и клетки фильтруют и заливают в акриловую смолу 32.
- ii) Следом за фиксацией и заливкой, изготовьте ультратонкие срезы и перенесите их на покрытые пленкой никелевые сеточки.
- iii) Изготовьте срезы из соответствующих блоков.
- iv) Блокируйте в 2% (вес/объем) порошковом обезжиренном молоке в растворе БСА в ФБР (PBS-A) (10 минут).

32 как, например, LR White или HM20 Lowicryl

- v) Блокируйте свободные альдегиды при помощи 0,1 М глицина в PBS-A (20 минут).
- vi) Промойте в PBS-A (3 × 1 минута). Это необязательный этап, применяемый только при наличии избыточного количества свободных альдегидов (о чем может свидетельствовать высокий фоновый уровень).
- vii) Если не используется протеин А-золото, тогда блокируйте в нормальной видовой сыворотке – эта сыворотка должна быть гомологична таковой, образующей комплекс с золотом. Рекомендованное разведение – приблизительно 1/40 (10 минут).
- viii) Инкубируйте в первичном антителе. Если детали инкубирования неизвестны, тогда осуществите первоначальные реакции с разведениями от 1/100 до 1/2700 (с трехкратными разведениями). Разведите антитела в 1% (объем/объем) желатине, произведенном из холодноводных рыб, в PBS-A (60 минут, комнатная температура).
- ix) Ополосните в 1% (объем/объем) желатине, произведенном из холодноводных рыб, в PBS-A (6 × 3 минуты).
- x) Инкубируйте в меченом золотом вторичном антителе или протеин А-золоте или протеин G-золоте. Предлагаемое разведение 1/40 в PBS-A, содержащем 1% (вес/объем) бычий сывороточный альбумин (БСА, BSA), 0,1% (объем/объем) Tween 20 и 0,1% (объем/объем) Triton X, 60 минут, комнатная температура.
- xi) Ополосните в PBS-A (6 × 3 минут, комнатная температура).
- xii) Произведите постфиксацию в 2,5% (объем/объем) глутаральдегиде в PBS-A (5 минут, комнатная температура).
- xiii) Ополосните в воде (подвергнутой обратному осмосу, RO) (3 × 3 минуты, комнатная температура).
- xiv) Просушите на фильтровальной бумаге (тип не имеет критического значения).
- xv) Окрасьте в ацетате уранила и ацетате свинца.

4.3.1.3.3. *Интерпретация результатов*

Мембраны (внешние), ассоциированные с зооспорами и спорангиями, будут помечены золотом.

4.3.1.4. Молекулярные методы, TaqMan-ПЦР

Идентификация Bd возможна с использованием описанного и валидированного (Boyle с соавт., 2004; Nyatt с соавт., 2007) TaqMan-анализа в реальном времени. Анализ может быть завершен менее чем через 24 часа при относительно малых затратах.

В Taqman-ОТ-ПЦР используется набор праймер/зонд, предназначенный для нацеливания на высококонсервативный регион 5.8, 18 и 28S ДНК, разделенных внутренними транскрибируемыми спейсерами (ITS-1 и ITS-2) и межгенным спейсером, для обнаружения *Vd* с использованием мазков (тампонов), ампутированных пальцев ног, фильтров и ротовых дисков головастика (нефиксированных или обезвоженных). Последовательности 5.8, 18 и 28S рРНК являются высококонсервативными, в то время как участки ITS-региона и межгенного спейсера быстро эволюционируют. Анализ обладает чувствительностью на уровне 0,1 зооспорных эквивалентов. Также он количественно определит уровень инфекции у животных.

Поскольку данный анализ весьма чувствителен, необходимо принять все возможные меры предосторожности для предотвращения контаминации (анализ количественно определит единственную зооспору в тестируемом образце). К ним относятся использование одноразовых принадлежностей для каждого образца, ношение перчаток, проведение анализов в боксе биологической безопасности II класса, аликвотирование реактивов для разового использования, использование наконечников с фильтром, использование специально предназначенных для определенной цели пипеток, работа в «чистой» зоне.

4.3.1.4.1. Подготовка тампонов

Тампоны, рекомендуемые для использования: Medical Wire & Equipment Co (Великобритания) MW 100-100, поставляемые Biomirieux Aust.). Альтернативные тампоны не были валидированы. При использовании альтернативных вариантов потребуется надлежащая валидация.

- i) Обработайте тампоном нижнюю поверхность стоп, ноги и участок на брюшке, через который происходит всасывание воды («drink patch») энергичными движениями 2-3 раза.
- ii) Отломите тампон в пробирку объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой (с О-образным кольцом), содержащую 30–40 мг 0,5 мм цирконий/силиконовых бусин³³ и 50 мкл PrepMan Ultra³⁴.
- iii) Гомогенизируйте при помощи гомогенизатора типа «beadbeater» (2 × 45 секунд). Центрифугируйте в микроцентрифуге (30 секунд) в промежутке между каждой гомогенизацией, для извлечения всего материала из пробирки, и еще раз после второй гомогенизации.
- iv) Поместите пробирки с завинчивающимися крышками в подходящий держатель и прогрейте образцы (10 минут при температуре 100°C).
- v) Охладите (2 минуты) при комнатной температуре, затем центрифугируйте в микроцентрифуге (3 минуты).

³³ Biospec. Products - Cat. # 11079105z

³⁴ Applied Biosystems. Cat. # 4318930

- vi) Соберите и храните столько супернатанта, сколько возможно – обычно 20–40 мкл.

При процессировании больших количеств, супернатанты можно хранить в 96-луночных планшетах с V-образным дном в каждом втором ряду – разведение (1/10 в воде) можно производить в промежуточных рядах планшета. Собранные супернатанты можно хранить в течение недели при 4°C, если в это время проводится анализ, в противном случае храните в замороженном виде при температуре –20°C. Запечатывайте планшеты во избежание испарения. Каждый раз необходимо предусматривать отрицательный контроль экстракции, чтобы гарантировать отсутствие контаминации (например, чистый тампон в 50 мкл PrepMan Ultra).

4.3.1.4.2. Подготовка ампутированных пальцев ног и ротовых частей

Экстракция – такая же, как и для тампонов. Используйте приблизительно (не более) 1 мг. Используйте новые стерильные лезвия скальпеля на чистой, свободной от Bd (т.е. не использовавшейся ранее) поверхности, например, чашке Петри. Что касается крупных пальцев ног, снимите кожу с пальца, используя чистые скальпели, чашку Петри и зубочистку, и добавьте не более 10% (вес/объем), чтобы не допустить перегрузки гомогенизационной системы; при необходимости, увеличьте объем PrepMan Ultra. Поместите образец непосредственно в пробирку с циркониевыми бусинами и PrepMan, как описано для тампонов.

4.3.1.4.3. Экстракция ДНК

Экстракцию ДНК осуществляют из ампутированных пальцев ног, тампонов, фильтров или ротовых дисков головастика путем выделения с использованием PrepMan Ultra.

- i) 50 мкл PrepMan Ultra (200 мкл для фильтров) добавляют к каждому образцу вместе с 30–40 мг цирконий/силиконовых бусин диаметром 0,5 мм³⁵.
- ii) Гомогенизируйте образец в течение 45 секунд в гомогенизаторе типа «bead-beater», например, Mini Beadbeater 836.
- iii) Центрифугируйте (30 секунд, 13000 *g* в микроцентрифуге, ×2): при этом происходит извлечение всего материала из пробирки.
- iv) Прогрейте образец при температуре 100°C (10 минут), охладите (2 минуты) и центрифугируйте (13000 *g*, 3 минуты в микроцентрифуге).
- v) Отберите 20%¹ (?) супернатанта и сразу же используйте; образец можно хранить при температуре –20°C до момента использования.

4.3.1.4.4. Приготовление стандартов

³⁵ Biospec Products

³⁶ Biospec Products

- i) 2 мл активно растущей культуры *B. dendrobatidis* высевает в планшеты с TGhL и выращивают в течение 4-5 дней.
- ii) Зооспоры собирают путем заливания планшета дважды 2 мл раствора DS.
- iii) Произведите подсчет зооспор в гемоцитометре ($\times 4$).
- iv) Пеллетируйте 10^7 зооспор в микроцентрифуге (13000 *g*, 1 минута).
- v) Удалите осадок от центрифугирования и ресуспендируйте в 200 мкл PrepMan Ultra.
- vi) Кипятите суспензию в течение 10 минут, охлаждайте 2 минуты, центрифугируйте в микроцентрифуге в течение 3 минут и удалите 150 мкл супернатанта.
- vii) Разведите ДНК в дистиллированной воде (2×10^5 на мл геномных эквивалентов) и аликвотах, хранившихся при температуре -20°C .

4.3.1.4.5. Внутренние контроли

Ингибиторы TaqMan-анализа, такие как почва на тампонах, могут присутствовать после процесса экстракции, приводя к тому, что регистрируются ложно-отрицательные результаты. Присутствие ингибиторов в образцах можно обнаружить путем использования внутреннего контроля. Applied Biosystems® производит синтетический ампликон из плазмидного источника, последовательность которого, как известно, не встречается в природе. VIC-меченый и ограниченный праймерами для использования в мультиплексных анализах 37: 1 мкл $10 \times \text{Eco IPC}$ смеси и 0,5 мкл $50 \times \text{Eco IPC}$ ДНК следует включить в состав мастер-микса 1 лунки трех повторностей. Значения пороговых циклов *Ct* в VIC-слое должны быть сопоставимы для контролей и тестируемых образцов. Если значение *Ct* тестируемого образца в VIC-слое в два-четыре раза выше, чем у отрицательного контроля, тогда образец следует развести 1/100 или больше.

4.3.1.4.6. TaqMan-анализ

- i) Аликвотируйте 20 мкл соединенных мастер-микса/праймеров/зонда на лунку.
- ii) Добавьте 5 мкл ДНК при разведении 1/10 (в воде) для образцов, подготовленных с использованием PrepMan Ultra.
- iii) Для каждого анализа необходимо использовать стандарты 100, 10, 1 и 0,1 зооспор для построения стандартной кривой. Стоковые растворы стандартов можно приготовить и хранить в замороженном виде и разводить при возникновении потребности.

- iv) Также на каждой планшете необходимо предусмотреть контроль экстракции без ДНК (безматричный контроль).
- v) Все образцы, включая стандарты, следует выполнить в трех повторностях.
- vi) Последовательности праймеров и зонда:

Праймер 1 (Прямой праймер): 1-3 Bd: 29 оснований 5'-CCT-TGA-TAT-AAT-ACA-GTG-TGC-CAT-ATG-TC-3'
Праймер 2 (Обратный праймер): 5 Bd: 22 основания 5'-AGC-CAA-GAG-ATC-CGT-TGT-CAA-A-3'
Зонд: 5'-Hytr MGB2 15 нуклеотидов – FAM-меченый. 5'-FAM-CGA-GTC-GAA-CAA-AAT-MGBNFQ-3'

В Референтной лаборатории МЭБ амплификация осуществляется в термоциклере ABI 7500 fast или 7900 Sequence Detection System с использованием следующей программы: 50°C в течение 2 минут (перевар с использованием урацил-N-гликозилазы) 1 цикл; 95°C в течение 10 минут (активация Taq Gold термостабильной ДНК-полимеразы, присутствующей в мастер-миксе), 1 цикл; 95°C в течение 15 секунд, 60°C в течение 1 минуты; 45 циклов.

ПРИМЕЧАНИЕ: Праймеры и зонды ресуспендируют в соответствии с инструкциями изготовителя.

4.3.1.4.6.1. Условия проведения циклов

С	минуты
С	минут
повторов:	
С	секунд
С	минута

4.3.1.4.7. Интерпретация данных

После завершения исследования, следует проанализировать результаты, пользуясь следующими указаниями:

- i) Выполните настройки параметров ОБТ (устранение выбросов, базовая линия и пороговый уровень), установив диапазон уровня базовой линии на 3, 15, а уровень пороговой линии – на Дельта R_N 0,1 (Bd и внутренний контроль).
- ii) Если положительные образцы имеют значение СТ <18, снизьте верхнее значение уровня базовой линии с 15 до уровня, по меньшей мере, на 3 ниже, чем значение СТ образца.

Определите, валиден ли анализ, посредством визуализации:

- i) Лунки с положительными контролями: кривые амплификации на слое красителя FAM должны иметь характерную форму.
- ii) Экзогенный положительный контроль не должен быть более чем в два раза выше, чем его определенное значение в отрицательном контроле. Если значение СТ выше более чем в два раза, значит, имело место ингибирование реакции и образец следует развести (1/00).
- iii) Экстракция с использованием безматричного контроля и отрицательного контроля: определите отсутствие контаминации посредством наблюдения отсутствия характерных кривых амплификации на слое красителя FAM. Слой красителя VIC должен иметь значение СТ больше, чем 39.
- iv) Стандартная кривая: стандарты при концентрациях 1/100, 10, 1, 0,1 находятся в пределах указанного диапазона эталонного стандарта. R² больше, чем 0,98.

Если тест признается валидным, то результаты для лунок с тестируемым образцом можно интерпретировать, используя следующие критерии:

- **Положительные результаты**

Дефиниция: Присутствие специфических ампликонов, о чем свидетельствует характерная кривая амплификации, подобная положительному контролю при значении СТ, меньшем или равном 39 (во всех трех лунках).

- **Отрицательные результаты**

Дефиниция: Отсутствие специфических ампликонов, о чем свидетельствует отсутствие характерной кривой амплификации и наличие значения СТ, большего, чем 41 (во всех трех лунках).

- **Неопределенные результаты**

Дефиниция: наличие характерных кривых амплификации подобно положительному контролю, но при значении СТ в диапазоне между 39 и 41 или малое количество зооспорных эквивалентов в только одной или двух лунках).

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для надзора, обнаружения и диагностики хитридиомикоза перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, использованные в Таблице, означают: а = данный метод является методом, рекомендуемым по причинам доступности, целесообразности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = данный метод применяется в некоторых ситуациях, однако затраты, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение; d = данный метод в настоящее время не рекомендуется для данной цели; и NA = не применяется. Данные обозначения в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает в себя такие аспекты, как достоверность, чувствительность, специфичность и целесообразность. Хотя не все из тестов, перечисленных как относящиеся к категории а или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию (смотрите Главу 1.1.2. настоящего Руководства по водным животным), их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются, не давая при этом вызывающих сомнение результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Целостные и/или семенные	Споровые и	Аморфные	Взрослые особи		
Микроскопические признаки	na				d	
Гистопатология	na				c	
Мунопероксидазное окрашивание	na				b	
Иммунофлуоресценция ЭМ	na				c	
Муно-ЭМ	na				c	
Дифференцирование	na	na	na	na	na	na
IFA с захватом антигена	na	na	na	na	na	na
IFA с захватом антитела	na	na	na	na	na	na
qMap-ПЦР	na				a	
Р-секвенирование	na				b	

Гистопатология является высокоспецифичной; na больных животных она также является высокочувствительной. ЭМ = электронная микроскопия; ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ; ПЦР = полимеразная цепная реакция; na = не применяется.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора для объявления свободы от хитридиомикоза

Отбор образцов и соответствующие TaqMan-анализы, описанные в данной статье, могут быть использованы для целевого надзора в отношении Bd. Прошедшая экспертную оценку процедура исследования, которая может быть использована для картирования Bd в пределах географических регионов, приведена в недавней статье (Skerratt с соавт., 2010).

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Земноводное, внешне здоровое или умирающее, которое демонстрирует аномальное поведение и имеет локализованные участки отшелушившейся кожи. Кожа должна заключать в себе признаки структуры, содержащей зооспоры и спорангии, которые окрашиваются с помощью антител, получаемых из референтной лаборатории.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Земноводное, внешне здоровое, умирающее или павшее, в коже которого содержится Bd согласно TaqMan-анализу.

ПРИМЕЧАНИЕ: Гистология (окрашенные гематоксилином и эозином срезы) могут быть с уверенностью использованы квалифицированными патологами, поскольку нет никаких других грибов, присутствующих на земноводных, с подобной структурой (спорангии с выводными трубочками, зооспорами внутри клеток stratum corneum); однако, окончательное определение осуществляется посредством TaqMan-ПЦР.

8. Библиография

BERGER L., SPEARE R., DASZAK P., GREEN D., CUNNINGHAM A., GOGGIN C., SLOCOMBE R., RAGAN M., HYATT A., MCDONALD K., HINES H., LIPS K., MARANTELLI G. & PARKES H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9031–9036.

BERGER L., HYATT A., OLSEN V., HENGSTBERGER S., BOYLE D., MARANTELLI G., HUMPHREYS K. & LONGCORE J. (2002). Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 213–220.

BERGER L., HYATT A., SPEARE R. & LONGCORE J. (2005a). Life cycle stages of *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore с соавт. 1999, the amphibian chytrid. *Dis. Aquat. Org.*, **68**, 51–63.

BERGER L., SPEARE R. & SKERRATT L. (2005b). Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs (*Litoria caerulea*) with severe chytridiomycosis. *Dis. Aquat. Org.*, **68**, 65–70.

BERGER L., LONGCORE J., SPEARE R., HYATT A. & SKERRATT L.F. (2009a). Fungal Diseases in Amphibians. In: Amphibian Biology, Volume 8 Amphibian Decline: Disease, Parasites, Maladies, and Pollution. H. Heatwole and J.W. Wilkinson, Surrey Beatty & Sons, New South Wales, Australia, 2986–3052.

- BERGER L., SPEARE R., MARANTELLI G. & SKERRATT L. (2009b). A zoospore inhibition technique to evaluate the activity of antifungal compounds against *Batrachochytrium dendrobatidis* and unsuccessful treatment of experimentally infected green tree frogs (*Litoria caerulea*) by fluconazole and bezalkonium chloride. *Res. Vet. Sci.*, **87**, 106–110.
- BERGER L., SPEARE R., PESSIER A., VOYLES J. & SKERRATT L.F. (2010). Treatment of chytridiomycosis requires urgent clinical trials. *Dis. Aquat. Org.*, **Special 4: Chytridiomycosis: an emerging disease**, 17.
- BLAUSTEIN A., ROMANSIC J.M., SCHEESSELE E.A., HAN B.A., PESSIER A.P. & LONGCORE J.E. (2005). Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biol.*, **19**, 1460–1468.
- BOYLE D.G., BOYLE D.B., OLSEN V., MORGAN J.A.T. & HYATT A.D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 133–139.
- BRIGGS C.J., VREDENBURG V.T., KNAPP R.A. & RACHOWICZ L.J. (2005). Investigating the population-level effects of chytridiomycosis: an emerging infectious disease of amphibians. *Ecology*, **86**, 3149–3159.
- DAVIDSON E.W., PARRIS M., COLLINS J.P., LONGCORE J.E., PESSIER A.P. & BRUNNER J. (2003). Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia*, **3**, 601–607.
- DRURY R.B. & WALLINGTON E.A. (1980). Carleton's Histological Technique, Oxford University Press, 520 pp.
- FISHER M.C., GARNER T.W.J. & WALKER S.F. (2009). Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *Microbiology*, **63**, 291–310.
- FORZAN M.J., GUNN H. & SCOTT P. (2008). Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs, diagnosis, treatment, and control. *J. Zoo. Wildl. Med.*, **39**, 406–411.
- GARNER T.W., GARCIA G., CARROLL B. & FISHER M.C. (2009). Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 257–260.
- HANSELMANN R., RODRIQUE A., LAMPO M., FAJARDO-RAMOS L., AGUIRRE A., MARM K.A., RODREQUIZ P. & DASZAK P. (2004). Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. *Biol. Conserv.*, **120**, 115–119.
- HOHREITER D.W. & RIGG D.K. (2001). Derivation of ambient water quality criteria for formaldehyde. *Chemosphere*, **45**, 471–486.
- HYATT A.D. (1991). Immunogold labelling techniques. *In: Electron Microscopy in Biology: a Practical Approach*. Harris R., ed. IRL Press, Oxford, UK, 59–81.

- HYATT A.D., BOYLE D.G., OLSEN V., BOYLE D.B., BERGER L., OBENDORF D., DALTON A., KRIGER K., HERO M., HINES H., PHILLOTT R., CAMPBELL R., MARANTELLI G., GLEASON F. & COLLING A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 175–192.
- JOHNSON M., BERGER L., PHILLIPS L. & SPEARE R. (2003). *In vitro* evaluation of chemical disinfectants and physical techniques against the amphibian chytrid, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 255–260.
- JOHNSON M. & SPEARE R. (2003). Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and control implications. *Dis. Aquat. Org.*, **9** (8), 922–925.
- JOHNSON M. & SPEARE R. (2005). Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 181–186.
- LIPS K., BREM F., BRENES F., REEVE J., ALFORD R., VOYLES J., CAREY C., LIVO L., PESSIER A. & COLLINS J. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** (9), 3165–3170.
- LONGCORE J., PESSIER A. & NICHOLS D. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, **91**, 219–227.
- LONGCORE J.R., LONGCORE J.E., PESSIER A.P. & HALTEMAN W.A. (2007). Chytridiomycosis widespread in anurans of northeastern United States. *J. Wildl. Management*, **71**, 435–444.
- MARANTELLI G., BERGER L., SPEARE R. & KEEGAN L. (2004). Distribution of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development. *Pacific Conservation Biol.*, **10** (1), 173–179.
- MARTEL A., VAN ROOIJ P., VERCAUTEREN G., BAERT K., VAN WAEYENBERGHE L., DEBACKER P., GARNER T.W., WOELTJES T., DUCATELLE R., HAESEBROUCK F. & PASMANS F. (2010). Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycol.*, **49** (2), 143–49.
- NICHOLS D.K. & LAMIRANDE E.W. (2009). Successful treatment of chytridiomycosis. *Froglog*, **2001**, 46.
- OLSEN V., HYATT A.D., BOYLE D.G. & MENDEZ D. (2004). Co-localisation of *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin for enhanced diagnosis of chytridiomycosis in frogs. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 85–88.
- PARKER J.M., MIKAELIAN I., HAHN N. & DIGGS H.E. (2002). Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Comp. Med.*, **52**, 265–268.
- PESSIER A.P., NICHOLS D.K., LONGCORE J.E. & FULLER M.S. (1999). Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 194–199.
- PIOTROWSKI J.S., ANNIS S.L. & LONGCORE J.F. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, **96** (1), 9–15.

- RETALLICK R.W.R., MCCALLUM H. & SPEARE R. (2004). Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community postdecline. *PLoS Biol.*, **2**, 1965–1971.
- PHILLOTT A.D., SPEARE R., HINES H.B., MEYER E., SKERRATT L.F., MCDONALD K.R., CASHINS S.D., MENDEZ D. & BERGER L. (2010). Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 175–185.
- ROWLEY J.J.L., CHAN S.K.F., TANG W.S., SPEARE R., SKERRATT L.F., ALFORD R.A., CHEUNG K.S., HO C.Y. & CAMPBELL R. (2007). Survey for the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hong Kong in native amphibians and in the international amphibian trade. *Dis. Aquat. Org.*, **78**, 87–95.
- SKERRATT L.F., BERGER L., SPEARE R., CASHINS S., MCDONALD K., PHILLOTT A., HINES H. & KENYON N. (2007). Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*, **4**, 125–134.
- SKERRATT L.F., MCDONALD K.R., HINES H.B., BERGER L., MENDEZ D., PHILLOTT A.D., CASHINS S.D., MURRAY K. & SPEARE R. (2010). Validation of the Mapping Protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* in Queensland, Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 117–129.
- SMITH K., SAX D. & LAFFERTY K. (2006). Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conservation Biol.*, **5**, 1349–1357.
- VOYLES J., YOUNG S., BERGER L., CAMPBELL G., VOYLES W.F., DINUDOM A., COOK D., WEBB R., ALFORD R.A., SKERRATT L.F. & SPEARE R. (2009). Pathogenesis of Chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, **23**, 582–585.
- WILLIAMS S. & HERO J. (1998). Rainforest frogs of the Australian wet tropics: guild classification and the ecological similarity of declining species. *Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci.*, **265**, 597–602.
- WOODHAMS D.C. & ALFORD R.A. (2005). The ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conservation Biol.*, **19**, 1449–1459.
- WOODHAMS D.C., ALFORD R.A. & MARANTELLI G. (2003). Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 65–67.

*

* *

ИНФЕКЦИЯ ВИРУСАМИ РОДА RANAVIRUS

1. Предмет рассмотрения¹

В целях данной главы ранавирусная инфекция считается системной клинической или субклинической инфекцией, в основном, представителей семейств Бесхвостые и Хвостатые, вирусами-представителями рода *Ranavirus*. Сюда не входит вирус эпизоотического гематопозитического некроза, который является возбудителем эпизоотического гематопозитического некроза (EHN).

2. Описание болезни

2.1. Факторы о возбудителе

2.1.1. Этиологический агент, штаммы возбудителя

Ранавирусы принадлежат к роду *Ranavirus* семейства *Iridoviridae*. Типоспецифичными являются вирус лягушек 3 (FV3) (Chinchar с соавт., 2005). Другие виды включают вирус Боле (BIV), вирус эпизоотического гематопозитического некроза (EHN), вирус обыкновенного сома (ECV), вирус европейского сома (ESV) и ранавирус Сент-Купер. В составе данного рода существует много других гипотетических видов. С момента подтверждения болезни, вызванной EHN у пелагической рыбы в Австралии в 1986 году, аналогичные системные некротические иридовиральные синдромы регистрировали у амфибий. Ранавирусы выделяли у здоровых или больных лягушек, саламандр и рептилий в Америке, Европе, Азии и Австралии (Chinchar, 2002; Drury с соавт., 1995; Fijan с соавт., 1991; Hyatt с соавт., 2002; Speare & Smith, 1992; Wolf с соавт., 1968; Xia с соавт., 2009; Zupanovic с соавт., 1998b). Ранавирусы имеют большие (150-170 нм) икосаэдрические вирионы, геном с двухцепочечной ДНК длиной 150–170 т.п.н, и реплицируется как в ядре, так и в цитоплазме наряду со скоплением в цитоплазме (Chinchar с соавт., 2005). Они имеют общие антигены, которые можно выявить несколькими методами.

Имя вируса	Число изолятов	Примеры	Графический источник
Вирус <i>Ambystoma tigrinum</i>	2	<i>Ambystoma tigrinum</i> virus, Regina ranavirus	Северная Америка

¹ NB: Редакция, принятая на Всемирной ассамблее МЭБ в мае 2011 года

довирус Боле ус лягушки 3	1	Bohle iridovirus	Австралия
		Frog virus 3	Южная Америка, Северная и Южная Америка
		Box turtle virus 3	Европа, Северная и Южная Америка
		<i>Bufo bufo</i> United Kingdom virus	Европа, Северная и Южная Америка
		<i>Bufo marinus</i> Venezuelan iridovirus 1	Европа, Северная и Южная Америка
		Lucké triturus virus 1	Европа, Северная и Южная Америка
		<i>Rana temporaria</i> United Kingdom virus	Европа, Северная и Южная Америка
		Redwood Park virus	Европа, Северная и Южная Америка
		Stickleback virus	Европа, Северная и Южная Америка
		Tadpole edema virus	Европа, Северная и Южная Америка
потетические виды	3	Tadpole virus 2	Европа, Северная и Южная Америка
		Tiger frog virus	Европа, Северная и Южная Америка
		Tortoise virus 5	Европа, Северная и Южная Америка
		<i>Rana esculenta</i> iridovirus	Европа, Северная и Южная Америка
		<i>Testudo</i> iridovirus	Европа, Северная и Южная Америка

2.1.2. Выживаемость вне хозяина

Все ранавирусы, скорее всего, чрезвычайно резистентны к высушиванию; EHNV может выживать в воде месяцами, в замороженных тканях рыб в течение более 2 лет (Langdon, 1989), а в замороженных тушках рыб в течение не менее года (Whittington с соавт., 1996). Ранавирус Santee сохраняет жизнеспособность в замороженных тканях рыб в течение не менее 155 дней (Plumb & Zilberg, 1999). Меньше информации известно о других ранавирусах, но, учитывая их сходство с EHNV, предполагается, что они обладают аналогичной устойчивостью. Вирус *Ambystoma tigrinum* (ATV) был инфекционным для саламандр, если он присутствовал во влажном, но не сухом донном осадке водоема, но длительность сохранения инфекционности неизвестна.

2.1.3. Устойчивость возбудителя (эффективные методы инактивации)

Ранавирусы (как продемонстрировано на примере EHNВ) чувствительны к 70% этанолу, гипохлориту натрия в объеме 200 мг/литр⁻¹ или нагреванию до 60°C в течение 15 минут (Fijan с соавт., 1991). При предварительном высушивании EHNВ может выживать при нагревании до 60°C в течение 15 минут (неопубликованные данные наблюдений). 10⁷ бляшкообразующих единиц/мл ранавируса, происходящего от амфибий, инактивировали в течение 1 минуты в растворе хлоргексидина 150 мг/литр⁻¹ (0,75% Nolvasan[®]), гипохлорида натрия 180 мг/литр⁻¹ (3% хлорная известь) или пероксимоносульфата калия 200 мг/литр⁻¹ (1% Виркон[®]) (Bryan с соавт., 2009).

2.1.4. Жизненный цикл

Путь заражения неизвестен, но амфибии чрезвычайно восприимчивы после контакта в водоеме или через царапины, нанесенные в лабораторных условиях. (Cunningham с соавт., 2007; Cunningham с соавт., 2008).

2.2. Факторы о хозяевах

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Случаи естественного заражения ранавирусом известны у представителей большинства семейств Anura и Caudata (Carey с соавт., 2003a; Carey с соавт., 2003b; Cullen & Owens, 2002; Daszak с соавт., 2003).

2.2.2. Стадии восприимчивости хозяина

Стадии восприимчивости хозяина включают все возрастные классы, личинки, метаморфы и взрослые особи.

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Неизвестна.

2.2.4. Органы-мишени и инфицированные ткани

Целевые органы и ткани амфибий, инфицируемые ранавирусами могут варьироваться. Приводится три примера:

- i) **BIV: печень, почки, легкие и прочие паренхимы (Cullen & Owens, 2002).**
- ii) **FV3 инфицирует проксимальные канальцевые эпителиальные клетки почек, печени и желудочно-кишечного тракта (Robert с соавт., 2005).**
- iii) **United Kingdom ranavirus (RUK) инфицирует эпителиальные клетки, фибробласты, лимфоциты, мелано-макрофаги и небольшую часть клеток эндотелия во многих тканях, а также гепатоциты и купферовские клетки печени, эпидермиса и дермы (Cunningham с соавт., 2008).**

ATV обнаруживают в коже, селезенке, печени, канальцевых эпителиальных клетках почек и в лимфоидных и гемопоэтических тканях саламандр.

2.2.5. Персистентная инфекция с пожизненными носителями

Неизвестно.

2.2.6. Векторы

Амфибии заражаются также как и рыбы, подробное описание заражения EHNV приводится здесь. Возможные векторы включают сети, лодки и прочее оборудование, или амфибий, используемых в качестве наживки рыболовами-любителями. Птицы являются потенциальными механическими векторами, т.к. ранавирус может переноситься в кишечнике, на перьях, лапах и клюве. Следует отметить, что ранавирусы, скорее всего, инактивируются при обычной температуре тела птиц (40–44°C). Тем не менее, существует вероятность того, что ранавирусы (что подтверждается EHNV) могут распространяться при отрывании переваренного материала в течение нескольких часов после поедания (Whittington с соавт., 1996). Кроме того, продемонстрировано, что амфибии могут заражаться при контакте с водными отложениями в местах, где отмечается падеж вследствие заражения ранавирусом.

2.2.7. Известные или предполагаемые дикие водные животные-носители

Неизвестно.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Инфекция ранавирусами может возникать при контакте животное-животное, при поедании зараженных, умирающих или мертвых особей (например, Cullen & Owens, 2002; Picco & Collins, 2008). Вирусы могут также распространяться между расположенными далеко друг от друга системами рек и водохранилищами. Считается, что передача происходит не с водой (см. выше); механизмы включают перемещение живой рыбы или приманок рыболовами-любителями (например, Picco с соавт., 2007).

2.3.2. Превалентность

Инфекции ранавирусами регистрируют на пяти континентах, включая Азию (Gray с соавт., 2009); их превалентность, основанная на результатах интенсивного и широкомасштабного серологического надзора и выявления антигенов, неизвестна.

2.3.3. Географическое распространение

Ранавирусы выделяют от свободно обитающих или разводимых здоровых или больных лягушек в Америке, континентальной Европе, Соединенном Королевстве и Азии (Ariel с соавт., 2009; Chinchar, 2002; Cunningham с соавт., 1996; Drury с соавт., 1995; Fijan с соавт., 1991; Fox с соавт., 2006; Green с соавт., 2002; He с соавт., 2002; Wolf с соавт., 1968; Zhan с соавт., 2001; Zupanovic с соавт., 1998b), а также от больных свободно обитающих желтопятнистых амбистом *Ambystoma maculatum* в Северной Америке (Docherty с соавт., 2003; Jancovich с соавт., 2003). Иридовirus Bohle (BIV), который отличается от FV3, изначально выделяли у больных головастиков лягушки *Limnodynastes ornatus* в северной части Квинсленда, Австралия (Speare & Smith, 1992). С тех пор его больше не выделяли, хотя имеется серологическое подтверждение заражения ранавирусом обыкновенных жаб *Bufo bufo* в этом регионе (Whittington с соавт., 1996). Еще один отдельный вид ранавирусов, ATV, ответственен за смертность тигровой амбистомы *A. tigrinum* (Jancovich с соавт., 2005). Вирусы, близко родственные FV3, также выделяли у рептилий. Иридовirus Wamena (WIV) выделяли у больных зеленых питонов *Chondropython viridis*, завозимых контрабандой из Западного Папуа (Ириан-Джайя), в то время как иридовirus *Testudo hermanni* (THIV) (TV-SN8) выделяли у больных баоканских черепах *Testudo hermanni* в Европе. В исследованных областях МСР как WIV, так и THIV имели >97% гомологичных нуклеотидных последовательностей с FV3 (Hyatt с соавт., 2002; Marschang с соавт., 1999).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Смертность и заболеваемость различаются от вида к виду. Данные лабораторных заражений и полевые данные показывают, что смертность может варьироваться от низкой (например, 0%) до 100% гибели инфицированных животных в экспериментальной группе в зависимости от вида, вируса, а также возраста и состояния здоровья хозяина после кратковременного периода инфекции (Harp & Petranka, 2006; Hyatt с соавт., 1998; Pearman с соавт., 2004). Однако другие эксперименты с участием различных видов хозяев и ранавирусов показали переменные результаты (Brunner с соавт., 2004; Brunner с соавт., 2007; Cunningham с соавт., 2007).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Природные эпизоотии ранавирусов амфибий кажутся аналогичными ранавирусам рыб (например, EHNV). Эпизоотии являются, по-видимому, сезонными и могут быть связаны с плохими условиями содержания (содержащиеся в неволе популяции) и скученностью (дикие и содержащиеся в неволе). Предполагается, что в случае некоторых амфибий, таких как саламандры (библиография), болезнь ассоциируется с ежегодным появлением многочисленного неиммунного молодняка и их последующим контактом с вирусом на мелководье (Brunner с соавт., 2004; Brunner с соавт., 2007; Green соавт., 2002; Greer & Collins, 2008; Greer с соавт., 2008; Jancovich с соавт., 1997; Jancovich с соавт., 2001; Rojas с соавт., 2005).

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Отсутствует.

2.4.2. Химиотерапия

Отсутствует.

2.4.3. Стимуляция иммунитета

Не тестировали.

2.4.4. Разведение резистентных популяций

Не тестировали.

2.4.5. Замена на резистентные виды

Не тестировали.

2.4.6. Блокирующие агенты

Не тестировали.

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Не тестировали.

2.4.8. Общие стратегии содержания

Не тестировали.

3. Пробоотбор

3.1. Выбор индивидуальных образцов

Простой метод подготовки тканей для исследования на культуре клеток или в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) валидирован на примере рыб (Whittington & Steiner, 1993; Whittington с соавт., 1999).

Крупных амфибий на 30 секунд опускают в 70% этанол; мелких амфибий на 5 секунд опускают в 70% этанол, затем промывают стерильной водой. В асептических условиях препарируют в ламинарном боксе Класса II.

3.1.1. Крупные амфибии (длина >60 мм)

0,1 г печени, почек, селезенки ($\pm$ другие органы в особых ситуациях) извлекают и помещают в стерильные 1,5 мл пробирки. Существуют пробирки, подходящие для использования с пестиком для размельчения тканей (см. ниже), но стандартные 1,5 мл также пробирки могут быть пригодны. В некоторых ситуациях печень, почки и селезенку можно объединить в одной пробирке (см. раздел 3.3).

3.1.2. Амфибии среднего размера (длина 30-60 мм)

Все внутренности соскабливают в пробирку.

3.1.3. Мелкие амфибии (длина <30 мм)

Удаляют голову и хвост, оставшуюся часть животного помещают в пробирку.

3.2. Консервирование образцов для отправки

Для исследования на культуре клеток и в ИФА пробирки с тканями замораживают при температуре от

–20°C до –80°C и хранят до момента использования. Для оптической микроскопии зафиксировать ткани фиксируют в 10% нейтральном забуференном формалине.

3.3. Объединение образцов в пулы

Оценка влияния объединения в пулы тканей от многочисленных животных на диагностическую чувствительность не проводилась. Однако для проведения выделения вируса ткани обычно объединяют в пулы 5-10 особей на один тест.

3.4. Лучшие органы или ткани

Печень, почки, селезенка, кожа.

3.5. Образцы/ ткани, которые непригодны

Неподходящие ткани включают гонады, гонадную жидкость, молоки и яйцеклетки, т.к. в них отсутствуют признаки инфекции полового тракта, и неизвестно, участвует ли маточное стадо в цикле инфекции.

4. Методы диагностики

4.1. Методы диагностики в полевых условиях

4.1.1. Клинические признаки

У лягушек наблюдается два симптома, ассоциированных с инфекцией ранавирусом: хронический язвенный синдром и острый геморрагический синдром (Cunningham с соавт., 1996). У саламандр, инфицированных вирусом *Ambystoma tigrinum*, развиваются язвенный дерматит и энтерит. У инфицированных личинок наблюдаются небольшие многоочаговые геморрагии, поражающие подкожные ткани на подошвенной поверхности лап, в паховой области и в области клоаки, вентральные отеки, а на коже могут появляться бледные очаги (Bollinger с соавт., 1999; Docherty с соавт., 2003).

4.1.2. Поведенческие изменения

Поверхностные и поведенческие изменения у различаются у разных видов, на разных этапах жизни и в зависимости от тяжести болезни. Изменения включают лордоз, хаотичное плавание, сонливость и нарушение равновесия (Gray с соавт., 2009).

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопические патологические признаки

Макроскопические или неспецифические поражения могут отсутствовать. У лягушек с инфекцией ранавирусом ассоциируется два синдрома: язвенный синдром и геморрагический синдром (Cunningham с соавт., 1996). У саламандр, инфицированных вирусом *Ambystoma tigrinum*, может наблюдаться язвенный дерматит, бледные очаги на коже, небольшие многоочаговые геморрагии на лапах, в области паха, клоаки, подсерозной поверхности кишечника; печень может быть бледной и опухшей; могут наблюдаться вентральные отеки (Bollinger с соавт., 1999; Docherty с соавт., 2003).

4.2.2. Клиническая химия

Неприменимо.

4.2.3. Микроскопические патологические признаки

BIV и FV3 могут вызывать многоочаговые геморрагии и некроз во многих органах (Cullen & Owens, 2002; Robert с соавт., 2005). У саламандр, инфицированных

вирусом *Ambystoma tigrinum* развивается некроз во многих тканях, включая селезенку, печень, канальцевые эпителиальные клетки почек, а также лимфидные и гемопоэтические ткани (Bollinger с соавт., 1999). В клетках, наряду с областями очагового некроза разного размера, могут присутствовать амфотрофные внутрицитоплазматические тельца-включения (Bollinger с соавт., 1999; Docherty с соавт., 2003). В коже могут наблюдаться очаги спонгиоза и баллонизирующей дегенерации, эрозия и изъязвления, а также гиперплазия эпителиальных клеток эпидермиса, в которой могут присутствовать внутрицитоплазматические тельца-включения (Bollinger с соавт., 1999).

4.2.4. Влажные препараты

Неприменимо.

4.2.5. Мазки

Не исследовались.

4.2.6. Фиксированные срезы

См. раздел 4.3.

4.2.7. Электронная микроскопия/ цитопатология

Пораженные ткани (например, почки, печень и селезенка) содержат клетки, демонстрирующие признаки некроза. Клетки содержат подозрительные цитоплазматические включения, которые представляют собой разреженные участки цитоплазмы, в которых собираются вирусы. В цитоплазме видны скопления (ложнокристаллические решетки) крупных (ранавирусы могут значительно варьироваться по размеру от около 150 нм до >170 нм) безоболочечных икосаэдрических вирусов; также присутствуют одиночные вирусы. Целые вирусы (содержащие электронноплотные ядра) отпочковываются/выходят из инфицированных клеток через клеточную мембрану. Ядра инфицированных клеток зачастую располагаются по периферии и деформированы по размеру.

4.3. Методы выявления и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямой детекции

4.3.1.1. Методы микроскопического анализа

4.3.1.1.1. *Оптическая микроскопия*

Для фиксации тканей в 10% забуференном формалине, заливки в парафин, подготовке 1-мкм срезов и окрашивания гематоксилином и эозином для демонстрации некроза тканей и базофильных внутрицитоплазматических телец-включений используют стандартные методы. Эти тельца-включения указывают, но не подтверждают ранавирус. Для идентификации антигена ранавируса, ассоциированного с некротическими тканями, зафиксированные формалином и залитые в парафин ткани можно также окрашивать с использованием иммунопероксидазного метода (см. ниже).

4.3.1.1.2. *Электронная микроскопия*

Традиционные методы приготовления ультратонких срезов можно использовать для подготовки тканей и культур клеток (Eaton с соавт., 1991) с целью демонстрации некроза тканей, присутствия вирусов и вирусных включений. Для детекции антигена можно использовать ткани и клетки, зафиксированные с использованием альтернативных схем фиксации и заливки (Nyatt, 1991).

4.3.1.1.3. *Электронная микроскопия с негативным контрастированием*

Для выявления вируса можно использовать супернатанты тканей, полученных в результате гомогенизации в гомогенизаторе Даунса (10% [в/об]), и культуры клеток. Ранавирусы имеют отличительный внешний вид. Они могут различаться диаметром (150–180 нм) и имеют ограничивающую клеточную (клеточная мембрана) оболочку, которая окружает ассиметричный капсид. В основе капсида снова находится мембрана, которая сама окружает ядро, содержащее двухнитевую (дн) ДНК и минорные белки. Эти препараты можно также использовать для подтверждения антигенности ранавируса (Eaton с соавт., 1991).

4.3.1.1.4. *Влажные препараты*

Неприменимо.

4.3.1.1.5. *Мазки*

Неприменимо.

4.3.1.1.6. *Фиксированные срезы*

Методы микроскопического исследования см. в Разделе 4.3.1.1.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. *Культура клеток/искусственные среды*

4.3.1.2.1.1. *Подготовка тканей амфибий для проведения выделения вируса и ИФА*

Описан простой метод подготовки тканей для использования на культуре клеток и в ИФА (Whittington & Steiner, 1993; Whittington с соавт., 1999) (см. процедуру пробоотбора в Разделе 3.1).

- i) **Пробирки с тканями замораживают при –80°C и хранят до момента необходимости.**
- ii) **В каждую пробирку добавляют 0,5 мл среды для гомогенизации (минимальная эссенциальная среда Игла с солями Эрла и глутамином [MEM] с добавлением 200 международных единиц [МЕ]/мл⁻¹ пенициллина, 200 мкг/мл⁻¹ стрептомицина и 4 мкг/мл⁻¹ амфотерицина В). Ткань перетирают в мелкую кашицу при помощи стерильного пестика.**
- iii) **В каждую пробирку добавляют 0,5 мл среды для гомогенизации и перемешивают пестиком.**
- iv) **В каждую пробирку помещают три стерильных шарика (диаметр 3 мм) и закрывают крышку пробирки.**
- v) **Суспензию энергично перемешивают в вортексе в течение 20-30 секунд и помещают в температуру 4°C на 2 часа.**
- vi) **Суспензию снова перемешивают, как описано выше, и центрифугируют в течение 10 минут при 2500 g в настольной микроцентрифуге.**
- vii) **Супернатант, который теперь называется очищенный тканевый гомогенат, переносят в новую стерильную пробирку. Гомогенаты можно заморозить при температуре –80°C и хранить до момента использования для вирус-выделения и ИФА.**

4.3.1.2.1.2. *Культивирование в культуре клеток/искусственная среда*

Культивирование в культуре клеток – это золотой стандарт тестирования, но данный тест дорогостоящ и времязатратен. Ранавирусы хорошо растут на многих линиях клеток рыб, включая BF-2 (мальки синежаберного солнечника ATCC CCL 91), FHM (толстоголов; ATCC CCL 42), EPC (эпителиома

parulosum cyprini [Fijan с соавт., 1983]) и CHSE-214 (линия клеток эмбрионов чавычи; ATCC CRL 1681) при температурах в диапазоне от 15 до 22°C (Crane с соавт., 2005), но Референтная лаборатория предпочитает BF-2, когда как до так и после инокуляции вируса используется температура инкубации 22°C. Процедура работы с клетками BF-2 представлена ниже. Процедура работы с клетками CHSE-214 приводится ниже в описании иммунопероксидазного окрашивания (см. Раздел 4.3.1.2.2). Вирус *Ambystoma tigrinum* продуцирует ЦПД аналогичное EHNВ в клетках FHM, RTG и в клетках языка лягушки-быка при температуре 25°C (Docherty с соавт., 2003). Некоторые используют фибробласты эмбрионов лягушки при температуре 27°C или клетки FHM для выделения и выращивания изолятов FV3 из Соединенного Королевства (Cunningham с соавт., 1996, Cunningham с соавт., 2007).

Идентичность вирусов в культуре клеток определяют посредством иммунного окрашивания, ИФА, иммуно-электронной микроскопии, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и других методов.

4.3.1.2.1.3. Образцы

Тканевые гомогенаты.

4.3.1.2.1.4. Техническая процедура культивирования клеток

Клетки культивируют (во флаконах, пробирках или на микропланшетах) с ростовой средой (MEM + 10% фетальной телячьей сыворотки [FCS] с 100 МЕ/мл⁻¹ пенициллина, 100 мкг/мл⁻¹ стрептомицина и 2 мкг/мл⁻¹ амфотерицина Б). Клетки инкубируют до почти полной конфлюентности при температуре 22°C, на что может потребоваться до 4 дней в зависимости от нормы посева. В день инокуляции среду заменяют на поддерживающую среду (MEM с 2% ФТС и 100 МЕ/мл⁻¹ пенициллина, 100 мкг/мл⁻¹ стрептомицина и 2 мкг/мл⁻¹ амфотерицина Б). Из индивидуальных или объединенных в пулы гомогенатов с помощью среды для гомогенизации готовят разведение 1/10. В каждую культуру инокулируют 100 мкл образца на мл культуральной среды. Это представляет собой разведение 1/100 тканевого гомогената в объеме 0,1 мг/мл⁻¹. В одну культуру инокулируют неразведенный гомогенат, а в две культуры вводят гомогенат, разведенный 1/10. Этап адсорбции не применяется. В качестве альтернативы в одну или три культуры можно ввести непосредственно 10 мкл неразведенного гомогената на мл культуральной среды. Следует отметить, что применение большого количества неразведенного инокулята зачастую сопровождается высокой степенью клеточной токсичности и контаминации. Культуры инкубируют в инкубаторе при температуре 22°C в течение 6 дней. Культуры исследуют на день 3 и день 6. Культуры пассируют не менее одного раза для выявления образцов с низкими уровнями вируса. На день 6 первичные культуры (P1) замораживают в течение ночи при температуре -20°C, размораживают, аккуратно перемешивают, и затем культуральный супернатант инокулируют на свежие

клетки аналогично описанию выше (P2), т.е. 100 мл супернатанта P1 на 1 мл культуральной среды. Оставшиеся супернатанты P1 переносят в стерильные 5 мл пробирки и помещают в температурные условия 4°C для исследования посредством ИФА или ПЦР или другими способами, позволяющими подтвердить цитопатическое действие (ЦПД), аналогичное EHNВ. P2 инкубируют как описано выше и, при необходимости, проводят третий пассаж.

4.3.1.2.1.5. Интерпретация результатов

ЦПД хорошо выражено и включает в себя очаговый лизис, окруженный округленными гранулоцитами. Данное изменение быстро распространяется и охватывает весь монослой, который отделяется и разрушается.

4.3.1.2.2. Методы выявления антигена на основе антител

Следует отметить, что антитела, используемые во всех соответствующих методах (иммунопероксидазное окрашивание, ИФА с захватом антигена и иммуно-электронная микроскопия) перекрестно реагируют со всеми известными ранавирусами (Нуатт с соавт., 2000).

4.3.1.2.2.1. Выявление ранавирусов с использованием иммунопероксидазного окрашивания инфицированных культур клеток

4.3.1.2.2.1.1. Принцип теста

Ранавирусы реплицируются внутри культивируемых клеток. Добавление мягкого детергента пермеабилизирует клетки, позволяя аффинно-очищенному кроличьему антителу связываться с внутриклеточными вирусными белками. Ранавирус выявляют при помощи биотинилированного антивидового антитела и конъюгата стрептавидин-пероксидаза. Добавление субстрата приводит к окрашиванию меченых антителами областей в цвет «красного кирпича».

4.3.1.2.2.1.2. Образцы

Тканевые гомогенаты.

4.3.1.2.2.1.3. Рабочие характеристики

При проведении согласно описанному протоколу окрашивание получается ярким и специфичным. Однако тест не валидировали на предмет чувствительности или воспроизводимости.

4.3.1.2.2.1.4. Подготовка клеток

Ниже описана процедура для клеток CHSE-214. Также можно использовать другие рекомендуемые линии клеток.

- i) 24-луночные планшеты с клетками CHSE-214 засевают за день до использования в количестве 250 000 клеток/лунка (или 4 миллиона клеток на 40 мл ростовой среды/ планшет) на 1,5 мл ростовой среды (минимальная поддерживающая среда Игла с неэссенциальными аминокислотами [EMEM], 10% ФТС, 10 мМ N-2-гидроксиэтил пиперазин-N-2-этан-сульфоновая кислоты [HEPES], 2 мМ глутаминала, 100 МЕ пенициллина и 100 мкг стрептомицина) и инкубируют в 5% CO₂ при температуре 22°C в течение ночи.

ПРИМЕЧАНИЕ: Перед использованием культуры должны быть почти конфлюэнтными, и они должны содержать здоровые делящиеся клетки.

- ii) Среду удаляют, в каждую лунку вводят 150 мкл 10% суспензии перемолотой ткани (например, печень, почки или селезенка), инкубируют в течение 1 часа (22°C), затем добавляют 1,5 мл свежей поддерживающей среды (как и в случае ростовой среды, за исключением 2% ФТС) и возвращают в инкубатор (22°C).
- iii) Культуры наблюдают на предмет ЦПД. Если к 10 дню ЦПД отсутствует, культуры пересевают на новые клетки CHSE, собирая клетки и среду и добавляя 150 мкл клеток на новый планшет; следует помнить, что клетки не подвергают замораживанию и размораживанию. Отсутствует необходимость удалять существующую среду, новый планшет просто возвращают в инкубатор (22°C). Снова проводят ежедневные обследования на ЦПД.
- iv) Клетки фиксируют (в каждую лунку добавляют 50 мкл 20% раствора формалина для культур на 96-луночном планшете с 200 мкл культуральной среды/ лунка или 400 мкл (для культур на 24-луночных планшетах с 1,6 мл культуральной среды/лунка), не удаляя культуральную среду при первом обнаружении ЦПД. После инкубации (22°C) в течение 1 часа при комнатной температуре (RT), среду/ смесь формалина удаляют и лунки дважды промывают ФБР-А (фосфатно-буферный раствор, без Ca⁺⁺ и Mg⁺⁺) для удаления формалина. Если планшеты требуется хранить при температуре 4°C, добавляют большее количество ФБР-А.

4.3.1.2.2.1.5. Протокол

- i) Первичное анти-ЕHNV антитело и нормальную сыворотку разводят до рабочей концентрации в 1% растворе обезжиренного молока (ОМ) (ФБР-А (ОМ)) до объема, требуемого для проведения теста, как описано ниже (протокол фиксации для иммуногистохимии) для соответствующего возбудителя.
- ii) ФБР-А удаляют из лунок (с зафиксированными культурами клеток) и дважды промывают 0,05% (объем/объем) ФБР/Tween 20 (ФБРТ). Добавляют 50 мкл растворов первичного антитела в каждую лунку 96-луночного планшета или 200 мкл в лунки 24-луночного

планшета. Инкубируют в планшетном шейкере при 100-200 об/мин при комнатной температуре (22–24°C) в течение 15–30 минут или без встряхивания при температуре 37°C в течение 1 часа.

- iii) Биотинилированную антивидовую сыворотку (вторичное антитело) разводят в растворе 0,1% ОМ, как описано в протоколе фиксации (ниже) для соответствующего возбудителя до объема, рекомендуемого для проведения теста.
- iv) Раствор первичного антитела удаляют, и лунки трижды промывают ФБРТ. В лунки добавляют вторичное антитело. Инкубируют в планшетном шейкере при 100-200 об/мин при комнатной температуре в течение 15–30 минут или без встряхивания при температуре 37°C в течение 1 часа.
- v) Конъюгат стрептавидин-пероксидаза разводят в растворе 0,1% ОМ (для соответствующего возбудителя) до объема, рекомендуемого для проведения теста.
- vi) Вторичное антитело удаляют из лунок и лунки трижды промывают ФБРТ. В каждую лунку добавляют конъюгат. Инкубируют в планшетном шейкере при 100-200 об/мин при комнатной температуре в течение 15–30 минут или без встряхивания при температуре 37°C в течение 1 часа.
- vii) Готовят исходный раствор субстрата 3-амино-9-этилкарбазола (АЕС): одну таблетку АЕС (20 мг) растворяют в 2,5 мл диметилформамида.
- viii) Конъюгат удаляют из лунок. Промывают ФБРТ (трижды).
- ix) Исходный раствор АЕС разводят в 47,5 мл ацетатного буфера (4,1 мл безводного ацетата натрия в 1 литре деионизированной воды; ледяной уксусной кислотой уровень рН доводят до 5,0). Непосредственно перед использованием в раствор АЕС добавляют 25 мкл 30% перекиси водорода, и затем вносят в каждую лунку. Инкубируют при комнатной температуре в течение 20 минут.
- x) Раствор субстрата удаляют и для остановки реакции лунки дважды промывают деионизированной водой.
- xi) Для визуализации все клетки в течение 1 минуты контрастно окрашивают гематоксилином Майера (50 мкл/лунка или 200 мкл/лунка) и промывают деионизированной водой.
- xii) Добавляют 50 мкл заменителя водопроводной воды Скотта и промывают деионизированной водой. Высушивают на открытом воздухе.

4.3.1.2.2.1.6. Интерпретация результатов

4.3.1.2.2.1.6.1. Положительная реакция

Гранулоподобное, очаговое окрашивание в цвет красного кирпича указывает на присутствие вируса, идентифицированного посредством диагностического антитела.

4.3.1.2.2.1.6.2. Отрицательная реакция

Отсутствие явного красного окрашивания – все клетки должны быть окрашены в бледно-голубой в результате контрастного окрашивания.

4.3.1.2.2.1.6.3. Фоновое окрашивание

В культуре может возникать негранулярное, неочаговое, более генерализованное, бледное, розоватое окрашивание. Данное фоновое окрашивание может возникать по ряду причин, например, неспецифическая реакция антитела с невирусными компонентами, неэффективная промывка или окончание срока годности других реактивов.

4.3.1.2.2.1.7. Реактивы для иммуногистохимических исследований

4.3.1.2.2.1.7.1. 20% формальдегидный солевой раствор (ФБР-А)

Формалин (36–38% формальдегид) 54 мл

Дистиллированная вода 36 мл

10 × ФБР-А 10 мл

4.3.1.2.2.1.7.2. 10 x ФБР-А

Для получения 1 литра 10 × ФБР-А используют:

NaCl 80,0 г

Na₂HPO₄ 11,5 г

KCl 2,0 г

KH₂PO₄ 2,0 г

Дистиллированная вода 1,0 литр

ПРИМЕЧАНИЕ: Некоторые соли поставляются с дополнительными водными группами. При использовании таких реактивов массы

корректируют с учетом добавления соответствующей массы соли, например, в случае $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ добавляют 15 г вместо 11,5 г ($156 \text{ мг}/120 \text{ мг} \times 11,5 \text{ г} = 14,95 \text{ г}$) для устранения воздействия молекул воды.

4.3.1.2.2.2. Выявление ранавируса с использованием ИФА с захватом антигена

ИФА с захватом антигена валидирован для выявления EHNВ в культуре клеток и непосредственно в гомогенатах тканей рыб. Этот же анализ можно применять и на тканях амфибий. Аналитическая чувствительность составляет от 10^3 до 10^4 ТЦД₅₀/мл⁻¹. Специфичность достигает 100%, а чувствительность при прямом выявлении в тканях рыб – 60% относительно золотого стандарта выделения вируса в клетках BF-2 (Drury с соавт., 1995; Marsh с соавт., 2002; и неопубликованные данные). ИФА подходит как для диагностики, так и для сертификации. Реакции нейтрализации нельзя использовать для идентификации EHNВ, т.к. нейтрализующие антитела не продуцируются после иммунизации млекопитающих или рыб. Мышинные моноклональные антитела, производимые против EHNВ, направлены на эпитопы основных капсидных белков (МСР) и не являются нейтрализующими (неопубликованные данные). Для использования в ИФА с захватом антигена, иммунопероксидазном окрашивании и иммуноэлектронной микроскопии разработаны кроличьи анти-EHNВ антитела (Hengstberger с соавт., 1993; Hyatt с соавт., 1991; Reddacliff & Whittington, 1996). Реактивы и протоколы предоставляются референтной лабораторией.

4.3.1.2.2.2.1. Образцы

Образцы тканевых гомогенатов, приготовленные с использованием валидированного протокола (см. ниже), а также культуры клеток.

4.3.1.2.2.2.2. Принцип теста

Частицы EHNВ захватываются из образца аффинно-очищенным кроличьим антителом, которым сенсibilизирован планшет. EHNВ выявляют вторым антителом и меченым пероксидазой конъюгатом с использованием хромогена АВТС (2,2'-азино-ди-[3-этил-бензотиазолин]-6-сульфокислота). Фермент инактивируется через 20 минут и полученную оптическую плотность (OD) сравнивают со стандартом.

4.3.1.2.2.2.3. Компоненты теста и подготовка реактивов

- i) Необходимы плоскодонные титрационные микропланшеты.
- ii) Аффинно-очищенный анти-EHNВ иммуноглобулин и овечья анти-EHNВ антисыворотка поставляются в лиофилизированном виде. Реактивы восстанавливают с использованием 1 мл очищенной воды и оставляют сосуд при комнатной температуре на 2 минуты. Очень аккуратно содержимое сосуда перемешивают. Данные реактивы устойчивы при хранении при температуре –20°C в течение не менее 4 лет. Для стандартного применения в ИФА рекомендуется готовить рабочие растворы обоих антител в виде разведения 1/10 в

трис-солевом растворе глицерол-метиолята TSGM (формула в конце данного раздела). Они устойчивы при температуре -20°C в течение не менее 5 лет и не затвердевают при данной температуре.

- iii) Конъюгат меченного пероксидазой анти-овечьего иммуноглобулина (коммерческий реактив, KPL #14-23-06; 0,5 мг) поставляется в виде лиофилизированного порошка. Этот реактив продемонстрировал значительное постоянство действия от партии к партии в течение 15-летнего периода. Продукт восстанавливают в стерильной 50% глицериновой воде, распределяют на 150 мл аликвоты и хранят при температуре -20°C в виде неразбавленного раствора. Рабочий раствор готовят посредством добавления 900 мкл TSGM к 100 мкл неразбавленного раствора. Рабочий раствор также хранят при температуре -20°C , и он устойчив в течение не менее 1 года. Новые партии данного конъюгата следует титровать в сравнении с предыдущими партиями с использованием стандартных протоколов.
- iv) Контрольный антиген EHNВ, термоинактивированный, поставляется в виде лиофилизированного порошка. Его восстанавливают в 1 мл стерильной воды и хранят в небольших аликвотах при температуре -20°C . Разведения готовят с использованием PBSTG (ФБР + Tween + желатин) в день проведения теста. Контрольные разведения антигена EHNВ (А, В, D и F) охватывают диапазон сигнального ответа анализа и позволяют проводить процедуру нормализации.

4.3.1.2.2.2.4. Оборудование

Рекомендуется использовать автоматический мойщик планшет, хотя планшеты можно мыть и вручную. Анализ чувствителен к условиям для мытья планшетов. Если OD контролей непредвиденно низкая, а срок действия конъюгата и других реактивов не истек, мойщик планшетов следует настроить таким образом, чтобы минимизировать давление при наполнении лунок и удалении жидкости из лунок.

Рекомендуется использовать автоматический планшетный ридер, хотя планшеты можно анализировать и визуально.

Для приготовления разведений всех реактивов и для загрузки реактивов в лунки микротитровальных планшетов следует использовать точно откалиброванные пипетки.

4.3.1.2.2.2.5. Протокол

- i) 96-луночный ИФА-планшет сенсibilизируют (100 мкл/ лунка⁻¹) аффинно-очищенным кроличьим анти-EHNВ антителом, разведенным в пропорции 1/12800 в боратном буфере для сенсibilизации. Инкубируют в течение ночи при температуре 4°C .
- ii) Планшеты промывают отмывочным буфером пять раз (очищенная

вода Milli-Q (MQ) плюс 0,05% Tween 20). Следует помнить, что на данном этапе, также как и на всех других этапах можно использовать дистиллированную и деионизированную воду.

- iii) Готовят блокирующий раствор: растворы нагревают в микроволновой печи или на водяной бане для растворения желатина и охлаждают при комнатной температуре.
- iv) Оставшиеся сайты связывания блокируют с использованием блокирующего раствора (100 мкл/ лунка⁻¹) (1% [вес/объем] желатина в разбавителе PBSTG [ФБР, 0,05% (объем/объем) Tween 20, 0,1% (вес/объем) желатина]). Инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут.
- v) Планшеты промывают пять раз как описано выше.
- vi) Работы проводят в ламинарном боксе Класса II. Контрольный антиген разводят в PBSTG (см. ниже) и вносят в нижний правый угол планшета. Добавляют образцы тканевого гомогената или культурального супернатанта и контрольные антигены в количестве 100 мкл/лунка. Все образцы и контроли вносят в двух повторностях. Инкубируют при комнатной температуре в течение 90 минут.

Контрольные антигены – это разведения супернатанта термоинактивированной культуры клеток EHNV 86/8774. Предполагается, что контроли покажут следующие показатели OD, хотя могут наблюдаться некоторые вариации между лабораториями и, таким образом, допускается вариация $\pm 10\%$:

контроль	Разведение в ФБР*	OD (405 нм)*
	1/5	>2,0
	1/40	1,90
	1/200	0,68
	1/3000	0,16

*Эти разведения и показатели OD определяются Референтной лабораторией МЭБ по EHNV и будут варьироваться в зависимости от партии контрольного антигена. Вышеуказанные показатели относятся к партии 86/8774-4-5-01. Пороговое значение положительный-отрицательный для очищенных образцов гомогенатов ткани речного окуня и радужной форели в данном ИФА приблизительно выражен как показатель OD контроля D на каждом планшете.

- vii) Планшеты промывают вручную во избежание контаминации мойщика планшетов. Работы проводят в ламинарном боксе Класса II. Лунки аспирируют с использованием многоканальной пипетки. Планшеты дважды промывают.

- viii) Планшеты пять раз промывают в мойщике планшетов как описано выше.
- ix) Добавляют второе овечье анти-EHNV антитело, разведенное 1/32000 в PBSTG (100 мкл/ лунка⁻¹). Инкубируют при комнатной температуре 90 минут.
- x) Планшет промывают пять раз в мойщике планшетов.
- xi) Добавляют конъюгат, разведенный 1/1500 в PBSTG (100 мкл/ лунка⁻¹). Инкубируют в течение 90 минут при комнатной температуре.
- xii) Планшет промывают пять раз в мойщике планшетов.
- xiii) Добавляют субстрат ABTS (22 мл ABTS + 10 мкл H₂O₂) (100 мкл/ лунка⁻¹) и помещают планшет в планшетный шейкер. Время проведения данного этапа засекают с момента добавление субстрата в первые лунки планшета 1. Инкубируют в течение 20 минут.
- xiv) Сразу же добавляют стоп-раствор ABTS (50 мкл/ лунка⁻¹), планшет быстро встряхивают и считывают OD при 405 нм. Рассчитывают среднюю OD ИФА для дубликатных лунок. Рассчитывают коэффициент вариации повторностей: образцы с CV >15% следует тестировать повторно, если средняя OD приближается к пороговому значению положительный-отрицательный.

4.3.1.2.2.6. Нормализация данных и контроль качества на основе порога принятия решения

Если принято решение нормализовать данные по планшетам и времени или провести контроль качества на основе порога принятия решений, можно использовать следующую процедуру. Контрольные антигены тестируют в ИФА не менее пяти раз за 3 недели (всего 20 отдельных ИФА-планшетов). Для каждого контрольного антигена рассчитывают среднюю OD. Затем для каждого планшета последовательно рассчитывают поправочный коэффициент (PCF) следующим образом:

$$PCF = (средняя\ OD\ контроля\ A / фактическая\ OD + средняя\ OD\ контроля\ B / фактическая\ OD + средняя\ OD\ контроля\ D / фактическая\ OD + средняя\ OD\ контроля\ F / фактическая\ OD) / 4.$$
 Фактическую среднюю OD каждого образца умножают на PCF данного планшета, и данные показатели регистрируют.

Допускается варьирование PCF от 0,8 до 1,2, что приблизительно составляет коэффициент вариации 10%. Значения, выходящие за пределы данного диапазона, следует исследовать. Графики PCF за период времени обеспечивают готовый механизм мониторинга стабильности реактивов, процедурных вариаций и ошибок оператора. Данный метод контроля качества валидирован для ИФА с захватом антигена.

4.3.1.2.2.7. Буферы и другие реактивы

4.3.1.2.2.7.1. Боратный буфер для сенсibilизации

Борная кислота 6,18 г

Динатрий тетраборат ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 9,54 г NaCl 4,38 g

MQ вода до 1 литр

Автоклавируют.

4.3.1.2.2.2.7.2. 10 x фосфатно-буферный раствор

NaCl 80,00 г

KCl 2,00 г

Na_2HPO_4 11,50 г

KH_2PO_4 2,00 г

MQ вода до 900 мл

Уровень pH доводят до 7.2 HCl или NaOH; доводят объем до литра. Автоклавируют.

Для получения рабочих характеристик разводят 1/10 и вновь проверяют уровень pH.

Для хранения порошка в банках готовят двойной объем порошка; хранят; для приготовления добавляют 1,8 литров MQW, pH, доводят объем до 2 литров.

4.3.1.2.2.2.7.3. ABTS

Цитратно-фосфатный буфер

Лимонная кислота 21,00 г

Na_2HPO_4 14,00 г

MQ вода до 800 мл; уровень pH до 4,2; довести объем до 1 литра.

ABTS 0,55 г

Цитратно-фосфатный буфер до 1 литр

Распределяют на аликвоты по 22 мл и замораживают.

Сразу перед использованием добавляют 10 мкл H₂O₂ на аликвоту 22 мл.

4.3.1.2.2.7.4. Стоп-раствор ABTS (0,01% NaN₃ в 0,1 М лимонной кислоты)

Лимонная кислота 10,5 г

до to 500 мл

Добавляют 50 мг азиды натрия или 1 мл 5% раствора.

4.3.1.2.2.7.5. Конъюгат KPL #14-23-062

• **Криопротектор TSGM**

10 × Tris/солевой раствор, pH 7,450 мл

Глицерин 250 мл

Стерильная очищенная вода до 500 мл

Автоклавируют.

Добавляют 1 мл 10% мертиолята. Хранят в темной бутылке при температуре 4°C.

• **10 × Tris/солевой раствор (250 mM Tris, 1,5 M NaCl)**

2 Поставщик реактивов: Bio-Mediq DPC Australia, P.O. Box 106, Doncaster, Victoria 3108, Австралия; Тел.: (+61-3) 9840 2767; Факс: (+61-3) 9840 2767. Ссылки на глобальную сеть дистрибьюторов см по: <http://www.kpl.com>

Tris	15,14 г
NaCl	43,83 г
Стерильная очищенная вода	500 мл

Уровень pH доводят до 7,4.

4.3.1.2.2.3. Иммуно-электронная микроскопия

4.3.1.2.2.3.1. Мечение золотом срезов, содержащих ткани или культуры клеток

4.3.1.2.2.3.1.1. Принцип теста

Культуры клеток, ткани и/или гомогенизированные ткани можно использовать для исследования с применением электронной микроскопии. Традиционная электронная микроскопия (исследование ультратонких срезов) позволяет получить данные о структуре и морфогенезе вируса. Электронная микроскопия с негативным контрастированием позволяет получить изображения, которые можно использовать для исследования корпускулярной структуры вируса. Применение ранавирус-специфичных антител и конъюгированного золота вместе с этими препаратами позволяет исследовать как ультраструктуру, так и антигенность (Nyatt, 1991). Эти объединенные данные позволяют классифицировать род *Ranavirus*.

4.3.1.2.2.3.2. Культуры клеток и ткани

- i) Ткани или культуры клеток фиксируют как описано у Nyatt, 1991. Кратко, 2,5% (объем/объем) забуференный глутаральдегид (какодилат или фосфат) используют для фиксации клеток в течение 40 минут. После первичной фиксации клетки промывают этим же буфером (3 × 20 минут), постфиксируют в 1% (вес/объем) забуференном оксиде осмия (1 час), промывают (3 × 5 минут) в воде, подвергнутой двойной дистилляции/ обратному осмосу (RO), дегидратируют посредством набора спиртов повышающей концентрации (70–100%), затем фильтруют и заключают в эпоксидную смолу (например, Spurr's или epon). При мечении золотом ультратонких заключенных в смолу срезов следует уделять внимание режимам фиксации и заключения. Например, клетки следует фиксировать в 0,25% (объем/объем) глутаральдегиде с добавлением 2–4% параформальдегида. Вторичную фиксацию не применяют, а клетки фильтруют и заключают в акриловую смолу, например, в LR White.
- ii) После фиксации и заключения ультратонкие срезы нарезают и переносят на пленочные никелевые сеточки.

- iii) Срезы нарезают из соответствующих блоков.
- iv) Блокируют в 2% (вес/объем) обезжиренном сухом молоке в ФБР-А (10 минут).
- v) Блокируют свободные альдегиды посредством 0,1 М глицина в ФБР-А (20 минут).
- vi) Промывают в ФБР-А (3 × 1 минуте). Это оптимальный этап, используемый только при избытке свободных альдегидов (на это может указывать интенсивный фон).
- vii) Если не используется белок А-золото, блокирование проводят в нормальной видовой сыворотке – данная сыворотка должна быть гомологична сыворотке, связываемой с золотом. Рекомендуемое разведение – около 1/40 (10 минут).
- viii) Инкубируют в первичном антителе. Если неизвестны детали инкубации, начальные реакции проводят в разведениях от 1/100 до 1/2700 (с трехкратными разведениями). Антитела разводят в 1% (объем/объем) растворе желатина из холодноводных рыб в ФБР-А, (60 минут, RT).
- ix) Промывают в 1% (объем/объем) растворе желатина из холодноводных рыб в ФБР-А, (6 × 3 минуты).
- x) Инкубируют в меченом золотом вторичном антителе или белок А-золоте или белок G-золоте. Предлагаемое разведение – 1/40 в ФБР-А, содержащем 1% (вес/объем) альбумина бычьей сыворотки (BSA), 0,1% (объем/объем) Tween 20 и 0,1% (объем/объем) Triton X, 60 минут, RT.
- xi) Промывают в ФБР-А (6 × 3 минуты, RT).
- xii) Постфиксируют в 2,5% (объем/объем) глутаральдегиде в ФБР-А (5 минут, RT).
- xiii) Промывают в воде (RO) (3 × 3 минуты, RT).
- xiv) Высушивают на фильтровальной бумаге (тип значения не имеет).
- xv) Окрашивают в ацетате уранила и ацетате свинца.

4.3.1.2.2.3.2.1. Интерпретация результатов

Вирусы в цитоплазме инфицированных клеток будут специфично мечены золотом. Вирусы будут расположены поодиночке в тельцах-скоплениях (тельцах-включениях) и в паракристаллических массивах.

4.3.1.2.2.3.3. Мечение золотом вирусных частиц (вирусов, адсорбированных на сетках)

- i) В гомогенизаторе Даунса гомогенизируют 10% (вес/объем) печени, почек или селезенки и освещают (5 минут, 2500 g).
- ii) Адсорбируют супернатант (из гомогената или культур клеток) на субстрат сетки.
- iii) Используют золотые сетки с углеродным покрытием, 200 ячеек.

- iv) Образец фиксируют 0,1% (объем/объем) глутаральдегидом и 1% (объем/объем) Nonidet P40 (NP40) в ФБР (2 минуты).
- v) Промывают в ФБР (3 × 3 минуты).
- vi) Блокируют 5% (объем/объем) раствором желатина из холодноводных рыб (Sigma) в ФБР (10 минут), затем буфером для инкубации (ФБР/0,1% раствор желатина из холодноводных рыб).
- vii) Инкубируют с антителом (аффинно-очищенное кроличье анти-ЕННВ антитело, Серия №. М708; поставляется Референтной лабораторией МЭБ; рекомендуемое разведение 1/500) в течение 1 часа при RT.
- viii) Сетки промывают (6 × 3 минуты) в буфере для инкубации.
- ix) Инкубируют с 10 нм белка А-золота (для приготовления разведения см. рекомендации поставщика) в течение 1 часа при RT.
- x) Промывают (6 × 3 минуты).
- xi) Фиксируют 2,5% глутаральдегидом (5 минут).
- xii) Промывают дистиллированной водой (3 × 3 минуты) и окрашивают 2% фосфорновольфрамовой кислотой (рН 6,8) в течение 1 минуты.

4.3.1.2.2.3.1. Интерпретация результатов

Включение NP40 позволит антителам и белку А-золото проникнуть через внешнюю мембрану и вступить в реакцию с находящимся под ней капсидом. Мечение должно быть вирус-специфичным. Аффинно-очищенную кроличью сыворотку без ЕННВ (1/500) следует включить в качестве отрицательного контроля.

4.3.1.2.2.4. Иммуногистохимия (иммунопероксидазное окрашивание)

4.3.1.2.2.4.1. Образцы

Фиксированные формалином залитые в парафин срезы ткани.

4.3.1.2.2.4.2. Техническая процедура

Следующий протокол предназначен для качественной демонстрации антигенов ранавируса в фиксированных формалином, залитых в парафин срезах ткани (He с соавт., 2002). Он предполагает, что антигены могут перекрестно связываться и, таким образом, включает этап протеазного расщепления, который можно опустить, если исследуются нефиксированные образцы. Для окрашивания используется коммерческий набор (DAKO® LSAB K0679) с меченым пероксидазой стрептавидином и смесью биотинилированных анти-кроличьих/ анти-мышинных/ анти-козьих иммуноглобулинов в качестве связывающих антител. Также используются другие коммерческие реактивы. Для удобства последние также

поставляются DAKO3. Первичное аффинно-очищенное кроличье анти-ЕHNV антитело (Серия № M708) поставляется в лиофилизированном виде Референтной лабораторией МЭБ.

i) Нарезают срезы толщиной 5 мкм и закрепляют на предметных стеклах SuperFrost® Plus G/Edge (Menzel-Glaser, HD Scientific Cat. No. HD 041300 72P3). Вокруг среза делают отметку алмазным стеклорезом для ограничения распространения реактивов.

ii) Срез депарафинируют:

- Предметные стекла предварительно нагревают в 60°C инкубаторе в течение 30 минут.
- Предметные стекла помещают в кювету с ксилолом и инкубируют в течение 5 минут. Повторяют один раз. Следует отметить, что без ущерба для производительности можно использовать заменители ксилола.
- Излишки жидкости удаляют, и предметные стекла помещают в абсолютный этиловый спирт на 3 минуты. Повторяют один раз.
- Излишки жидкости удаляют, и предметные стекла помещают в 95% этиловый спирт на 3 минуты. Повторяют один раз.
- Излишки жидкости удаляют, и предметные стекла помещают в дистиллированную или деионизированную воду на 30 секунд.

iii) Антигены сенсibilизируют посредством обработки протеиназой. Предметное стекло заливают протеиназой К (5–7 мкг/мл⁻¹) и инкубируют в течение 20 минут (готовый к использованию раствор, DakoCytomation Кат № S3020). Предметное стекло промывают посредством трехкратного погружения в воду. Помещают в кювету с PBST на 5 минут (ФБР pH 7,2; 0,05% [объем/объем] Tween 20). Избыток промывочного раствора удаляют и аккуратно промокают поверхность вокруг среза.

iv) Реакцию иммунного окрашивания проводят с использованием универсального набора Universal DAKO LSAB®+ Kit, Peroxidase (DakoCytomation Кат. № K0679). Убедившись, что срез ткани полностью покрыт, добавляют на предметное стекло следующие реагенты. Избегать высыхания.

v) 3% перекись водорода:

3 Dako Cytomation California Inc., 6392 via Real, Carpinteria, CA 93013, USA, Тел.: (+1-805) 566 6655, Факс: (+1-805) 566 6688; Dako Cytomation Pty Ltd, Unit 4, 13 Lord Street, Botany, NSW 2019, Australia, Факс: (+61-2) 9316 4773; Ссылки на другие страны см. <http://www.dakocytomation.com>

- Покрыть срез и инкубировать в течение 5 минут.
- Аккуратно промыть PBST и поместить в кювету со свежей водой.
- vi) Нанести первичное антитело (аффинно-очищенное кроличье анти-EHNV 1/1500 Серия № M708) и отрицательный контрольный реактив (неиммунная кроличья сыворотка в разведении 1/1500) на второе предметное стекло. Накрыть срез и инкубировать в течение 15 минут. Промыть предметные стекла.

vii) Связывание:

- Накрывают срез и инкубируют в течение 15 минут.
- Промывают предметные стекла.

viii) Стрептавидин-пероксидаза:

- Накрывают срез и инкубируют в течение 15 минут.
- Промывают предметные стекла.

ix) Раствор субстрата и хромогена:

- Накрывают срез и инкубируют в течение 5 минут.
- Аккуратно промывают предметные стекла дистиллированной водой.
- x) Контрастно окрашивают, поместив предметные стекла в кювету с гематоксилином DAKO® Mayer's Haematoxylin на 1 минуту (Lillie's Modification, Кат. № S3309). Аккуратно промывают дистиллированной водой. Погружают 10 раз в кювету с водой. Помещают в дистиллированную или деионизированную воду на 2 минуты.
- xi) Закрепляют и накрывают образцы покровными стеклами с закрепляющей средой на водной основе (DAKO® Faramount Aqueous Mounting Medium Кат № S3025).

4.3.1.2.2.4.2.1. Интерпретация результатов

Антиген ранавируса проявляется как коричневое окрашивание в областях, окружающих дегенеративные и некротические области в паренхиматозных зонах. Окрашивание должно отсутствовать при использовании отрицательной контрольной кроличьей сыворотки на одном и том же срезе.

4.3.1.2.2.4.2.2. Доступность тестов и реактивов

Антитела и протоколы тестов имеются в Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

Идентификация ранавируса на уровне рода и вида возможна при использовании методов ПЦР на основе гена МСР. При использовании первого метода две ПЦР с праймерами МСР используются наряду с рестрикционным анализом для выявления и быстрой дифференциации ранавирусов рыб (EHNV, ECV) от ранавирусов амфибий (FV3, BIV) (Harp & Petranka, 2006). Это можно сделать менее чем за 24 часа с относительно низкими затратами. При использовании второго метода применяется одна ПЦР с МСР для получения продукта длиной 580 п.о., который затем секвенируют для идентификации типа ранавируса (см. Главу 2.3.1. Эпизоотический гематопозитический некроз).

4.3.1.2.3.1. Образцы

Вирус из культуры клеток или прямой анализ гомогената ткани.

4.3.1.2.3.2. ПЦР и рестрикционно-эндонуклеазный анализ (REA): техническая процедура

Аmplицированный продукт ПЦР с МСР-1, расщепленный *Pfl*М I, позволяет дифференцировать австралийские иридовирусы (EHNV и BIV) от неавстралийских иридовирусов (FV3, Северная и Южная Америки; и ECV, Европа). Амплицированный продукт ПЦР с МСР-2, расщепленный *Hinc* II, *Acc* I и *Fnu*4H I (по-отдельности), позволяет дифференцировать EHNV и BIV (Австралия) друг от друга и от FV3 (Северная и Южная Америка) и ECV (Европа).

4.3.1.2.3.2.1. Подготовка реактивов

Контрольные реактивы для ПЦР в виде ДНК, очищенной от EHNV, и ДНК, очищенной от BIV, поставляются референтной лабораторией в лиофилизированном виде. Восстанавливают с использованием 0,5 мл буфера Tris-ЭДТА (TE) (10 mM Tris/HCl, 1 mM ЭДТА, pH 8,0) и оставляют сосуд при комнатной температуре на 2 минуты. Очень аккуратно перемешивают содержимое флакона. Для рутинного применения в качестве ПЦР-контроля рекомендуется готовить рабочие растворы в виде разведений 1/10 в буфере TE (pH 8,0). Аликвоты объемом 250 мкл следует хранить при температуре –20°C. Каждой аликвоты достаточно для проведения не менее 50 реакций (в коктейль добавляют 1-5 мкл), и срок ее хранения составляет 6 месяцев с даты разведения.

Праймеры M151 и M152 (MCP-1, 321 п.о.), M153 и M154 (MCP-2, 625 п.о.) поставляются в рабочем состоянии, и их следует хранить при температуре – 20°C. Праймеры можно также заказать у коммерческих поставщиков. Последовательности праймеров см. в Таблице 4.1.

Таблица 4.1. Последовательности праймеров MCP-1 и MCP-2

ПЦР	Праймер	Последовательность	Длина продукта	Позиция гена
MCP-1	M151	AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA	321 п.о.	266-586
	M152	CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT		
MCP-2	M153	ATG-ACC-GTC-GCC-CTC-ATC-AC	625 п.о.	42-1466
	M154	CCA-TCG-AGC-CGT-TCA-TGA-TG		

4.3.1.2.3.2.2. Коктейль для проведения ПЦР

Реакции амплификации в итоговом объеме 50 мкл (включая 5 мкл образца ДНК) содержат 2,5 мкл каждого рабочего праймера, 200 мкМ каждого нуклеотида из состава dATP, dTTP, dGTP и dCTP, 10 × буфера ПЦР (66,6 мМ Tris/HCl, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 1,65 мг/мл⁻¹ BSA, 10 мМ бета-меркаптоэтанол) и 2 Ед Taq полимеразы. Инструкции по приготовлению 10 × буфера ПЦР приведены в Таблице 4.2.

Таблица 4.2. Приготовление 10 × буфера ПЦР

Ингредиенты	Количество	Итоговая концентрация в 50 мкл ПЦР-смеси
Tris	4,050 г	66,6 мМ
Сульфат аммония	1,100 г	16,6 мМ
BSA (фракция V бычьего альбумина, без жирных кислот)	0,825 г	1,65 мг/мл ⁻¹
Хлорид магния	1,25 мл	2,5 мМ
Этанол TE (стерильный)	50 мл	

ПРИМЕЧАНИЕ: Также можно использовать альтернативные коммерческие буферы.

Включены два отрицательных контроля, один включает в себя только реакционную смесь для проведения ПЦР, второй содержит 5 мкл буфера ТЕ.

Реакции с МСР-1 и МСР-2 имеют следующий профиль: 1 цикл денатурации при температуре 94°C в течение 3 минут, затем 35 циклов денатурации при температуре 94°C в течение 30 секунд, отжиг при температуре 50°C в течение 30 секунд и элонгация при температуре 72°C в течение 1 минуты; финальная элонгация при температуре 72°C в течение 5 минут и охлаждение до 4°C.

ПРИМЕЧАНИЕ: Когда анализ используется для исследования тканей рыб, для снижения неспецифичной амплификации температуру отжига можно повышать до 60 или 62°C.

Результаты ПЦР оценивают посредством электрофореза в 2% агарозных гелях, окрашенных этидия бромидом. Контрольная ДНК EENV для ПЦР (1/10 рабочего раствора) должна демонстрировать результат, идентичный по интенсивности 10-3 полосы в обоих случаях.

4.3.1.2.3.2.3. Рестрикционно-эндонуклеазный анализ (REA)

ПЦР-ампликоны подвергают REA с ферментами, описанными в Таблице 4.3. Все эндонуклеазы следует использовать в соответствии с инструкциями производителя. Реакции REA готовят посредством добавления 1–4 мкл продукта ПЦР, 2 Ед соответствующей рестрикционной эндонуклеазы, 1,6 мкл буфера (поставляется с каждой рестрикционной эндонуклеазой), 1,6 мкл 100 мкг/мл⁻¹ BSA (для *Pfl* I и *Hinc* II) и доводят до итогового объема 16 мкл стерильной очищенной водой. Рестрикты инкубируют в течение 2-4 часов при рекомендуемых температурах и оценивают посредством электрофореза в агарозном геле в 3% гелях. Прогнозируемые размеры полос приведены в Таблице 4.3.

Таблица 4.3. Рестрикционно-эндонуклеазный анализ МСР-ампликонов ранавируса

ПЦР	рестрикционный фермент	прогнозируемый размер полосы после рестрикции (п.о.)	паттерн применим к
-1 (321 п.о.)	M I	1	INV, BIV
		1, 190	1/3, WIV
-2 (625 п.о.)	nc II	0, 138, 387	INV
		0, 525	V, FV3
		0, 240, 285	IV
	c I	8, 387	INV
		5	V, ESV, ECV, WIV

	4, 461	73, GV ¹
	, 38, 44, 239, 271	INV
	33, 38, 44, 108, 399	V
и4Н I	38, 44, 108, 432	73, GV ¹
	9, 38, 44, 108, 151, 272	IV, ECV
	44, 71, 108, 399	IV

1. GV: Вирус Gutapo (Hyatt с соавт., 2000).

Разделяют на аликвоты объемом 500 мкл и хранят при температуре –20°C. Для получения рабочего раствора добавляют 3,5 мкл бета-меркаптоэтанола на 500 мкл 10 × буфера. Весь оставшийся буфер следует утилизировать после приготовления реакционной смеси для проведения ПЦР.

Проводится оценка чувствительности ПЦР в ходе диагностического применения непосредственно на тканях рыб.

Подробные протоколы проведения теста, аналитические листы и ДНК очищенного контрольного EHNВ можно получить в Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3.3. Альтернативная ПЦР и секвенирование для идентификации вируса

В ходе данного анализа для амплификации целевой последовательности МСР (580 пар оснований [п.о.]) ДНК EHNВ посредством ПЦР используют два праймера: обратный праймер (5'-AAA-GAC-CCG-TTT-TGC-AGC-AAA-C-3') и прямой праймер (5'-CGC-AGT-CAA-GGC-CTT-GAT-GT-3'). Данную процедуру ПЦР можно использовать для специфической детекции ранавирусов у краснопёрки, радужной форели, обыкновенного сома, зубатки, гупий (*Poecilia reticulata*), линей (*Labroides dimidiatus*) и ряда ранавирусов амфибий (Eaton с соавт., 1991). Нуклеиновую кислоту (1 мкл) добавляют к Таq полимеразному буферу, содержащему 0,1 мкМ каждого праймера, 2,5 Ед. Таq полимеразы (Promega) и 2,5 мМ MgCl₂. Смесь инкубируют в автоматическом термоциклере, запрограммированном на 35 циклов при температуре 95°C в течение 60 секунд, при 55°C в течение 60 секунд и при 72°C в течение 60 секунд, а в заключение выдерживают при температуре 72°C в течение 15 минут. Амплифицированную ДНК (580 п.о.) анализируют посредством электрофореза в агаровом геле, отсекают и секвенируют с использованием ряда стандартных технологий). Каждый вид вируса идентифицируют по его уникальной последовательности ДНК, опубликованной в GenBank. Образцы предоставляются в Референтную лабораторию МЭБ для специфической идентификации.

4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

Описана очистка EHNV (Drury с соавт., 1995; Hyatt с соавт., 2000) и в референтной лаборатории можно получить протокол.

4.3.2. Серологические методы

У рыб или млекопитающих не выявляют нейтрализующие антитела, индуцированные в ответ на ранавирусы. Непрямой ИФА для выявления антител, индуцированных после воздействия ранавирусов, описаны для *Bufo marinus*. Для проведения этих тестов в референтной лаборатории имеются протоколы и специфичные анти-иммуноглобулиновые реактивы.

5. Оценка тестов по цели применения

Используемые в настоящее время методы надзора, выявления и диагностики ранавируса перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, использованные в Таблице, означают: а = метод рекомендован по причине доступности, практичности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы значительно ограничивают его применение; и d = в настоящее время метод не рекомендуется для этой цели; NA = неприменимо. Это, в некоторой мере, субъективно, т.к. пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и практичности. Несмотря на то, что не все тесты, перечисленные в категории а или b, прошли официальные процедуры стандартизации и валидации (см. Главу 1.1.2 данного *Водного руководства*), их рутинная суть и факт их широкого применения без сомнительных результатов делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы целевого надзора и диагностики

год	Целевой надзор				вари- тельный диагноз	тверж- дающий диагноз
	клетки/ семенники	вастики	морфы	слые особи		
микроскопические поражения	н/п				d	
гистопатология	н/п				b	
гистохимическое окрашивание	н/п				b	
иммунофлуоресцентная ЭМ	н/п				c	
ультраструктурная ЭМ	н/п				c	
культивирование в клетках	н/п				a	
ИФА с захватом антигена	н/п				b	

А с захватом антитела	н/п				с	
Р-REA	н/п				с	
Р, секвенирование	н/п				с	

ЭМ = электронная микроскопия; ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ; ПЦР = полимеразная цепная реакция; REA = рестрикционно-эндонуклеазный анализ; н/п = неприменимо.

6. Тест(ы), рекомендованные для целевого надзора в целях признания благополучия по инфекции ранавирусом

Необходимо использовать статистически достоверные стратегии выборки, но в настоящее время их невозможно определить для амфибий. Необходимо отбирать правильные органы/образцы.

Следует применять стандартизированные тесты с установленной чувствительностью и специфичностью. Это ограничивает тестирование для сертификации культивированием в культуре клеток, что является золотым стандартом тестирования.

Серология также могла бы играть полезную роль в обследованиях, направленных на идентификацию инфицированных популяций амфибий. Для подтверждения правильности данного подхода требуются дополнительные научные исследования.

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Определение случая подозрения

Амфибии, визуально здоровые, умирающие или погибшие, у которых на коже или в тканях паренхимы содержатся гистологические признаки фокального, многоочагового или локального распространения колликвационного или коагуляционного некроза с внутрицитоплазматическими базофильными включениями или без них.

7.2. Определение подтвержденного случая

Амфибии, визуально здоровые, умирающие или погибшие, у которых на коже или в тканях паренхимы содержатся гистологические признаки фокального, многоочагового или локального распространения колликвационного или коагуляционного некроза с внутрицитоплазматическими базофильными включениями или без них и/или у которых ранавирус продемонстрирован следующими способами:

1. **Характерное ЦПД в культуре клеток, или культура клеток положительна по ранавирусу в иммунопероксидазном тесте или ИФА с захватом антигена или в ПЦР,**

или

2. **Ткани положительны в ИФА с захватом антигена или иммунопероксидазном окрашивании или иммунной электронной микроскопии или в ПЦР.**

И в отношении как пункта 1 так и пункта 2 при использовании ПЦР: Последовательности, характерные для ранавируса, продемонстрированы посредством ПЦР-REA или PCR-секвенирования.

8. Библиография

ARIEL E., KIELGAST J., SVART H.E., LARSEN K., TAPIOVAARA H., JENSEN B.B. & HOLOPAINEN R. (2009).

Ranavirus in wild edible frogs (*Pelophylax kl. esculentus*) in Denmark. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 7–14.

BOLLINGER T.K.M., SCHOCK J., BRIGHAM D. & GREGORY R.M. (1999). Pathology, isolation, and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in Saskatchewan. *J. Wildl. Dis.*, **35**, 413–429.

BRUNNER J., SCHOCK D., DAVIDSON E. - & COLLINS J. (2004). Intraspecific reservoirs: complex life history and the persistence of a lethal ranavirus. *Ecology*, **85**, 560–566.

BRUNNER J.L., SCHOCK D.M. & COLLINS J.P. (2007). Transmission dynamics of the amphibian ranavirus

Ambystoma tigrinum virus. *Dis. Aquat. Org.*, **77**, 87–95.

BRYAN L.K., BALDWIN C.A., GRAY M.J. & MILLER D.L. (2009). Efficacy of select disinfectants at inactivating Ranavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **84**, 89–94.

CAREY C., BRADFORD D.F., BRUNNER J.L., COLLINS J.P., DAVIDSON E.W., LONGCORE J.E., OUELLET M.,

PESSIER A.P. & SCHOCK D.M. (2003a). Biotic factors in amphibian population declines. *In: Multiple stressors and declining amphibian populations*. Linder G., Sparling D.W. & Krest S.K., eds. Society for Environmental Chemistry and Toxicology Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Press, Pensacola, Florida, USA.

CAREY C., PESSIER A.P. & PEACE A.D. (2003b). Pathogens, infectious disease, and immune defenses. *In: Amphibian conservation*. Semlitsch R.D., ed., Smithsonian Institute, Washington, DC, USA, 127–136.

CHINCHAR V.G. (2002). Ranaviruses (family *Iridoviridae*): emerging cold-blooded killers - brief review. *Arch. Virol.*,

147, 447–470.

CHINCHAR G., ESSBAUER S., HE J.G., HYATT A., MIYAZAKI T., SELIGY V. & WILLIAMS T. (2005). Family

Iridoviridae. *In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, 145–161.

CRANE M.S.J., YOUNG J. & WILLIAMS L. (2005). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): growth in fish cell lines at different temperatures. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **25**, 228–231.

CULLEN B.R. & OWENS L. (2002). Experimental challenge and clinical cases of Bohle iridovirus (BIV) in native Australian anurans. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 83–92.

CUNNINGHAM A.A., HYATT A.D., RUSSELL P. & BENNETT P.M. (2007). Emerging epidemic diseases of frogs in Britain are dependent on the source of ranavirus agent and the route of exposure. *Epidemiol. Infect.*, **135**, 1200–1212.

CUNNINGHAM A.A., LANGTON T.E.S., BENNETT P.M., LEWIN J.F., DRURY S.E.N., GOUGH R.E. & MACGREGOR

S.K. (1996). Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Phil. Trans. R. Soc. B*, **351**, 1539–1557.

CUNNINGHAM A.A., TEMS C.A. & RUSSELL P.H. (2008). Immunohistochemical demonstration of Ranavirus antigen in the tissues of infected frogs (*Rana temporaria*) with systemic haemorrhagic or cutaneous ulcerative disease. *J. Comp. Pathol.*, **138** (1), 3–11.

DASZAK P., CUNNINGHAM A.A. & HYATT A.D. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. *Divers Distrib.*, **9**, 141–150.

DOCHERTY D.E., METEYER C.U., WANG J., MAO J., CASE S.T. & CHINCHAR V.G. (2003). Diagnostic and molecular evaluation of three iridovirus-associated salamander mortality events. *J. Wildl. Dis.*, **39**, 556–566.

DRURY S.E.N., GOUGH R.E. & CUNNINGHAM A.A. (1995). Isolation of an iridovirus-like agent from common frogs (*Rana temporaria*). *Vet. Rec.*, **137**, 72–73.

EATON B.T., HYATT A.D. & HENGSTBERGER S. (1991). Epizootic haematopoietic necrosis virus: purification and classification. *J. Fish Dis.*, **14**, 157–169.

FIJAN N., MATASIN Z., PETRINEC Z., VALPOTIC I. & ZWILLENBERG L.O. (1991). Isolation of an iridovirus-like agent from the green frog (*Rana esculenta* L.). *Veterinarski Arhiv*, **61**, 151–158.

FIJAN N., SULIMANOVIC D., BEARZOTTI M., MUZINIC D., ZWILLENBERG L., CHILMONCZYK S., VAUTHEROT J.

& DE KINKELIN P. (1983). Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*). *Ann. Virol. Institut Pasteur*, **134**, 207–220.

FOX S.F., GREER A.L., TORRES-CERVANTES R. & COLLINS J.P. (2006). First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 87–92.

GREEN D.E., CONVERSE K.A. & SCHRADER A.K. (2002). Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996–2001. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **969**, 323–339.

GREER A.L., BRIGGS C.J. & COLLINS J.P. (2008). Testing a key assumption of host-pathogen theory: density and disease transmission. *Oikos*, **117**, 1667–1673.

GREER A.L. & COLLINS J.P. (2008). Habitat fragmentation as a result of biotic and abiotic factors controls pathogen transmission throughout a host population. *J. Anim. Ecol.*, **77**, 364–369.

GRAY M.J., MILLER D.L. & HOVERMAN J.T. (2009). Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **87** (3), 243–266.

HARP E.M. & PETRANKA J.W. (2006). Ranavirus in wood frogs (*Rana sylvatica*): potential sources of transmission within and between ponds. *J. Wildl. Dis.*, **42**, 307–318.

HENGSTBERGER S.G., HYATT A.D., SPEARE R. & COUPAR B.E.H. (1993). Comparison of epizootic

haematopoietic necrosis and Bohle iridoviruses, recently isolated Australian iridoviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 93–107.

HE J.G., LU L., DENG M., HE H.H., WENG S.P., WANG X.H., ZHOU S.Y., LONG Q.X., WANG X.Z. & CHAN S.M.

(2002). Sequence analysis of the complete genome of an iridovirus isolated from the tiger frog. *Virology*, **292**, 185–97.

HYATT A.D. (1991). Immunogold labelling techniques. *In*: Electron Microscopy in Biology: a Practical Approach Harris R., ed. IRL Press, Oxford, UK, 59–81.

HYATT A.D., EATON B.T., HENGSTBERGER S. & RUSSEL G. (1991). Epizootic hematopoietic necrosis virus: detection by ELISA, immuno-histochemistry and electron microscopy. *J. Fish Dis.*, **14**, 605–617.

HYATT A., PARKES H. & ZUPANOVIC Z. (1998). Identification, characterisation and assessment of Venezuelan viruses for potential use as biological control agents against the cane toad (*Bufo marinus*) in Australia. Available at <http://www.environment.gov.au/biodiversity/invasive/publications/cane-toad-maintenance/index.html>

HYATT A.D., GOULD A.R., ZUPANOVIC Z., CUNNINGHAM A.A., HENGSTBERGER S., WHITTINGTON R.J.,

KATTENBELT J. & COUPAR B.E.H. (2000). Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch. Virol.*,

145, 301–331.

HYATT A.D., WILLIAMSON M., COUPAR B.E.H., MIDDLETON D., HENGSTBERGER S.G., GOULD A.R., SELLECK

P., WISE T.G., KATTENBELT J., CUNNINGHAM A.A. & LEE J. (2002). First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). *J. Wildl. Dis.*, **38**, 239–252.

JANCOVICH J.K., DAVIDS E.W., SEILER A., JACOBS B.L. & COLLINS J.P. (2001). Transmission of the *Ambystoma*

tigrinum virus to alternative hosts. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 159–163.

JANCOVICH J.K., DAVIDSON E.W., MORADO J.F., JACOBS B.L. & COLLINS J.P. (1997). Isolation of a lethal virus

from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum* *stebbinsi*. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 161–167.

JANCOVICH J.K., MAO J.H., CHINCHAR V.G., WYATT C., CASE S.T., KUMAR S., VALENTE G., SUBRAMANIAN S.,

DAVIDSON E.W., COLLINS J.P. & JACOBS B.L. (2003). Genomic sequence of a ranavirus (family *Iridoviridae*) associated with salamander mortalities in North America. *Virology*, **316**, 90–103.

JANCOVICH J.K., DAVIDSON E.W., PARAMESWARAN N., MAO J., CHINCHAR V.G., COLLINS J.P., JACOBS B.L.

& STORFER A. (2005). Evidence for emergence of an amphibian iridoviral disease because of human-enhanced spread. *Molecular Ecology*, **14**, 213–224.

LANGDON J.S. (1989). Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *J. Fish Dis.*, **12**, 295–310.

MARSH I.B., WHITTINGTON R.J., O'ROURKE B., HYATT A.D. & CHISHOLM O. (2002). Rapid differentiation of

Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Molec. Cell. Probes*, **16**, 137–151.

MARSCHANG R.E., BECHER P., POSTHAUS H., WILD P., THIEL H.-J., MULLER-DOBILES U., KALETA E.F. &

BACCIARINI L.N. (1999). Isolation and characterization of an iridovirus from Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *Arch. Virol.*, **144**, 1909–1922.

PICCO A.M., BRUNNER J.L. & COLLINS J.P. (2007). Susceptibility of the endangered california tiger salamander,

Ambystoma californiense, to Ranavirus infection. *J. Wildl. Dis.*, **43**, 286–290.

PICCO A.M. & COLLINS J.P. (2008). Amphibian commerce as a likely source of pathogen pollution. *Conservation Biology*, **22**, 1582–1589.

PEARMAN P.B., GARNER T.W.J., STRAUB M. & GREBER U.F. (2004). Response of the Italian agile frog (*Rana latastei*) to a Ranavirus, frog virus 3: a model for viral emergence in naïve populations. *J. Wildl. Dis.*, **40**, 660–669.

PLUMB J.A. & ZILBERG D. (1999). The lethal dose of largemouth bass virus in juvenile largemouth bass and the comparative susceptibility of striped bass. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 246–252.

REDDACLIFF L.A. & WHITTINGTON R.J. (1996). Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L.). *J. Comp. Pathol.*, **115**, 103–115.

ROBERT J., MORALES H., BUCK W., COHEN N., MARR S. & GANTRESS J. (2005). Adaptive immunity and

histopathology in frog virus 3-infected *Xenopus*. *Virology*, **332**, 667–675.

ROJAS S., RICHARDS K., JANCOVICH J.K. & DAVIDSON E.W. (2005). Influence of temperature on Ranavirus infection in larval salamanders *Ambystoma tigrinum*. *Dis. Aquat. Org.*, **63** (2–3), 95–100.

SPEARE R. & SMITH J.R. (1992). An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 51–57.

WHITTINGTON R.J., KEARNS C., HYATT A.D., HENGSTBERGER S. & RUTZOU T. (1996). Spread of epizootic

haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch (*Perca fluviatilis*) in southern Australia. *Aust. Vet. J.*, **73**, 112–114.

WHITTINGTON R.J., REDDACLIFF L.A., MARSH I., KEARNS C., ZUPANOVIC Z. & CALLINAN R.B. (1999). Further

observations on the epidemiology and spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in southeastern Australia and a recommended sampling strategy for surveillance. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 125–130.

WHITTINGTON R.J. & STEINER K.A. (1993). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): improved ELISA for detection in fish tissues and cell cultures and an efficient method for release of antigen from tissues. *J. Virol. Methods*, **43**, 205–220.

WOLF K., BULLOCK G.L., DUNBAR C.E. & QUIMBY M.C. (1968). Tadpole edema virus: a viscerotropic pathogen for anuran amphibians. *J. Infect. Dis.*, **118**, 253–262.

XIA L., CAO J., HUANG X. & QIN Q. (2009). Characterization of Singapore grouper iridovirus (SGIV) ORF086R, a putative homolog of ICP18 involved in cell growth control and virus replication. *Arch. Virol.*, **154**, 1409–1416.

ZHAN Q.Y., XIAO F., LI Z.Q., GUI J.F., MAO J. & CHINCHAR V.G. (2001). Characterization of an iridovirus from the cultured pig frog *Rana grylio* with lethal syndrome. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 27–36.

ZUPANOVIC Z., LOPEZ G., HYATT A.D., GREEN B., BARTRAN G., PARKES H., WHITTINGTON R.J. & SPEARE R.

(1998a). Giant toads *Bufo marinus* in Australia and Venezuela have antibodies against 'ranaviruses'. *Dis. Aquat. Org.*, **32**, 1–8.

ZUPANOVIC Z., MUSSO C., LOPEZ G., LOURIERO C.L., HYATT A.D., HENGSTBERGER S. & ROBINSON A.J.

(1998b). Isolation and characterisation of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 1–9.

*

* *

NB: Имеется Референтная лаборатория МЭБ по инфекции ранавирусом

(см. Таблица 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 инфекции ранавирусом обратитесь в Референтную лабораторию.

РАЗДЕЛ 2.2.

БОЛЕЗНИ РАКООБРАЗНЫХ

ГЛАВА 2.2.0.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

ВВЕДЕНИЕ

В принципах и методах, обсуждаемых в настоящей главе, будет, в силу необходимости, сделан акцент на пенеидных креветках, поскольку большинство болезней, включенных в список (а также болезни, которые изучаются с целью возможного включения в список) МЭБ, являются болезнями пенеидных креветок (Всемирная организация по охране здоровья животных, 2014). Таксономия пенеидных креветок была пересмотрена в 1997 году (Perez Farfante & Kensley, 1997). Подроды пенеид были подняты до уровня полноценных родов. Однако, поскольку данное изменение в таксономии пенеид не получило всеобщего признания, в настоящем Руководстве по водным животным будет использоваться таксономия пенеид, как описано у Holthuis (Holthuis, 1980).

ОТБОР ОБРАЗЦОВ

1. Оценка статуса эпидемиологической единицы по здоровью

Отбор образцов в популяциях диких ракообразных представляет собой сложную задачу при планировании обследований на наличие болезней. Там, где существует промысел диких ракообразных, имеется потенциальная возможность получения образцов. Однако это является репрезентативным для популяции относительно здоровых животных, доживших до достижения ими возраста и размера, подходящих для вылова, а поэтому может быть в недостаточной мере репрезентативным для представляющих интерес болезней.

Общий подход к надзору и отбору образцов представлен в *Ветеринарно-санитарном кодексе по водным животным* (Глава 1.4. *Надзор за здоровьем водных животных*).

1.1. Материал для использования в качестве образца для тестов

Материал, используемый в качестве образца, зависит от болезни или патогена, на которые предстоит проводить тестирование, а также как от размера животных, так и цели

тестирования, т.е. диагностика клинической формы болезни, выявление субклинических носителей патогенов или отбор образцов для целевого надзора для демонстрации свободы от определенной болезни. Смотрите специфические детали требований в отношении образцов в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Corsin с соавт., 2009) и главы, посвященные отдельным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

1.2. Специфические аспекты, касающиеся размера ракообразных

Специфические детали требований в отношении образцов смотрите в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Corsin с соавт., 2009) и в главах, посвященных отдельным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

1.3. Специфические аспекты, касающиеся популяций ракообразных

В дополнение к соображениям, приведенным в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Corsin с соавт., 2009), при разработке системы надзора следует принимать во внимание следующие моменты, имеющие отношение к популяциям ракообразных:

1. Обычно популяции культивируемых ракообразных распределены по многочисленным участкам хозяйства, которые, как правило, не пользуются общими водными ресурсами и могут совместно подвергаться воздействию различных условий, а могут и не подвергаться.
2. Ракообразные имеют тенденцию к расслоению в пределах участка хозяйства и в толще воды в зависимости от состояния здоровья и прочих поведенческих аспектов взаимодействия (как, например, в случае больных животных, которые нередко перемещаются к краям или к поверхности прудов).
3. Что касается ряда болезней ракообразных, имеется большое количество восприимчивых видов, относительная восприимчивость которых часто недостаточно хорошо известна.
4. Разделение или смешивание популяций ракообразных изменяет характеристики данных популяций.
5. Некоторые популяции диких ракообразных иногда характеризуются стайным поведением, что подразумевает определенную степень однородности в пределах каждой стаи.

Некоторые популяции диких ракообразных иногда характеризуются стайным поведением, что подразумевает определенную степень однородности в пределах каждой стаи.

1.4. Специфические аспекты, касающиеся клинического статуса

В случаях клинической болезни следует получить тщательно выбранные, качественные экземпляры с репрезентативными поражениями из числа живых или умирающих ракообразных. Необходимо приложить все усилия для того, чтобы отобрать для диагностики образцы в виде таких особей, которые являются репрезентативными в

отношении болезни (болезней), поражающей (поражающих) представляющее интерес поголовье ракообразных, и которые являются умирающими или клинически больными. Отбора павших экземпляров во время эпидемий болезней следует по возможности избегать, однако образцы в виде недавно павших особей могут быть пригодны для ряда диагностических исследований. Когда популяции культивируемых или диких ракообразных демонстрируют клинические признаки активной формы болезни, которые соответствуют или позволяют предположить наличие любой болезни ракообразных из включенных в список МЭБ, следует следить за тем, чтобы обеспечить, что отобранные образцы надлежащим образом сохраняются для ожидаемых диагностических тестов (смотрите рекомендуемые методы в разделе о сохранении образцов). Что касается болезней, включенных в список МЭБ, настоятельно рекомендуется спланировать график отбора образцов (например, на основе графика фермы, сезона и т.д.) таким образом, чтобы отбор образцов конкретной стадии (стадий) развития производился в период времени, когда наиболее велика вероятность обнаружения соответствующего патогена. Это особенно важно, когда имеющиеся в распоряжении диагностические методы полагаются на простую микроскопию или гистологические методы и не включают в себя молекулярные методы. Что касается синдрома Таура, инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза, болезни белых пятен, инфекционного мионекроза, некротизирующего гепатопанкреатита (NHP) и болезни желтой головы, то молодь и подвзрослая молодь представляют собой наиболее подходящие образцы; а что касается чумы раков, то подходящими образцами являются молодь и взрослые особи.

Образцы, отбираемые для молекулярных тестов или тестов на основе антител на включенные в список МЭБ болезни ракообразных, можно объединять в пулы, состоящие из не более чем пяти экземпляров на каждый объединенный в пул образец. Недавно павшие раки или другие ракообразные могут подойти (в зависимости от их состояния) для определенных диагностических исследований, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), выделение и/или культивирование возбудителя болезни, биопроба и т.д.).

2. Общая подготовка образцов

2.1. Макроскопическое исследование

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

2.2. Вирусологическое исследование

2.2.1. Транспортировка образцов и обработка их антибиотиками

Не применимо.

2.2.2. Экстракция вируса

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

2.2.3. Обработка для нейтрализации энзоотических вирусов

Не применимо.

2.3. Бактериологическое исследование

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время, за исключением случаев ННР. Поскольку ННР не культивировали, а также из-за его очень маленького размера, при бактериологическом исследовании можно ограничиться окраской по Граму.

2.4. Обследование на наличие паразитов

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время.

2.5. Исследование на наличие грибов и других протистов

Смотрите Главу 2.2.2 Инфекция *Aphanomyces astaci* (Чума раков), а также Главу 2.3.2 Инфекция *Aphanomyces invadans*.

МАТЕРИАЛЫ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕНОВ РАКООБРАЗНЫХ

3. Вирусы ракообразных

3.1. Линии клеток ракообразных

Не применимо. В настоящее время нет подтвержденных или документально оформленных линий клеток ракообразных.

3.2. Культуральные среды

Не применимо.

3.3. Вирус-положительные контроли и получение антигена

3.3.1. Номенклатура вирусов

В целом, номенклатура вирусов, используемая в главах, посвященных конкретным болезням, следует самой последней таксономии вирусов, как она представлена в Отчете Комитета по таксономии вирусов (Fauquet с соавт., 2005). Также в главах, посвященных конкретным болезням, приводятся названия болезней и вирусов, которые обычно используются в отраслях по разведению различных видов креветок, а также наиболее распространенные синонимы, которые использовались или используются в настоящее время.

3.3.2. Получение вирусов

Поскольку линии клеток (ракообразных, членистоногих или беспозвоночных), которые можно использовать для получения вирусов ракообразных, неизвестны, инфицирование известных восприимчивых видов-хозяев является предпочтительным методом для получения вируса в экспериментальных целях.

3.3.3. Сохранение и хранение вирусов

Инфекционную активность всех известных вирусов ракообразных можно сохранить путем замораживания инфицированных ракообразных в целом виде или

инфицированных целевых тканей при температуре -20°C для кратковременного хранения, либо при температуре -80°C или ниже для длительного хранения.

4. Бактерии ракообразных

4.1. Культуральные среды

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время.

4.2. Хранение культур

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время.

5. Паразиты ракообразных

5.1. Культуральные среды

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время.

5.2. Хранение культур

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время.

6. Гриб ракообразных

6.1. Культуральные среды

Смотрите главу 2.2.1 и главу 2.3.2.

6.2. Хранение культур

Смотрите главу 2.2.1.

7. Методы

Имеющиеся методы диагностики болезней ракообразных включают в себя традиционные методы морфологической патологии (прямая световая микроскопия, гистопатология и электронная микроскопия), методы биопроб с использованием восприимчивых хозяев-индикаторов и молекулярные методы (генетические зонды и ПЦР). При том, что культура тканей считается стандартным инструментом в медицинских, ветеринарных лабораториях и лабораториях по диагностическим исследованиям рыб, она все еще нуждается в разработке в качестве пригодного для использования, рутинного диагностического инструмента для патогенов ракообразных. Клиническая химия пока не стала диагностическим инструментом, применяемым специалистами по патологии ракообразных на рутинной основе.

На момент написания настоящего раздела *Руководства по водным животным* имеющиеся диагностические методы, которые могут быть выбраны для диагностики болезней ракообразных, включенных в список МЭБ, или для обнаружения их этиологических возбудителей, основаны на следующем:

1. Макроскопические и клинические признаки.
2. Прямая светлопольная, фазово-контрастная или темнопольная микроскопия с использованием тотальных окрашенных или неокрашенных влажных препаратов

тканей, давленных препаратов тканей и мазков-отпечатков; а также влажных препаратов фекалий.

3. Гистология фиксированных образцов.
4. Биопробы на подозреваемых или субклинических носителях с использованием высокочувствительного хозяина (стадии развития или вида) в качестве индикатора присутствия патогена.
5. Трансмиссионная или сканирующая электронная микроскопия.
6. Тесты на основе антител для обнаружения патогенов с использованием поликлональных антител (ПКА, PAbs) иммунной сыворотки или моноклональных антител (МКА, MAbs).
7. Молекулярные методы (включая секвенирование, в соответствующих случаях, для определения штамма):

ДНК-зонды при исследованиях методом дот-блот гибридизации прямым методом с использованием образцов нефиксированных тканей или с использованием экстрагированной ДНК;

ДНК-зонды или РНК-зонды для исследований методом гибридизации *in-situ* (ISH) с использованием гистологических срезов фиксированных тканей;

Стандартная ПЦР и ПЦР в реальном времени, а также ОТ-ПЦР для исследования прямым методом с использованием образцов нефиксированных тканей или с использованием экстрагированной ДНК или РНК.

Имеется очень небольшое количество диагностических тестов на основе антител для патогенов, которые вызывают болезни ракообразных. Поскольку у ракообразных не вырабатываются антитела, применение диагностических тестов на основе антител ограничивается обнаружением патогена. При том, что целый ряд диагностических методов на основе антител разработан и описан в литературе, эти методы были разработаны с использованием антител мыши или кролика, сгенерированных к специфическим возбудителям болезней, очищенным и полученным от инфицированных хозяев. Поскольку вирусы ракообразных невозможно в рутинном порядке культивировать *in vitro* (т.е. получать в культуре клеток), для получения антитела традиционно использовался очищенный вирус, полученный от инфицированных хозяев. Не так давно на основе данных вирусной последовательности были получены рекомбинантные вирусные структурные белки, и эти белки использовали для получения антител. Отсутствие методов культивирования клеток ракообразных до недавнего времени резко ограничивало разработку и доступность данного диагностического инструмента. Недавнее использование технологий на основе МКА в отношении данной проблемы положило начало появлению нескольких тестов на основе антител. Имеются МКА к возбудителям ряда включенных в список МЭБ болезней ракообразных (вирус синдрома белых пятен (WSSV), вирус синдрома Таура (TSV), вирус желтой головы (YHV) и вирус инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза (IHNV)). В настоящее время доступны из коммерческих источников диагностические тест-наборы/реагенты на основе антител для выявления инфекций TSV, WSSV и YHV.

Были разработаны молекулярные методы, и некоторые методы широко используются для обнаружения многих вирусных, бактериальных, грибных и протозойных патогенов пенеидных креветок (или некоторых других десятиногих ракообразных). Методы обнаружения на основе нуклеиновых кислот легко найти в литературе, а некоторые доступны из коммерческих источников в виде тест-наборов для выявления включенных в список МЭБ патогенов TSV, WSSV и YHV/GAV (вирус, поражающий жабры креветок), IHNV, MBV (монодон-бакуловирус), BP (Baculovirus renaei) и IMNV (вирус инфекционного мионекроза). Методы ПЦР или ОТ-ПЦР существуют для всех этих вирусов и используются в рутинном порядке некоторыми секторами отрасли аквакультуры ракообразных. Что касается возбудителей других болезней, включенных в список МЭБ, то либо о специфических ДНК-зондах, меченных нерадиоактивными метками, имеются сообщения в литературе, либо они доступны коммерчески для применения в формате дот-блот с экстрактами из гемолимфы или тканей или для применения с рутинными гистологическими срезами при использовании ISH.

Образцы, отобранные для молекулярных тестов или тестов на основе антител на болезни ракообразных, включенные в список МЭБ, могут быть объединены в пулы, состоящие из не более чем пяти экземпляров на один объединенный в пул образец молоди, подвзрослой молоди и взрослых особей. Однако, что касается икринок, личинок и постличинок, может потребоваться объединить в пул и большее количество (например, ~150 или более икринок или личинок, либо от 50 до 100 постличинок в зависимости от их размера/возраста) для получения достаточного количества материала образца (антигена для тестов на основе антител или экстрагированной нуклеиновой кислоты для молекулярных тестов с целью проведения диагностического исследования).

7.1. Тесты на основе антител

7.1.1. Получение кроличьей антисыворотки и поликлональных антител к вирусам ракообразных

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

7.1.2. Антисыворотка к бактериям ракообразных

Не применимо для болезней, включенных в список в настоящее время.

7.1.3. Подготовка и хранение иммунной сыворотки

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

7.1.4. Мышиные моноклональные антитела к вирусам и бактериям ракообразных

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

7.1.5. Прямая микроскопия

Образцы для исследования методом прямой микроскопии следует подвергнуть исследованию в ближайшее возможное время после отбора. По возможности используйте живые экземпляры или же нефиксированные, охлажденные или фиксированные 10% забуференным формалином, когда использование живых экземпляров практически невозможно. Если имеется соответствующая требованиям полевая лаборатория, следует воспользоваться ею для проведения подготовки и исследования образцов поблизости от места отбора.

7.1.6. Гистологические методы

Отберите креветок (или других десятиногих ракообразных) при помощи любых имеющихся средств с минимальным стрессом, связанным с манипуляциями с ними. Либо зафиксируйте креветок (или других десятиногих ракообразных) возле резервуара или пруда, либо транспортируйте в лабораторию, используя приспособление, наполненное водой с высоким содержанием кислорода. Обеспечьте достаточную аэрацию контейнера, если креветок (или других десятиногих ракообразных) предстоит оставить на непродолжительное время до фактической фиксации. Для изучения предположительно больных креветок (или других десятиногих ракообразных) выбирайте животных умирающих, с изменением окраски, демонстрирующих аномальное поведение или иного рода отклонения от нормы, за исключением тех случаев, когда целью отбора образцов является оценка распространенности болезни (например, оценка превалентности болезни), предпочтительным методом отбора для которой является вероятностная выборка.

7.1.6.1. Держите наготове достаточный запас фиксатора

Общее правило заключается в том, что для какого-либо объема образца ткани следует использовать как минимум десятикратный объем фиксатора (например, для 10-граммового образца креветки [или другого десятиногого ракообразного] потребовалось бы 100 мл фиксатора).

7.1.6.2. Фиксатор AFA (спирт, формалин, уксусная кислота) Дэвидсона

Фиксатор AFA Дэвидсона рекомендуется для большинства случаев гистологического применения. Фиксатор обладает быстрым действием, сокращает автолитические изменения у десятиногих ракообразных (то есть, в особенности, у пенеидных креветок, *Macrobrachium rosenbergii*, лангустов рода *Panilurus* и других разводимых на ферме десятиногих ракообразных в тропических и субтропических регионах), а его кислотное содержимое декальцифицирует кутикулу. Состав фиксатора AFA Дэвидсона (для получения 1 литра) следующий:

330 мл 95% этилового спирта

220 мл 100% формалина* (насыщенный 37–39% водный раствор формальдегида (газа))

115 мл ледяной уксусной кислоты**

335 мл водопроводной воды (для морских ракообразных возможна замена морской водой)

Храните фиксатор в стеклянных или пластиковых бутылках с надежными крышками при комнатной температуре.

*Не используйте ранее приготовленный 10% формалин для приготовления фиксатора АФА Дэвидсона, поскольку содержания формалина в АФА Дэвидсона будет недостаточно для обеспечения удовлетворительной фиксации.

**Не заменяйте уксусную кислоту другими кислотами, как, например, HCl. Гистологические срезы, приготовленные с помощью раствора Дэвидсона с использованием HCl, не подходят для рутинного гистологического окрашивания гематоксилином и эозином.

7.1.6.3. Процедуры фиксации с помощью фиксатора АФА Дэвидсона

1. Для личинок и постличинок, которые слишком малы для того, чтобы без труда сделать инъекцию фиксатора с помощью туберкулинового шприца:

Используя сетку с мелкими отверстиями или пастеровскую пипетку, выберите и отберите экземпляры. Погрузите креветок (или других десятиногих ракообразных), выбранных с целью отбора образцов, непосредственно в фиксатор. Фиксируйте в течение 12-24 часов в фиксаторе, а затем перенесите в 70% этиловый спирт для хранения.

2. Для более крупных постличинок и очень мелкой молодежи, которые слишком малы, для того, чтобы сделать инъекцию:

Выберите и отберите экземпляры. Используйте иглу или остроконечный пинцет для того, чтобы рассечь кутикулу и сразу же погрузите креветок (или других десятиногих ракообразных), выбранных с целью отбора образцов, непосредственно в фиксатор. Фиксируйте в течение 12–24 часов в фиксаторе, а затем перенесите в 50–70% этиловый спирт для хранения.

3. Для более крупных постличинок, молодежи и взрослых особей:

Сделайте инъекцию фиксатора (используйте 5–10% соотношение объем:вес) при помощи иглы и шприца (калибр иглы – в зависимости от размера креветок [или других десятиногих ракообразных], то есть игла калибра 27 – для постличинок и мелкой молодежи) живой креветке (или другим десятиногим ракообразным).

Сначала следует сделать инъекцию фиксатора в гепатопанкреас (НР) и в два других места или более в объеме, достаточном для того, чтобы изменить цвет гепатопанкреаса на белый и до оранжевого (при использовании фиксатора АФА Дэвидсона); затем сделайте инъекцию фиксатора в прилегающие участки головогруды, в переднюю часть брюшного отдела и в заднюю часть брюшного отдела.

Фиксатор следует распределить между различными отделами, при этом на головогрудной отдел, а конкретно, на гепатопанкреас, должна приходиться большая доля, чем на брюшной отдел.

Чтобы гарантировать надлежащую фиксацию, следует руководствоваться следующим: вводить количество, эквивалентное 5–10% веса тела креветки (или другого ракообразного); все признаки жизни должны быстро прекратиться, и на участках инъекций должно произойти видимое изменение цвета.

Сразу же после инъекции, разрежьте кутикулу при помощи анатомических ножниц от шестого брюшного сегмента до основания рострума, особенно следя за тем, чтобы не разрезать на большую глубину подлежащую ткань. Разрез в области головогруды должен быть чисто боковым до дорсальной срединной линии, в то время как в брюшном отделе он должен быть примерно срединно-боковым.

4. Для креветок (и большинства других ракообразных) весом более ~12 г:

После инъекции фиксатора следует затем рассечь тело на две части в поперечном направлении, по меньшей мере один раз, сразу позади сочленения брюшка/головогруды, а также (необязательно) еще раз посередине брюшного отдела.

5. Для очень крупных ракообразных (например, лобстеры, крабы, взрослые особи пенеид, взрослые особи *Macrobrachium rosenbergii*, некоторые виды и стадии развития крабов и т.д.):

Представляющие интерес органы можно иссечь после инъекции фиксатора. Затем производится завершение фиксации данных образцов тканей согласно описанному выше.

После инъекции, выполнения разрезов и рассечения на две/три части или иссечения ключевых органов погрузите экземпляр в фиксатор (используйте соотношение фиксатор:ткань 10:1).

Оставьте для фиксации при комнатной температуре на 24–72 часа в зависимости от размера сохраняемого ракообразного. При использовании фиксатора АФА Дэвидсона можно применять более длительные периоды фиксации для того, чтобы тщательно декальцифицировать панцири крабов, лобстеров, раков и т.д.

После фиксации экземпляры следует перенести в 70% этиловый спирт, где их можно хранить в течение неопределенного периода времени.

Запишите полное описание экземпляров на момент отбора: макроскопические наблюдения в отношении состояния ракообразного, вид, возраст, вес, источник (дикое или, если речь идет о культивируемом, то номер пруда или резервуара, номер популяции и т.д.) и любую другую относящуюся к делу информацию, которая может понадобиться позже.

Этикетка должна оставаться вместе с образцами в том же контейнере во время фиксации, хранения и транспортировки в лабораторию. Всегда используйте мягкий графитовый карандаш № 2 на водостойкой бумаге (рекомендуется

использовать пластиковую бумагу; никогда не используйте чернильные ручки или фломастеры, поскольку чернила растворяются спиртом).

7.1.6.4. Перевозка и отправка сохраненных образцов

Поскольку большие количества спирта не подлежат пересылке по почте или отправке, рекомендуются следующие способы. Достаньте образцы из 70% этилового спирта. Для личинок, постличинок или молоди небольшого размера используйте герметичные пластиковые сосуды с завинчивающейся крышкой при наличии таковых; если должны быть использованы стеклянные сосуды, упакуйте их, чтобы они не разбились. Что касается более крупных экземпляров, оберните образцы белыми бумажными полотенцами так, чтобы полностью покрыть их (не используйте хлопок сырец или переработанный хлопок). Поместите обернутые полотенцами экземпляры в плотно закрывающийся пластиковый пакет и пропитайте 70% этиловым спиртом. Вложите этикетку и запечатайте пакет. Поместите этот пакет во второй плотно закрывающийся пакет. Большое количество небольших плотно закрывающихся пакетов можно в свою очередь поместить в твердый, ударопрочный, соответствующим образом маркированный контейнер для отправки (подробную информацию смотрите в Главе 5.10 *Меры, касающиеся международной перевозки возбудителей болезней водных животных и патологических материалов Кодекса по водным животным*).

7.1.7. Трансмиссионная или сканирующая электронная микроскопия

Электронная микроскопия (ЭМ – трансмиссионная или сканирующая) является ценным исследовательским инструментом для изучения болезни у ракообразных. Тем не менее, методы ЭМ доступны только в качестве подтверждающих методов применительно к некоторым болезням и не используются в рутинном порядке для диагностики болезней, включенных в список МЭБ. Поэтому применение ЭМ ограничивается специфическими целями (смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*).

7.1.8. Использование молекулярных методов и методов на основе антител для подтверждающего тестирования и диагностики

7.1.8.1. Подготовка образцов и виды

Манипуляции с образцами, выбранными для диагностических тестов на основе нуклеиновых кислот или антител, и их упаковку (в новые пластиковые пакеты или флаконы для образцов) следует осуществлять с большой осторожностью, чтобы свести к минимуму возможность перекрестной контаминации между образцами, отобранными от разных (диких или разводимых на ферме) популяций, резервуаров, прудов, ферм и т.д. Необходимо использовать новые пластиковые пакеты или флаконы для образцов. Водостойкую этикетку с соответствующими данными, заполненную карандашом № 2, следует поместить внутрь каждой упаковки или контейнера для каждого комплекта образцов.

Некоторые методы, подходящие для сохранения и транспортировки образцов, отобранных для молекулярных тестов или тестов на основе антител:

1. Живые экземпляры:

Можно провести подготовку живых экземпляров в полевых условиях или отправить их в диагностическую лабораторию для тестирования.

2. Гемолимфа:

Гемолимфа является предпочтительным образцом для определенных молекулярных и основанных на антителах диагностических тестов (смотрите главы, посвященные конкретным болезням). Образцы можно отобрать при помощи иглы и шприца путем пункции сердца, из гемоцели (т.е. вентрального синуса у пенеид) или из отрезанного придатка и сразу же перенести в пробирку, наполовину наполненную ~90–95% этанолом или подходящим консервантом (например, RNALater®) для сохранения образца.

3. Сохраняемые при помощи льда или охлажденные экземпляры:

Сохраняемые при помощи льда или охлажденные экземпляры – это для экземпляров, которых можно транспортировать в лабораторию для тестирования в пределах 24 часов. Упакуйте образцы в пакетах для образцов, поместив вокруг помещенных в пакеты образцов достаточное количество влажного льда, в контейнер, термоизолированный при помощи Styrofoam™2, и отправьте в лабораторию.

4. Замороженные целые экземпляры:

Выберите живые экземпляры в соответствии с критериями, перечисленными в главах, посвященных конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*, быстро заморозьте их в полевых условиях или проведите заморозку в полевых лабораториях, используя морозильник с механическим управлением, при температуре –20°C или ниже. Подготовьте и вложите в контейнер с образцами этикетку, упакуйте образцы, используя достаточное количество сухого льда, в термоизолированный при помощи Styrofoam™ контейнер и отправьте в лабораторию.

5. Образцы, сохраненные при помощи спирта:

В регионах, где хранение и отправка замороженных образцов проблематичны, может быть использован 90–95% этанол для сохранения, хранения и перевозки определенных видов образцов для молекулярных тестов. Образцы, сохраненные при помощи спирта, как правило, не подходят для тестов на основе антител. Ракообразных в целом виде (любую стадию развития при условии, что экземпляр весит не более 2-3 г), иссеченные ткани (например, плеоподы) от крупных ракообразных или гемолимфу можно сохранить в 90-95% этаноле, а затем упаковать для отправки в соответствии с методами, приведенными в Разделе 5.3, параграф iv (смотрите

2 Ссылка на конкретные коммерческие продукты в качестве примеров не подразумевает их одобрения со стороны МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, упоминаемым в настоящем *Руководстве по водным животным*.

дополнительную подробную информацию о международной перевозке таких образцов в главе 5.10 *Кодекса по водным животным*).

7.1.8.2. Сохранение РНК или ДНК в тканях

Для рутинного диагностического тестирования методом ПЦР, ОТ-ПЦР или для тестов методом дот-блота с использованием ДНК-зондов, необходимо подготовить образцы, чтобы сохранить нуклеиновую кислоту патогена. Для большинства целей сохранение образцов в спирте (70–100%) является предпочтительным методом для последующих молекулярных тестов. Коммерчески доступны и другие продукты (например, RNeasy, различные лизирующие буферы и т.д.) для этой же цели, и информация о данных продуктах представлена в главах, посвященных конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*, там, где это применимо.

7.1.8.3. Экстракция ДНК

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

7.1.8.4. Экстракция РНК

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

7.1.8.5. Подготовка предметных стекол для гибридизации *in-situ*

Смотрите главы, посвященные конкретным болезням, в настоящем *Руководстве по водным животным*.

8. Сбор дополнительной информации

Рекомендации в отношении любой дополнительной информации, которая может потребоваться или которая может помочь диагностической лаборатории в определении наиболее подходящего теста (тестов), который (которые) следует провести в отношении предоставленных образцов, смотрите в главах, посвященных конкретным болезням в настоящем *Руководстве по водным животным*.

9. КЛЮЧЕВЫЕ БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ЧТЕНИЯ

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Asian Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper, No. 402, supplement 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 240 pp.

BROCK J.A. & MAIN K. (1994). A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. Published by the Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA.

CORSIN F., GEORGIADIS M., HAMMELL K.L. & HILL B. (2009). Guide for Aquatic Animal Health Surveillance. The World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France., 114 pp.

FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego and London, USA and UK, 1259 pp.

JOHNSON P.T. (1980). Histology of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*. A Model for the Decapoda. Prager, New York, USA, 440 pp.

HOLTHUIS L.B. (1980). FAO Species Catalogue. Vol. 1 – Shrimp and Prawns of the World. FAO Fisheries Synopsis No. 125. FAO, Rome, Italy, 271 pp.

LIGHTNER D.V. (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.

LIGHTNER D.V. (1996). The penaeid shrimp viruses IHHNV and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15**, 579–601.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.*, **33**, 165–180.

LOTZ J.M. (1997). Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 405–413.

PEREZ FARFANTE I. & KENSLEY B.F. (1997). The Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnosis for the Families and Genera. *Editions du Museum national d'Histoire Naturelle, Paris, France*, **175**, 1–233.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2014). Chapter 1.3. Diseases listed by the OIE. *In: Aquatic Animal Health Code, Seventeenth Edition*. OIE, Paris, France.

*

* *

ОСТРЫЙ ГЕПАТОПАНКРЕАТИЧЕСКИЙ НЕКРОЗ

1. Предмет рассмотрения

«Острый гепатопанкреатический некроз» (АНПНД) означает инфекцию штаммами *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp_{АНПНД}*), которые содержат плазмиду из ~70 тысяч пар нуклеотидов с генами, которые кодируют гомологи связанных с насекомыми рода *Photorhabdus* (Pir) токсинов PirA и PirB. Несмотря на то, что известны случаи выделения других видов *Vibrio* из клинических случаев АНПНД, было продемонстрировано, что только *Vp_{АНПНД}* вызывает АНПНД.

2. Информация о болезни

2.1. Особенности возбудителя

2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

АНПНД имеет бактериальную этиологию (Kondo *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013a; Tran *с соавт.*, 2013b). Его вызывают особые вирулентные штаммы *V. parahaemolyticus* (*Vp_{АНПНД}*) которые содержат плазмиду из ~70 тысяч пар нуклеотидов с генами, которые кодируют гомологи связанных с насекомыми рода *Photorhabdus* (Pir) бинарных токсинов PirA и PirB (Gomez-Gil *с соавт.*, 2014; Gomez-Jimenez *с соавт.*, 2014; Han *с соавт.*, 2015a; Kondo *с соавт.*, 2014; Lee *с соавт.*, 2015; Yang *с соавт.*, 2014). Плазида, содержащаяся в *Vp_{АНПНД}*, была обозначена как pVA1, и ее размер может немного различаться. Удаление (или «устранение») pVA1 лишает штаммы *Vp_{АНПНД}* возможности вызывать АНПНД.

Внутри популяции *Vp_{АНПНД}*-бактерий, у нескольких особей может встречаться естественная делеция оперона Pir^{vp} (Lee *с соавт.*, 2015; Tinwongger *с соавт.*, 2014). Данная делеция обусловлена нестабильностью, вызванной повторяющимися последовательностями или транспозазой, которые фланкируют оперон Pir-токсина. Когда происходит делеция, это означает, что штамм *Vp_{АНПНД}* утратит способность индуцировать АНПНД. Однако, если последовательность Pir-токсина используется в качестве мишени для обнаружения, то колония, в которой имеется данная делеция, даст отрицательный результат, даже если колония была получена из изолята *Vp_{АНПНД}*, вызывающего АНПНД.

Плазида pVA1 также несет кластер генов, связанных с конъюгативным переносом, что означает, что данная плазида потенциально способна передаваться другим бактериальным клеткам.

2.1.2. Выживание вне хозяина

Предполагается, что *V_pANPND* обладает свойствами, аналогичными с другими штаммами *V. parahaemolyticus*, обнаруженными в морепродуктах, которые выживают до 9 и 18 дней в отфильтрованной воде эстуария и отфильтрованной морской воде при температуре окружающей среды $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (Karunasagar *с соавт.*, 1987).

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

Экспериментальные исследования продемонстрировали, что *V_pANPND* не может передаваться через замороженных зараженных креветок (Tran *с соавт.*, 2013a). Аналогичным образом известно, что другие штаммы *V. parahaemolyticus* чувствительны к замораживанию, охлаждению, нагреванию и к обычным дезинфицирующим средствам (Andrews *с соавт.*, 2000; Muntada-Garriga *с соавт.*, 1995; Su & Liu, 2007; Thomson & Thacker, 1973).

2.1.4. Жизненный цикл

Не применимо.

2.2. Особенности хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

К видам, которые отвечают критериям для включения в список в качестве восприимчивых к АНПND в соответствии с требованиями Главы 1.5. *Ветеринарно-санитарного кодекса водных животных (Кодекса по водным животным)*, относятся: гигантская тигровая креветка (*Penaeus monodon*) и белоногая креветка (*Penaeus vannamei*).

2.2.2. Виды, в отношении которых недостаточно доказательств об их восприимчивости

К видам, которые не полностью отвечают критериям для включения в список в качестве восприимчивых к АНПND в соответствии с требованиями Главы 1.5. *Кодекса по водным животным*, относятся: китайские белые креветки (*Penaeus chinensis*).

Кроме того, положительные результаты патоген-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) были зарегистрированы в следующих организмах, но без активной инфекции: японские тигровые креветки (*Penaeus japonicus*).

2.2.3. Стадии развития хозяев, на которых организмы наиболее восприимчивы к инфекции

Гибель наступает в течение 30–35 дней, и уже в течение 10 дней после посадки в пруды послеличинок (PL) или молоди креветок (Joshi *с соавт.*, 2014b; Leñaño & Mohan, 2012; Nunan *с соавт.*, 2014; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013b). de la Peña *с соавторами*, 2015 г., сообщали о вспышках болезни на Филиппинах, которые произошли через 46–96 дней после посадки креветок в пруды.

2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Не применимо.

2.2.5. Органы-мишени и инфицированные ткани

Органы и ткани кишечника.

2.2.6. Персистентная инфекция

Нет данных или неизвестно.

2.2.7. Виды-переносчики

Не известны, хотя в связи с тем, что *Vibrio* spp. повсеместно распространены в морской среде, можно предположить, что виды-переносчики существуют.

2.3. Модель болезни

2.3.1. Механизмы передачи

V_{рАНPNД} передавались экспериментально путем погружения, кормления (перорально) и введения Рiг-токсина с помощью инъекции (Dabu *с соавт.*, 2017; Joshi *с соавт.*, 2014b; Nunan *с соавт.*, 2014; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013b), что воспроизводило естественную горизонтальную передачу пероральным путем и передачу в условиях совместного обитания.

2.3.2. Превалентность

В регионах, где АНPNД является энзоотической болезнью у разводимых на фермах креветок, существует почти 100% превалентность (Tran *с соавт.*, 2014a).

2.3.3. Географическое распределение

Заболевание было зарегистрировано в Китае (Китайская Народная Республика) (2010 г.), Вьетнаме (2010 г.), Малайзии (2011 г.), Таиланде (2012 г.) (Flegel, 2012 г.; Lightner *с соавт.*, 2012 г.), Мексике (2013 г.) (Nunan *с соавт.*, 2014) и на Филиппинах (2014 г.) (Dabu *с соавт.*, 2017; de la Peña *с соавт.*, 2015).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

АНPNД характеризуется внезапной массовой гибелью (до 100%), как правило, в течение 30–35 дней после посадки в нагульные пруды послеличинок (PL) или молоди креветок (ФАО, 2013; Hong *с соавт.*, 2016; НАСА, 2012). Болезнь может также поражать молодь более старшего возраста (de la Peña *с соавт.*, 2015).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Слабосоленая вода (<20 ppt (частей на тысячу)), по-видимому, снижает заболеваемость. Пик заболеваемости, вероятно, приходится на жаркий и сухой сезон с апреля по июль. Перекармливание, плохое качество молоди, плохое качество воды, плохое качество кормов, цветение воды также являются факторами, которые могут привести к возникновению АНPNД в эндемичных районах (ФАО, 2013; НАСА, 2012).

2.4. Профилактика и борьба с болезнью

2.4.1. Вакцинация

Не применимо.

2.4.2. Лекарственное лечение

Лекарственные средства отсутствуют.

2.4.3. Иммуностимуляция

Эффективные методы неизвестны.

2.4.4. Разведение для получения резистентной популяции

Не применимо.

2.4.5. Повторное заселение резистентными видами креветок

Отсутствуют.

2.4.6. Блокирующие агенты

Отсутствуют.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Не известно.

2.4.8. Общие практики ведения деятельности по выращиванию креветок

Как и в случае с другими инфекционными заболеваниями креветок, вероятно, будет целесообразным использование установленных надлежащих санитарных практик и практик биобезопасности, таких как улучшение санитарных условий в инкубатории и скрининг послеличинок; надлежащее управление маточным стадом, использование послеличинок высокого качества и надлежащее управление фермами по разведению креветок, включая строгий контроль частоты кормления, надлежащую плотность посадки и т.д., - все это хорошо зарекомендовавшие себя практики, снижающие воздействие заболеваний, включая AHPND (NACA, 2012).

3. Отбор образцов

3.1. Отбор отдельных особей

Для диагностики AHPND следует отбирать образцы умирающих креветок или креветок, демонстрирующих клинические признаки (см. Раздел 4.1.1). Предполагается, что взрослые особи (маточное стадо) могут нести штаммы *Vp_{AHPND}* (Lee *с соавт.*, 2015; Nunan *с соавт.*, 2014; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013b). Таким образом, маточное стадо без клинических признаков также можно отбирать для диагностического тестирования.

3.2. Консервирование образцов

Образцы должны быть представлены в следующем виде: (i) свежие и охлажденные на льду для выделения бактерий, (ii) фиксированные в 90% этаноле для обнаружения при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) и (iii) консервированные с использованием фиксатора АФА Дэвидсона для гистологии (Joshi *с соавт.*, 2014a;

Joshi *с соавт.*, 2014b; Leañó & Mohan, 2012; Lee *с соавт.*, 2015; Nunan *с соавт.*, 2014; Sirikharin *с соавт.*, 2015; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013b).

3.3. Объединение образцов в пулы

То, как объединение в пулы влияет на диагностическую чувствительность, не оценивалось, поэтому креветки большего размера следует обрабатывать и тестировать по отдельности. Однако, может понадобиться объединить в пулы особи на ранних стадиях развития (послеличинки или особи до 0,5 г) для получения достаточного количества материала для молекулярных исследований.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Наиболее подходящими являются образцы органов и тканей кишечника, такие как гепатопанкреас, желудок, средняя кишка и задняя кишка. Кроме того, у маточного стада ценных видов креветок можно отбирать фекальные образцы (до гибели).

3.5. Неподходящие образцы/ткани

Неподходящими являются образцы органов и тканей, не относящихся к кишечнику (ФАО, 2013; НАСА, 2012; НАСА, 2014; Nunan *с соавт.*, 2014; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013b).

4. Методы диагностики

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Появление клинических признаков и случаев гибели может начаться уже через 10 дней после посадки креветок в пруды. К клиническим признакам относятся: бледно-белый гепатопанкреас (НР), значительная атрофия гепатопанкреаса, мягкий панцирь, кишечник с неоднородным или отсутствующим содержимым, черные пятна или полосы, видимые внутри гепатопанкреаса (из-за меланизации канальцев). Кроме того, гепатопанкреас не сдавливается легко между большим и указательным пальцем (вероятно, из-за увеличения фиброзной соединительной ткани и гемоцитов) (НАСА, 2012; НАСА, 2014).

4.1.2. Изменение поведения

Не применимо.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Клиническая химия

Не известно.

4.2.2. Микроскопическая патология

Болезнь имеет две различные фазы:

i) Острая фаза характеризуется обширной и прогрессирующей дегенерацией канальцев гепатопанкреаса от проксимальных до дистальных, со значительным округлением и отслаиванием эпителиальных клеток канальцев гепатопанкреаса в канальцы HP, собирающие протоки HP и заднюю стенку желудка при отсутствии бактериальных клеток (ФАО, 2013; Nunan *с соавт.*, 2014; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013a; Tran *с соавт.*, 2013b; Tran *с соавт.*, 2014a; Tran *с соавт.*, 2014b).

ii) Конечная фаза характеризуется выраженным межканальцевым гемоцитарным воспалением и развитием обширных вторичных бактериальных инфекций, которые возникают в сочетании с отмиранием и отслаиванием клеток канальцев HP (ФАО, 2013; Leañó & Mohan, 2012; NACA, 2012; NACA, 2014; Nunan *с соавт.*, 2014; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015; Tran *с соавт.*, 2013a; Tran *с соавт.*, 2013b; Tran *с соавт.*, 2014a; Tran *с соавт.*, 2014b).

4.2.3. Влажные препараты

Не применимо.

4.2.4. Мазки

Не применимо.

4.2.5. Фиксированные срезы ткани (для гибридизации *in-situ*)

Гибридизации *in-situ* в настоящее время не имеется (октябрь 2015 г.).

4.2.6. Электронная микроскопия / цитопатология

Не применимо.

4.3. Методы обнаружения и идентификации агента

4.3.1. Метод прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

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

См. Раздел 4.2.5.

4.3.1.2. Выделение и идентификация агента

*Vp*_{HPND} можно выделить на стандартной среде, используемой для выделения

бактерий из заболевших креветок (Lee *с соавт.*, 2015; Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015). Идентификация видов бактерий может быть проведена с использованием ПЦР, нацеленной на 16S рРНК (Weisburg *с соавт.*, 1991) или ПЦР, нацеленной на *toxR* (Kim *с соавт.*, 1999) и секвенирования. АHPND-специфичные методы ПЦР, нацеленные на гены токсина *Vp_{AHPND}*, описаны в разделе 4.3.1.2.3.1.

4.3.1.2.1. Культура клеток /искусственные среды

См. разделы 4.3.1.2.3.1. и 4.3.1.2.2.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

На данный момент отсутствуют (октябрь, 2015 г.).

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1 Протоколы ПЦР для обнаружения бактерий, вызывающих АHPND, в культурах или зараженных креветках

Были разработаны методы ПЦР, которые нацелены на гены токсина *Vp_{AHPND}*. Метод AP3 является одношаговой ПЦР, которая нацелена на ген *PirA_{vp}* массой 12,7 кДа (Sirikharin *с соавт.*, 2015). Данный метод был валидирован на 100% прогностическую ценность положительного и отрицательного результата путем тестирования 104 изолятов *Vp_{AHPND}* и непатогенных бактерий (включая другие виды *Vibrio* и виды, не относящиеся к *Vibrio*), которые ранее были протестированы с использованием биопробы (Sirikharin *с соавт.*, 2015). Впоследствии Soto-Rodriguez *с соавт.*, 2015 г., с использованием 9 *Vp_{AHPND}* и 11 непатогенных изолятов *V. parahaemolyticus*, продемонстрировали, что метод AP3 дал самую высокую прогностическую ценность положительного (90%) и отрицательного (100%) результата пяти протестированных методов ПЦР.

Методы одношаговой ПЦР, такие как AP3 и другие, например, *VpPirA-284*, *VpPirB-392* (Нап *с соавт.*, 2015a) и TUMSAT-*Vp3* (Tinwongger *с соавт.*, 2014), имеют относительно низкую чувствительность, когда используются для выявления *Vp_{AHPND}* на низких уровнях (например, бессимптомная инфекция) или в пробах окружающей среды, таких как наносы и биопленки. Для таких проб рекомендуется предварительный этап обогащения (см. Раздел 4.3.1.2.3.1.1).

В качестве альтернативы был разработан метод гнездовой ПЦР, AP4, с прогностической ценностью положительного результата, составляющей 100% для *Vp_{AHPND}*, с использованием тех же 104 бактериальных изолятов, которые применялись для валидации вышеописанного метода AP3 (Dangtip *с соавт.*, 2015). Данный метод обладает большей чувствительностью (1 фг ДНК, экстрагированной из *Vp_{AHPND}*), что позволяет использовать его непосредственно с образцами ткани и пробами окружающей среды без стадии обогащения.

Кроме того, методы ПЦР в реальном времени, например метод *Vp_{AHPND}*-специфичной ПЦР в реальном времени (по технологии TaqMan), разработанный Нап *с соавт.*,

2015b, и метод петлевой изотермической амплификации (LAMP), разработанный Koiwai *с соавт.*, 2016, также имеют высокую чувствительность и могут использоваться непосредственно с образцами ткани и пробами окружающей среды без стадии обогащения.

4.3.1.2.3.1.1. Обогащение образцов перед выделением ДНК

Предварительное обогащение культуры для выявления *Vr_{AHPND}* в случае бессимптомных инфекций или в пробах окружающей среды можно проводить с использованием любой подходящей бактериологической питательной среды (например, триптического соевого бульона или щелочной пептонной воды с добавлением 2,5% NaCl), инкубированной в течение 4 часов при 30°C при встряхивании. Затем, после осаждения дебриса, бактерии в культуральном бульоне осаждают центрифугированием. После удаления надосадочной жидкости, ДНК можно выделить из бактериального осадка при подготовке к анализу ПЦР.

4.3.1.2.3.1.2. Выделение агента

Vr_{AHPND} можно выделить в чистой культуре, полученной из заболевших креветок, креветок с бессимптомной инфекцией или из проб окружающей среды с использованием стандартных микробиологических сред для выделения видов *Vibrio* из данных материалов (Lightner, 1996; Tran *с соавт.*, 2013a; Tran *с соавт.*, 2013b). Подтверждение идентификации *Vr_{AHPND}* можно провести с помощью ПЦР-анализа и биопробы.

4.3.1.2.3.1.3. Выделение ДНК

Общепринятый метод выделения ДНК может быть использован для выделения ДНК из ткани желудка или гепатопанкреаса предположительно зараженных креветок, из культур очищенных бактериальных изолятов или из бактериального осадка, полученного из обогащенных культур (см. выше). Количество ДНК-матрицы для реакционной смеси ПЦР объемом 25 мкл должно составлять 0,01–1 нг ДНК при выделении из бактериальных изолятов (то есть непосредственно из очищенной культуры) и 10–100 нг общей ДНК при выделении из тканей креветок или из бактериального осадка, полученного из обогащенной культуры.

4.3.1.2.3.1.4. Выявление плазмиды *pVA1* при помощи одношаговой ПЦР

Здесь описаны два метода одношаговой ПЦР (AP1 и AP2) для обнаружения плазмиды *pVA1* в обогащенных бульонных культурах. Праймеры, ген-мишень и размер ожидаемых ампликонов указаны в Таблице 4.1.

Таблица 4.1. Праймеры ПЦР для выявления бактерий, вызывающих AHPND, при помощи одношаговой ПЦР

Название метода	Праймеры	Ген-мишень	Размер ожидаемых ампликонов	Ссылка
AP1	APIF: 5'-CCT-TGG-GTG-TGC-TTA-GAG-GAT-G-3'	<i>pVA1</i>	700 пар оснований	Flegel & Lo, 2014

	AP1R: 5'-GCA-AAC-TAT-CGC-GCA-GAA-CAC-C-3'			
AP2	AP2F: 5'-TCA-CCC-GAA-TGC-TCG-CTT-GTG-G-3' AP2R: 5'-CGT-CGC-TAC-TGT-CTA-GCT-GAA-G-3'	<i>pVA1</i>	700 пар оснований	Flegel & Lo, 2014

4.3.1.2.3.1.5. Протокол для методов ПЦР AP1 и AP2

Данный протокол соответствует методу, описанному Flegel & Lo, 2014. Реакционная смесь для ПЦР состоит из 2,5 мкл 10 × ПЦР смеси, 0,7 мкл 50 мМ MgCl₂, 0,4 мкл 10 мМ dNTP, 0,5 мкл 10 мкМ AP3-F1, 0,5 мкл 10 мкМ AP3-R1, 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы и приблизительно 0,01-1 нг матричной ДНК в реакционной смеси объемом 25 мкл, доведенной до нужного объема дистиллированной водой. ПЦР реакция: денатурация при 94°C в течение 5 мин; затем 25-30 циклов при 94°C в течение 30 секунд, при 60°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 60 секунд со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 10 минут; затем реакционную смесь можно хранить при 4°C.

(http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication_id=1128)

4.3.1.2.3.1.6. Выявление генов токсинов PirA/PirB при помощи одношаговой ПЦР

Здесь описаны четыре метода одношаговой ПЦР (AP3, TUMSAT-Vp3, VpPirA-284 и VpPirB-392) для обнаружения генов Pir-токсинов в обогащенных бульонных культурах. Праймеры, ген-мишень и размер ожидаемых ампликонов указаны в Таблице 4.2.

Таблица 4.2. Праймеры ПЦР для выявления бактерий, вызывающих AHPND, при помощи одношаговой ПЦР

Название метода	Праймеры	Ген-мишень	Размер ожидаемых ампликонов	Ссылка
AP3	AP3-F: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3' AP3-R: 5'-GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA-3'	<i>pirAvp</i>	333 пар оснований	Sirikharin с соавт., 2014, 2015
TUMSAT-Vp3	TUMSAT-Vp3 F: 5'-GTG-TTG-CAT-AAT-TTT-GTG-CA-3' TUMSAT-Vp3 R: 5'-TTG-TAC-AGA-AAC-CAC-GAC-TA-3'	<i>pirAvp</i>	360 пар оснований	Tinwongger et al., 2014
VpPirA-284	VpPirA-284F: 5'-TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG-3' VpPirA-284R: 5'-CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA-3'	<i>pirAvp</i>	284 пар оснований	Han с соавт., 2015a
VpPirB-392	VpPirB-392F: 5'-TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC-3'	<i>pirAvp</i>	392 пар оснований	Han с соавт., 2015a

	VpPirB-392R: 5'-TGT-AAG-CGC-CGT-TTA- ACT-CA-3'			

4.3.1.2.3.1.7. Протокол для метода AP3 ПЦР

Данный протокол соответствует методу, описанному Sirikharin *с соавт.*, 2015. Реакционная смесь для ПЦР состоит из 2,5 мкл 10 × ПЦР смеси, 0,7 мкл 50 mM MgCl₂, 0,4 мкл 10 mM dNTP, 0,5 мкл 10 мкМ AP3-F1, 0,5 мкл 10 мкМ AP3-R1, 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы и приблизительно 100 нг матричной ДНК в реакционной смеси объемом 25 мкл, доведенной до нужного объема дистиллированной водой. ПЦР реакция: денатурация при 94°C в течение 5 мин; затем 30 циклов при 94°C в течение 30 секунд, при 53°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 40 секунд со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 5 минут; затем реакционную смесь можно хранить при 4°C.

4.3.1.2.3.1.8. Протокол для методов ПЦР VpPirA-284 и VpPirB-392

Данный протокол соответствует методу, описанному Nan *с соавт.*, 2015b, с использованием ПЦР-сфер «PuReTaq ready-to-go PCR beads» (GE Healthcare). 25 мкл реакционной смеси для ПЦР готовят, используя ПЦР-сферы «PuReTaq ready-to-go PCR beads». Каждая реакция содержит 0,2 мкМ каждого праймера, 10 mM Трис/HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 U Taq ДНК-полимеразы и 1 мкл экстрагированной ДНК. ПЦР реакция: денатурация при 94°C в течение 3 минут, затем 35 циклов при 94°C в течение 30 секунд, при 60°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 30 секунд со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 7 минут.

4.3.1.2.3.1.9. Протокол для метода ПЦР TUMSAT-Vp3

Данный протокол соответствует методу, описанному Tinwongger *с соавт.*, 2014. Готовят 30 мкл реакционной смеси для ПЦР, содержащей 1 мкл матричной ДНК, 10 × ПЦР-буфера, 0,25 mM dNTP-смеси, 0,6 мкМ каждого праймера и 0,01 U Taq-полимеразы. ПЦР реакция включает стадию предварительного нагрева при 95°C в течение 2 минут, затем 30 циклов денатурации при 95°C в течение 30 секунд, отжиг при 56°C в течение 30 секунд и стадию элонгации при 72°C в течение 30 секунд.

4.3.1.2.3.1.10. Протокол для метода AP4 гнездовой ПЦР для обнаружения VpAHPND

Данный протокол соответствует методу, описанному Dangtip *с соавт.*, 2015. Первая реакционная смесь для ПЦР содержит 2,5 мкл 10 × ПЦР смеси, 1,5 мкл 50 mM MgCl₂, 0,5 мкл 10 mM dNTP, 0,5 мкл 10 мкМ AP4-F1, 0,5 мкл 10 мкМ AP4-R1, 0,3 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл) и приблизительно 100 нг матричной ДНК в реакционной смеси объемом 25 мкл, доведенной до нужного объема дистиллированной водой. Протокол ПЦР: денатурация при 94°C в течение 2 мин; затем 30 циклов при 94°C в течение 30 секунд, при 55°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 90 секунд со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 2 минут; затем реакционную смесь можно хранить при 4°C.

Реакционная смесь для гнездовой ПЦР состоит из 2,5 мкл 10 × ПЦР смеси, 1,5 мкл 50 mM MgCl₂, 0,5 мкл 10 mM dNTP, 0,375 мкл 10 мкМ AP4-F2, 0,375 мкл 10 мкМ AP4-

R2, 0,3 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл) и 2 мкл первой реакционной смеси для ПЦР в объеме 25 мкл. Протокол гнездовой ПЦР: денатурация при 94°C в течение 2 мин; затем 25 циклов при 94°C в течение 20 секунд, при 55°C в течение 20 секунд и при 72°C в течение 20 секунд; затем реакционную смесь можно хранить при 4°C.

Праймеры для гнездовой ПЦР, созданные с использованием китайского (Китайская Народная Республика) изолята бактерий AHPND (Yang *с соавт.*, 2014), указаны в таблице 4.3. Размер ожидаемых ампликонов для внешних праймеров (AP4-F1 и AP4-R1) составляет 1269 пар оснований, и 230 пар оснований для внутренних праймеров (AP4-F2 и AP4-R2). При высоких концентрациях ДНК-мишени на этапе вложения могут возникать дополнительные ампликоны в виде продукта остаточного праймера AP4-F1, присоединившегося к AP4-R2 (357 пар оснований) или AP4-F2, присоединившегося к AP4-R1 (1142 пар оснований).

Таблица 4.3. Праймеры для метода AP4 гнездовой ПЦР для обнаружения *VpAHPND*

Название метода	Праймеры	Размер ожидаемых ампликонов	Ссылка
AP4 Этап 1	AP4-F1: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3' AP4-R1: 5'-ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA-3'	1269 пар оснований	Dangtip ^с соавт., 2015
AP4 Этап 1	AP4-F2: 5'-TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG-3' AP4-R2: 5'-GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC-3'	230 пар оснований	Dangtip ^с соавт., 2015

4.3.1.2.3.1.11. Анализ продуктов традиционной ПЦР при помощи электрофореза в агарозном геле

После проведения ПЦР ампликоны визуализируют с помощью электрофореза в агарозном геле. Двадцать мкл реакционной смеси ПЦР, с добавлением красителя в 6×-буфере наносят на 1,5% агарозный гель и проводят электрофорез при 90 В в течение 40 минут. Ампликоны визуализируют с помощью агарозного геля SYBR Safe gel stain (Invitrogen, кат. № 33102) согласно инструкциям производителя. Ампликоны ожидаемого размера, соответствующего используемым методам ПЦР (таблицы 4.2 и 4.3.), указывают на положительный результат. Положительные результаты должны быть подтверждены секвенированием.

4.3.1.2.3.1.12. Протокол для AHPND-специфичного метода ПЦР в реальном времени

Данный протокол соответствует методу, описанному Han *с соавт.*, 2015b. Используют реакционную смесь для ПЦР TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies), и экстрагированную ДНК добавляют к реакционной смеси для ПЦР в реальном времени, содержащей 0,3 мкМ каждого праймера и 0,1 мкМ зонда, до конечного объема 10 мкл. Постановка ПЦР в реальном времени: 20 секунд при 95°C, затем 45 циклов при 95°C по 3 секунды, и 30 секунд при 60°C. По завершении ПЦР в режиме реального времени с использованием технологии TaqMan, наличие ДНК PirA демонстрируется наличием специфических ампликонов, идентифицированных при

помощи программно-генерируемых характерных кривых амплификации. Безматричные контроли не должны иметь признаков специфичных ампликонов.

Праймеры, зонд и ген-мишень для *Vp_{AHPND}*-специфичной ПЦР в реальном времени указаны в Таблице 4.4.

Таблица 4.4. Праймеры и зонд для метода ПЦР в реальном времени для обнаружения *Vp_{AHPND}*

Название праймера/зонда	Последовательность	Ген-мишень	Ссылка
VpPirA-F	5'-TTG-GAC-TGT-CGA-ACC-AAA-CG-3'	pirA	Нан с соавт., 2015b
VpPirA-R	5'-GCA-CCC-CAT-TGG-TAT-TGA-ATG-3'	pirA	Нан с соавт., 2015b
VpPirA Probe	5'-6FAM-AGA-CAG-CAA-ACA-TAC-ACC-TAT-CAT-CCC-GGA-TAMRA-3'	pirA	Нан с соавт., 2015b

4.3.1.2.3.1.13. Контроли для всех методов ПЦР

Следующие контроли должны быть включены во все ПЦР для обнаружения *Vp_{AHPND}*: а) отрицательный контроль экстракции, то есть матричная ДНК, выделенная из заведомо отрицательного образца; б) матричная ДНК, выделенная из заведомо положительного образца, такого как ткани креветок, зараженных *Vp_{AHPND}*, или ДНК из *Vp_{AHPND}*-положительной бактериальной культуры, или плазмидная ДНК, которая содержит целевой участок набора специфичных праймеров; с) безматричный контроль. Кроме того, необходим дополнительный контроль, чтобы продемонстрировать, что экстрагированная нуклеиновая кислота не содержит ингибиторов ПЦР, например, выявление 18S рРНК декапод методом ПЦР для тканей креветок (Lo с соавт., 1996) или выявление 16S рРНК методом ПЦР для бактерий (Weisburg с соавт., 1991).

4.3.2. Серологические методы

Не применимо.

4.3.3. Биопробы

Vp_{AHPND} передавались экспериментально путем погружения, и введения Pir-токсина с помощью инъекции (Joshi с соавт., 2014b; Nunan с соавт., 2014; Soto-Rodriguez с соавт., 2015; Tran с соавт., 2013b), что воспроизводило естественную горизонтальную передачу пероральным путем и передачу в условиях совместного обитания. Таким образом, после выделения и очистки бактерии, которая предположительно вызывает AHPND, можно выполнить биопробу для подтверждения наличия возбудителя заболевания. Процедура погружения: 15 креветок погружают на 15 минут в суспензию (150 мл чистой искусственной морской воды), состоящую из 2×10^8 клеток культивируемой бактерии/мл, с аэрацией. После данного начального 15-минутного периода креветки и инокулят переносят в больший резервуар с таким объемом чистой искусственной морской воды,

при котором конечная концентрация бактерий составляет 2×10^6 клеток/мл. Мониторинг креветок проводят с интервалами 6 - 8 часов. Мертвые креветки могут быть обработаны для ПЦР для обнаружения V_{rAHPND} , и для секвенирования. Умирающих или выживших креветок обрабатывают для гистологии, повторного выделения бактерий, ПЦР и секвенирования. Положительную биопробу подтверждает следующее: обнаружение характерных гистологических поражений и обнаружение V_{rAHPND} посредством ПЦР и секвенирования.

5. Категории тестов в зависимости от их назначения

В качестве примера, методы, имеющиеся в настоящее время для целевого надзора и диагностики АHPND, перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = 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 а 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	Надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	Послеличинки (PL)	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	d	d	d	c	d
Биопроба	d	d	d	d	d	a
Гистопатология	d	c	a	c	a	b
ПЦР в реальном времени	d	a	a	a	a	b
Гнездовая ПЦР и секвенирование	d	b	b	b	a	a
Одношаговая ПЦР и секвенирование	d	c	c	c	a	a

PL=послеличинки; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от АHPND

Как указано в Таблице 5.1., ПЦР в режиме реального времени является рекомендуемым методом для целевого надзора по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение случая подозрения на болезнь

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

- i) Смертность и клинические признаки, указывающие на АHPND;
- ii) Гистопатологическая картина, указывающая на АHPND;
- iii) Обнаружение генов Pir-токсина с помощью ПЦР или ПЦР в реальном времени.

7.2. Определение подтвержденного случая болезни

Случай АHPND следует рассматривать как подтвержденный, если выполняются два или более условий:

- i) Гистопатологическая картина, указывающая на АHPND;
- ii) Обнаружение генов Pir-токсина в плазмиде pVA1, содержащейся в *Vibrio parahaemolyticus*, с помощью ПЦР и секвенирования;
- iii) Положительные результаты биопробы (характерные гистологические поражения и обнаружение *Vp_{AHPND}* с помощью ПЦР и секвенирования).

8. Список литературы

ANDREWS L.S., PARK D.L. & CHEN Y.P. (2000). Low temperature pasteurization to reduce the risk of *Vibrio* infections from raw shell-stock oysters. *Food Addit. Contam.*, **17**, 787–791.

DABU I.M., LIM J.J., ARABIT P.M.T, ORENSE S.J.A.B., TABARDILO J.A., CORRE V.L. & MANINGAS M.B.B. (2017). The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquacult. Res.*, **48**, 792–799.

DANGTIP S., SIRIKHARIN R., SANGUANRUT P., THITAMADEE S., SRITUNYALUCKSANA K., TAENGCHAIYAPHUM S., MAVICHAK R., PROESPRAIWONG P. & FLEGEL T.W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of АHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Rep.*, **2**, 158–163.

DE LA PEÑA L.D., CABILLON N.A., CATEDRAL D.D., AMAR E.C., USERO R.C., MONOTILLA W.D., CALPE A.T., FERNANDEZ D.D. & SALOMA C.P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (АHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Dis. Aquat. Org.*, **116**, 251–254.

DE SCHRYVER P., DEFOIRDT T. & SORGELOOS P. (2014). Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? *PLoS Pathog.*, **10**, e1003919.

FAO (2013). Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (АHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304), 2013. Hanoi, Viet Nam, 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053, Rome, Italy, 54 p.

FLEGEL T.W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 166–173.

FLEGEL T.W. & LO C.F. (2014). Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand.

GOMEZ-GIL B., SOTO-RODRÍGUEZ S., LOZANO R. & BETANCOURT-LOZANO M. (2014). Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00055-14.

GOMEZ-JIMENEZ S., NORIEGA-OROZCO L., SOTELO-MUNDO R.R., CANTU-ROBLES V.A., COBIAN-GUEMES A.G., COTA-VERDUGO R.G., GAMEZ-ALEJO L.A., DEL POZO-YAUNER L., GUEVARA-HERNANDEZ E., GARCIA-OROZCO K.D., LOPEZ-ZAVALA A.A. & OCHOA-LEYVA A. (2014). High-quality draft genomes of two *Vibrio parahaemolyticus* strains aid in understanding acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00800-14.

HAN J.E., TANG K.F.J., TRAN L.H. & LIGHTNER D.V. (2015a). *Phototransducing* related (*Pir*) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **113**, 33–40.

HAN J.E., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (2015b). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, **442**, 12–15.

HONG X.P., XU D., ZHUO Y., LIU H.Q. & LU L.Q. (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **39**, 1085–1097.

JOSHI J., SRISALA J., SAKAEW W., PRACHUMWAT A., SRITUNYALUCKSANA K., FLEGEL T.W. & THITAMADEE S. (2014a). Identification of bacterial agent(s) for acute hepatopancreatic necrosis syndrome, a new emerging shrimp disease. *Suranaree J. Sci. Technol.*, **21**, 315–320.

JOSHI J., SRISALA J., TRUONG V.H., CHEN I.T., NUANGSAENG B., SUTHIENKUL O., LO C.F., FLEGEL T.W., SRITUNYALUCKSANA K. & THITAMADEE S. (2014b). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, **428–429**, 297–302.

KARUNASAGAR I., KARUNASAGAR I., VENUGOPAL M.N. & NAGESHA C.N. (1987). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine and sea water and in association with clams. *Syst. Appl. Microbiol.*, **9**, 316–319.

KIM Y.B., OKUDA J., MATSUMOTO C., TAKAHASHI N., HASHIMOTO S. & NISHIBUCHI

M. (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the toxR gene. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1173–1177.

KOIWAI K., TINWONGGER S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2016). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease strain of *Vibrio parahaemolyticus* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **39**, 603–606.

KONDO H., TINWONGGER S., PROESPRAIWONG P., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R. & HIRONO I. (2014). Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00221-14.

KONDO H., VAN P.T., DANG L.T. & HIRONO I. (2015). Draft genome sequences of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc.*, **3**, e00978-15.

LEAÑO E.M. & MOHAN C.V. (2012). Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. *Global Aquaculture Advocate.*, **July/August**, 38–39.

LEE C.T., CHEN I.T., YANG Y.T., KO T.P., HUANG Y.T., HUANG J.Y., HUANG M.F., LIN S.J., CHEN C.Y., LIN S.S., LIGHTNER D.V., WANG A.H., WANG H.C., HOR L.I. & LO C.F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 10798–10803.

LIGHTNER D.V. (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp. LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., NOBLE B.L. & TRAN L. (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate.*, **January/February**, 40.

LO C.F., LEU J.-H., HO C.-H., CHEN C.H., PENG S.E., CHEN Y.-T., CHOU M.M.C., YEH P.-Y., HUANG C.J., CHOU H.Y., WANG C.H. & KOU G.H. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.

MUNTADA-GARRIGA J.M., RODRIGUEZ-JEREZ J.J., LOPEZ-SABATER E.I. & MORA-VENTURA M.T. (1995). Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. *Lett. Appl. Microbiol.*, **20**, 225–227. NACA (2012). Report of the Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: Early mortality syndrome (EMS)/acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS), 9–10 August 2012 Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand.

NACA (2014). Acute hepatopancreatic necrosis disease card (updated June 2014). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand.

NUNAN L., LIGHTNER D., PANTOJA C. & GOMEZ-JIMENEZ S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Org.*, **111**, 81–86.

SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SRITUNYALUCKSANA K., THITAMADEE S., FLEGEL T.W., MAVICHAK R. & PROESPRAIWONG P. (2014). A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand, Source:
http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030.

SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SANGUANRUT P., CHI T.D., MAVICHAK R., PROESPRAIWONG P., NUANGSAENG B., THITAMADEE S., FLEGEL T.W. & SRITUNYALUCKSANA K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS One*, **10**, e0126987. doi:10.1371/journal.pone.0126987.

SOTO-RODRIGUEZ S.A., GOMEZ-GIL B., LOZANO-OLVERA R., BETANCOURT-LOZANO M. & MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 1689–1699.

SU Y.C. & LIU C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol.*, **24**, 549–558.

TANIGUCHI H., OHTA H., OGAWA M. & MIZUGUCHI Y. (1985). Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes. *J. Bacteriol.*, **162**, 510–515.

THOMSON W.K. & THACKER C.L. (1973). Effect of temperature on *Vibrio parahaemolyticus* in oysters at refrigerator and deep freeze temperatures. *Can. Inst. Food Sci. Tech. J.*, **6**, 156–158.

TINWONGGER S., PROESPRAIWONG P., THAWONSUWAN J., SRIWANAYOS P., KONGKUMNERD J., CHAWEEPACH T., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2014). Development of PCR diagnosis method for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathol.*, **49**, 159–164.

TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014a). AHPND/EMS: From the academic science perspective to the production point of view. *Aquaculture Asia Pacific*, **10**, 14–18.
TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014b). Tilapia could enhance water conditions, help control EMS in shrimp ponds. *Global Aquaculture Advocate*, **January/February**, 11–12.

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R.M., LIGHTNER D.V. & FITZSIMMONS K. (2013a).

EMS/AHPNS: Infectious disease caused by bacteria. *Global Aquaculture Advocate*, **July/August**, 18–20.

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R.M., MOHNEY L.L., PANTOJA C.R., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2013b). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org*, **105**, 45–55.

WEISBURG W.G., BARNS S.M., PELLETIER D.A. & LANE D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697–703.

YANG Y.T., CHEN I.T., LEE C.T., CHEN C.Y., LIN S.S., HOR L.I., TSENG T.C., HUANG Y.T., SRITUNYALUCKSANA K., THITAMADEE S., WANG H.C. & LO C.F. (2014). Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00816-14.

NB: Не существует Референтных лабораторий МЭБ по АHPND
(см. Таблицу в конце данного *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения дальнейшей информации о АHPND свяжитесь с Референтной лабораторией МЭБ.

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2017 ГОДУ; ПОСЛЕДНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2018 ГОДУ.

ГЛАВА 2.2.2.

ИНФЕКЦИЯ *APHANOMYCES ASTACI* (ЧУМА РАКОВ)

1. Сфера применения

Инфекция *Aphanomyces astaci* означает инфекцию патогенным возбудителем *A. astaci* из семейства Leptolegniaceae, Phylum Oomycota (водяная плесень). Болезнь широко известна под названием «чума раков».

2. Информация о болезни

2.1. Особенности возбудителя

2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

Aphanomyces astaci является членом группы организмов, широко известных как водяная плесень. Хотя эта группа, Oomycetida или oomycota (оомицеты), ранее относилась к грибам, позже она была переведена из царства грибов в протисты, и была включена в группу, называемую страменопилы или хромисты вместе с диатомовыми водорослями и бурыми водорослями. Хромисты — это супергруппа эукариот, возможно, полифилетическая, которую можно рассматривать как отдельное царство или включить в состав Protista.

Четыре группы (A – D) *A. astaci* были описаны на основе ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК (RAPD PCR) (Huang *с соавт.*, 1994; Diéguez Uribeondo *с соавт.*, 1995): Группа A (так называемые штаммы *Astacus*) включает ряд штаммов, которые были выделены из *Astacus astacus* (широкопалый речной рак) и *Astacus leptodactylus* (узкопалый речной рак); считается, что эти штаммы присутствовали в Европе в течение длительного периода времени. Группа B (штаммы *Pacifastacus* группы I) включает изоляты из *A. astacus* в Швеции и *Pacifastacus leniusculus* (американский сигнальный рак) из Лейк-Тахо, США. Вероятно, занос *A. astaci* произошел при импорте в Европу *P. leniusculus*, что привело к заражению местного вида *A. astacus* в Европе. Группа C (штаммы *Pacifastacus* группы II) включает штамм, выделенный из *P. leniusculus* из озера Питт, Канада. Еще один штамм (Pc), выделенный из *Procambarus clarkii* в Испании, относится к группе D (штамм *Procambarus*). Данный штамм демонстрирует температурные кривые/кривые роста с более высокими оптимальными температурами по сравнению с изолятами из северной Европы (Diéguez Uribeondo *с соавт.*, 1995). Штаммы *Aphanomyces astaci*, которые присутствовали в Европе в течение многих лет (штаммы группы A), по-видимому, являются менее патогенными, чем штаммы, появившиеся позднее (с 1960-х годов) в результате импорта раков из Северной Америки.

2.1.2. Выживание вне хозяина

Зооспоры *Aphanomyces astaci* остаются подвижными до 3 дней, а цисты выживают в дистиллированной воде в течение 2 недель (Svensson & Unestam, 1975; Unestam, 1966). Поскольку *A. astaci* может иметь три цикла образования зооспор, максимальная продолжительность жизни вне хозяина может составлять несколько недель. Споры оставались жизнеспособными в суспензии спор, которая хранилась при 2°C в течение 2 месяцев (Unestam, 1966).

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

Aphanomyces astaci, как в культуре, так и в зараженных раках, погибает при кратковременном воздействии температуры +60°C или –20 °C (или ниже) в течение 48 часов (или более) (Alderman, 2000; Oidtmann *с соавт.*, 2002). Гипохлорит натрия и йодофоры эффективны для дезинфекции загрязненного оборудования. Оборудование должно быть очищено перед дезинфекцией, поскольку выяснилось, что органическое вещество снижает эффективность йодофоров (Alderman & Polglase, 1985). Тщательная сушка оборудования (> 24 часа) также эффективна, так как *A. astaci* не устойчив к высушиванию.

2.1.4. Жизненный цикл

Жизненный цикл *A. astaci* прост: вегетативные гифы проникают в ткани хозяина и разрастаются в них, что в конечном итоге приводит к развитию экстраматрикальных спорангиев, из которых выходят первичные амeboидные споры. Они сначала инцистируются, а затем из них выходит двуугутиковая зооспора (вторичная зооспора). Двуугутиковые зооспоры плавают в толще воды и, встретив восприимчивого хозяина, прикрепляются и прорастают, образуя инвазивные вегетативные гифы. По-видимому, свободно плавающие зооспоры хемотактически притягиваются к кутикуле раков (Cerenius Söderhäll, 1984a), и часто оседают на кутикуле возле раны (Nyhlén & Unestam, 1980). Зооспоры способны к повторному инцистированию и повторному образованию, что продлевает период их инфекционной жизнеспособности (Cerenius & Söderhäll, 1984b). Способность к росту и спорообразованию зависит от штамма и температуры (Diéguez Uribeondo *с соавт.*, 1995).

2.2. Особенности хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

На сегодняшний день все виды пресноводных раков должны рассматриваться как восприимчивые к инфекции *A. astaci*. Исход инфекции варьируется в зависимости от вида. Все стадии видов европейских раков, включая широкопалых речных раков (*Astacus astacus*) из северо-западной Европы, белоклешневых речных раков (*Austropotamobius pallipes*) из юго-западной и западной Европы, родственные виды *Austropotamobius torrentium* (горные реки юго-западной Европы) и узкопалых речных раков (*Astacus leptodactylus*) из Восточной Европы и Малой Азии, являются высоко восприимчивыми к инфекции (Alderman, 1996; Alderman *с соавт.*, 1984; Rahe & Soylu, 1989; Unestam, 1969b; Unestam, 1976; Unestam & Weiss, 1970). Лабораторные испытания продемонстрировали, что австралийские виды раков также высоко восприимчивы (Unestam, 1976). Североамериканские раки, такие как сигнальные раки (*Pacifastacus leniusculus*), красные флоридские раки (*Procambarus clarkii*) и виды *Orconectes spp.* инфицируются *A. astaci*, но при нормальных условиях инфекция не

вызывает клинического заболевания или гибели. Было продемонстрировано, что все североамериканские виды раков, исследованные до настоящего времени, восприимчивы к инфекции, о чем свидетельствует присутствие патогена в кутикуле хозяина (Oidtmann *с соавт.*, 2006; Unestam, 1969b; Unestam & Weiss, 1970), и поэтому в настоящее время предполагается, что это относится и к любым другим североамериканским видам раков.

Существует еще только один вид ракообразных, восприимчивых к инфекции *A. astaci*: китайский мохнаторукий краб (*Eriocheir sinensis*) (Benisch, 1940).

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

Все стадии развития следует рассматривать как восприимчивые к инфекции.

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Виды хозяев, восприимчивые к инфекции *A. astaci*, делятся на две основные категории: виды хозяев, высоко восприимчивых к инфекции с развитием клинического заболевания и смертности, и виды хозяев, которые инфицируются, но инфекция не вызывает клинического заболевания или гибели.

Высоко восприимчивые виды

Вспышки клинического заболевания, вызванного инфекцией *A. astaci*, обычно известны под названием «чума раков». В местах вспышек заболевания можно обнаружить умирающих и мертвых раков различных размеров (и, следовательно, различного возраста).

Североамериканские виды раков

Превалентность инфекции, как правило, ниже у животных, у которых недавно закончилась линька (В. Oidtmann, неопубликованные данные). Тем не менее, тщательных исследований для подтверждения этих наблюдений не проводили. У молодых раков линька происходит несколько раз в год, тогда как линька взрослых раков обычно происходит не реже одного раза в год в умеренном климате. Следовательно, животные, у которых после последней линьки прошло некоторое время, могут демонстрировать более высокую превалентность по сравнению с животными, у которых линька прошла недавно.

2.2.4. Органы-мишени и инфицируемые ткани

Экзоскелет (кутикула) является тканью, которая инфицируется в первую очередь. Преимущественно поражается мягкая кутикула на нижней стороне брюшка и вокруг суставов. У высоко восприимчивых европейских видов раков патогену часто удается проникнуть через базальную пластинку, расположенную под слоем клеток эпидермиса. Оттуда *A. astaci* распространяется по всему телу, главным образом путем проникновения в соединительную ткань и гемальные пазухи; однако могут поражаться все ткани.

У североамериканских видов раков инфицирование обычно ограничивается кутикулой. Результаты ПЦР свидетельствуют о том, что часто инфицируется хвостовой веер (состоящий из уроподов и тельсона) и мягкая кутикула брюшка (Oidtmann *с соавт.*, 2006; Vrålstad *с соавт.*, 2011).

2.2.5. Персистентная инфекция

Было продемонстрировано, что несколько североамериканских видов раков заражаются *A. astaci* (Oidtmann *с соавт.*, 2006; Unestam, 1969a; Unestam & Söderhäll, 1977). У инфицированных прижившихся или выращенных на ферме популяций североамериканских раков инфекция не вызывает клинического заболевания или повышенной смертности (Oidtmann *с соавт.*, 2006; Strand *с соавт.*, 2011; Strand *с соавт.*, 2012).

Исходя из результатов исследований, проведенных в отношении североамериканских видов раков, можно предположить, что все виды раков, обитающие на североамериканском континенте, могут быть инфицированы *A. astaci* без развития клинического заболевания, и поэтому они могут выступать в качестве пожизненных носителей патогена.

Последний отчет из Финляндии также указывает на то, что популяции холодноводных широкопалых речных раков могут быть хронически инфицированы при низкой превалентности (Viljamaa-Dirks *с соавт.*, 2011).

2.2.6. Переносчики инфекции

Перемещение рыбы может привести к распространению *A. astaci*: например, через споры, присутствующие в транспортной воде, или при совместной транспортировке рыбы и зараженных раков, или при сочетании данных способов (Alderman *с соавт.*, 1987; Oidtmann *с соавт.*, 2002). Имеются также косвенные доказательства того, что инфекция распространяется через зараженное оборудование (сети, обувь, одежда и т. д.) (Alderman *с соавт.*, 1987).

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Основными путями распространения патогена являются: 1) перемещение зараженных раков, 2) перемещение спор с загрязненной водой или оборудованием, например при перемещении рыбы, или 3) заселение мест обитания североамериканскими видами раков.

Передача инфекции от рака к раку происходит путем выхода зооспор из зараженного животного и прикрепления зооспор к незараженным ракам. Зооспоры *A. astaci* активно плавают в толще воды, и продемонстрировали положительный хемотаксис в отношении раков (Cerenius & Söderhäll, 1984a).

В основном инфекция *A. astaci* распространялась в Европе между 1960-ми и 2000-ми годами путем заселения диких водоемов североамериканскими видами раков или через раков, попавших в дикую природу с ферм (Alderman, 1996; Dehus *с соавт.*, 1999). Распространение в настоящее время происходит главным образом в результате увеличения популяции североамериканских раков, случайной совместной транспортировки особей и путем подсадов североамериканских раков в дикие водоемы частными лицами (Edsman, 2004).

Заселение мест обитания, первоначально занятых высоко восприимчивыми видами, североамериканскими видами раков, инфицированными *A. astaci*, может привести к эпизоотии среди высоко восприимчивых животных. Скорость распространения будет

зависеть, среди прочих факторов, от превалентности инфекции в популяции североамериканских раков.

Перемещение рыбы может привести к распространению *A. astaci*: например, через споры, присутствующие в транспортной воде, или при совместной транспортировке рыбы и зараженных раков, или при сочетании данных способов (Alderman *с соавт.*, 1987; Oidtmann *с соавт.*, 2002). Имеются также косвенные доказательства того, что инфекция распространяется через зараженное оборудование (сети, обувь, одежда и т. д.) (Alderman *с соавт.*, 1987).

2.3.2. Превалентность

У высоко восприимчивых европейских видов раков проникновение спор *A. astaci* обычно приводит к заражению и в конечном итоге к гибели. Минимальная инфекционная доза до сих пор не установлена, но она может составлять всего одну спору на животное (В. Oidtmann, неопубликованные данные). Превалентность инфекции в популяции в начале вспышки может быть низкой (может заразиться несколько животных в популяции реки). Однако патоген развивается в инфицированных животных и впоследствии выходит в воду; как правило, он вызывает 100%-ную смертность в смежной популяции. Скорость распространения от первоначально зараженных животных зависит от нескольких факторов, одним из которых является температура воды. Следовательно, время от первого заноса патогена в популяцию до заметной смертности среди раков может сильно различаться и может составлять от нескольких недель до месяцев. Превалентность инфекции в течение этого времени постепенно увеличивается и обычно достигает 100%. Данные по популяции широкопалых речных раков (благородных раков) в Финляндии, в которой в 2001 году произошла массовая гибель в связи с инфекцией *A. astaci*, свидетельствуют о том, что в малочисленных популяциях широкопалых речных раков распространение болезни в популяции хозяев может занять несколько лет (Viljamaa-Dirks *с соавт.*, 2011).

Уровни превалентности у североамериканских раков, по-видимому, сильно различаются. Немногочисленные исследования продемонстрировали, что возможны уровни превалентности от 0 до 100% (Oidtmann *с соавт.*, 2006).

2.3.3. Географическое распределение

В Европе сообщения о высокой смертности среди раков регистрировались в Италии еще в 1860 году (Ninni, 1865; Seligo, 1895). Позднее также сообщалось о случаях гибели раков, (при отсутствии случаев заражения среди других видов водных животных), во франко-германском пограничном регионе в третьей четверти 19-го века. Оттуда происходило постоянное распространение инфекции, главным образом в двух направлениях: вниз по Дунаю на Балканы и к Черному морю, через Северо-Германскую низменность в Россию и оттуда на юг к Черному морю и на северо-запад к Финляндии и, в 1907 году в Швецию. В 1960-х годах были зарегистрированы первые вспышки в Испании, а в 1980-х наблюдалось дальнейшее распространение инфекции на Британские острова, в Турцию, Грецию и Норвегию (Alderman, 1996). Первоначальный резервуар возбудителя инфекции в 19 веке так и не был установлен; не было данных о том, что виды *Orconectes* были завезены в Европу до 1890-х годов, но распространение инфекции после 1960-х годов во многом связано с более поздним завозом североамериканских раков для разведения (Alderman,

1996). Произошло попадание завезенных видов в дикую природу, и *Pacifastacus leniusculus* и *Procambarus clarkii* в настоящее время широко акклиматизировались во многих частях Европы.

В Австралии и Новой Зеландии никогда не наблюдалось вспышек инфекции *A. astaci*, и в настоящее время данные страны считаются свободными от этой болезни (веб-сайт OIE WAHID, доступ по состоянию на июнь 2011 года).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Когда инфекция впервые попадает в незараженную популяцию высоко восприимчивых видов раков, в течение короткого промежутка времени обычно наблюдается высокий уровень смертности, поэтому в районах с высокой плотностью раков дно озер, рек и ручьев покрыто мертвыми и умирающими раками. Инфекция, сопровождающаяся гибелью раков, быстро распространяется от места первичной вспышки вниз по течению, тогда как распространение вверх по течению происходит медленнее. Там, где плотность популяции восприимчивых раков низкая, образуется меньше зооспор, и распространение инфекции будет происходить медленнее, и гибель будет не такой массовой. Температура воды оказывает некоторое влияние на скорость распространения инфекции, и это наиболее очевидно в популяциях раков с низкой плотностью, где распространение от животного к животному занимает больше времени, а интенсивность заражения будет ниже. Более низкие темпы роста смертности и больший диапазон клинических признаков у зараженных животных обусловлены более низкими температурами воды и уменьшением количества зооспор (Alderman *с соавт.*, 1987). Результаты исследований, проведенных в Финляндии, указывают на то, что при низких температурах воды широкопалые речные раки могут быть инфицированными в течение нескольких месяцев, без высокого уровня смертности (S. Viljamaa-Dirks, неопубликованные данные).

Иногда единичных особей высоко восприимчивых видов обнаруживали после того, как в реке или озере прошла волна инфекции *A. astaci*. Скорее всего, это связано с недостаточным воздействием патогена на данных животных во время вспышки (животные могли быть в притоке реки/озера или в части зараженной реки/озера, куда не проникли споры, или раки могли оставаться в норах во время эпизоотии). Тем не менее, было описано, что низковирулентные штаммы *A. astaci* выживали в водоемах, вызывая слабую инфекцию в оставшейся популяции (Viljamaa-Dirks *с соавт.*, 2011). Хотя остатки популяций восприимчивых видов раков обитают во многих водосборных бассейнах Европы, численность популяций с высокой плотностью, которые существовали 150 лет назад, в настоящее время сильно сократилась (Alderman, 1996; Souty-Grosset *с соавт.*, 2006). Популяции восприимчивых раков могут восстановиться, но как только плотность популяции и географическое распределение станут достаточными для контакта восприимчивых животных с инфекцией, возникнут новые вспышки инфекции *A. astaci* и будет происходить массовая гибель.

2.3.5. Факторы окружающей среды

В лабораторных условиях предпочтительный диапазон температур, при котором растет мицелий *A. astaci*, незначительно различается в зависимости от штамма. В исследовании, в котором сравнивалось несколько штаммов *A. astaci*, выделенных из различных видов раков,

рост мицелия наблюдался в диапазоне от 4°C до 29,5°C, причем у штамма, выделенного из *Procambarus clarkii*, наблюдался более быстрый рост при более высоких температурах по сравнению с другими штаммами. Интенсивность спорообразования была одинаково высокой для всех протестированных штаммов при температуре от 4 до 20°C, но она заметно снижалась при 25°C для штаммов, выделенных не из *Procambarus clarkii*, и отсутствовала при 27°C. Напротив, спорообразование продолжалось в штамме *Procambarus clarkii* при 27°C. Доля подвижных зооспор (из всех зооспор, наблюдаемых в суспензии зооспор) составила почти 100% при температуре от 4 до 18°C, и снизилась приблизительно до 60% при 20°C и приблизительно до 20% при 25°C у всех штаммов, кроме штамма *P. clarkii*. В штамме *P. clarkii* 80% зооспор оставались подвижными при 25°C, но подвижных спор не было обнаружено при 27°C (Diéguez Uribeondo *с соавт.*, 1995).

Полевые наблюдения продемонстрировали, что вспышки инфекции *A. astaci* происходят при широком диапазоне температур и, по крайней мере, в диапазоне от 4 до 20°C. Скорость распространения внутри популяции зависит от нескольких факторов, включая температуру воды. При температуре от 4 до 16°C скорость эпизоотии увеличивается в связи с более высокими температурами воды. При низких температурах воды кривая эпизоотии может подниматься очень медленно, и период, в течение которого наблюдаются случаи гибели, может составлять несколько месяцев (В. Oidtmann, неопубликованные данные).

В буферной, дистиллированной воде споруляция происходит при pH от 5 до 8, (оптимальный диапазон pH от 5 до 7). Оптимальный диапазон pH для плавания зооспор, по-видимому, находится в пределах от 6 до 7,5, а максимальный диапазон pH составляет от 4,5 до 9,0 (Unestam, 1966).

На появление зооспор влияет наличие определенных солей в воде. CaCl₂ стимулирует появление зооспор из первичных цист, тогда как MgCl₂ оказывает ингибирующее действие. Как правило, появление зооспор запускается путем переноса вегетативного мицелия в среду, где питательные вещества отсутствуют или имеют низкую концентрацию (Cerenius & Söderhäll, 1984b).

2.4. Профилактика и борьба с болезнью

После заноса *A. astaci* в популяцию высоко восприимчивых видов раков в дикой природе, распространение внутри зараженной популяции невозможно контролировать. Таким образом, предотвращение заноса имеет ключевое значение. Во избежание заноса, необходимо принять следующие меры:

4. Следует предотвращать перемещение потенциально зараженных живых или мертвых раков, потенциально контаминированной воды, оборудования или любых других предметов, посредством которых патоген может быть занесен из неблагополучного пункта в благополучный пункт, где содержатся восприимчивые виды.

5. Если планируется перемещение рыбы, водный источник следует оценить с точки зрения вероятности наличия в нем инфицированных раков (включая североамериканских раков-носителей).

6. Следует избегать перемещения рыбы из пункта, где в настоящее время наблюдается эпизоотия инфекции *A. astaci*, так как это сопряжено с высоким риском распространения заболевания.

7. Если планируется перемещение рыбы из водного источника, в котором водятся североамериканские раки, к методам вылова рыбы в данном водоеме предъявляются следующие требования: а) совместная транспортировка рыбы и раков не допускается; б) в транспортной воде должны отсутствовать споры *A. astaci*, и, в) оборудование должно дезинфицироваться между каждым использованием; д) груз не должен контаминироваться при транспортировке.

8. Не следует выпускать североамериканских раков в дикие водоемы в районах, где присутствует какой-либо из высоко восприимчивых видов. После того как их выпустили, североамериканские раки имеют тенденцию распространяться, иногда на большие расстояния. Если планируется выпустить североамериканских раков в дикие водоемы, то должна быть проведена оценка риска для прогнозирования долгосрочных возможных последствий. В конечном итоге могут инфицироваться высоко восприимчивые популяции раков вдали от места выпуска.

9. Чрезвычайно трудно осуществить меры биобезопасности, полностью гарантирующие, что раки не покинут аквакультурные предприятия. Поэтому необходимо провести оценку риска, чтобы определить, следует ли создавать эти предприятия.

Определенные пути заноса, такие как выпуск североамериканских раков частными лицами, трудно контролировать.

2.4.1. Вакцинация

В настоящее время нет доказательств того, что вакцины обеспечивают долгосрочную защиту ракообразных, и даже если это не так, вакцинация природных популяций раков нецелесообразна.

2.4.2. Лекарственное лечение

В настоящее время не известно никаких методов лечения высоко восприимчивых видов раков после их заражения.

2.4.3. Иммуностимуляция

В настоящее время не известно никаких иммуностимуляторов, которые могли бы успешно защитить высоко восприимчивые виды раков от инфекции и последующего заболевания, вызванного инфекцией *A. astaci*.

2.4.4. Разведение для получения резистентной популяции

За 125 лет, прошедших с момента появления инфекции *A. astaci* в Европе, получено мало свидетельств резистентности популяций европейских раков. Однако тот факт, что у североамериканских раков, как правило, не развивается клиническое заболевание, позволяет предположить, что возможен отбор для получения резистентной популяции, и лабораторные исследования с использованием штаммов *A. astaci* с ослабленной

вирулентностью могут быть успешными. Однако в настоящее время нет опубликованных данных таких исследований.

2.4.5. Повторное заселение резистентными видами

Североамериканские раки использовались в различных европейских странах для восполнения утраченного поголовья местных раков. Однако, поскольку североамериканские раки считаются восприимчивыми к *A. astaci*, повторное заселение североамериканскими раками может создать резервуар инфекции *A. astaci*. Это сведет к минимуму вероятность успешного повторного заселения местными видами. Следует провести оценку риска для принятия решения о повторном заселении.

2.4.6.	Блокирующие	агенты
Нет данных.		

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Имеется ограниченная информация о восприимчивости икринок раков к инфекции *A. astaci*. Unestam & Söderhäll отмечают, что они экспериментально подвергли икринки *Astacus astacus* и *P. leniusculus* воздействию суспензий зооспор и не смогли вызвать инфекцию (Unestam & Söderhäll, 1977). Однако подробные данные этих исследований не были опубликованы.

Несмотря на то, что опубликованных данных недостаточно, дезинфекция личинок после заражения вряд ли будет успешной, поскольку *A. astaci* будет защищен от дезинфекции кутикулой раков, в которой он будет присутствовать.

2.4.8. Общие практики разведения раков

Если планируется создание хозяйства по разведению раков высоко восприимчивых видов, следует тщательно изучить, имеются ли североамериканские виды раков вблизи территории запланированного участка, или присутствуют ли популяции североамериканских раков вверх по течению (для участков, которые расположены непосредственно на реке или берут воду из реки), даже если они находятся на большом расстоянии вверх по течению. Если североамериканские виды раков присутствуют, существует высокая вероятность того, что восприимчивые раки, выращенные в хозяйстве, в конечном итоге инфицируются.

В эндемичном районе, где выращиваются высоко восприимчивые виды, следует соблюдать следующие рекомендации по биобезопасности во избежание заноса *A. astaci* в хозяйство:

1. Должны осуществляться общие меры биобезопасности (например, контролируемый доступ на территорию; дезинфекция обуви при входе в хозяйство; расследование случаев гибели, если они имеются; завоз живых животных (раков, рыб) только из источников, свободных от инфекции *A. astaci*).
2. Не следует допускать перемещения потенциально инфицированных живых или мертвых раков, потенциально контаминированной воды, оборудования или любых других

предметов, посредством которых патоген может быть занесен из неблагополучного пункта в благополучный пункт, где содержатся восприимчивые виды.

3. Если планируется перемещение рыбы или раков, они не должны поступать из рек или других водоемов, в которых обитают потенциально инфицированные раки (либо восприимчивые популяции раков, в которых в настоящий момент наблюдается вспышка инфекции *A. astaci*, либо североамериканские раки-носители).

4. В хозяйство не должны завозиться североамериканские раки.

5. Рыба, полученная из неизвестных источников пресной воды или из источников, где могут присутствовать североамериканские раки или может иметь место вспышка инфекции *A. astaci*, не должна использоваться в качестве приманки или корма для раков, кроме тех случаев, когда рыба подверглась температурной обработке, уничтожающей *A. astaci* (см. Раздел 2.1.3).

6. Любое оборудование, ввезенное в хозяйство, должно быть продезинфицировано.

3. Отбор образцов

3.1. Отбор отдельных особей

В случае подозрения на вспышку инфекции *A. astaci* в популяции высоко восприимчивых видов раков, образцы раков, отобранных для выявления *A. astaci*, в идеале должны включать: а) живых раков с признаками заболевания и б) живых раков, которые кажутся здоровыми. Мертвые раки также могут быть пригодными, хотя это будет зависеть от их состояния.

Живых раков следует перевозить в контейнерах из полистирола с небольшими отверстиями для аэрации или в аналогичных контейнерах. Температура в контейнере не должна превышать 16°C.

Контейнер должен обеспечивать защиту от значительных перепадов температур вне контейнера. В периоды жаркой погоды следует использовать морозильные пакеты со льдом, чтобы температура не оказывала вредного воздействия на животных. Пакеты могут быть прикреплены внутри на дне транспортного контейнера. Тем не менее, раки должны быть защищены от прямого контакта с морозильными пакетами. Для этого можно использовать, например, картон или нескольких слоев газеты.

Раков следует перевозить во влажной атмосфере, например, с использованием увлажненной древесной стружки/опилок, газеты или травы/сена. Если транспортная вода не достаточно насыщена кислородом, живых раков не следует перевозить в воде, поскольку они могут задохнуться.

Время между отбором живых животных и доставкой в исследовательскую лабораторию не должно превышать 24 часов.

Даже если на месте предполагаемой вспышки найдены только мертвые животные, они могут быть пригодны для диагностики. В зависимости от их состояния, их можно: а) перевозить в охлажденном состоянии (если предполагается, что они погибли совсем недавно), или б) поместить в неметилованный этанол (минимальная концентрация 70%; см. Раздел 3.2).

Если животные находятся в стадии разложения, маловероятно, что будет получен достоверный результат, однако, при отсутствии других животных, их все равно можно протестировать.

3.2. Консервирование образцов

Как описано выше, предпочтительно использовать неконсервированных раков. Если транспортировка недавно погибших или умирающих раков не может быть организована, раки могут быть зафиксированы в этаноле (минимум 70%). Однако фиксация может снизить чувствительность теста. Соотношение раков и этанола в идеале должно быть 1:10 (1 часть раков, 10 частей этанола).

3.3. Объединение образцов в пулы
Не рекомендуется.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

У высоко восприимчивых видов раков наиболее подходящей тканью для отбора образцов является мягкая кутикула брюшка, которая находится на нижней стороне брюшка.

У североамериканских видов раков рекомендуется отбор образцов мягкой кутикулы брюшка, уropод и тельсона.

3.5. Неподходящие образцы/ткани

Автолитический материал не подходит для анализа.

4. Методы диагностики

Если имеется большое количество мертвых раков высоко восприимчивых видов, а остальная водная фауна остается здоровой, то можно заподозрить, что популяция инфицирована *A. astaci*. Клинические признаки инфекции *A. astaci* включают изменения в поведении и ряд видимых внешних поражений. Однако клинические признаки имеют ограниченную диагностическую ценность. Основными доступными методами диагностики являются полимеразная цепная реакция (ПЦР) и выделение патогена в культуральных средах с последующим подтверждением его идентичности. Выделение может быть сложным и для него требуется, чтобы образцы были в хорошем состоянии, при их поступлении в диагностическую лабораторию (Oidtmann *с соавт.*, 1999). Молекулярные методы в меньшей степени зависят от скорости доставки образцов и могут использоваться для большего диапазона образцов по сравнению с методами, основанными на выделении возбудителя (Oidtmann *с соавт.*, 2006; Vrålstad *с соавт.*, 2009).

4.1.1. Клинические признаки

Высоко восприимчивые виды

Макроскопические клинические признаки различны и зависят от серьезности заражения и температуры воды. Первым признаком эпизоотии может быть появление раков в дневное время (раки обычно ведут ночной образ жизни), у некоторых из раков может нарушиться координация, раки опрокидываются на спину и не могут перевернуться. Однако часто первым признаком вспышки является большое количество мертвых раков в реке или озере (Alderman с соавт., 1987).

У восприимчивых видов, если численность раков достаточна для быстрого распространения заболевания, особенно при летних температурах воды, все высоко восприимчивые местные виды раков на участке реки протяженностью более 50 км могут погибнуть в течение 21 дня или ранее, с момента первых наблюдаемых случаев гибели (D. Alderman, субъективные комментарии.) Инфекция *A. astaci* имеет беспрецедентную степень тяжести, поскольку зараженные восприимчивые раки обычно не выживают. Однако следует подчеркнуть, что наличие большого количества мертвых раков само по себе недостаточно для диагностики. Следует оценить общее состояние остальной водной фауны. Гибель или исчезновение других водных беспозвоночных, равно как и раков, даже если рыба выживает, может указывать на загрязнение (например, загрязнение инсектицидами, такими как циперметрин, приводило к постановке ошибочного диагноза).

Североамериканские виды раков

Иногда считается, что меланизированная кутикула является признаком инфекции *A. astaci*. Однако меланизация может иметь самые разные причины и не является специфическим признаком инфекции *A. astaci*.

4.1.2. Изменение поведения

Высоко восприимчивые виды

Зараженные раки высоко восприимчивых видов могут оставлять свои убежища в дневное время (что обычно не наблюдается у раков), у них пропадает рефлекс защиты и наблюдается прогрессирующий паралич. Умиравшие раки иногда лежат на спине. Животные часто уже не в состоянии перевернуться. Иногда можно увидеть, как зараженные животные пытаются чесать или щипать себя.

Североамериканские виды раков

Зараженные североамериканские раки не демонстрируют каких-либо поведенческих изменений (B. Oidtmann, неопубликованные данные).

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Высоко восприимчивые виды

В зависимости от ряда факторов, очаги инфекции у раков могут быть видны невооруженным глазом или могут быть не заметными, несмотря на тщательное исследование. Такие очаги лучше всего можно увидеть под стереомикроскопом малой мощности увеличения, и чаще всего их можно узнать по белым пятнам на мышцах под кутикулой. В некоторых случаях кутикула и мышцы могут приобрести коричневую окраску, а в других случаях в инфицированной кутикуле можно увидеть гифы в виде мелких коричневых (меланизированных) следов в самой кутикуле. Участки, которые подлежат тщательному исследованию, включают мягкую кутикулу на нижней стороне брюшка и хвоста, кутикулу перианальной области, кутикулу между панцирем и брюшком, суставы грудных ног (ходильных ног), особенно проксимальный сустав и, наконец, жабры.

Североамериканские виды раков

Зараженные североамериканские раки могут иногда иметь меланизированные пятна на мягкой кутикуле, например, мягкой кутикуле на нижней стороне брюшка. Тем не менее, данные меланизированные пятна могут быть вызваны механическими повреждениями или инфицированием другими видами водяной плесени, и не являются специфичными.

4.2.2. Клиническая химия
Подходящие методы отсутствуют.

4.2.3. Микроскопическая патология

Если ткань для фиксации была выбрана неправильно, будет трудно обнаружить гифы *A. astaci* в окрашенных препаратах. Можно использовать метод гистологического окрашивания, например серебряную окраску Грокотта с контрокраской обычным гематоксилином и эозином. Однако данный материал не подтверждает, что наблюдаемые гифы принадлежат *A. astaci*.

См. также Раздел 4.2.4

4.2.4. Влажные препараты

В небольших кусочках мягкой кутикулы, вырезанных из участков, упоминаемых выше (Раздел 4.2.1), и исследованных под составным микроскопом с использованием малой и средней мощности увеличения, будет подтверждено наличие асептатных грибковых гиф шириной 7–9 мкм. Обычно можно обнаружить гифы, которые пронизывают всю толщину кутикулы, образуя трехмерную сеть гиф в сильно пораженных областях кутикулы. Присутствие гемоцитов хозяина и, возможно, некоторая меланизация, ассоциированная с гифами и их инкапсулирование, позволяют предположить, что гифы представляют собой патоген, а не вторичный оппортунистический возбудитель заболевания. В некоторых случаях исследование поверхности данных влажных препаратов кутикулы продемонстрирует наличие характерного для *A. astaci* спорангия со скоплениями инцистированных первичных спор (см. Раздел 4.3).

4.2.5. Мазки
Не применимо.

4.2.6.	Фиксированные	срезы	ткани
См. Раздел 4.2.3			

4.2.7.	Электронная	микроскопия/цитопатология
Не применимо.		

4.3. Методы обнаружения и идентификации агента

4.3.1. Метод прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Как указано выше (Раздел 4.2.4), предварительно идентифицировать *A. astaci* можно на основании i) наличия гиф, пронизывающих кутикулу и ii) спорангиев правильных морфологических типов (см. ниже) на поверхности экзоскелетов раков.

4.3.1.1.2.		<i>Мазки</i>
Не применимо.		

4.3.1.1.3.	Фиксированные	срезы	ткани
См. Раздел 4.2.3			

4.3.1.2. Выделение и идентификация агента

4.3.1.2.1.	Культура	клеток	/искусственные	среды

Высоко восприимчивые виды

Следует позаботиться о том, чтобы животные, которые будут использоваться для выделения *A. astaci* в культуре, не подвергались высушиванию.

Методы выделения были описаны Benisch, 1940; Nyhlén & Unestam, 1980; Alderman & Polglase, 1986; Cerenius *с соавт.*, 1988; Oidtmann *с соавт.*, 1999 и Viljamaa-Dirks & Heinikainen, 2006.

Среда для выделения (IM) по Alderman и Polglase, 1986: 12,0 г агара; 1,0 г дрожжевого экстракта; 5,0 г глюкозы; 10 мг оксолиновой кислоты; 1000 мл речной воды; и 1,0 г пенициллина G (стерильного), добавленного после автоклавирования и охлаждения до 40°C. Речная вода определяется как любая природная речная или озерная вода, в отличие от деминерализованной воды.

Любое поверхностное загрязнение следует сначала удалить с мягкой внутренней поверхности кутикулы на нижней стороне брюшка или с любых других областей, из которых будет вырезаться кутикула, тщательно протерев кутикулу влажным (с использованием автоклавированной воды) чистым одноразовым бумажным полотенцем. Простого асептического иссечения инфицированных тканей, которые затем помещаются в

виде маленьких кусочков (3–5 мм²) на поверхность планшетов со средой для выделения, обычно достаточно для успешного выделения *A. astaci* из умирающих или недавно погибших (<24 часов) животных. В зависимости от ряда факторов, очаги инфекции у раков могут быть легко видны невооруженным глазом или могут быть не заметными, несмотря на тщательное исследование. Такие очаги лучше всего можно увидеть под стереомикроскопом малой мощности увеличения, и чаще всего их можно узнать по белым пятнам на мышцах под кутикулой. В некоторых случаях кутикула и мышцы могут приобрести коричневую окраску, а в других случаях в инфицированной кутикуле можно увидеть гифы в виде мелких коричневых (меланизированных) следов в самой кутикуле. Участки, которые подлежат тщательному исследованию, включают мягкую кутикулу на нижней стороне брюшка и хвоста, кутикулу перианальной области, кутикулу между панцирем и брюшком, суставы грудных ног (ходильных ног), особенно проксимальный сустав и, наконец, жабры.

Если инфицированные ткани вырезаются с осторожностью, загрязняющие вещества не должны представлять значительных проблем при выделении. Небольшие кусочки кутикулы и мышц можно перенести в чашку Петри со стерильной водой и затем разрезать на мелкие кусочки стерильными инструментами для переноса в среду для выделения (ИМ). Подходящими инструментами для такой работы являются скальпели, остроконечные пинцеты и ножницы.

Для минимизирования возможной контаминации, проводится дезинфекция кутикулы этанолом, и погружение стерильного стеклянного кольца на глубину 1-2 мм в среду для выделения. Это может повысить успех выделения (Nyhlén & Unestam, 1980; Oidtmann *с соавт.*, 1999). Было описано добавление теллурида калия во внутреннюю часть стеклянного кольца (Nyhlén & Unestam, 1980).

Инокулированный агар можно инкубировать при температуре от 16 до 24°C. Чашки Петри должны быть закрыты герметизирующей пленкой (например, парафильмом³⁸), чтобы предотвратить высыхание.

На агаре для выделения рост новых изолятов *A. astaciis* почти полностью происходит внутри агара, за исключением температур ниже 7°C, когда происходит поверхностный рост. Колонии бесцветны. Размеры и внешний вид гиф почти одинаковы в тканях раков и в агаре. Вегетативные гифы являются асепатными гифами шириной (5)7–9(10) мкм (т.е. обычный диапазон составляет 7–9 мкм, но по результатам наблюдений он варьируется от 5 до 10 мкм). Молодые, активно растущие гифы имеют плотную оболочку в виде крупнозернистой цитоплазмы с многочисленными рефрактивными глобулами (Alderman & Polglase, 1986). Более зрелые гифы имеют вакуолизированную цитоплазму, которая в значительной степени ограничена периферией, оставляя только тонкие нити протоплазмы, образующие связь с крупной центральной вакуолью. Самые старые гифы, по-видимому, лишены содержимого. Гифы сильно ветвятся, вегетативные ответвления часто бывают несколько

³⁸ 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.

уже, чем основные гифы на протяжении первых 20–30 мкм роста.

Когда активно растущие талломы или части талломов из бульонной или агаровой культуры переносят в речную воду (природная вода с катионами способствует спорообразованию в большей степени, чем дистиллированная вода), спорангии легко образуются через 20–30 часов при 16°C и 12–15 часов при 20°C. Талломы, перенесенные из бульонной культуры, можно промыть стерильной речной водой в стерильном сите из нержавеющей стали перед переносом в свежую стерильную речную воду для стимулирования спорообразованию. Талломы в агаре следует переносить, вырезая тонкую полоску с поверхности агара, содержащего водяную плесень, таким образом, чтобы перенести минимальное количество агара, содержащего питательные вещества. Следует всегда использовать большой объем стерильной речной воды относительно количества переносимой водяной плесени (100:1). Спорангии являются мицелоидными, терминальными или интеркалярными, развиваются из недифференцированных вегетативных гиф. Форма спорангий различна: терминальные спорангии простые, они развиваются из новых экстратрикаральных гиф, тогда как интеркалярные спорангии могут иметь довольно сложную форму. Интеркалярные спорангии развиваются путем роста новой латеральной экстратрикаральной ветви, которая образует трубочку спорангия для выброса спор. Цитоплазма данных развивающихся трубочек для выброса спор достаточно плотная, и эти ветви немного шире (10–12 мкм), чем обычные вегетативные гифы. Спорангии имеют одну основную перегородку в случае терминального спорангия и перегородки на обоих концах сегмента в случае интеркалярных спорангий. Такие перегородки заметно толще стенок гиф и имеют высокий рефракционный индекс. Последовательные участки вегетативной гифы могут развиваться в спорангий, и большая часть вегетативного таллома способна перерасти в спорангий.

Внутри развивающегося спорангия цитоплазма расщепляется на группы вытянутых компонентов (10–25 × 8 мкм), которые первоначально связаны нитями протоплазмы. Хотя концы этих цитоплазматических единиц становятся закругленными, они остаются удлинненными до и во время выброса. Выброс спор проходит по ахлиондному типу, то есть первая стадия спор представляет собой апланоспору, которая инцистируется у отверстия спорангия и, вероятно, представляет собой недоразвитую сапролегниевую первичную зооспору. Не было обнаружено никаких доказательств существования жгутиковой первичной споры, поэтому в данном описании использовались термины «спорангий», а не «зооспорангий» и «первичная спора», а не «первичная зооспора». Выброс спор проходит быстро (<5 минут), и отдельные первичные споры (= компоненты цитоплазмы) проходят через кончик спорангия и накапливаются вокруг отверстия спорангия. Скорость цитоплазматического расщепления и выброса зависит от температуры. При выходе каждая первичная спора сохраняет свою удлинненную неправильную амебоидную форму незадолго до инцистирования.

Инцистирование характеризуется постепенным округлением с последующим формированием стенки цисты, о чем свидетельствует изменение рефракционного индекса клетки. Период времени от выхода до инцистирования составляет 2–5 минут. Некоторые споры могут отделиться от массы спор на кончике спорангия и инцистироваться отдельно. Формирование стенки первичной цисты происходит быстро, и после инцистирования споры остаются вместе как единая группа и хорошо прилипают к кончику спорангия, так

что для разрушения массы спор требуется заметное физическое воздействие.

Инцистированные первичные споры имеют сферическую форму, их диаметр составляет (8)9–11(15) мкм, и они относительно немногочисленны, (8)15–30(40) на спорангий по сравнению с другими видами *Aphanomyces*. Споры остаются инцистированными в течение 8–12 часов. Оптимальная температура для образования спорангиев и выброса спор для большинства европейских изолятов *A. astaci* находится в диапазоне от 16 до 24°C (Alderman & Polglase, 1986). Для некоторых изолятов, особенно из водоемов Испании, оптимальные температуры могут быть более высокими (Dehus *с соавт.*, 1999). Выброс вторичных зооспор из первичных цист достигает максимума при 20°C и не происходит при 24°C. Что касается новых изолятов *A. astaci*, для большинства первичных цист выброс в качестве вторичных зооспор является нормой, хотя это может происходить по-разному в зависимости от старения в длительной лабораторной культуре. Образование спорангиев и выброс спор происходит при температуре до 4°C. *A. astaci* не выживает в культуре при температуре -5°C и ниже в течение более 24 часов, хотя может потребоваться температура -20°C в течение >48 часов в тканях инфицированных раков, а также *A. astaci* не остается жизнеспособным в тканях раков, которые подверглись обычной кулинарной обработке (Alderman, 2000; Oidtmann *с соавт.*, 2002).

Во многих случаях выброс некоторых первичных спор из спорангия не происходит, а многие спорангии вообще не выбрасывают спор. Вместо этого первичные споры, по-видимому, инцистируются *in situ* внутри спорангия, часто приобретают сферическую, а не удлиненную форму и, безусловно, претерпевают те же изменения рефракционного индекса, которые указывают на инцистирование спор вне спорангия. Такое инцистирование внутри спорангия наблюдается у раков. Споры, инцистированные при таких условиях, по-видимому, способны прорасти, вызывая дальнейший рост гиф.

Вторичные зооспоры выходят через сосочек, сосочек образуется незадолго до выброса спор. Цитоплазма споры медленно, амебоидным образом выходит из узкой поры на кончике сосочка, округляется и начинает легкое раскачивающее движение, когда начинается появление жгутика, и форма споры постепенно изменяется от сферической до почкообразной. Жгутики прикрепляются сбоку (Scott, 1961); зооспоры являются типичными сапролегниевыми вторичными зооспорами размером 8 × 12 мкм. Активная подвижность появляется в течение приблизительно 5–20 минут (в зависимости от температуры), и вначале зооспоры движутся медленно и хаотично. При температуре от 16 до 20°C зооспоры могут продолжать плавать в течение как минимум 48 часов (Alderman & Polglase, 1986).

Чувствительность и специфичность метода культивирования могут сильно различаться в зависимости от опыта специалиста, проводящего тестирование, но в целом они будут ниже, чем при использовании ПЦР.

Североамериканские виды раков

Выделение *A. astaci* культивированием, согласно методам, описанным для высоко восприимчивых видов, обычно дает неудовлетворительный результат. В настоящее время

рекомендуемым методом для выявления инфекции у данных видов является ПЦР.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

Отсутствуют.

4.3.1.2.3.

Молекулярные

методы

Животные

В случае подозрения на вспышку заболевания у высоко восприимчивых видов раков для выделения ДНК рекомендуется отбирать умирающих или недавно погибших (<24 часов) раков. Живых раков можно убить с помощью хлороформа. Если единственными имеющимися животными являются животные, которые умерли за несколько дней до выделения ДНК, их можно протестировать, но отрицательный результат ПЦР следует интерпретировать с осторожностью, поскольку возможно, что произошла деградация ДНК. Можно использовать эндогенные контроли для определения того, произошла ли деградация. Для них рекомендуется использовать ткани хозяина, которые содержат большее количество клеток хозяина по сравнению с кутикулой; сама кутикула содержит очень мало ядер клеток хозяина. Если обстоятельства не позволяют доставить раков в специализированную лабораторию в течение 24 часов, возможна фиксация в 70% этаноле (соотношение этанола к ткани раков $\geq 10:1$), но это может привести к снижению выхода ДНК.

Выделение ДНК

При анализе животных высоко восприимчивых видов, мягкая кутикула на нижней стороне брюшка является рекомендуемой тканью для выделения ДНК. Любое поверхностное загрязнение следует сначала удалить с мягкой кутикулы на нижней стороне брюшка, тщательно протерев кутикулу влажным (с использованием автоклавированной воды) чистым одноразовым бумажным полотенцем. Затем мягкую кутикулу на нижней стороне брюшка вырезают и измельчают в жидком азоте по 30–50 мг до мелкого порошка с помощью пестика и ступки (можно использовать альтернативные методы измельчения, но перед рутинным использованием их следует сравнить с методом жидкого азота). Для идентификации носителя отбирают и обрабатывают по-отдельности 30–50 мг ткани из мягкой кутикулы на нижней стороне брюшка, а также тельсон и уropоды. ДНК выделяют из измельченной кутикулы, используя метод на основе протеиназы К (например, набор тканей DNeasy; Qiagen, Hilden, Германия; протокол для тканей насекомых), следуя инструкциям производителя (Oidtmann *с соавт.*, 2006) или используя СТАВ (анализ на основе бромид цетилтриметиламмония) (Vrålstad *с соавт.*, 2009). Параллельно с образцами должны тестироваться и отрицательные контроли. В качестве отрицательных контролей могут использоваться ткани креветок.

4.3.1.2.3.1. ПЦР

Было разработано несколько ПЦР-анализов с различными уровнями чувствительности и специфичности. Здесь описаны два анализа, которые обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Оба анализа нацелены на участок ITS (внутренний транскрибируемый спейсер) кластера ядерных рибосомных генов в геноме *A. astaci*. Согласно стандартной

процедуре проведения любых диагностических тестов на основе ПЦР, отрицательные контроли должны тестироваться параллельно с образцами, для контроля возможной контаминации. Контрольные образцы из окружающей среды (с использованием, например, ткани креветок, как описано выше) и контроль экстрагирования холостой пробы при выделении ДНК следует использовать параллельно с образцами безматричного контроля ПЦР (матричная ДНК заменяется сверхчистой водой). Образец безматричного контроля ПЦР должен включать контрольный образец ПЦР из окружающей среды, оставленный открытым во время пипетирования образца ДНК.

Метод 1:

В данной традиционной ПЦР используются сайты видоспецифических праймеров, находящиеся в участках ITS1 и ITS2. Прямой праймер (BO 42) 5'-GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CT-3' и обратный праймер (BO 640) 5'-СТА-ТСС-ГАС-ТСС-ГСА-ТТС-TG-3'. Реакционная смесь для ПЦР объемом 50 мкл содержит 1 × ПЦР-буфера, 75 mM Трис/HCl, pH 8,8, 20 mM [NH₄]₂SO₄, 0,01% (об/об) Твин 20), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM каждого dATP, dCTP, dTTP и dGTP, 0,5 мкМ каждого праймера и 1,25 единиц ДНК-полимеразы (например, ДНК-полимеразы Thermoprime Plus; AB Gene, Epsom, UK) или эквивалентной Taq-полимеразы и 2 мкл матричной ДНК. Денатурация смеси проводится при 96°C в течение 5 минут, затем 40 циклов амплификации: 1 минута при 96°C, 1 минута при 59°C и 1 минута при 72°C со стадией финальной элонгации в течение 7 минут при 72°C. Амплифицированную ДНК анализируют с помощью электрофореза в агарозном геле. Целевой продукт представляет собой фрагмент размером 569 пар оснований. Подтверждение идентичности ПЦР-продукта рекомендуется проводить с использованием секвенирования. Анализ позволяет последовательно обнаружить до 500 фг геномной ДНК-мишени, что эквивалентно десяти зооспорам, используемым в реакции ПЦР (Tuffs & Oidtmann, 2011).

Метод 2:

Данный анализ представляет собой ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зондов связывания с малой бороздкой (MGB), нацеленную на уникальный мотив последовательности *A. astaci* в участке ITS1 размером 59 пар оснований. Прямой праймер AphAstITS-39F (5'-AAG-GCT-TGT-GCT-GGG-ATG-TT-3'), обратный праймер AphAstITS-97R (5'-CTT-CTT-GCG-AAA-CCT-TCT-GCT-A-3') и TaqMan зонд связывания с малой бороздкой (MGB) AphAstITS-60T (5'-6-FAM-TTC-GGG-ACG-ACC-CMG-BNF-Q-3'), меченный флуоресцентным репортерным красителем FAM на 5'-конце зонда и нефлуоресцентным гасителем (MGBNFQ) на 3'-конце. ПЦР-амплификация в реальном времени выполняется в общем объеме 25 мкл, содержащем 12,5 мкл Master Mix для ПЦР (например, Universal PCR Master Mix или Environmental PCR Master Mix, Applied Biosystems), 0,5 мкМ прямого (AphAstITS-39F) и обратного (AphAstITS-97R) праймера, 0,2 мкМ 200 нМ зонда MGB (AphAstITS-60T), 1,5 мкл сверхчистой воды и 5 мкл матричной ДНК (неразбавленной и разбавленной в 10 раз). Амплификацию и обнаружение выполняют на оптических реакционных планшетах, запечатанных оптической клейкой пленкой или аналогичным материалом на термоцикле в реальном времени. Программа ПЦР включает начальную стадию деконтаминации продолжительностью 2 минуты при 50°C, чтобы обеспечить оптимальную ферментативную активность UNG, затем 10 минут при 95°C для активации ДНК-полимеразы, деактивации UNG и денатурации матричной ДНК, и 50

последовательных циклов по 15 секунд при 95°C и 60 секунд при 58°C. Серии разведений с эталонной ДНК с известным содержанием ДНК необходимо проводить параллельно с образцами.

Абсолютный предел обнаружения данного анализа составил приблизительно 5 копий целевой матрицы, что эквивалентно менее чем одному геному *A. astaci* (Vrålstad *с соавт.*, 2009). В другом исследовании сообщалось о стабильном обнаружении вплоть до 50 фг с использованием данного анализа (Tuffs & Oidtmann, 2011).

Диагностическая чувствительность любого теста в значительной степени зависит от качества отобранных образцов. Если расследуется вспышка заболевания, ожидается, что чувствительность теста у животных, которые погибли от инфекции *A. astaci* не позднее чем за 12 часов до отбора образцов или у живых раков, демонстрирующих явные клинические признаки заболевания, будет высокой. Исследования, направленные на изучение потери чувствительности, вызванной плохим качеством образцов (например, в связи с поздним отбором, обработкой образцов или ненадлежащим хранением образцов), не проводились. Рекомендуется тестировать несколько (5–10) раков, чтобы компенсировать различия в качестве образцов и в местах проникновения патогена.

Было проведено исследование специфичности аналитического теста (Oidtmann *с соавт.*, 2006; Tuffs & Oidtmann, 2011; Vrålstad *с соавт.*, 2009), и перекрестной реакции не наблюдалось. Однако в связи с открытиями новых штаммов *Aphanomyces*, для подтверждения диагноза рекомендуется проводить секвенирование. В случае ПЦР в реальном времени, для этого потребуется отдельная амплификация ПЦР-продукта, либо с использованием праймеров, как описано в методе 1, либо с использованием праймеров ITS1 и ITS4 (см. Раздел «Секвенирование» ниже).

4.3.1.2.3.2. Секвенирование

ПЦР-продукт размером 569 пар оснований можно амплифицировать, используя праймеры BO42 и BO640. Размер ПЦР ампликона проверяют с использованием электрофореза в агарозном геле и очищают путем вырезания из геля (например, с использованием системы очистки ДНК Freeze n 'Squeeze, Anachem, Luton, Соединенное Королевство). Обе цепи ДНК следует секвенировать с использованием праймеров, применяемых в ходе начальной амплификации. Консенсусная последовательность строится с использованием программного обеспечения для секвенирования и сравнивается с опубликованными последовательностями с использованием программы для обнаружения сходства последовательностей белков путем их локального выравнивания (программа BLAST). Если установлено 100%-ное совпадение между анализируемой последовательностью и опубликованными последовательностями, то амплифицированным продуктом является *A. astaci*. Если 100%-ное совпадение не установлено, дальнейшее секвенирование следует проводить с использованием праймеров ITS-1 (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3') и ITS-4 (5'-TCC- TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3') (White *с соавт.*, 1990), которые генерируют ампликон размером 757 пар оснований, предоставляющий данные о последовательности в том же участке, но удлинённый на обоих концах по сравнению с последовательностью, сгенерированной праймерами BO42 и BO640. Эта удлинённая последовательность должна подтвердить идентичность возбудителя на уровне вида.

Высоко восприимчивые виды

ПЦР (традиционная или в реальном времени) является подходящим методом для расследования предполагаемых вспышек инфекции *A. astaci* (см. Раздел 7.1). Если выполняются условия, на основании которых устанавливается случай подозрения на болезнь, амплификация ПЦР-продукта ожидаемого размера с использованием традиционной ПЦР или ПЦР в реальном времени в качестве подтверждающей диагностики может считаться достаточной, если обнаружен высокий уровень матричной ДНК. Если обнаружены низкие уровни матричной ДНК (слабая амплификация) или образцы исследуются из участка, не отвечающего условиям, на основании которых устанавливается случай подозрения на болезнь, для подтверждения диагноза рекомендуется проводить секвенирование ПЦР-продуктов, генерированных согласно описанию в разделе «Секвенирование».

4.3.1.2.4.

Выделение

агента

Не применимо.

4.3.2.

Серологические

методы

Не применимо.

5. Категории тестов в зависимости от их назначения

Методы, имеющиеся в настоящее время для диагностики клинических заболеваний, вызванных инфекцией *Aphanomyces astaci* у высоко восприимчивых видов, перечислены в Таблице 5.1. Методы целевого надзора для демонстрации свободы от инфекции *A. astaci* у высоко восприимчивых видов представлены в Таблице 5.2.

Клиническое заболевание крайне редко встречается у североамериканских раков. Поэтому классификация методов диагностики клинического заболевания у данных видов не приводится. Однако методы целевого надзора для демонстрации свободы от инфекции у североамериканских раков перечислены в Таблице 5.3.

Обозначения, используемые в Таблице: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = 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 а 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 диагностики инфекции *A. astaci* у высоко восприимчивых видов раков

Метод	Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
Макроскопические и микроскопические признаки	b	d
Выделение и культивирование	b	d
Гистопатология	d	d
ПЦР	a	b или a ¹
кПЦР	a	b или a ¹
Секвенирование ПЦР-продуктов	н/п	a
Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	н/п	н/п
Методы на основе антител	н/п	н/п
ДНК зонды <i>in situ</i>	н/п	н/п

ПЦР = полимеразная цепная реакция; кПЦР = количественная ПЦР; ЭМ = электронная микроскопия; н/п = не применимо или нет в наличии; ¹ = см. определение подтвержденного случая болезни в Разделе 7.1

Таблица 5.2. Методы целевого надзора для демонстрации свободы от инфекции *A. astaci* у высоко восприимчивых видов раков

Метод	Метод скрининга	Подтверждающий метод
Исследование макроскопических признаков и смертности	a	c
Микроскопические признаки (влажные препараты)	c	c
Выделение и культивирование	c	b
Гистопатология	d	d
ПЦР	a	b, возможно a ¹
кПЦР	a	b, возможно a ¹
Секвенирование ПЦР-продуктов	н/п	a
Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	н/п	н/п
Методы на основе антител	н/п	н/п
ДНК зонды <i>in situ</i>	н/п	н/п

ПЦР = полимеразная цепная реакция; кПЦР = количественная ПЦР; ЭМ = электронная микроскопия; н/п = не применимо или нет в наличии; ¹ = см. определение подтвержденного случая болезни в Разделе 7.1

Таблица 5.3. Методы целевого надзора для демонстрации свободы от инфекции *A. astaci* у североамериканских видов раков

Метод	Метод скрининга	Подтверждающий метод
Макроскопические и микроскопические признаки	d	d
Выделение и культивирование	c	c
Гистопатология	d	d
ПЦР	a	b
кПЦР	a	b
Секвенирование ПЦР-продуктов	н/п	a

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	н/п	н/п
Методы на основе антител	н/п	н/п
ДНК зонды <i>in situ</i>	н/п	н/п

ПЦР = полимеразная цепная реакция; кПЦР = количественная ПЦР; ЭМ = электронная микроскопия; н/п = не применимо или нет в наличии

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от инфекции *Aphanomyces astaci*

6.1. Высоко восприимчивые виды

Фермы по разведению раков, на которых содержатся восприимчивые раки, необходимо инспектировать с периодичностью, указанной в Главе 2.2.0. Отсутствие смертности (сюда не входят потери, связанные с истреблением хищниками) в популяции в течение периода не менее 12 месяцев, в сочетании с отсутствием клинических признаков, а также макроскопической и микроскопической патологии на момент обследования, являются подходящими методами для данной цели. Надзор за популяцией диких раков представляет большие проблемы, особенно там, где данный вид находится под угрозой исчезновения. Поскольку перемещение как рыбы, так и раков из зараженных водоемов представляет риск передачи заболевания, необходим мониторинг статуса популяций раков, чтобы убедиться, что они остаются здоровыми.

На фермах по разведению раков инфекцию *A. astaci* можно заметить относительно быстро в связи быстрым нарастанием смертности в разводимой популяции.

Для проведения целевого надзора рекомендуется проводить регулярные инспекции с отбором образцов, если имеются случаи гибели от заболевания или случаи подозрения на заболевание. Если обнаружены умирающие или погибшие животные, рекомендуется анализировать образцы с помощью ПЦР, а если ПЦР дает положительный результат, ПЦР-продукты, полученные с использованием праймеров 42 и 640 или ITS-1 и ITS -4, должны подвергаться секвенированию, а последовательности должны анализироваться.

6.2. Североамериканские виды раков

Что касается североамериканских видов раков, образцы животных необходимо отбирать и анализировать с помощью одного из описанных выше методов ПЦР. По причинам более высокой чувствительности, ПЦР в реальном времени является рекомендуемым методом. Это относится как к выращенным на ферме, так и к прижившимся ракам, и в программах надзора необходимо учитывать риски косвенной передачи инфекции в связи с перемещением рыбы.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение случая подозрения на болезнь

У высоко восприимчивых видов раков подозрение на инфекцию *A. astaci* возникает, если выполняется как минимум одно из следующих условий:

i) Если наблюдается высокая смертность только среди высоко восприимчивых видов пресноводных раков, а остальная флора и фауна, особенно другие водные ракообразные, остаются здоровыми.

ii) Наличие макроскопических и микроскопических признаков, указывающих на инфекцию *A. astaci*.

iii) Выделение и культивирование водяной плесени, указывающей на принадлежность *A. astaci*.

iv) Положительный результат ПЦР на *A. astaci*.

v) Положительный результат ПЦР в реальном времени на *A. astaci*.

Североамериканские виды раков

У североамериканских видов раков подозрение на инфекцию *A. astaci* возникает, если выполняется как минимум одно из следующих условий:

i) Положительный результат ПЦР на *A. astaci*.

ii) Положительный результат ПЦР в реальном времени на *A. astaci*.

7.2. Определение подтвержденного случая болезни

У высоко восприимчивых видов раков случай инфекции *A. astaci* следует рассматривать как подтвержденный, если выполняются два или более условий:

i) Выделение и культивирование водяной плесени, указывающей на принадлежность *A. astaci*.

ii) Положительный результат ПЦР на *A. astaci*.

iii) Положительный результат ПЦР в реальном времени на *A. astaci*.

iv) Секвенированные ПЦР-продукты совпадают с известными последовательностями *A. astaci*.

Если расследуемый случай подозрения на болезнь произошел в стране или зоне, ранее считавшейся свободной от инфекции *A. astaci*, для подтверждения следует провести секвенирование ПЦР-продуктов.

У североамериканских видов раков случай инфекции *A. astaci* следует рассматривать как подтвержденный, если выполняются два или более условий:

i) Положительный результат ПЦР на *A. astaci*.

- ii) Положительный результат ПЦР в реальном времени на *A. astaci*.
- iii) Секвенированные ПЦР-продукты совпадают с известными последовательностями *A. astaci*.

8. Список литературы

- ALDERMAN D.J. (1996). Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Rev sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15** (2), 603–632.
- ALDERMAN D.J. (2000). Summary final report: effects of exposure to high and low temperatures on the survival of the crayfish plague fungus *A. astaci* *in vitro* and *in vivo*. Australian Quarantine and Inspection Service, Canberra, Australia.
- ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1985). Disinfection for crayfish plague. *Aquac. Res.*, **16**, 203–205.
- ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1986). *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *J. Fish Dis.*, **9**, 367–379.
- ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L. & FRAYLING M. (1987). *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. *J. Fish Dis.*, **10**, 385–393.
- ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L., FRAYLING M. & HOGGER J. (1984). Crayfish plague in Britain. *J. Fish Dis.*, **7**, 401–405.
- BENISCH J. (1940). Kuenstlich hervorgerufener *Aphanomyces* Befall bei Wollhandkrabben. *Zeitschrift fuer Fischerei*, **38**, 71–80.
- CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1984a). Chemotaxis in *Aphanomyces astaci*, an arthropod-parasitic fungus. *J. Invertebr. Pathol.*, **43**, 278–281.
- CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1984b). Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Exp. Mycol.*, **8**, 370–377.
- CERENIUS L., SÖDERHÄLL K., PERSSON M. & AJAXON R. (1988). The crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* – diagnosis, isolation and pathobiology. *Freshw. Crayfish*, **7**, 131–144.
- DEHUS P., BOHL E., OIDTMANN B., KELLER M., LECHLEITER S. & PHILLIPSON S. (1999). German conservation strategies for native crayfish species with regard to alien species. In: Crustacean Issues 11: Crayfish in Europe as Alien Species (How to Make the Best of a Bad Situation?) Gherardi F. & Holdich D.M., eds. A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands, 149–160.

DIÉGUEZ URIBEONDO J., HUANG T.S., CERENIUS L. & SODERHÄLL K. (1995). Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycol. Res.*, **99**, 574–578.

EDSMAN L. (2004). The Swedish story about import of live crayfish. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **372–373**, 281–288.

HUANG T.S., CERENIUS L. & SODERHÄLL K. (1994). Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*, **126**, 1–9.

NINNI A.P. (1865). Sulla mortalita dei gambari (*Astacus fluviatilis* L.) nel veneto e piu particalarmenta nella provincial trevigiana. *Atti Inst. Veneto Ser. III*, **10**, 1203–1209.

NYHLÉN L. & UNESTAM T. (1980). Wound reactions and *Aphanomyces astaci* growth in crayfish cuticle. *J. Invertebr. Pathol.*, **36**, 187–197.

OIDTMANN B., GEIGER S., STEINBAUER P., CULAS A. & HOFFMANN R.W. (2006). Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 53–64.

OIDTMANN B., HEITZ E., ROGERS D. & HOFFMANN R.W. (2002). Transmission of crayfish plague. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 159–167.

OIDTMANN B., SCHMID I., ROGERS D. & HOFFMANN R. (1999). An improved isolation method for the cultivation of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Freshw. Crayfish*, **12**, 303–312.

RAHE R. & SOYLU E. (1989). Identification of the pathogenic fungus causing destruction to Turkish crayfish stocks (*Astacus leptodactylus*). *J. Invertebr. Pathol.*, **54**, 10–15.

SCHRIMPF A., SCHMIDT T. & SCHULZ R. (2014). Invasive Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) transmits crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*). *Aquat. invasions*, **9**, 203–209.

SCOTT W.W. (1961). A monograph of the genus *Aphanomyces*. *Virginia Agricultural Research Station Technical Bulletin*, **151**, 1–95.

SELIGO A. (1895). Bemerkungen ueber die Krebspest, Wasserpest, Lebensverhaeltnisse des Krebses *Zeitschrift fuer Fischerei und deren Hilfswissenschaften*, **3**, 247–261.

SKURDAL J. & QVENILD T. (1986). Growth, maturity and fecundity of *Astacus astacus* in Lake Steinsfjorden, S.E. Norway. *Freshwater Crayfish*, **6**, 182–186.

SOUTY-GROSSET C., HOLDICH D.M., NOEL P.Y., REYNOLDS J.D. & HAFFNER P. (2006).

Atlas of Crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (Patrimoines naturels, 64), 188 pp.

STRAND D.A., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H., EDVARDBSEN B., KLAVERNESS D., JUSSILA J. & VRÅLSTAD T. (2011). Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 9–17.

STRAND D.A., JUSSILA J., VILJAMAA-DIRKS S., KOKKO H., MAKKONEN J., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H. & VRÅLSTAD T. (2012). Monitoring the spore dynamics of *Aphanomyces astaci* in the ambient water of latent carrier crayfish. *Vet. Microbiol.*, **160**, 99–107.

SVENSSON E. & UNESTAM T. (1975). Differential induction of zoospore encystment and germination in *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Physiologia Plantarum*, **35**, 210–216.

TUFFS S. & OIDTMANN B. (2011). A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **153** (3–4), 343–353.

UNESTAM T. (1966). Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. II. Factors affecting zoospores and zoospore production. *Physiologia Plantarum*, **19**, 1110–1119.

UNESTAM T. (1969a). On the adaptation of *Aphanomyces astaci* as a parasite. *Physiologia Plantarum*, **22**, 221–235.

UNESTAM T. (1969b). Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. *Report Institute Freshw. Res. Drottningholm*, **49**, 202–206.

UNESTAM T. (1976). Defence reactions in and susceptibility of Australian and New Guinean freshwater crayfish to European-crayfish-plague fungus. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **53**, 349–359.

UNESTAM T. & SÖDERHÄLL K. (1977). Specialisation in crayfish defence and fungal aggressiveness upon crayfish plague infection. *Freshw. Crayfish*, **3**, 321–331.

UNESTAM T. & WEISS D.W. (1970). The host-parasite relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: responses to infection by a susceptible and a resistant species. *J. Gen. Microbiol.*, **60**, 77–90.

VILJAMAA-DIRKS S. & HEINIKAINEN S. (2006). Improved detection of crayfish plague with a modified isolation method. *Freshw. Crayfish*, **15**, 376–382.

VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S., NIEMINEN M., VENNERSSTRÖM P. & PELKONEN S. (2011). Persistent infection by crayfish plague *Aphanomyces astaci* in a noble crayfish population – a case report. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* (in press).

VRÅLSTAD T., JOHNSEN S.I., FRISTAD R., EDSMAN L. & STRAND D.A. (2011). Potent infection reservoir of crayfish plague now permanently established in Norway. *Dis. Aquat. Org.*, **97**, 75–83.

VRÅLSTAD T., KNUTSEN A.K., TENGS T. & HOLST-JENSEN A. (2009). A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **137**, 146–155.

WHITE T.J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds Academic Press, San Diego, California, USA, 315–322.

*

* *

NB: Имеются Референтные лаборатории МЭБ по диагностике инфекции *Aphanomyces astaci* (см. Таблицу в конце данного *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения дальнейшей информации по инфекции *Aphanomyces astaci* (чума раков) свяжитесь с Референтными лабораториями МЭБ.

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 1995 ГОДУ; ПОСЛЕДНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2017 ГОДУ.

ИНФЕКЦИЯ *HEPATOBACTER PENAEI* (НЕКРОТИЗИРУЮЩИЙ ГЕПАТОПАНКРЕАТИТ)

1. Предмет рассмотрения

Инфекция *Hepatobacter penaei* означает инфекцию патогенным возбудителем *Candidatus Hepatobacter penaei*, облигатной внутриклеточной бактерией Класса α -Proteobacteria. Болезнь широко известна под названием «некротизирующий гепатопанкреатит».

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Hepatobacter penaei – это плеоморфная, грамотрицательная, внутрицитоплазматическая бактерия (Nunan с соавт., 2013). Она является представителем α Proteobacteria (Frelie с соавт., 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy с соавт., 1996a; Loy с соавт., 1996a). Преобладающая форма – палочковидный, подобный риккетсиям организм ($0,25 \times 0,9$ мкм), в то время как спиралевидная форма ($0,25 \times 2-3,5$ мкм) имеет восемь жгутиков (флагелл) на базальном полюсе (Frelie с соавт., 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy с соавт., 1996a; Loy с соавт., 1996b). Генетический анализ *H. penaei*, ассоциированной со вспышками в Северной и Южной Америке, дает основание предположить, что изоляты являются или идентичными, или очень близко родственными подвидами (Loy et al., 1996a; Loy с соавт., 1996b).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Данные отсутствуют.

2.1.3. Стабильность возбудителя

Ткани, инфицированные *Hepatobacter penaei*, остаются инфекционными после неоднократных циклов замораживания–оттаивания и после хранения в 50% глицерине. *Hepatobacter penaei*, подвергнутые замораживанию при температуре –20°C –70°C и –80°C, как было продемонстрировано, сохраняли инфекционную активность при испытаниях по экспериментальной передаче с использованием *Penaeus vannamei* (Crabtree с соавт., 2006; Frelie с соавт., 1992).

2.1.4. Жизненный цикл

Не применимо.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды-хозяева

Виды, удовлетворяющие критериям для включения в список в качестве восприимчивых к инфекции *H. penaei* в соответствии с Главой 1.5. Ветеринарно-

санитарного кодекса по водным животным (Кодекса по водным животным), включают: белоногую креветку (*Penaeus vannamei*).

2.2.2. Виды, данные о восприимчивости которых являются неполными

Виды, в отношении которых имеются неполные данные, чтобы удовлетворять критериям для включения в список в качестве восприимчивых к инфекции *H. penaei* в соответствии с Главой 1.5. Кодекса по водным животным, включают: северную белую креветку (*Penaeus setiferus*), северную розовую креветку (*Penaeus duorarum*), голубую креветку (*Penaeus stylirostris*), банановую креветку (*Penaeus merguensis*), креветку «алоха» (*Penaeus marginatus*), северную коричневую креветку (*Penaeus aztecus*) и гигантскую тигровую креветку (*Penaeus monodon*).

Кроме того, сообщалось о патоген-специфических положительных результатах полимеразной цепной реакции (ПЦР) у следующего вида, однако активная инфекция продемонстрирована не была: американский омар (*Homarus americanus*).

2.2.3. Восприимчивые стадии развития хозяина

Инфекция *H. penaei* была продемонстрирована у молоди, взрослых особей и маточного поголовья.

2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций

Смотрите пункты 2.2.1 и 2.2.3.

2.2.5. Целевые органы и инфицируемая ткань

Целевой тканью является гепатопанкреас: инфекция *H. penaei* была зарегистрирована во всех видах клеток гепатопанкреаса.

2.2.6. Персистентная инфекция

Некоторые представители популяций *P. vannamei*, которые выживают после инфекции *H. penaei*, могут быть носителями этой внутриклеточной бактерии на протяжении всей жизни и передавать ее другим популяциям путем горизонтальной передачи (Aranguren с соавт., 2006; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2008; Morales-Covarrubias, 2010; Vincent & Lotz, 2005).

2.2.7. Переносчики

Векторы в случаях естественной инфекции неизвестны.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Горизонтальная передача *H. penaei* может происходить вследствие каннибализма или посредством контаминированной воды (Aranguren с соавт., 2006; Aranguren с соавт., 2010; Frelie с соавт., 1993; Gracia-Valenzuela с соавт., 2011; Morales-Covarrubias с соавт., 2012; Vincent с соавт., 2004). Высказывались также предположения относительно *Hepatobacter penaei*, которая выделяется с фекалиями в прудовую воду,

как источника контаминации (Aranguren с соавт., 2006; Briñez с соавт., 2003; Morales-Covarrubias с соавт., 2006).

2.3.2. Превалентность

Зарегистрированные значения превалентности *H. penaei* в диких популяциях находятся в диапазоне от 5,6 до 15% у *P. duorarum* и от 5 до 17% у *P. aztecus*, отобранных в зонах Carrizal и Carbonera, Лагуна Мадре в Тамаулипас, Мексика (Aguirre-Guzman с соавт., 2010). Lightner & Redman, 1994 сообщали о превалентности 0,77% у культивируемых *P. vannamei* и 0,43% у культивируемых *P. stylirostris* из региона Тумбес, Перу.

Зарегистрированные значения превалентности *H. penaei* на фермах по выращиванию креветок находятся в диапазоне от 0,6% до 1,3% у *P. vannamei* с ферм по выращиванию креветок, расположенных в Белизе, Бразилии, Гватемале, Гондурасе, Мексике, Никарагуа и Венесуэле (Morales-Covarrubias с соавт., 2011).

2.3.3. Географическое распространение

Hepatobacter penaei, по всей видимости, распространена в западном полушарии среди как диких, так и культивируемых пенеидных креветок (Aguirre-Guzman с соавт., 2010; Del Río-Rodríguez с соавт., 2006). В западном полушарии *H. penaei* обычно встречается у культивируемых пенеидных креветок на территории Белиза, Бразилии, Колумбии, Коста-Рики, Эквадора, Эль-Сальвадора, Гватемалы, Гондураса, Мексики, Никарагуа, Панамы, Перу, Соединенных Штатов Америки и Венесуэлы (Frelie с соавт., 1992; Ibarra-Gómez с соавт., 2007; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias et al., 2011).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

У *P. vannamei* инфекция *H. penaei* приводит, как правило, к болезни, имеющей катастрофические последствия, с уровнем смертности, приближающимся к 100%.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Распространенность инфекции *H. penaei* на фермах может возрастать при продолжительных периодах высоких температур (>29°C) и высокой солености (20–38 ppt – частей на триллион) (Morales-Covarrubias, 2008). В Мексике была обнаружена *H. penaei* при невысоких значениях превалентности (<7%) на фермах по выращиванию креветок в такие месяцы, как апрель, май, июль и август. Однако, в такие месяцы, как сентябрь и октябрь, когда в дневное время температурные показатели высокие, а в ночное время низкие, наблюдаются высокие уровни превалентности и смертности (>20%) (Morales-Covarrubias, 2010).

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Профилактика

- а) Раннее обнаружение (начальная стадия) клинической инфекции *H. penaei* имеет важное значение для успешного лечения, поскольку каннибализм может привести к усилению и передаче болезни.

- b) Голодание креветок и каннибализм в отношении инфицированных креветок, а также благоприятные условия для размножения *H. repaei* являются важными факторами распространения *H. repaei* среди *P. vannamei*.
- c) Использование гидратированной извести (Ca(OH)_2) для обработки дна прудов при проведении подготовки прудов к заселению поголовья может способствовать снижению инфекции *H. repaei*.
- d) Меры профилактики могут включать рыхление граблями, вспашку и удаление осадочных отложений со дна пруда, продолжительное просушивание (путем подвергания воздействию солнечного света) прудов и водораспределительных каналов на протяжении нескольких недель, дезинфекция орудий лова и другого оборудования фермы с использованием гипохлорита кальция и масштабное известкование.
- e) Использование свободного от специфических патогенов (СПФ) маточного поголовья является эффективной профилактической мерой.

2.4.2. Контроль

Применение антибиотиков – окситетрациклина и флорфеникола – в лечебных кормах каждые 8 часов в течение 10 дней является, по всей вероятности, наиболее подходящим способом лечения, существующим на настоящий момент, в особенности, если инфекцию *H. repaei* обнаруживают на начальной стадии (Frelie с соавт., 1995; Morales-Covarrubias с соавт., 2012).

2.4.3. Вакцинация

Научно подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.4. Химиотерапия

Научно подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.5. Иммуностимуляция

Научно подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.6. Выведение резистентных особей

Научно подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.7. Пополнение поголовья резистентными видами

Научно подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.8. Блокирующие агенты

Научно подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.9. Дезинфекция икринок и личинок

Дезинфекция икринок и личинок представляет собой надлежащую практику ухода и содержания (Lee & O'Bryen, 2003) и рекомендуется ввиду ее потенциала в плане

снижения контаминации выметанных икринок и личинок *H. penaei* (и контаминации другими возбудителями болезней).

2.4.10. Общие практики ведения хозяйства

Превалентность и степень тяжести инфекции *H. penaei* могут возрастать при выращивании креветок в условиях относительной скученности или в стрессовых условиях. Некоторые практики ведения хозяйства успешно применялись для предотвращения инфекции *H. penaei*. Среди них было применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) для предварительного скрининга дикого или выращиваемого в прудах маточного поголовья.

3. Отбор образцов

3.1. Выбор отдельных образцов

Подходящими образцами для тестирования на наличие инфекции *H. penaei* являются следующие стадии развития (постличинки [PL], молодь и взрослые особи).

3.2. Сохранение образцов для предоставления на исследование

Смотрите информацию о рутинных гистологических или молекулярных исследованиях, а также руководящие указания относительно сохранения образцов для предполагаемого метода тестирования в Главе 2.2.0.

3.3. Объединение образцов в пул

Влияние объединения в пул на диагностическую чувствительность не оценивалось, поэтому более крупных креветок следует подготавливать и тестировать по отдельности. Тем не менее, образцы, в особенности PL или образцы весом до 0,5 г включительно, можно объединять в пулы для получения достаточного количества материала для молекулярного тестирования.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Hepatobacter penaei в наибольшей степени инфицирует кишечную ткань. Основной целевой тканью для *H. penaei* является гепатопанкреас. Можно произвести сбор фекалий и использовать их для тестирования (обычно методом ПЦР или дот-блот гибридизации со специфическими зондами), когда необходимо провести нелетальное тестирование ценного маточного поголовья (Bondad-Reantasco с соавт., 2001; Bradley-Dunlop с соавт., 2004; Briñez с соавт., 2003; Frelie с соавт., 1993; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias с соавт., 2012).

3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

Hepatobacter penaei не реплицируется в средней кишке, слепых отростках, клетках соединительной ткани, жабрах, гематопозитических узелках и гемоцитах, вентральном нервном стволе и ганглиях, эпителиальных клетках канальцев сжиковой (антеннальной) железы и паренхимальных клетках лимфоидных органов.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Широкий ряд макроскопических признаков может быть использован как указание на возможное присутствие инфекции *H. repaei*. К ним относятся: вялость, снижение потребления пищи, атрофированный гепатопанкреас, анорексия и пустой кишечник, заметное сокращение роста и неудовлетворительное соотношение длины и веса («тонкие хвосты»); мягкие панцири и вялое тело; черные или потемневшие жабры; сильное обрастание организмами-эпibiонтами/комменсалами; бактериальная болезнь панциря, включая язвенные поражения кутикулы или эрозию меланизированных придатков; и расширенные хроматофоры, что приводит к появлению темных краев у уропод и плеопод. Ни один из этих признаков не является патогномоничным.

4.1.2. Изменения в поведении

При острой форме болезни *P. vannamei* могут демонстрировать изменения в поведении, включая вялость и сниженную активность питания.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Инфекция *H. repaei* нередко вызывает острую форму болезни с очень высоким уровнем смертности у ранней молодежи, взрослых особей и маточного поголовья. У инфицированных горизонтальным путем ранней молодежи, взрослых особей и маточного поголовья инкубационный период и степень тяжести болезни в некоторой степени зависят от размера и/или возраста. Макроскопические признаки не являются специфическими, однако при острой инфекции *H. repaei* наблюдается заметное сокращение потребления пищи с последующими изменениями в поведении и внешнем виде (смотрите Пункт 4.1.1).

4.2.2. Клиническая химия

Не применимо.

4.2.3. Микроскопическая патология

Острую и хроническую инфекции *H. repaei* у *P. vannamei* можно без труда диагностировать, используя рутинные гистологические методы с окрашиванием гематоксилином и эозином (H&E) (смотрите Пункт 4.2.6).

4.2.3.1. Начальная стадия инфекции *H. repaei*

На начальной стадии инфекцию *H. repaei* сложно диагностировать при помощи рутинных гистологических методов с использованием H&E. Для диагностики инфекции на начальной стадии рекомендуется использовать молекулярные методы для обнаружения *H. repaei* (например, при помощи ПЦР или путем применения *H. repaei*-специфических ДНК-зондов для тестов методом дот-блот гибридизации или гибридизации *in-situ* [ISH] на гистологических срезах).

4.2.3.2. Острая стадия инфекции *H. repaei*

Острая инфекция *H. repaei* характеризуется атрофированным гепатопанкреасом с умеренной атрофией эпителия канальцев, наличием бактериальных клеток и инфильтрации гемоцитами, затрагивающей один или несколько канальцев (мультифокальная инкапсуляция). Гипертрофированные клетки, отдельные эпителиальные клетки, по-видимому, отделившиеся от соседних клеток, подвергаются некрозу и отслаиванию в просвет канальцев, и липидное содержание эпителиальных клеток канальцев варьирует.

4.2.3.3. Переходная стадия инфекции *H. repaei*

Переходная стадия инфекции *H. repaei* характеризуется гемоцитным воспалением межкапиллярцевых промежутков в качестве реакции на некроз, цитолиз и отслаивание эпителиальных клеток канальцев гепатопанкреаса. Эпителий канальцев гепатопанкреаса заметно атрофирован, что приводит к образованию больших отежных (наполненных жидкостью или «водянистых») участков в гепатопанкреасе. Эпителиальные клетки канальцев в месте мультифокальной инкапсуляции, как правило, атрофированы и редуцированы из простых столбчатых до кубовидных в плане морфологии. Они содержат небольшое количество или вообще не содержат накопленных липидных вакуолей, заметно сократившееся количество или вообще не содержат секреторных вакуолей и массы бактерий. На данной стадии наблюдались гемоцитные узелки при наличии масс бактерий в центре узелка.

4.2.3.4. Хроническая стадия инфекции *H. repaei*

При хронической стадии инфекции *H. repaei* происходит снижение обилия и степени тяжести поражений капиллярцев, мультифокальной инкапсуляции и отежных участков, и они сменяются инфильтрацией и аккумулярованием гемоцитов в местах некрозов. Имеются участки с фиброзами, немногочисленные меланизированные и некротизированные капиллярцы, и присутствует очень малое количество гипертрофированных клеток с массами бактерий в цитоплазме и небольшое количество гемоцитных узелков.

4.2.4. Влажные препараты

Исследование ткани гепатопанкреаса (НР) методом давленных влажных препаратов в основном проводится для обнаружения предполагаемой инфекции *H. repaei*. Гепатопанкреас может быть атрофирован и обладать какими-либо из следующих характеристик: мягкий и водянистый; наполненная жидкостью центральная часть; побледневший цвет с черными полосками (меланизированные капиллярцы); бледная центральная часть вместо нормальной оранжевой окраски. Для анализа влажных препаратов креветки должны находиться в межличинной стадии и не быть подвергнутыми обработке, которая могла бы привести к изменению капиллярцев. Данный метод использует деформацию или атрофию капиллярцев, главным образом, апикальной области в качестве указания на наличие ранних стадий инфекции *H. repaei*.

Инфекция *H. repaei* имеет четыре стадии (полуколичественная шкала):

Начальная стадия: присутствие в небольших количествах деформации капилляров (1–5 полей⁻¹ организм⁻¹) и отделения клеток.

Острая стадия: инфильтрация гемоцитами, увеличение количества деформированных капилляров (6–10 полей⁻¹ организм⁻¹), наличие инкапсуляции на различных участках образца, что представляет собой атрофированные капилляры, окруженные многочисленными слоями гемоцитов.

Переходная стадия: инфильтрация гемоцитами, увеличение количества деформированных капилляров (11–15 полей⁻¹ организм⁻¹), меланизированные капилляры, некротизированные капилляры и высокий уровень инкапсуляции на различных участках образца.

Хроническая стадия: участки с фиброзами, немногочисленные меланизированные и некротизированные капилляры и присутствие очень небольшого количества гипертрофированных клеток.

4.2.5. Мазки

Не применимо.

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

В настоящее время неприменимы для диагностических целей.

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

Смотрите пункт 4.2.4.

4.3.1.1.2. Мазки

Не применимо.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

Смотрите пункт 4.2.3.

4.3.1.1.4. Метод биопробы

Подтверждение инфекции *H. repaei* можно осуществить методом биопробы на подозрительных животных с использованием СПФ-молоди *P. vannamei*, которая служит в качестве индикатора внутриклеточных бактерий (Cock с соавт., 2009; Johnson, 1990; Lee & O'Bryen, 2003; Lightner, 2005). Можно использовать процедуры перорального заражения. Пероральный способ относительно прост в исполнении и осуществляется путем скармливания измельченного гепатопанкреаса подозрительных креветок СПФ-молоди *P. vannamei* в небольших резервуарах. Требуется использовать в качестве негативного контроля резервуар с индикаторными креветками, которые получают только

обычный корм. При использовании процедуры скармливания гепатопанкреаса (*per os*) для проведения биопробы на наличие *H. penaei*, *H. penaei*-положительные индикаторные креветки (по макроскопическим признакам и гистопатологии), как правило, выявляются в пределах 3–4 дней с момента первоначального подвергания воздействию, а значительное количество случаев гибели происходит к 3–8 дню после первоначального подвергания воздействию. Креветки, выступающие в качестве отрицательных контролей, должны оставаться отрицательными (в течение, по меньшей мере, 10–15 дней) в том, что касается макроскопических и гистологических признаков инфекции *H. penaei* и необычной смертности.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные среды

Hepatobacter penaei не выращивали *in vitro*. Линий клеток ракообразных не существует (Morales-Covarrubias et al., 2010; Vincent & Lotz, 2007).

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе использования антител

Существуют иммуногистохимические (ИГХ) тесты с использованием моноклональных антител (МАТ, МАbs) к *H. penaei* в соответствии с методами, описанными у Bradley-Dunlop с соавт., 2004, для обнаружения *H. penaei*.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

Были разработаны ISH- и ПЦР-тесты для обнаружения *H. penaei*, и ПЦР-наборы являются коммерчески доступными (Loy & Frelie, 1996; Loy с соавт., 1996b). Генетические зонды и ПЦР-методы обеспечивают более высокую диагностическую чувствительность, чем классические гистологические подходы к диагностике инфекции *H. penaei*. Более того, данные методы имеют дополнительное преимущество – возможность применения для нелетального тестирования ценного маточного поголовья креветок.

4.3.1.2.3.1. ДНК-зонды для применения в исследованиях методом ISH с нерадиоактивными кДНК-зондами

Метод ISH, описанный Loy & Frelie, 1996 и Lightner, 1996, обеспечивает более высокую диагностическую чувствительность, чем более традиционные методы обнаружения и диагностики *H. penaei*, которые задействуют классические гистологические методы (Johnson, 1990; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias с соавт., 2012). Исследование методом ISH рутинных гистологических срезов поражений гепатопанкреаса, ассоциированных с острой, переходной и хронической стадиями, с использованием специфических меченных дигоксигенином (DIG) кДНК-зондов для *H. penaei* обеспечивает точную диагностику инфекции бактерией некротизирующего гепатопанкреатита (NHPB) (Lightner, 1996; Loy & Frelie, 1996; Morales-Covarrubias с соавт., 2006). Патогномоничные *H. penaei*-положительные поражения демонстрируют выраженные участки синего – иссиние-черного цвета в цитоплазме пораженных клеток при реакции с кДНК-

зондами. (Подробную информацию о методе ISH смотрите в Главе 2.2.2 Инфекция вирусом инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза, а подробную информацию о применении фиксатора AFA Дэвидсона – в Главе 2.2.0 Пункт B.5.3.ii).

4.3.1.2.3.2. Метод ПЦР

Исследование гепатопанкреаса и фекалий на наличие *H. penaei* можно провести с использованием ОТ-ПЦР. Праймеры, обозначенные как NHPF2: 5'-CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAGT-3' и NHPR2: 5'-GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C-3', амплифицируют фрагмент длиной 379 пар-оснований (п.о.), соответствующий 16S рРНК *H. penaei*. Метод ПЦР, кратко описанный ниже, в целом соответствует методу, описанному у Aranguren с соавт., 2010.

- i) *Получение ДНК-матрицы:* ДНК можно экстрагировать из 25–50 мг нефиксированного, замороженного или сохраненного с применением этилового спирта гепатопанкреаса. Экстракцию ДНК следует проводить с использованием коммерчески доступных наборов для экстракции ДНК из тканей, следуя процедурам изготовителя для получения качественных ДНК-матриц. Другие наборы для экстракции ДНК включают QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), MagMax™ Nucelic Acid kits (Life Technologies) или Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega)³⁹.
- ii) При проведении исследования методом ПЦР следует предусмотреть следующие контроли: а) известный *H. penaei*-отрицательный образец ткани; б) известный *H. penaei*-положительный образец (гепатопанкреас); и с) «безматричный» контроль.
- iii) Набор бус PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Bead (RTG beads, GE Healthcare) используется для всех описываемых здесь реакций амплификации.
- iv) Оптимизированные условия проведения ПЦР (5–50 нг ДНК) (конечные концентрации в общем объеме 25 мкл) для обнаружения *H. penaei* в образцах гепатопанкреаса креветок следующие: праймеры (по 0,2 мкМ каждого), дезоксирибонуклеозид трифосфаты (дНТФ, dNTP) (по 200 мкМ каждого), Taq-полимераза (0,1 Ед. мкл⁻¹), хлорид марганца (1,5 мМ) в 10 мМ Трис-НСl, рН 9,0, 50 мМ КСl.
- v) Если у термоциклера нет нагреваемой крышки, тогда легкое минеральное масло (50 мкл) наслаивается поверх 50 мкл реакционной смеси для предотвращения конденсации или испарения во время термоциклирования.

³⁹ Ссылка на конкретные коммерческие продукты в качестве примеров не подразумевает их одобрения со стороны МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, упоминаемым в настоящем *Руководстве по водным животным*.

- vi) Параметры проведения циклов: этап 1: 95°C в течение 5 минут, 1 цикл; этап 2: 95°C в течение 30 секунд, 60°C в течение 30 секунд и 72°C в течение 30 секунд, 35 циклов; этап 3: 60°C в течение 1 минуты, 72°C в течение 2 минут, 1 цикл; 4°C, «бесконечное» время выдержки.

Примечание: Следует проводить оптимизацию условий для каждого термоциклера с использованием известных положительных контролей.

4.3.1.2.3.3. Метод ПЦР в реальном времени

Методы ПЦР в реальном времени для обнаружения *H. penaei* обладают такими преимуществами, как быстрота, специфичность и чувствительность. Чувствительность ПЦР в реальном времени составляет ~100 копий целевой последовательности из генома *H. penaei* (Aranguren с соавт., 2010; Vincent & Lotz, 2005).

Метод ПЦР в реальном времени с использованием реагентов TaqMan, описанный ниже применительно к *H. penaei*, в целом следует методу, использованному у Aranguren с соавт., 2010.

- i) Были подобраны праймеры для ПЦР и зонд TaqMan на основе гена 16s рРНК *H. penaei* (GenBank U65509) (Loy & Frelie, 1996). Праймеры и зонд TaqMan были сконструированы при помощи программного обеспечения Primer Express software version 2.0 (Applied Biosystems). Последовательности прямого (NHP1300F) и обратного (NHP1366R) праймеров следующие: 5'-CGT-TCA-CGG-GCC-TTG-TACAC-3' и 5'-GCT-CAT-CGC-CTT-AAA-GAA-AAG-ATA-A-3', соответственно. TaqMan зонд NHP: 5'-CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA-3', который соответствует региону из нуклеотидов 1321–1340, синтезирован и помечен флуоресцирующими красителями 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и N,N,N,N-тетраметил-6-карбоксиродамин (TAMRA) на 3'-конце.
- ii) Получение ДНК-матрицы: осуществление экстракции из гепатопанкреаса и очистки ДНК-матрицы – такое же, как описано в разделе, касающемся традиционной ПЦР в реальном времени.
- iii) Реакционная смесь для ПЦР в реальном времени содержит: TaqMan One-step real-time PCR SuperMix (Quanta, Biosciences), по 0,3 мкМ каждого праймера, 0,1 мкМ зонда TaqMan, 5–50 нг ДНК и воду в объеме реакционной смеси 25 мкл. Для получения оптимальных результатов реакционную смесь следует встряхнуть на вортексе и тщательно перемешать.
- iv) Амплификация осуществляется при помощи мастерциклера Realplex 2.0 (Eppendorf). Проведение циклов включает в себя начальную денатурацию при 95°C в течение 3 минут, за которой следуют 40 циклов денатурации при 95°C в течение 15 секунд и отжиг/элонгация при 60°C в течение 1 минуты. После каждого цикла проводят измерение уровней флуоресценции.

- v) Необходимо предусмотреть «безматричный контроль» при каждом прогоне реакции. Это делается для того, чтобы исключить присутствие контаминантов флуоресценции в реакционной смеси, а также для того, чтобы исключить контаминацию реагентов специфической мишенью исследования. Следует также предусмотреть положительный контроль, и это может быть плазмидная ДНК, содержащая целевую последовательность, очищенные бактерии или ДНК, экстрагированная из инфицированного *H. penaei* гепатопанкреаса.

4.3.1.2.3.4. Секвенирование

Продукты ПЦР могут быть клонированы и секвенированы или непосредственно секвенированы, когда необходимо подтвердить инфекцию *H. penaei* или идентифицировать ложноположительные результаты или неспецифическую амплификацию (Aranguren с соавт., 2010; Bustin et al., 2009; Vincent & Lotz, 2005).

4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

Существуют методы для выделения и очистки *H. penaei* (Aranguren с соавт., 2010; Nunan с соавт., 2013; Vincent с соавт., 2004; Vincent & Lotz, 2005). *Hepatobacter penaei* невозможно культивировать, используя традиционные бактериологические методы, таким образом, поддержание инфекции *H. penaei* должно осуществляться путем непрерывного подвергания неинфицированного поголовья *P. vannamei* воздействию со стороны популяции, где имеет место эпидемия *H. penaei*.

4.3.2. Серологические методы

Не применимы, поскольку креветки являются беспозвоночными животными, у которых не вырабатываются специфические антитела, которые можно было бы использовать для демонстрации инфекции или предшествовавшего подвергания воздействию *H. penaei*.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для целевого надзора и диагностики инфекции *H. penaei* перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, использованные в Таблице, означают: а = данный метод является методом, рекомендованным по причинам доступности, целесообразности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = данный метод применяется в некоторых ситуациях, однако затраты, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение; и d = данный метод в настоящее время не рекомендуется для данной цели. Данные обозначения в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает в себя такие аспекты, как достоверность, чувствительность, специфичность и целесообразность. Хотя не все из тестов, перечисленных как относящиеся к категории а или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются, не давая при этом вызывающих сомнение результатов, делают их приемлемыми.

таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Посттщичинки	PL	Метод	Посттщичинки		
Макроскопические признаки					d	d
Биопсия					c	d
Прямая СМ (влажный препарат)					d	d
Гистопатология					a	c
In-situ с использованием ДНК-зондов					a	a
Трансмиссионная ЭМ					c	c
Методы анализа, основанные на использовании антител					c	c
ПЦР в реальном времени					a	a
ПЦР						
Секвенирование						

PL = посттщичинки; СМ = световая микроскопия; ЭМ = электронная микроскопия; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора для объявления свободы от инфекции *H. repaеi*

Как показано в Таблице 5.1., ПЦР в реальном времени (Пункт 4.3.1.2.3.2) является методом, рекомендуемым для целевого надзора по причине его доступности, целесообразности и диагностической специфичности и чувствительности. При расследовании случаев смертности, ассоциированной с острой стадией, в рамках программы целевого надзора демонстрация патогномичных *H. repaеi*-индуцированных поражений в гепатопанкреасе посредством гистологии (с подтверждением или без подтверждения при помощи ISH с использованием *H. repaеi*-специфических ДНК-зондов) является подходящим методом (Таблица 5.1.).

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Инфекцию *H. repaеi* подозревают, если удовлетворен, по меньшей мере, один из следующих критериев:

- i) гистопатология, соответствующая с инфекцией *H. repaеi*

или

- ii) положительные результаты ISH на целевых тканях
или
- iii) положительный результат, полученный посредством ПЦР или ПЦР в реальном времени.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Инфекция *H. penaei* считается подтвержденной в случае, если удовлетворены два или более из следующих критериев:

- i) гистопатология, сообразная с инфекцией *H. penaei*
- ii) положительные результаты ISH на целевых тканях
- iii) ПЦР (с последующим секвенированием), или ПЦР в реальном времени с положительными результатами на наличие инфекции *H. penaei*.

8. Библиография

AGUIRRE-GUZMAN G., SANCHEZ-MARTINEZ J.G., PÉREZ-CASTAÑEDA R. & ORTA-RODRIGUEZ R. (2010). Detection of necrotizing hepatopancreatitis (nhp) in wild shrimp from Laguna Madre, Mexico by a multiplex polymerase chain reaction. *Thai J. Vet. Med.*, **40**, 337–341.

ARANGUREN L.F., BRIÑEZ B., ARAGON L., PLATZ C., CARABALLO X., SUAREZ A. & SALAZAR M. (2006). Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female broodstock: effect on reproductive parameters nauplii and larvae quality. *Aquaculture*, **258**, 337–343.

ARANGUREN L.F., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2010). Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*, **307**, 187–192.

BONDAD-REANTASCO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Chapter 10: Necrotizing hepatopancreatitis. *In: Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases*. FAO Fisheries Technical Paper No. 402. Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 207 pp.

BRADLEY-DUNLOP D.J., PANTOJA C. & LIGHTNER D.V. (2004). Development of monoclonal antibodies for detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 233–240.

BRIÑEZ B., ARANGUREN F. & SALAZAR M. (2003). Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 69–72.

BUSTIN S.A., BENES V., GARSON J.A., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M.W., SHIPLEY G.L., VANDESOMPELE J. & WITTEWER C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55**, 611–622.

COCK J., GITTERLE T., SALAZAR M. & RYE M. (2009). Breeding for disease resistance of penaeid shrimps. *Aquaculture*, **286**, 1–11.

- CRABTREE B.G., ERDMAN M.M., HARRIS D.L. & HARRIS I.T. (2006). Preservation of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) by freezing tissue collected from experimentally infected *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **70**, 175–179.
- DEL RÍO-RODRÍGUEZ R.E., SOTO-RODRÍGUEZ S., LARA-FLORES M., CU-ESCAMILLA A.D. & GOMEZ-SOLANO M.I. (2006). A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a shrimp farm in Campeche, Mexico: A first case report. *Aquaculture*, **255**, 606–609.
- FRELIER P.F., LOY J.K. & KRUPPENBACH B. (1993). Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 44–48.
- FRELIER P.F., LOY J.K., VARNER P., THOMPSON J.A., LAWRENCE A.L. & BRAY W.A. (1995). Management procedures for the treatment of necrotizing hepatopancreatitis in farmed shrimp. *In*: Swimming Through Troubled Waters. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society '95, San Diego, CA, USA, 240 pp.
- FRELIER P.F., SIS R.F., BELL T.A. & LEWIS D.H. (1992). Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Vet. Pathol.*, **29**, 269–277.
- GRACIA-VALENZUELA M.H., LUZ ANGELICA ÁVILA-VILLA L.A., GLORIA YEPIZ-PLASCENCIA G., HERNÁNDEZ-LÓPEZ J., MENDOZA-CANO F., GARCÍA-SANCHEZ G. & GOLLAS-GALVÁN T. (2011). Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at –20°C for use in forced-feeding infection of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, **311**, 105–109.
- IBARRA-GÁMEZ J.C., GALAVÍZ-SILVA L. & MOLINA-GARZA Z.J. (2007). Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico. *Ciencias Marinas*, **33**, 1–9.
- JOHNSON S.K. (1990). Handbook of Shrimp Diseases. Texas A&M Sea Grant College Program, Galveston, TX, USA.
- LEE C.S. & O'BRYEN P.J. (2003). Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 293 pp.
- LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.
- LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquacult. Soc.*, **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1994). An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. *Aquaculture*, **122**, 9–18.
- LOY J.K., DEWHIRST F.E., WEBER W., FRELIER P.F., GARBAR T.L., TASCA S.I. & TEMPLETON J.W. (1996a). Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3439–3445.

- LOY J.K. & FRELIER P.F. (1996). Specific, non radioactive detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by *in situ* hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 324–331.
- LOY J.K., FRELIER P.F., VARNER P. & TEMPLETON J.W. (1996b). Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 117–122.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2008). Capítulo 3: Enfermedades bacterianas. *En: Patología e Inmunología de Camarones* Editores Vielka Morales y Jorge Cuellar-Angel. Programa CYTED Red II-D vannamei, Panamá, Rep. De Panamá, 120–134.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2010). Enfermedades del camarón. Detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas, SA de CV., Av. Río Churubusco 385, Col. Pedro María Anaya, México, D.F. Segunda edición. ISBN: ISBN 978-607-17-0436-8, 1–180.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., LOZANO-OLVERA R.Y. & HERNÁNDEZ-SILVA A.J. (2010). Necrotizing hepatopancreatitis in cultured shrimp caused by extracellular and intracellular bacteria. *Tilapia & Camarones*, **5**, 33–39.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., RUIZ-LUNA A., MOURA-LEMUS A.P., SOLÍS MONTIEL V.T. & CONROY G. (2011). Prevalence of diseases in cultured white shrimp (*penaeus vannamei*) in eight regions of Latin America. *Rev. Científica, FCV-LUZ*, **2**, 434–446.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., OSUNA-DUARTE A.G., GARCIA-GASCA A., LIGHTNER D.V. & MOTA-URBINA J.C. (2006). Prevalence of necrotizing hepatopancreatitis in female broodstock of *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 19–25.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., TLAHUEL-VARGAS L., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ I.E., LOZANO-OLVERA R. & PALACIOS-ARRIAGA J.M. (2012). Necrotising hepatobacterium (NHPB) infection in *Penaeus vannamei* with florfenicol and oxytetracycline: a comparative experimental study. *Rev. Científica, FCV-LUZ*, **22**, 72–80.
- NUNAN L.M., PANTOJA C.R., GOMEZ-JIMENEZ S. & LIGHTNER D.V. (2013). ‘*Candidatus Hepatobacter penaei*,’ an intracellular pathogenic enteric bacterium in the hepatopancreas of the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 1407–1409.
- NUNAN M.L., PANTOJA C. & LIGHTNER D.V. (2008). Improvement of a PCR method for the detection of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **80**, 69–73.
- VINCENT A.G., BRELAND V.M. & LOTZ J.M. (2004). Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with necrotizing hepatopancreatitis (NHP) bacterium by *per os* exposure. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 227–233.
- VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2005). Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP-bacterium using real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 163–169.

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2007). Effect of salinity on transmission of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) to Kona stock *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 265–268.

*

* *

NB: На момент публикации (2017 год) еще не было Референтной лаборатории МЭБ по инфекции *Hepatobacter penaei* (некротизирующему гепатопанкреатиту)

(смотрите 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/>).

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2012 ГОДУ; САМЫЕ ПОСЛЕДНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2017 ГОДУ.

Г Л А В А 2 . 2 . 4 .

ИНФИЦИРОВАНИЕ ВИРУСОМ ИНФЕКЦИОННОГО ГИПОДЕРМАЛЬНОГО И ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА

1. Предмет рассмотрения

Заражение инфекционным вирусом гиподермального и гематопозитического некроза это инфицирование возбудителем вируса инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза (IHNV) семейства *Parvoviridae*, род *Penstyldensovirus*.

Международный комитет по таксономии вирусов присвоил IHNV видовое название *Decapod penstyldensovirus 1* (King с соавт., 2012).

2. Информация о болезни

2.1. Факторы агента

2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

IHNV -наименьший из известных вирусов креветок-пенеид. Вирион представляет собой икосаэдр (20–22 нм) без оболочки плотностью 1,40 г / мл в CsCl, содержит линейную одноцепочечную ДНК (предполагаемый размер 3,9 т.п.н.) и имеет капсид с четырьмя полипептидами молекулярной массы 74, 47, 39 и 37,5 кДа (Bonami с соавт., 1990; Nunan с соавт., 2000; GenBank AF218266).

Были идентифицированы, по крайней мере, два различных генотипа IHNV (Tang с соавт., 2003): тип 1 из Северной и Южной Америки и Восточной Азии (главным образом, Филиппин); тип 2 из Юго-Восточной Азии. Эти генотипы являются инфекционными для *P. vannamei* и *P. monodon*. Обнаружено, что две последовательности, гомологичные части генома IHNV, встроены в геном креветок пенеид. Первоначально они были описаны как Тип 3А из Восточной Африки, Индии и Австралии и Тип 3В из западной части Индо-Тихоокеанского региона, включая Мадагаскар, Маврикий и Танзанию (Tang & Lightner, 2006; Tang с соавт., 2007). Ткани, содержащие IHNV-гомологичные последовательности в геноме *P. monodon*, не являются инфекционными для восприимчивых видов хозяев *P. vannamei* и *P. monodon* (Lightner с соавт., 2009; Tang & Lightner, 2006; Tang с соавт., 2007).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Данные отсутствуют.

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

ИHHV является стабильным вирусом креветок; инфицированные ткани остаются инфекционными после многократных циклов замораживания-оттаивания и после хранения в 50% глицерине (Lightner, 1996a; Lightner с соавт., 1987; Lightner с соавт., 2009).

2.1.4. Жизненный цикл

Не применимо.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды, которые соответствуют критериям для включения в список восприимчивых к инфекции ИHHV в соответствии с главой 1.5. *Кодекса здоровья водных животных (Водный кодекс)* включают: коричневые креветки (*Penaeus californiensis*), гигантские тигровые креветки (*Penaeus monodon*), северные белые креветки (*Penaeus setiferus*), голубые креветки (*Penaeus stylirostris*) и белоногие креветки (*Penaeus vannamei*).

2.2.2. Виды, в отношении которых полные данные о восприимчивости отсутствуют

Виды, для которых имеются неполные доказательства соответствия критериям для включения в список восприимчивых к инфекции ИHHV в соответствии с главой 1.5. *Водного кодекса*, включают: северную коричневую креветку (*Penaeus aztecus*).

Кроме того, патоген-специфические положительные результаты полимеразной цепной реакции (ПЦР) были зарегистрированы у следующих организмов, но активной инфекции не было продемонстрировано: гигантская речная креветка (*Macrobrachium rosenbergii*), северная розовая креветка (*Penaeus duorarum*), тихоокеанская белая креветка (*Penaeus occidentalis*), японская креветка (*Penaeus japonicus*), зеленая тигровая креветка (*Penaeus semisulcatus*), *Hemigrapsus penicillatus*, аргентинская креветка (*Artemesia longinaruis*), краб-плавунец (*Callinectes arcuatus*), морской язык (Mazatlan sole, *Archirus mazatlanus*), желтоперый (*Gerres cinereus*), тилапия (*Oreochromis sp.*), тихоокеанская пикитинга (*Lile stolifera*), малый морской дракон (*Centropomus medius*).

2.2.3. Стадии восприимчивости у хозяев

Вирус IHNV был обнаружен на всех стадиях жизни (то есть икра, личинки, пост-личинки [PL], молодь и взрослые особи) *P. vannamei*. Было обнаружено, что, как правило, не происходит развитие и вылупление икринок от самок, инфицированных IHNV, с высокой вирусной нагрузкой. Те науплии, которые были получены из инфицированного маточного стада и которые вылупляются, имеют высокую превалентность инфекции IHNV (Motte с соавт., 2003).

2.2.4. Вероятность обнаружения видов и субпопуляции

Смотрите разделы 2.2.1 и 2.2.3

2.2.5. Целевые органы и инфицированная ткань

IHNV инфицирует и, как было продемонстрировано, реплицируется (используя гибридизацию *in situ* [ISH] со специфичными ДНК-зондами) в тканях эктодермального и мезодермального происхождения, отобранных от эмбриона. Таким образом, к основным органам-мишеням относятся: жаберы, кутикулярный эпителий (или гиподерма), все соединительные ткани, кроветворные ткани, лимфоидный орган, антеннальная железа и вентральный нервный тяж, его стволы и его ганглии. В органах кишечника (энтодерма, гепатопанкреас, эпителий слизистой оболочки средней кишки и средней кишки), а также в гладких, сердечных и поперечно-полосатых мышцах нет гистологических признаков инфекции IHNV, и они обычно являются отрицательными по ISH (Lightner, 1993; Lightner, 1996a; Lightner, 2011; Lightner с соавт., 1992b).

2.2.6. Устойчивая инфекция

Некоторые представители популяций *P. stylirostris* и *P. vannamei*, которые выживают после эпизоотии IHNV, могут быть носителями вируса всю жизнь и передавать вирус своему потомству и другим популяциям путем вертикальной и горизонтальной передачи (Bell & Lightner, 1984; Lightner, 1996a); Lightner, 1996b; Morales-Covarrubias & Chavez-Sanchez, 1999; Motte с соавт., 2003).

2.2.7. Векторы

Векторы неизвестны.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача ИHNВ может быть горизонтальной или вертикальной. Горизонтальная передача осуществлялась посредством каннибализма или через контаминированную воду (Lightner, 1996a; Lightner и др., 1983a; Lightner и др., 1983b; Lightner и др., 1985), а вертикальная передача - через инфицированную икру (Motte с соавт., 2003).

2.3.2. Превалентность

В регионах, где вирус является энзоотическим в диких популяциях, превалентность вируса ИHNВ была обнаружена в различных исследованиях в диапазоне от 0 до 100%. Некоторые сообщенные средние значения превалентности ИHNВ в диких популяциях составляют: 26% и 46% у *P. stylirostris* в нижней и верхней частях Калифорнийского залива соответственно (Pantoja с соавт., 1999); 100% и 57%, соответственно, у взрослых женских и мужских особей *P. stylirostris* из среднего региона Калифорнийского залива (Morales-Covarrubias с соавт., 1999); 28% у дикого *P. vannamei*, собранного с тихоокеанского побережья Панама (Nunan с соавт., 2001); и от 51 до 63% у *P. vannamei*, собранного на тихоокеанском побережье Эквадора, Колумбии и Панама (Motte с соавт., 2003). Другие пенеиды, собранные во время некоторых из этих исследований и признанные положительными по ИHNВ, включали коричневую креветку, *P. californiensis* и белую тихоокеанскую креветку *P. occidentalis*. В хозяйствах, где присутствует ИHNВ, его превалентность может варьироваться от очень низкой до 100%, но типичной является высокая превалентность, приближающаяся к 100% (Chayaburakul с соавт., 2004; Lightner, 1988; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Lightner с соавт., 1992a; Lightner с соавт., 1983a; Martinez-Cordova, 1992).

2.3.3. Географическое распределение

ИHNВ, по-видимому, имеет всемирное распространение как у диких, так и у культивируемых креветок-пенеид (Brock & Lightner, 1990; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Owens с соавт., 1992). Несмотря на то, что сообщалось об инфицировании ИHNВ культивируемых *P. vannamei* и *P. stylirostris* в большинстве районов выращивания креветок в Западном полушарии и у диких пенеид по всему их ареалу вдоль тихоокеанского побережья Северной и Южной Америки (от Перу до северной Мексики), вирус не был зарегистрирован у диких креветок-пенеид на атлантическом побережье Северной и Южной Америки (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Brock & Main, 1994; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Lightner с соавт., 1992a; Lightner & Redman 1998a; Lightner & Redman, 1998b). Также сообщалось об инфицировании ИHNВ у культивируемых креветок-пенеид с островов Тихого океана, включая Гавайские острова, Французскую Полинезию, Гуам и Новую Каледонию. В Индо-Тихоокеанском регионе вирус был зарегистрирован среди культивируемых и диких креветок-пенеид в Восточной Азии, Юго-Восточной Азии и на Ближнем Востоке (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner, 1996a).

В Австралии была зарегистрирована последовательность вируса, подобного ИHN, (Krabsetsve с соавт., 2004; Owens с соавт., 1992), а о наличии инфекции ИHNV у креветок, выращиваемых на ферме в Австралии, было сообщено в МЭБ в 2008 году. Как обсуждалось в разделе 2.1.1 были обнаружены ИHNV-ассоциированные последовательности, встраиваемые в геном *P. monodon* из Восточной Африки, Австралии и западного Индо-Тихоокеанского региона (Tang & Lightner, 2006; Tang с соавт., 2007).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Последствия инфицирования вирусом ИHNV варьируются среди видов и популяций креветок, где инфекции могут быть острыми или хроническими. Например, в не отобранных популяциях *P. stylirostris* инфицирование вирусом ИHNV приводит к острому, обычно катастрофическому заболеванию со смертностью, приближающейся к 100%. Напротив, в популяциях *P. vannamei*, некоторых отобранных линиях *P. stylirostris* и некоторых популяциях *P. monodon*, инфицирование вирусом ИHNV приводит к болезни со стертым, хроническим течением, RDS, при которой высокая смертность не характерна, но распространены подавление роста и деформация кутикулы (Kalagayan с соавт., 1991).

Инфицирование вирусом ИHNV препятствует нормальному развитию икры, личинок и пост-личинок. При использовании маточного поголовья из диких или выращиваемых на фермах популяций, у которых болезнь является энзоотической, успешность вылупления личинок из икры снижается, так же, как и показатели выживаемости и культивирования личиночной и пост-личиночной стадий (Motte с соавт., 2003).

Популяции *P. stylirostris*, молодые, половозрелые и взрослые особи, демонстрируют устойчиво высокие показатели смертности. Популяции *P. vannamei* и, возможно, *P. monodon*, инфицированные ИHNV, демонстрируют слабый и несоизмеримо сильный рост и деформации кутикулы, в особенности, искривленные рострумы и деформированные шестые брюшные сегменты.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Скорость репликации вируса ИHNV при высоких температурах воды была значительно снижена в исследовании, в котором вирусная репликация сравнивалась у экспериментально инфицированной креветки *P. vannamei*, которую содержали при температуре 24 и 32°C. После подходящего периода инкубации креветки, выдерживаемые при 32 °C, имели вирусную нагрузку примерно на 102 ниже, чем креветки, выдерживаемые при 24°C (Montgomery-Brock с соавт., 2007).

2.4. Контроль и меры профилактики

2.4.1. Вакцинация

Пока не разработаны эффективные методы вакцинации против IHNV.

2.4.2. Химиотерапия

Не существует научно доказанных сведений относительно эффективного лечения с применением химиотерапии.

2.4.3. Иммуностимуляция

Не существует научно доказанных сведений относительно эффективного лечения с применением иммуностимуляции.

2.4.4. Племенное разведение для повышения резистентности

Были выведены популяции *P. stylirostris*, устойчивые к инфекции IHNV, и они успешно применялись на креветочных фермах (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Weppe, 1992; Zarain-Herzberg & Ascensio-Valle, 2001). Однако линии *P. stylirostris*, которые были выведены для устойчивости к инфекции IHNV (Tang с соавт., 2000), не обладают повышенной устойчивостью к другим заболеваниям, таким как вирус синдрома белого пятна (WSSV), поэтому их использование было ограничено. В некоторых случаях сообщалось о генетической основе восприимчивости к IHNV у *P. vannamei* (Alcivar-Warren с соавт., 1997).

2.4.5. Восполнение популяции резистентными видами

Использование устойчивого к болезням вида *P. stylirostris* было ограничено и недостаточно успешным (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; Weppe, 1992; Zarain-Herzberg & Ascensio-Valle, 2001). Относительная резистентность *P. vannamei* к заражению IHNV считается одним из основных факторов, которые привели к тому, что *P. vannamei* является основным видом креветок, выращиваемым в Западной полушарии и, начиная с 2004 года, во всем мире (Lightner, 2005; Lightner с соавт., 2009).

2.4.6. Блокирующие агенты

Нет данных относительно блокирующих агентов IHNV.

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Было продемонстрировано, что IHNV передается вертикально посредством трансвариальной передачи (Motte с соавт., 2003). Следовательно, в то время как дезинфекция икры и личинок является хорошей практикой содержания (Chen с соавт., 1992) и рекомендуется благодаря ее потенциалу к снижению контаминации икры и личинок, полученных из них (и контаминации другими возбудителями болезней), метод является неэффективным для предотвращения трансвариальной передачи IHNV (Motte с соавт., 2003).

2.4.8. Общие практики содержания

Некоторые методы содержания креветок были успешными в предотвращении распространения IHNV. Среди них применение предварительного скрининга посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) в отношении дикой и выращенной в пруду популяции или вымеченной ею икры / науплий, а также выбраковка при наличии положительного результата на вирус (Fegan & Clifford, 2001; Motte с соавт., 2003), а также выведение популяций креветок *P. vannamei* и *P. stylirostris*, свободных от специфических патогенных организмов (SPF) (Lightner, 1996b; Lightner, 2005; Lotz и др., 1995; Pruder и др., 1995; Wyban, 1992). Последняя практика оказалась наиболее успешной практикой ведения хозяйства для профилактики и контроля IHNV (Jaenike с соавт., 1992; Lightner, 2005; Pruder с соавт., 1995).

3. Пробоотбор

3.1. Отбор отдельных образцов

В то время как инфекция вирусом IHNV может влиять на все стадии жизни, тяжесть заражения и, следовательно, вирусная нагрузка могут быть ниже пределов обнаружения в вымеченной икре и на личиночных стадиях, поэтому эти стадии жизни не подходят для выявления или подтверждения свободы от инфекции IHNV.

3.2. Консервирование образцов для представления

Обычные гистологические или молекулярные исследования и руководство по консервации образцов для предполагаемого метода исследования описаны в Главе 2.2.0.

3.3. Объединение образцов в пул

Влияние объединения в пул на диагностическую чувствительность не оценивалось, поэтому креветки большего размера должны обрабатываться и тестироваться индивидуально. Тем не менее, креветка на ранних жизненных этапах, особенно PL или образцы до 0,5 г, могут быть объединены в пул, чтобы получить достаточно материала для молекулярных исследований.

3.4. Наиболее подходящие органы и ткани

ИHHNV поражает ткани эктодермального и мезодермального происхождения. Основными тканями-мишенями для ИHHNV являются клетки соединительной ткани, жабры, гемопоэтические узелки и гемоциты, вентральный нервный тяж и ганглии, эпителиальные клетки канальцев антенны и паренхимные клетки лимфоидных органов (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a). Следовательно, цельные креветки (например, личинки или PL) или образцы тканей, содержащие вышеупомянутые ткани-мишени, подходят для большинства испытаний с использованием молекулярных методов.

Гемолимфа или удаленные плеоподы могут быть собраны и использованы для тестирования (обычно для ПЦР или дот-блот-гибридизации со специфическими зондами), когда необходимо тестирование с сохранением жизнеспособности ценного маточного поголовья (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a).

3.5. Неподходящие образцы/ткани

ИHHNV является системным вирусом, и он не размножается в кишечных тканях (например, гепатопанкреас, средняя кишка или ее слепая кишка). Следовательно, кишечные ткани являются неподходящими образцами для выявления ИHHNV (Lightner, 1996a; Lightner, 2011; Lightner & Redman, 1998a).

4. Диагностические методы

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Некоторые деформации кутикулы, в частности деформированный рострум, согнутый влево или вправо, который может наблюдаться у *P. vannamei* и *P. stylirostris* с RDS, являются патогномоничными для инфекции ИHHNV (см. Раздел 4.2.1.2). Однако этот клинический признак не всегда очевиден в популяциях

креветок, хронически инфицированных ИHNВ. Так как *P. vannamei*, *P. stylirostris* и *P. monodon* могут быть инфицированы ИHNВ и не демонстрировать явных признаков инфекции (например, они могут демонстрировать заметно сниженные темпы роста или "рант" синдром), рекомендуется проведение молекулярных исследований, когда требуются доказательства свободы от инфекции ИHNВ.

4.1.2. Изменения в поведении

При острой форме болезни у *P. stylirostris* могут наблюдаться поведенческие изменения (см. Раздел 4.2.1.1), но при наличии RDS у пораженных креветок не регистрировались стабильные изменения поведения.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

4.2.1.1. Инфекция *Penaeus stylirostris* вирусом ИHNВ

Инфекция вирусом ИHNВ часто является острой и сопровождается очень высокой смертностью, встречающейся на ювенольной стадии жизни этого вида. Вертикально инфицированные личинки и ранние пост-личинки не заболевают, но у особей приблизительно 35-дневного или более старшего возраста могут наблюдаться макроскопические признаки заболевания, сопровождаемые массовой гибелью. У горизонтально инфицированной молоди инкубационный период и тяжесть заболевания в некоторой степени зависят от размера и / или возраста, при этом молодь всегда страдает в большей степени. Инфицированные взрослые особи редко проявляют признаки заболевания или смертности (Bell & Lightner, 1984; Bell & Lightner, 1987; Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Brock с соавт., 1983; Brock & Main, 1994; Lightner, 1988; Lightner, 1993; Lightner, 1996a; Lightner, 2011; Lightner с соавт., 1983a; Lightner с соавт., 1983b). Макроскопические признаки не являются специфическими, но у молоди *P. stylirostris*, инфицированной ИHNВ в острой форме, наблюдается заметное снижение потребления пищи, сопровождаемое изменениями поведения и внешнего вида. Наблюдалось, что креветки этого вида с острой инфекцией ИHNВ медленно поднимаются в резервуарах для разведения на поверхность воды, где они становятся неподвижными, а затем переворачиваются и медленно опускаются (брюхом вверх) на дно резервуара. Креветки, демонстрирующие такое поведение, могут повторять этот процесс в течение нескольких часов, пока они не станут слишком слабыми, чтобы продолжать, или пока они не будут атакованы и съедены своими более здоровыми собратьями. Представители *Penaeus stylirostris* на этой стадии инфекции часто имеют белые или ярко-красные пятна (которые отличаются по внешнему виду и расположению от белых пятен, которые иногда встречаются у креветок, инфицированных вирусом WSSV) в кутикулярном эпидермисе, особенно в месте соединения тыльных пластин брюшка, придавая такой креветке пестрый вид. Эта

пятнистость позднее исчезает у умирающих особях *P. stylirostris*, поскольку такие особи становятся более голубоватыми. У *P. stylirostris* и *P. monodon* на конечной стадии инфекции вирусом ИHNВ умирающие особи креветок часто имеют отчетливо голубоватый цвет с нечеткой мускулатурой брюшной полости (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner с соавт., 1983a; Lightner с соавт., 1983b).

4.2.1.2. Инфицирование *Penaeus vannamei* вирусом ИHNВ

RDS, хроническая форма инфекции ИHNВ, встречается у *P. vannamei*. Тяжесть и распространенность RDS в инфицированных популяциях молодых или более взрослых особей *P. vannamei* может быть связана с инфекцией, которая возникла на личиночной или ранней пост-личиночной стадиях. RDS также был обнаружен в выращиваемых популяциях *P. stylirostris* и *P. monodon*. У молоди креветок с RDS могут наблюдаться изогнутый (изгиб на 45–90 ° влево или вправо) или иным образом деформированный рострум, деформированный шестой сегмент брюшной полости, морщинистые жгутики антенн, неровность кутикулы, пузырчатая болезнь ('bubble-heads') и другие деформации кутикулы. В популяции молоди креветок, инфицированных RDS, наблюдается неравномерный рост с широким распределением по размерам и большим количеством, вопреки ожиданиям, маленьких (с задержкой роста) креветок. Коэффициент вариаций ($CV = \text{стандартное отклонение} / \text{среднее значение}$ для групп с разными размерами в популяции) для популяций с RDS обычно превышает 30% и может приближаться к 90%, тогда как популяции молодых *P. vannamei* и *P. Stylirostris*, свободные от инфекции ИHNВ (и, следовательно, свободные от RDS), обычно показывают CV 10-30% (Bray с соавт., 1994; Brock & Lightner, 1990; Brock с соавт., 1983; Brock & Main, 1994; Browdy с соавт., 1993; Carr с соавт., 1996; Lightner, 1996a; Primavera & Quinitio, 2000; Pruder с соавт., 1995).

4.2.2. Клиническая химия

Не применимо

4.2.3. Микроскопия патологических изменений

Острые инфекции у *P. stylirostris* могут быть легко диагностированы с использованием рутинного метода окрашивания срезов гематоксилином и эозином (H & E) (см. Раздел 4.2.6). Хроническую инфекцию ИHNВ и RDS диагностировать гораздо сложнее с помощью рутинных гистологических методов H & E. Для диагностики хронических инфекций рекомендуется использовать молекулярные методы для выявления ИHNВ (например, с помощью ПЦР или

применения ДНК-зондов, специфичных для IHNV, для дот-блот-гибридизации или in-situ гибридизации (ISH) гистологических срезов).

Гистологическая демонстрация явных внутриядерных телец включения Каудри, тип А, позволяет сделать предварительный диагноз инфекции IHNV. Эти характерные для IHNV тельца включения являются эозинофильными и часто окружены ореолами (с Н & Е-пятнами тканей, сохраненными с помощью фиксаторов, которые содержат уксусную кислоту, таких как AFA Дэвидсона и раствор Буина) (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996a), внутриядерные тельца включения в хроматин - окаймленные, гипертрофированные ядра клеток в тканях эктодермального (эпидермис, подкожный эпителий переднего и заднего кишечника, нервного тяжа и нервных ганглиев) и мезодермального происхождения (органы кроветворения, железа антенны, гонады, лимфоидный орган и соединительная ткань). Внутриядерные тельца включения, вызванные инфекцией IHNV, можно легко спутать с развитием внутриядерных телец включения, вызванных инфекцией WSSV. Анализ ISH (см. Раздел 4.3.1.2.3 этой главы) таких срезов с использованием специального ДНК-зонда для IHNV обеспечивает точный диагноз инфекции IHNV (Lightner, 1996a; Lightner, 2011; Lightner & Redman, 1998a).

4.2.4. Влажные препараты

Надежные методы микроскопических исследований патологических изменений не разработаны.

4.2.5. Смывы

Не применимо.

4.2.6. Зафиксированные срезы

4.2.6.1. Гистопатология

Для всех рутинных гистологических исследований креветок настоятельно рекомендуется использовать фиксатор Дэвидсона (содержащий 33% этилового спирта [95%], 22% формалина [приблизительно 37% формальдегида], 11,5% ледяной уксусной кислоты и 33,5% дистиллированной или водопроводной воды) (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996a). Для достижения наилучших результатов не следует использовать павшие креветки. Для фиксации и гистологического исследования нужно отбирать только живую, умирающую или поврежденную креветку. Отобранных креветок умерщвляют инъекцией фиксатора непосредственно в гепатопанкреас; кутикулу над цефалотораксом и брюшной полостью,

расположенная сбоку от дорсальной срединной линии, вскрывают хирургическими ножницами с острыми концами для усиления проникновения в фиксатор (брюшную полость можно удалить и выбросить), целую креветку (или цефалоторакс без брюшной полости) погружают в фиксатор на 24 - 48 часов, а затем переносят в 70% этиловый спирт для хранения. После переноса в 70% этиловый спирт зафиксированные образцы можно транспортировать (по почте или курьером в диагностическую лабораторию), завернув в ткань или бумажное полотенце, пропитанное 70% этиловым спиртом и упаковав в герметичные пластиковые пакеты (см. Раздел 4.2.3).

4.2.6.2. Гибридизация *in-situ*

Смотри Раздел 4.3.1.2.3 ниже.

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Для рутинной диагностики ИHNV проведение электронной микроскопии не рекомендуется.

4.3. Методы обнаружения и идентификации агента

4.3.1. Прямые методы обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Смотри Раздел 4.2.4

4.3.1.1.2. Смывы

Смотри Раздел 4.2.5

4.3.1.1.3. Зафиксированные срезы

Смотри Раздел 4.2.6

4.3.1.2. Выделение и идентификация агента

4.3.1.2.1. Клеточная культура/искусственная среда

ИHNHV не выращивали *in vitro*. Не существует линий клеток ракообразных (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a; Lightner & Redman, 1998b).

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигенов, основанные на антителах

Успешных методов разработано не было.

4.3.1.2.3. Методы молекулярных исследований

Прямые методы обнаружения с использованием ДНК-зондов, специфичных для ИHNHV, доступны в формате дот-блоттинга и ISH. Были разработаны ПЦР-тесты для обнаружения ИHNHV и ряд методов и коммерческих наборов для обнаружения ПЦР являются доступными.

4.3.1.2.3.1. ДНК-зонды для дот-блоттинга и ISH

Методы генного зондирования и ПЦР обеспечивают большую диагностическую специфичность и чувствительность, чем традиционные методы, которые используют классические гистологические подходы. Кроме того, эти методы имеют дополнительное преимущество в том, что они применимы к тестированию живого маточного поголовья креветки. Образец гемолимфы может быть отобран с использованием туберкулинового шприца, или придаток (например, плеопод), может быть подвергнут биопсии (Bell с соавт., 1990) и использован в качестве образца для дот-блот-гибридизации.

4.3.1.2.3.2. Дот-блот-гибридизация для обнаружения ИHNHV

Метод дот-блот гибридации, описанный ниже, использует ДНК-зонд, меченный дигоксигендином-11-dUTP (DIG), для ИHNHV и в целом следует методам, изложенным в Mari с соавт., 1993 и Lightner, 1996a. Формулы для необходимых реагентов приведены после протоколов.

- i) Готовят положительно заряженную нейлоновую мембрану: отрезают до размера, подходящего для образцов и контролей, и с использованием мягкого графитового карандаша, делают квадраты по 1 см для каждого образца. Включают положительный и отрицательный контроль на каждый фильтр. Выкладывают на лист фильтровальной бумаги (Whatman 3MM).
- ii) При необходимости образцы могут быть разведены в ТЕ-буфере (10 mM Трис-HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА) плюс 50 мкг мл⁻¹ ДНК спермы лосося. Образцами для дот-блот гибридации могут быть гемолимфа, ткани, гомогенизированные в буфере TN (20 mM Трис-

HCl, pH 7,4, 0,4 M NaCl), или экстрагированная ДНК в 10 mM Трис / HCl.

- iii) Образцы варят в течение 5 минут и охлаждают на льду в течение 1-2 минут. Держат на льду, пока образцы не будут нанесены на мембрану.
- iv) Наносят 1–3 мкл каждого образца в соответствующее место на фильтрах. Дают высохнуть на воздухе, а затем закрепляют образцы на мембране, подвергнув термической обработке при 80 °C в течение 30 минут или с помощью УФ-сшивания с использованием трансиллюминатора ДНК в течение 3 минут.
- v) Мембраны извлекают из печи или трансиллюминатора и помещают в термосвариваемый пакет с 4 мл. раствора для предварительной гибридизации. на мембрану. Пакеты герметично закрывают и помещают в водяную баню (68 °C) на 0,5 –1 час.
- vi) DIG-меченный зонд кипятят в течение 3–5 минут, а затем держат на льду. Из пакетов удаляют раствор для предварительной гибридизации. Добавляют 2 мл свежего раствора для предварительной гибридизации в каждый пакет, а затем добавляют заранее определенное количество DIG-меченного зонда к каждому, хорошо перемешивая по мере его добавления. Пакеты герметично закрывают, помещают обратно в водяную баню с температурой 68 °C и инкубируют в течение 8–12 часов.
- vii) Мембраны тщательно промывают:

SC/0.1% SDS	2	5 минут при комнатной температуре
	×	
SSC/0.1% SDS	3	15 минут при 68°C
	×	
p I	1	5 минут при комнатной температуре
	×	

- viii) Мембрану в пакетах с анти-DIG конъюгатом щелочной фосфатазы (Roche Diagnostics¹), разведенным 1/5000 в буфере I, инкубируют в течение 30–45 минут при комнатной температуре на платформе шейкера. Промыть мембрану с использованием:

Буфер I	2 ×	15 мин при комнатной температуре
Буфер III	1 ×	5 минут при комнатной температуре

- ix) Мембраны проявляют в пакетах, используя проявляющий раствор (нитросиний тетразолий хлорид [NBT] / X-фосфат в буфере III), приготовленный непосредственно перед использованием. Оставляют для вступления в реакцию в темноте при комнатной температуре на 1-2 часа Реакцию останавливают с использованием

буфера IV и мембрану высушивают на 3 мм фильтровальной бумаге.

х) Результаты фотографируют (со временем цвет блекнет).

xi) Сухие мембраны хранят в термосвариваемых пакетах.

4.3.1.2.3.3. Процедура гибридизации in-situ (ISH)

В приведенном ниже методе ISH использует DIG-меченный ДНК-зонд для HHNV и в целом он следует методам, описанным в Magi с соавт., 1993 и Lightner, 1996a.

Ткань помещают в парафин и нарезают срезы толщиной 4–6 мкм. Срезы помещают на положительно заряженные предметные стекла микроскопа (не кладите желатин в воду, чтобы срезы плавали; просто используйте воду).

Предметные стекла помещают на подставку для предметных стекол, например, Tissue-Tek. Предметные стекла нагревают в духовке в течение 45 минут при 60°C. В центре окрашивания ткань регидратируют следующим образом:

юл (или подходящий заменитель)	3	5 минут каждый
лютный спирт	2	1 мин. кадлый
спирт	2	10 погружений каждый
спирт	2	10 погружений каждый
спирт	1	10 погружений
Дистиллированная вода высыхать)	6	промываний (стекла не должны

i) Предметные стекла промывают в течение 5 минут в ФБР (или трис / NaCl / ЭДТА [TNE] буфере). Подготавливают свежую протеиназу К, 100 мкг мл⁻¹ в ФБР (или TNE). Стекла помещают во влажную камеру, пипеткой наносят 500 мкл раствора протеиназы К и инкубируют в течение 10–15 минут при 37 °C. Жидкость сливают на бумагу для блоттинга.

¹ Ссылка на конкретные коммерческие продукты в качестве примеров не означает то, что они одобрены МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, указанным в данном руководстве по водным животным.

- ii) Предметные стекла возвращают на поставку для предметных стекол. Срезы фиксируют в 0,4% холодном формальдегиде в течение 5 минут при комнатной температуре.
- iii) Предметные стекла инкубируют в $2 \times \text{SSC}$ в течение 5 минут при комнатной температуре.
- iv) При горизонтальном положении предметных стекол добавляют 0,5–1 мл буфера для предварительной гибридизации и инкубируют во влажной камере в течение 15–30 минут при 37 °C.
- v) DIG-меченный зонд кипятят в течение 3–5 минут и охлаждают на льду; в течение непродолжительного времени вращают в холоде и держат на льду. Зонд разводят до 25 нг мл⁻¹ в растворе для предварительной гибридизации и покрывают ткань 250 мкл раствора. Предметные стекла инкубируют в течение 2–4 часов при 42 °C или в течение ночи при 37 °C во влажной камере.
- vi) Предметные стекла помещают на подставку. Предметные стекла промывают следующим образом:

SC	2 ×	5–30 минут при 37°C
SC	2 ×	5 минут при 37°C
SSC	2 ×	5 минут при 37°C

- vii) Предметные стекла промывают в течение 1–3 минут в буфере I при комнатной температуре. Предметные стекла помещают во влажную камеру и блокируют Буфером II 0,5 мл на стекло. Инкубируют в течение 15 минут при 37°C.
- viii) Разводят анти-DIG AP конъюгатом в соотношении 1/1000 в буфере II. Ткань покрывают 500 мкл разведенного конъюгата и инкубируют во влажной камере в течение 30 минут при 37 °C.
- ix) Предметные стекла помещают на подставку для предметных стекол. Промывают в буфере I дважды в течение 5–10 минут, каждый раз при комнатной температуре. Промывают один раз с использованием буфера III в течение 1-2 минут.
- x) Готовят проявляющий раствор, сначала добавив 4.5 мкл NBT на 1 мл буфера III. Хорошо перемешивают. Затем добавляют 3,5 мкл Х-фосфата на мл раствора и хорошо перемешивают. Наносят пипеткой по 500 мкл на предметное стекло и инкубируют во влажной камере в темноте в течение 2–3 часов при комнатной температуре.
- xi) Реакцию останавливают, вернув предметные стекла в подставку для предметных стекол и промыв их в буфере IV в течение 15 минут при комнатной температуре.
- xii) Производят контрастное окрашивание предметных стекол погружением на 5 минут в 0,5% водный раствор Бисмарк коричневого Y.
- xiii) Предметные стекла дегидратируют в центре окрашивания

следующим образом:

спирт	3	1

элютивный спирт	3	1

юл (или подходящий заменитель)	4	1

Предметные стекла не должны высыхать — оставить их в последнем контейнере для Ксилола (или подходящего заменителя) пока они не будут готовы для использования покрывных стекол.

xiv) Накрывают покрывными стеклами и гистологической средой (Permount).

xv) Предметные стекла изучают под светлым полем на предмет темно-синего или черного осадка, который отмечает участки, где присутствует ДНК IHHNV. Патодиагностические внутриядерные

включения Каудри типа А хорошо отмечены зондом. Также часто мечение наблюдается на ядрах клеток-хозяев без явных включений, цитоплазматических включений и накопления свободного вируса в тканевых пространствах и гемолимфе.

4.3.1.2.3.3.1. Формулы реактивов для метода ISH

i) 10 × Трис/NaCl/ЭДТА (TNE) буфер

Трис база 60.57 г.

NaCl 5.84 г.

ЭДТА 3.72 г.

H₂O 900 мл (qs до 1 литра)

pH до 7,4 с помощью концентрированной HCl или HCl (5 M). Чтобы приготовить 1 × TNE, разводят 100 мл 10 × TNE в 900 мл H₂O.

Протеиназа К, 100 мкг мл⁻¹ (приготовить непосредственно перед использованием)

ФБР 10 мл 1 × ФБР

Протеиназа К 1 мг

ii) Буфер для предварительной гибридизации (50 мл конечного объема)

4 × SSC 10 мл 20 × SSC

50% формамид 25 мл 100% формамида

1 × Раствор Денхардта

2.5 мл 20 × Раствор Денхардта

5% сульфат декстрана 10 мл 25% сульфат декстрана

Нагревают до 60°C.

Кипятят 2,5 мл 10 мг / мл⁻¹ ДНК спермы лосося и добавляют в буфер до конечной концентрации 0,5 мг / мл ДНК спермы лосося.

iii) 10 × буфер I

1 М Трис/HCl	121.1 г Трис база

1.5 М NaCl	87.7 г NaCl

H ₂ O	1000 мл (qs)

pH до 7,5 с помощью HCl. Автоклавируют. Чтобы приготовить 1 × буфер I, разводят 100 мл × 10 исходного материала в 900 мл H₂O.

iv) Буфер II (блокирующий буфер)

Блокирующий реактив	0.25 г. Блокирующий реактив (Roche Diagnostics)

Буфер I	50 мл 1 × Буфер I

v) Буфер III

100 ммоль/л Трис/HCl	1.21 г. Трис база

100 ммоль/л NaCl	0.58 г. NaCl

DD H ₂ O (дистиллят двойной перегонки)	100 мл (qs)

pH до 9.5 с использованием HCl. Затем добавляют:

50 ммоль/л MgCl ₂	1.02 г. MgCl ₂ ·6H ₂ O

vi) Проявляющий раствор

Смешивают 90 мл буфера III с 10 мл 10% PVA. Хранят при температуре 4 °С. Непосредственно перед использованием на каждый 1 мл буфера III с PVA добавляют:

4.5 мкл NBT	75 мг NBT мл ⁻¹ в 70% диметилформамиде
3.5 мкл X-фосфата	5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат,
толуидиновая соль,	

vii) Буфер IV

10 ммоль/л /Трис/HCl	1.21 г Трис база
1 ммоль/л ЭДТА	0.37 г ЭДТА.2H ₂ O (динатриевая соль)
H ₂ O	1000 мл

pH до 8.0 с использованием HCl.

viii) 0.5% Бисмарк коричневый Y

Бисмарк коричневый Y	2.5 г
H ₂ O	500 мл

Краситель растворяют в воде. Фильтруют через фильтр Whatman № 1; хранят при комнатной температуре.

4.3.1.2.3.4. Полимеразная цепная реакция для обнаружения *IHHNV*

Несколько одноступенчатых методов ПЦР (Krabsetsve с соавт., 2004; Nunan с соавт., 2000; Shike с соавт., 2000; Tang с соавт., 2000; Tang с соавт., 2003) и ряд коммерческих ПЦР наборов доступны для обнаружения *IHHNV*. Вложенные методы также доступны из коммерческих источников.

Существует несколько географических вариантов вируса IHNV, некоторые из которых можно обнаружить не всеми доступными методами. Два набора праймеров, 392F/R и 389F/R, являются наиболее подходящими для обнаружения всех известных генетических вариантов вируса IHNV (Tang с соавт., 2000; Tang с соавт., 2007). Тем не менее, эти тесты также выявляют связанные с вирусом IHNV последовательности, называемые типами 3А и 3В, которые вставляются в геном некоторых популяций *P. monodon* из западной части Индийского Тихого океана, Восточной Африки, Австралии и Индии (Tang & Lightner, 2006; Tang и др., 2007; Saksmerpromе и др., 2011). Были разработаны ПЦР-праймеры, которые могут обнаруживать последовательность вируса IHNV, но не вступают в реакцию с последовательностями, ассоциированными с вирусом IHNV, присутствующими в популяциях *P. monodon* из Африки, Австралии (Tang с соавт., 2007) или Таиланда (Saksmerpromе с соавт., 2011). Набор праймеров 309F/R амплифицирует только сегмент из вируса IHNV типов 1 и 2 (инфекционные формы вируса IHNV), но не типов 3А и 3В, которые не являются инфекционными и входят в геном *P. monodon* (Tang & Lightner, 2006; Tang с соавт., 2007). Набор праймеров MG831F/R вступает в реакцию только с типами 3А и 3В, которые не являются инфекционными и входят в геном *P. monodon* (Tang с соавт., 2007). Следовательно, настоятельно рекомендуется подтверждение неожиданных положительных или отрицательных результатов ПЦР на вирус IHNV с использованием второго набора праймеров или использование другого диагностического метода (то есть гистологии, биопробы, ISH).

Таблица 4.1. Наборы праймеров, рекомендованные для одноэтапной ПЦР для обнаружения вируса IHNV

праймер	продукт	последовательность	С% / темп.	нБанк & ссылки
89F	3 п.н.	CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'	%/72°C	218266
89R		GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'	%/71°C	ng с соавт., 0)
012F	5 п.н.	ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA-3'	%/68°C	218266
353R		TCG-TAC-TGG-CTG-TTC-ATC-3'	%/63°C	map с соавт., 0)
92F	2 п.н.	GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA-3'	%/68°C	218266
92R		ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG-3'	%/71°C	ng с соавт., 0; ig с соавт., 7)
09F	3 п.н.	TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A-3'	%/68°C	218266
09R		TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A-3'	%/69°C	ng с соавт., 7)
MG831F	1 п.н.	TTG-GGG-ATG-CAG-CAA-TAT-CT-3'	%/58°C	228358

5831R	5'-GTC-CAT-CCA-CTG-ATC-GGA-CT-3'	%/62°C	(Tang с соавт., 2007)

ПРИМЕЧАНИЕ: описанные выше праймеры 389F/R и 392F/R относятся к области генома вируса IHNV, кодирующей неструктурный белок. Праймеры 77012F/77353R получены из области между областями генома, кодирующими неструктурные и капсидные белки. В случае неоднозначности результатов при использовании набора универсальных праймеров 389F/R рекомендуется использовать праймеры из другой области генома для подтверждающего тестирования. В этом случае это будет означать использование праймеров 77012F/77353R или наборов праймеров 392F/R и последующее определение последовательности ПЦР-ампликонов для подтверждения.

4.3.1.2.3.5. *Общепринятый метод ПЦР для обнаружения IHNV*

Метод ПЦР для обнаружения вируса IHNV, описанный ниже, в целом соответствует методам, описанным Tang с соавт., 2007 и Nunan с соавт., 2000. Однако недавние незначительные модификации, включая источники реактивов и использование автоматического инструмента для экстракции ДНК, являются приемлемыми. Модификации включают метод экстракции ДНК, выбор праймеров (Таблица 4.1) и объем реакции. Эти несколько измененные методы были валидированы в соответствии с главой 1.1.2 Принципы и методы валидации диагностических тестов на инфекционные болезни и не влияют на диагностические характеристики анализа.

- i) В качестве матрицы используют ДНК, экстрагированную из тканей или гемолимфы, которая была консервирована в 95% этаноле и затем высушена. Контроль, состоящий из тканей или гемолимфы от известных отрицательных животных, должен быть включен во время стадии экстрагирования ДНК. ДНК может быть извлечена различными способами. Другие наборы для экстракции ДНК включают мини-набор QIAamp DNA (Qiagen), наборы нуклеиновых кислот MagMax™ (Life Technologies), набор для очистки ДНК LEV Maxwell® 16 Cell (Promega) или DNazol (Life Technologies). Спектрофотометрические способы определения конечной ДНК будут указывать на чистоту ДНК и количество всей ДНК, выделенной из образца. Используют 1–5 мкл экстрагированной ДНК в качестве матрицы для 25 мкл объема реакционной смеси.
- ii) Следующие контроли должны быть включены в каждый ПЦР-анализ на IHNV: а) ДНК из известного отрицательного образца ткани; б) ДНК из известного положительного образца (из ткани или гемолимфы или из плазмидного клона, который содержит фрагмент, который амплифицируется конкретным набором праймеров); и с) контроль «без матрицы».
- iii) В качестве праймеров используют праймеры 389F и 389R, которые извлекают полосу размером 389 п.н. из материала,

инфицированного IHNV, или праймеры 77012F и 77353R, которые извлекают полосу размером 356 п.н. из материала, инфицированного IHNV. Праймеры готовят при 10 мкМ в дистиллированной воде.

- iv) Если используются PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare), профиль ПЦР включает 3–5-минутный этап при 95°C для денатурации ДНК с последующим 35 циклами при 95°C в течение 30 секунд, 60°C в течение 30 секунд и 72°C в течение 30 секунд, и окончательное удлинение при 72 °C в течение 5 минут.
- v) Готовят «мастер-микс», состоящий из воды и праймеров.
- vi) Для реакционной смеси объемом 25 мкл добавляют 24 мкл "мастер-микса" в каждую пробирку и затем добавляют 1 мкл матрицы ДНК для тестирования.
- vii) Быстро вращают на центрифуге / вортексе каждую пробирку, чтобы осадить всю жидкость. Пробирки помещают в термоциклер и запускают программу ПЦР
- viii) После проведения ПЦР 6–10 мкл образца помещают в 1,5% агарозный гель (содержащий 0,5 мкг/мл⁻¹ бромистого этидия для окрашивания ДНК). Ищут полосу 389 п.н. (при использовании праймеров 389F и 389R) или полосу 356 п.н. (при использовании праймеров 77012F и 77353R). Полосы не всегда видны, так как для того, чтобы увидеть ДНК в геле, необходимо чтобы ДНК составляла, по крайней мере, 10 нг/мкл⁻¹. Прямое секвенирование амплифицированных продуктов может быть выполнено посредством гель-экстракции полосы ПЦР с правильным размером и праймера (ов) для секвенирования, используемого (ых) для амплификации, чтобы подтвердить присутствие IHNV.

4.3.1.2.3.6. Метод ПЦР в реальном времени (кПЦР) для обнаружения IHNV

Для обнаружения IHNV были разработаны методы кПЦР. Эти методы обеспечивают необычайную чувствительность, которая позволяет обнаружить единственную копию целевой последовательности из генома IHNV (Dhar с соавт., 2001; Tang & Lightner, 2001). Метод кПЦР с использованием набора TaqMan, описанный ниже, для обнаружения IHNV, в общем вытекает из метода, используемого Tang & Lightner, 2001.

- i) ПЦР праймеры и зонд TaqMan выбирают из области геномной последовательности IHNV (GenBank AF218266), которая кодирует неструктурный белок. Праймеры и зонд TaqMan разработаны с помощью программного обеспечения Primer Express (Life Technologies). Последовательности прямых (IHNV1608F) и обратных (IHNV1688R) праймеров: 5'-TAC-TCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A-3' и 5'-GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA-3' соответственно. Зонд TaqMan (5'-ACC-AGA-CAT-AGA-GCT-ACA-ATC-CTC-GCC-TAT-TTG-3') синтезирован и помечен

флуоресцентными красителями 5-Карбокси-флуоресцеин (FAM) на 5' конце и N, N, N', N'-тетраметил-6-карбоксиродамин (TAMRA) на 3' конце.

- ii) Подготовка матрицы ДНК: экстракция матрицы ДНК такая же, как описано выше.
- iii) Реакционная смесь кПЦР содержит: TaqMan Fast virus 1-step Master Mix (Life Technologies или коммерчески доступные эквивалентные реагенты), 0,3 мкМ каждого праймера, 0,15 мкМ зонда TaqMan, 5–50 нг ДНК и воду в объеме реакции 20 мкл. Для достижения оптимальных результатов реакцию следует встряхивать и хорошо перемешивать.
- iv) Амплификацию проводят с использованием системы StepOnePlus PCR System (Life Technologies или эквивалентных систем ПЦР). Профиль цикла: начальная денатурация 20 секунд при 95°C, затем 40 циклов денатурации при 95°C в течение 1 секунды и отжиг/удлинение при 60°C в течение 20 секунд.
- v) В конце реакции измеряют интенсивность флуоресценции. Будет установлен порог выше базовой линии, при котором прибор начинает обнаруживать увеличение сигнала, ассоциированное с экспоненциальным накоплением продукта ПЦР. Значение точки разделения C_t устанавливается путем анализа нескольких независимых исследований отрицательного и положительного контролей. Образцы со значением C_t ниже 40 пороговых циклов считаются положительными.
- vi) Необходимо включить контроль «без матрицы» в каждую реакцию. Это исключает присутствие флуоресцирующих контаминантов в реакционной смеси. Положительный контроль также должен быть включен, и он может представлять собой плазмиду, содержащую целевую последовательность, или очищенные вирионы, или ДНК, экстрагированную из ткани, инфицированной ИHNВ.

4.3.1.2.3.6.1. Секвенирование

Секвенирование: продукты ПЦР могут быть непосредственно секвенированы или клонированы и секвенированы, когда необходимо подтвердить инфекцию ИHNВ, идентифицировать ложноположительные результаты или неспецифическую амплификацию или отличить амплифицированные продукты от инфекционной формы вируса и продемонстрировать наличие инсерции не-инфекционного генома ИHNВ в ДНК хозяина (Tang & Lightner, 2006).

При помощи ПЦР ИHNВ был обнаружен у *P. monodon* из Юго-Восточной Азии. Некоторые из этих ПЦР праймеров ИHNВ также реагировали на ИHNВ - ассоциированные последовательности в популяциях *P. monodon* в Африке, Австралии и Таиланде (Saksmerprom et al., 2011; Tang & Lightner, 2006). Чтобы отличить ИHNВ-ассоциированные последовательности от фактического вируса, были разработаны ПЦР-

анализы с использованием праймеров, которые обнаруживают IHNV и не вступают в реакцию с IHNV-ассоциированными последовательностями, наблюдающимися в популяциях *P. monodon* из Африки или Австралии (Tang с соавт., 2007), или Таиланда (например, Saksmerprome с соавт., 2011).

Коммерческие ПЦР-наборы доступны для обнаружения IHNV и могут быть приемлемыми, при условии, что они были валидированы, как пригодные для этой цели. Процедура валидации МЭБ описана в главе 1.1.2 Принципы и методы валидации диагностических тестов для инфекционных болезней.

4.3.2. Методы серологических исследований

Креветки являются беспозвоночными животными и не продуцируют антитела. Поэтому серологические методы выявления инфекции IHNV отсутствуют

5. Рейтинг исследований по цели использования

Методы, доступные в настоящее время для наблюдения, выявления и диагностики инфекции IHNV, перечислены в таблице 5.1. Обозначения, используемые в таблице, означают: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы серьезно ограничивают его применение; и d = метод в настоящее время не рекомендуется и / или недоступен для этой цели. Это несколько субъективно, поскольку пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и полезности. Хотя не все тесты, перечисленные как категории а или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинное использование и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы наблюдения, обнаружения и диагностики

Метод	Наблюдение				Предварительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Истинный	Чувствительность	Специфичность	Чувствительность		
Помакр					d	

ос ко пи че ск им пр из на ка м						
Б и о п р о б а					с	
Пря м а я о п т и ч е с к а я м и к р о с к о п и я (L M) (в л а					d	

ж н ы й п р е п а р а т)						
Гистоп ат ал ог ия					а	
Просве чи ва ю щ ая эл ек тр он на я ми кр ос ко пи я (Е М)					с	
Ана л и з ы н а о с н о в е					д	

а н т и т е л						
<i>In-situ</i> ги бр ид из ац ия					а	
Дот- б л о т г и б р и д и з а ц и я					а	
ПЦР, кПЦР					а	
П о с л е д о в а т е л ь н о с т ь					д	

PLs = пост-личинки; LM = оптическая микроскопия; EM = электронная микроскопия; кПЦР = полимеразная цепная реакция в реальном времени.

6. Исследование, рекомендованные для целевого надзора для провозглашения свободы от инфекции вирусом инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза

Как указано в таблице 5.1., ПЦР или ПЦР в режиме реального времени являются рекомендованными методами для целевого надзора по причинам доступности, практичности, а также специфичности и чувствительности диагностики.

При исследовании эпизодов высокой смертности в рамках целевой программы эпиднадзора подходящим методом является демонстрация патогномичных индуцированных вирусом IHNV поражений эпителий кутикулы с помощью гистологии (с подтверждением или без подтверждения ISH с помощью IHNV-специфических ДНК-зондов) (таблица 5.1.).

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение подозрительного случая

Имеется подозрение относительно инфекции вирусом IHNV, если выполнен, по крайней мере, один из следующих критериев:

i) Клинические признаки, характерные для инфекции вирусом

IHNV или

ii) Гистопатологические исследования, указывающие на инфицирование

вирусом

или

iii) Положительный результат ПЦР.

7.2. Определение подтвержденного случая

Инфицирование вирусом IHNV считается подтвержденным, если выполнены два из следующих критериев:

i) Положительный результат при гибридизации *in-situ*

- ii) Положительный результат ПЦР (всегда генотип-специфический)
- iii) Анализ последовательности для подтверждения последовательности нуклеиновой кислоты IHNV.

Два метода должны быть нацелены на разные области генома.

8. Библиография

ALCIVAR-WARREN A., OVERSTREET R.M., DHAR A.K., ASTROFSKY K., CARR W.H., SWEENEY J. & LOTZ J.M.

(1997). Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and *Baculovirus penaei*: possible relationship with growth status and metabolic gene expression. *J. Invertebr. Pathol.*, **70**, 190–197.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1984). IHNV virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and

Penaeus vannamei. *Aquaculture*, **38**, 185–194.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1987). IHNV Disease of *Penaeus stylirostris*: Effects of Shrimp Size on Disease Expression. *J. Fish Dis.*, **10**, 165–170.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. Special Publication No. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.

BELL T.A., LIGHTNER D.V. & BROCK J.A. (1990). A biopsy procedure for the non-destructive determination of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) infection in *Penaeus vannamei*. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**, 151–153.

BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M. & LIGHTNER D.V. (1990). Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2657–2664.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Asia Diagnostic Guide to

Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 240 pp.

BRAY W.A., LAWRENCE A.L. & LEUNG-TRUJILLO J.R. (1994). The effect of salinity on growth and survival of

Penaeus vannamei, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture*, **122**, 133–146.

BROCK J.A. & LIGHTNER D.V. (1990). Diseases of Crustacea. Diseases Caused by Microorganisms. *In*: Diseases of Marine Animals, Vol. III. Kinne O., ed. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 245–349.

BROCK J.A., LIGHTNER D.V. & BELL T.A. (1983). A review of four virus (BP, MBV, BMN, and IHHNV) diseases of penaeid shrimp with particular reference to clinical significance, diagnosis and control in shrimp aquaculture. Proceedings of the 71st International. Council for the Exploration of the Sea, C.M. 1983/Gen:10/1–18.

BROCK J.A. & MAIN K. (1994). A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. The Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA, 241 pp.

BROWDY C.L., HOLLOWAY J.D., KING C.O., STOKES A.D., HOPKINS J.S. & SANDIFER P.A. (1993). IHHN virus

and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. *J. Crustacean Biol.*,

13, 87–94.

CARR W.H., SWEENEY J.N., NUNAN L., LIGHTNER D.V., HIRSCH H.H. & REDDINGTON J.J. (1996). The use of an

infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, **147**, 1–8.

CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANPIPAT P., SRIURAIRATANA S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2004).

Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. *In*: Diseases of

Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In: Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress. Jory D.E., ed., Panama City, Panama, 1–11.

DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2001). Detection and quantification of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and White spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2835–2845.

FEGAN D.F. & CLIFFORD H.C. III. (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001. Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 168–198.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2006). State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 500. FAO, Rome, Italy, 134 pp.

JAENIKE F., GREGG K. & HAMPER L. (1992). Shrimp production in Texas using specific pathogen-free stocks. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA, 295–302.

KALAGAYAN G., GODIN D., KANNA R., HAGINO G., SWEENEY J., WYBAN J. & BROCK J. (1991). IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquaculture Soc.*, **22**, 235–243.

KING A.M.Q., ADAMS M.J., CARSTENS E.B. & LEFKOWITZ E.J. (2012). Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

KRABSETSVE K., CULLEN B.R. & OWENS L. (2004). Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 153–158.

LIGHTNER D.V. (1988). Diseases of Cultured Penaeid Shrimp and Prawns.*In: Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*. Sindermann C.J. & Lightner D.V., eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 8–127.

LIGHTNER D.V. (1993). Diseases of penaeid shrimp.*In: CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture*. McVey J.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

LIGHTNER D.V. (1996a). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.

LIGHTNER D.V. (1996b). Epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **15**, 579–601.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. (2011). Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management.*In: Diseases in Asian Aquaculture VII*, Bondad-Reantaso M.G., Jones J.B., Corsin F. & Aoki T., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, 121–134.

LIGHTNER D.V., BELL T.A., REDMAN R.M. & PEREZ L.A. (1992a). A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. *ICES Marine Science Symposia*, **194**, 97–105.

LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., WILLIAMS R.R. & REDMAN R.M. (1987). Glycerol tolerance of IHHN virus of penaeid shrimp. *J. World Aquaculture. Soc.*, **18**, 196–197.

LIGHTNER D.V., POULOS B.T., BRUCE L., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.R. (1992b). New developments in penaeid virology: application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas.*In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*. Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 233–253 .

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998a). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998b). Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathology*, **33**, 165–180.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific Pathogen-Free (SPF) Shrimp Stocks in Shrimp Farming Facilities as a Novel Method for Disease Control in Crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*. Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, 384–424.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BELL T.A. (1983a). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **42**, 62–70.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., BELL T.A. & BROCK J.A. (1983b). Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J. World Mariculture Soc.*, **14**, 212–225.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., WILLIAMS R.R., MOHNEY L.L., CLERX J.P.M., BELL T.A. & BROCK J.A. (1985).

Recent advances in penaeid virus disease investigations. *J. World Mariculture. Soc.*, **16**, 267–274.

LOTZ J.M., BROWDY C.L., CARR W.H., FRELIER P.F. & LIGHTNER D.V. (1995). USMSFP suggested procedures

and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed. *In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 66–75.

MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1993). Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.*, **74**, 2637–2643.

MARTINEZ-CORDOVA L.R. (1992). Cultured blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in Northwestern Mexico. *Prog. Fish Cult.*, **54**, 265–266.

MONTGOMERY-BROCK D., TACON A.G.J., POULOS B. & LIGHTNER D.V. (2007). Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture*, **265**, 41–48.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. & CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Histopathological studies on wild broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* in the Platanitos area, adjacent to San Blas, Nayarit, Mexico. *J. World Aquaculture Soc.*, **30**, 192–200.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., NUNAN L.M., LIGHTNER D.V., MOTA-URBINA J.C., GARZA-AGUIRRE M.C. &

CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Prevalence of IHHNV in wild broodstock of *Penaeus stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 296–301.

MOTTE E., YUGCHA E., LUZARDO J., CASTRO F., LECLERCQ G., RODRÍGUEZ J., MIRANDA P., BORJA O., SERRANO J., TERREROS M., MONTALVO K., NARVÁEZ A., TENORIO N., CEDEÑO V., MIALHE E. & BOULO V.

(2003). Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **219**, 57–70.

NUNAN L.M., ARCE S.M., STAHA R.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Prevalence of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J. World Aquaculture Soc.*, **32**, 330–334.

NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2000). Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, **2**, 319–328.

OWENS L., ANDERSON I.G., KENWAY M., TROTT L. & BENZIE J.A.H. (1992). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 219–228.

PANTOJA C.R., LIGHTNER D.V. & HOLTSCHMIT H.K. (1999). Prevalence and geographic distribution of IHHN parvovirus in wild penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 23–34.

PRIMAVERA J.H. & QUINITIO E.T. (2000). Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*.

J. Crustacean Biol., **20**, 796–802.

PRUDER G.D., BROWN C.L., SWEENEY J.N. & CARR W.H. (1995). High health shrimp systems: seed supply - theory and practice. *In*: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95, San Diego, California, 1–4 February 1995. Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 40–52.

SAKSMERPROME V., JITRAKORN S., CHAYABURAKUL K., LAIPHROM S., BOONSUA K. & FLEGEL T.W. (2011).

Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus Res.*, **160**, 180–190.

SHIKE H., DHAR A.K., BURNS J.C., SHIMIZU C., JOUSSET F.X., KLIMPEL K.R. & BERGOIN M. (2000). Infectious

hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses. *Virology*, **277**, 167–177.

TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., PANTOJA C.R. & LIGHTNER D.V. (2000). Postlarvae and

juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, **190**, 203–210.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 79–85.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2006). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res.*, **118**, 185–191.

TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2007). A PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **74**, 165–170.

TANG K.F.J., POULOS B.T., WANG J., REDMAN R.M., SHIH H.H. & LIGHTNER D.V. (2003). Geographic variations

among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection.

Dis. Aquat. Org., **53**, 91–99.

WEPPE M. (1992). Demonstration de altas cuaidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACOP SPR 43) resistente al virus IHHN. Proceeding of the Ecuadorian Aquaculture Congress. CENAIM, Guayaquil, Ecuador, 229–232.

WYBAN J.A. (1992). Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*. Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 257–268.

ZARAIN-HERZBERG M. & ASCENSIO-VALLE F. (2001). Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*, **193**, 1–9.

*

* *

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по вирусу инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза (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 вирусе инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 1995 г. КАК ИНФЕКЦИОННЫЙ ГИПОДЕРМАЛЬНЫЙ И ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИЙ НЕКРОЗ; ПОСЛЕДНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2018 г.

ГЛАВА 2.2.5.

ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ ИНФЕКЦИОННОГО МИОНЕКРОЗА

1. Предмет рассмотрения

Инфекция вирусом инфекционного мионекроза означает инфекцию патогенным возбудителем вируса инфекционного мионекроза (ВИМН), имеющим схожесть с членами семейства Totiviridae.

2. Информация о болезни

2.1 Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Филогенетический анализ кодирующей последовательности гена РНК-зависимой РНК полимеразы (RdRp) указывает на то, что ВИМН наиболее близкородственен вирусу *Giardia lamblia*, члену семейства Totiviridae (Fauquet с соавт., 2005; Lightner, 2011; Nibert, 2007; Poulos с соавт., 2006).

Частицы ВИМН имеют икосаэдральную форму 40 нм в диаметре с плавучей плотностью 1,366 г мл⁻¹ в хлориде цезия. Геном состоит из одной молекулы двуцепочечной (дц)РНК размером 8226–8230 п.о. (Loу с соавт., 2015; Naim с соавт., 2015). Определение последовательности вирусного генома обнаружило две неперекрывающиеся открытые рамки считывания (ОРС). Первая ОРС (ОРС1, нт 470–5596) кодирует предполагаемый РНК-связывающий белок и капсидный белок. Кодирующий регион РНК-связывающего белка расположен в первой половине ОРС1 и содержит дцРНК-связывающий мотив в первых 60 аминокислотах. Вторая половина ОРС1 кодирует капсидный белок, что было установлено определением аминокислотной последовательности с молекулярной массой 106 кДа. Вторая ОРС (ОРС2, нт 5884–8133) кодирует предполагаемый RdRp (Poulos с соавт., 2006).

Последовательности полных геномов типов ВИМН происхождения из Бразилии и Индонезии были определены и было обнаружено, что они на 99,6% идентичны на нуклеотидном уровне (Poulos с соавт., 2006; Senarip с соавт., 2007). 99,6% идентичность последовательностей полного генома (и разрозненные данные о завозе популяций *P. vannamei* из Бразилии) указывают на то, что болезнь была завезена из Бразилии в Индонезию в 2006 г.

2.1.2 Выживание вне хозяина

Доступна только разрозненная информация. ВИМН является, очевидно, более сложным в плане инактивации с помощью типичных процедур дезинфекции прудов (напр. просушивание на солнце, хлорирование и т.д.), по сравнению с другими вирусами пенеидных креветок, как например вирус синдрома белых пятен (WSSV), вирус желтой головы генотипа 1 (YHV1), вирус синдрома Таура (TSV) и инфекционный гиподермальный и гематопозитический вирус (IHHNV). Существует подозрение о наличии резервуарных хозяев, но никаких задокументированных фактов нет.

2.1.3 Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Данных нет.

2.1.4. Жизненный цикл

Не применимо.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев (общепринятые названия и названия на латыни).

Виды, которые отвечают критериям к внесению в список, как восприимчивые к инфекции ВИМН в соответствии с Главой 1.5 Кодекса здоровья водных животных (Водного кодекса), включают: коричневую тигровую креветку (*Penaeus esculentus*), банановую креветку (*P. merguensis*) и белоногую креветку (*P. vannamei*).

2.2.2. Виды с недостаточной доказанностью восприимчивости

Виды, в отношении которых не существует достаточно доказательства выполнения критериев внесения в список видов, восприимчивых к ВИМН на основании положений Главы 1.5. *Водного кодекса*, включают: гигантскую тигровую креветку (*Penaeus monodon*) и голубую креветку (*Penaeus stylirostris*).

К тому же, патоген-специфичные положительные результаты ПЦР были получены от следующих организмов, но активной инфекции продемонстрировано не было: южная коричневая креветка (*Penaeus subtilis*).

2.2.3. Восприимчивые этапы жизни хозяина

Молодые и подвзрослые особи *P. vannamei*, выращенные в морской, солоноватой и низкосолёной воде, по-видимому, являются наиболее подверженными тяжелой инфекции ВИМН (Lightner, 2011; Lightner с соавт., 2004; Nunes с соавт., 2004; Poulos с соавт., 2006).

2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Нет данных.

2.2.5. Органы-мишени и инфицируемая ткань

Основные ткани-мишени для ВИМН включают поперечнополосатые мышцы (скелетные и менее часто сердечные), соединительные ткани, гематоциты и паренхимные клетки

лимфоидных органов (Lightner, 2011; Lightner с соавт., 2004; Poulos с соавт., 2006; Tang с соавт., 2005).

2.2.6. Персистентная инфекция

Некоторые члены популяций *P. vannamei*, которые выживают после перенесенных инфекций или эпизоотий ВИМН, могут переносить вирус.

2.2.7 Векторы

Определенные данные по векторам отсутствуют. Однако, по причине безоболочечной структуры частицы, скорее всего, ВИМН, как и вирус синдрома Таура, будет сохранять инфекционность в кишечнике и фекалиях морских птиц, которые питаются мертвыми или умирающими креветками на фермах, где протекает инфекция ВИМН, и будет распространяться между и внутри ферм с фекалиями или неперевавленными креветками, содержащимися в отрыжке птиц (Vanpatten с соавт., 2004).

2.3. Паттерн болезни

У молодых или взрослых *P. vannamei* в регионах, где инфекция ВИМН является энзоотической, вспышки инфекции ВИМН связанные с резким повышением смертности, могут возникать после стрессогенных событий, как например вылов сетью, кормление, внезапные изменения в солености или температуре воды и т.д. Креветки на острой стадии болезни ВИМН будут демонстрировать от очаговых до обширных белых некротических областей в поперечнополосатых (скелетных) мышцах, особенно в дистальных брюшных сегментах и в веере хвоста, которые становятся некротическими и краснеют у некоторых креветок. Креветки с тяжелыми поражениями начинают погибать, и смертность может быть высокой после «стрессовой» ситуации и продолжается в течение нескольких дней (Lightner, 2011; Lightner с соавт., 2004; Nunes с соавт., 2004; Poulos с соавт., 2006). Кормовой коэффициент (КК) пораженных популяций может повышаться от обычного показателя на ~ 1,5 до 4,0 или выше (Andrade с соавт., 2007).

2.3.1. Механизмы передачи

Было продемонстрировано, что ВИМН передается горизонтально при каннибализме (Lightner, 2011; Poulos с соавт., 2006). Возможно, существует передача через воду. Несмотря на то, что подозревается возможность вертикальной передачи на основании бессистемных данных, неизвестно, происходит ли она посредством трансовариального механизма или через контаминацию поверхности вновь отложенной икры.

2.3.2. Превалентность

В регионах, где ВИМН является энзоотичным в выращиваемых популяциях *P. vannamei*, его превалентность может достигнуть 100% (Andrade с соавт., 2007; Nunes с соавт., 2004).

2.3.3. Географическое распределение

Сообщалось о том, что инфекция ВИМН была зарегистрирована в северо-восточной Бразилии (Andrade с соавт., 2007; Lightner с соавт., 2004; Nunes с соавт., 2004; Poulos с соавт., 2006) и в Индонезии (Naim с соавт., 2014).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Смертность, вызванная ВИМН, может варьировать в диапазоне от 40 до 70% у выращиваемых *P. vannamei*.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Температура и соленость воды, скорее всего, являются факторами, предрасполагающими к вспышкам болезни, но никаких экспериментальных данных не существует (Nunes с соавт., 2004).

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Эффективных вакцин против инфекции ВИМН не существует.

2.4.2. Фармакотерапия

Нет сообщений об эффективных терапевтических средствах против ВИМН.

2.4.3. Иммуностимуляция

Нет данных.

2.4.4. Разведение резистентных популяций

Существуют отдельные сообщения о некоторых селекционных линиях *P. vannamei*, с более высокой выживаемостью и производственными показателями на фермах, где инфекция ВИМН является энзоотичной. В течение 20-дневного лабораторного исследования в контролируемых условиях, в котором креветок заражали ВИМН, было обнаружено, что

некоторые одомашненные линии *P. vannamei* выживали лучше, чем другие линии (White-Noble с соавт., 2010).

2.4.5. Восстановление популяции резистентными особями

Несмотря на то, что нет опубликованных данных, полагается, что некоторые креветочные фермы в Индонезии заселяли популяциями *P. monodon* и *P. stylirostris*, так как данные предварительного исследования указывали на то, что некоторые виды более резистентны к ВИМН, чем *P. vannamei* (Tang с соавт., 2005).

2.4.6. Блокирующие агенты

Нет данных.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Наряду с тем, что считается, что ВИМН передается вертикально, не существует научных данных, подтверждающих этот путь передачи. Дезинфекция икринок и личинок (Chen с соавт., 1992) является надлежащей практикой содержания, рекомендуемой в целях снижения способности к передаче ряда болезней пенеидных креветок от самок, откладывающих икру яйцам и личинкам; данная практика может сократить контаминацию ВИМН отложенной икры и личинок, появляющихся из них.

2.4.8. Общие практики содержания

Некоторые практики содержания успешно применяются с целью профилактики инфекции ВИМН и развития клинической болезни на креветочных фермах. Главной среди них является применение полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для скрининга маточного стада, выращенного в пруду, и/или икры от этого стада/науплий и отсеивания особей с положительными результатами в ПЦР (Andrade с соавт., 2007). Опустошение и повторное заселение пораженных ферм или целых регионов выращивания популяциями *P. vannamei*, свободными от ВИМН, и создание популяций креветок *P. vannamei*, свободных от патогенных факторов (СПФ) и наиболее подходящих для местных условий выращивания, доказало, что является наиболее успешной практикой содержания для профилактики и контроля других вирусных болезней креветок, которая должна применяться с целью контроля и профилактики инфекции ВИМН (Lee & O'Bryen, 2003; Lightner, 2005; Lightner с соавт., 2009; Moss & Moss, 2009).

3. Отбор проб

3.1. Отбор индивидуальных образцов

Образцы, подходящие для исследования на инфекцию ВИМН с помощью молекулярных методов (напр. ОТ-ПЦР, гнездовая ОТ-ПЦР количественная ОТ-ПЦР и т.д.), включают постличинок, молодых, подвзрослых и взрослых особей. Несмотря на то, что ВИМН может поражать креветок на всех жизненных стадиях, тяжесть инфекции и соответственно

вирусная нагрузка могут быть ниже пределов выявления в отложенной икре и на личиночной стадии, поэтому эти жизненные стадии могут не подойти для выявления ВИМН или сертификации свободы от инфекции ВИМН.

3.2. Сохранение проб для последующего направления на исследования

В отношении рутинной гистологии или молекулярных исследований и руководства по сохранению проб для определенных исследований, см. Главу 2.2.0.

3.3. Объединение проб в пулы

Влияние объединения проб в пулы на диагностическую чувствительность не была оценена, поэтому более крупные креветки должны быть обработаны и исследованы индивидуально. Однако, жизненные стадии небольшого размера, особенно постличинки или образцы весом менее 0,5 г, могут быть объединены в пул для получения достаточного количества материала в целях молекулярного исследования.

3.4. Наиболее подходящие органы и ткани

ВИМН поражает ткани мезодермального происхождения. Основными тканями-мишенями в острой фазе инфекции ВИМН являются поперечнополосатые мышцы (скелетные и менее часто сердечная мышца), соединительные ткани, гемоциты и паренхимные клетки трубочки лимфоидного органа. При хронических инфекциях лимфоидный орган может быть основной тканью-мишенью.

Можно отбирать и использовать гемолимфу или плеоподы, когда необходимо провести исследование на ценном маточном поголовье, не прибегая к умерщвлению.

3.5 Неподходящие пробы/ткани

ВИМН реплицируется систематически, но не реплицируется в кишечных тканях (напр. гепатопанкреас, средняя кишка или ее слепой вырост). Следовательно, кишечные ткани не являются подходящими пробами для выявления инфекции ВИМН.

4. Диагностические методы

4.1. Полевые диагностические методы

4.1.1 Клинические признаки

Пораженные креветки имеют очевидно белые хвосты. Такие тяжело инфицированные креветки могут употреблять корм до наступления стресса и могут иметь полный кишечник. Тяжело пораженные креветки начинают погибать, и смертность может моментально повыситься и быть высокой в течение нескольких дней. Клинические признаки могут проявиться внезапно после пережитых стрессов (напр. вылов сетью, кормление или внезапные изменения в температуре или солености воды).

4.1.2 Изменения в поведении

Только креветки на острой фазе болезни демонстрируют изменения в поведении. Обычно, тяжело пораженные креветки становятся вялыми во время или вскоре после наступления стрессогенного события, такого как вылов сетью, кормление или внезапные изменения в температуре воды или резкое снижение солености воды, и т.д.).

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Креветки в острой фазе болезни демонстрируют от очаговых до обширных белых некротических областей в поперечнополосатых (скелетных) мышцах, особенно в дистальных брюшных сегментах и в веере хвоста, которые становятся некротическими и краснеют у некоторых креветок. Проведение простого иссечения на парных лимфоидных органах обнаружит их гипертрофию (в 3-4 раза больше обычного размера) (Lightner с соавт., 2004; Poulos с соавт., 2006).

4.2.2 Клиническая химия

Не применимо.

4.2.3. Микроскопическая патология

Инфекцию ВИМН в острой и хронической фазе можно предположительно диагностировать с помощью гистологии (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 2011; Lightner с соавт., 2004; Poulos с соавт., 2006). Однако поражения в поперечнополосатых мышцах и лимфоидных органах не являются патогномоничными для инфекции ВИМН. Болезнь белого хвоста пенеидных креветок, вызываемая нодавиром *P. vannamei* (PvNV), может имитировать инфекцию ВИМН (Tang с соавт., 2007). Поэтому информация о диагностике из других источников (напр. история, макроскопические признаки, заболеваемость, смертность или результаты ОТ-ПЦР) могут быть необходимы для подтверждения диагноза инфекцией ВИМН.

С помощью гистологии при использовании обычных, окрашенных гематоксилин-эозином (H&E) парафиновых срезов (Bell & Lightner, 1988), срезы ткани от креветок на острой стадии инфекции ВИМН, демонстрируют мионекроз с характерным коагулятивным некрозом поперечнополосатых (скелетных) мышечных волокон, часто с выраженной отечностью в пораженных мышечных волокнах. Некоторые креветки могут демонстрировать смесь острых и более старых поражений. У таких креветок пораженные мышечные волокна, по-видимому, прогрессируют от коагулятивного некроза до колликвационного некроза, который сопровождается умеренной инфильтрацией и скоплением гемоцитов. При более глубоких поражениях, гемоциты и воспаленные мышечные волокна заменяются рыхлой матрицей фиброцитов и соединительными мышечными волокнами, которые перемежаются с гемоцитами и очагами (предположительно) регенерирующих мышечных волокон (Lightner et al., 2004; Poulos с соавт., 2006).

Значительная гипертрофия лимфоидных органов, вызванная скоплением сфероидов лимфоидных органов - часто встречающееся поражение у креветок в острой или хронической фазе инфекции ВИМН. Часто, многие эктопические сфероиды лимфоидных органов обнаруживаются в других тканях, в отдалении от основного тела лимфоидных органов. Обычное расположение эктопических сфероидов лимфоидных органов включают гемоцель в жабрах, сердце, вблизи от усиковых канальцев железы, и брюшного нервного ствола (Lightner с соавт., 2004; Poulos с соавт., 2006).

4.2.4. Влажные анатомические препараты

Окрашенные или неокрашенные сдавленные препараты ткани пораженной скелетной мышцы или лимфоидного органа могут демонстрировать аномалии. Препараты ткани скелетной мышцы, при изучении с использованием фазово-контрастной или световой микроскопии, могут демонстрировать утрату нормальной исчерченности. Фрагментация мышечных волокон также может быть очевидной. Препараты лимфоидных органов могут демонстрировать значительное скопление сферических масс клеток (сфероиды лимфоидных органов) между обычными канальцами лимфоидных органов.

4.2.5 Мазки

Не применимо.

4.2.6. Фиксированные срезы

См. Раздел 4.2.1

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Не применимо для диагностических целей.

4.3. Обнаружение возбудителя и методы идентификации

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные анатомические препараты

См. Раздел 4.2.4

4.3.1.1.2. Мазки

См. Раздел 4.2.5

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

См. Разделы 4.2.3 и 4.2.6

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные среды

До настоящего момента данных нет.

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе антител

К капсидному белку ВИМН вырабатывались моноклональные антитела (Kunaporparat с соавт., 2011). Вырабатывались три моноклональных тела, и при применении в комбинации, они обеспечивали более высокую чувствительность, чем одно моноклональное тело, используемое по отдельности. Однако чувствительность была приблизительно в десять раз ниже, чем чувствительность одноступенчатого ОТ-ПЦР анализа при использовании одной и той же пробы.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

Опубликованные методики касаются молекулярного выявления ВИМН с помощью гибридизации in-situ, гнездовой ОТ-ПЦР и количественной ОТ-ПЦР в реальном времени (Andrade с соавт., 2007; Poulos с соавт., 2006; Tang с соавт., 2005). Тест-система с использованием гнездовой ОТ-ПЦР для выявления вируса доступна в продаже. Все ПЦР анализы доказали свою специфичность к ВИМН.

Так как чувствительность гнездовой ПЦР и ПЦР в реальном времени более высокая, чем у любого другого диагностического метода на данный момент, достигающая предел выявления в 10 копий вирусного генома, эти анализы являются золотым стандартом для выявления ВИМН (Andrade с соавт., 2007; Poulos с соавт., 2006).

4.3.1.2.3.1. ДНК зонд для выявления ВИМН с помощью гибридизации in-situ

кДНК библиотека была выработана на основе очищенного ВИМН (см. Раздел 4.3.1.2.3.2.1.). ДНК зонд для гибридизации in-situ, специфичный к ВИМН, подготовлен из клона IMNV-317 с помощью ПЦР мечения диоксигенином-11-dUTP (DIG). ПЦР праймеры, используемые для амплификации 993 п.о. зонда - IMNV993F (5'-AAC-ACA-AAA-TCT-GCC-AGC-AA-3') и IMNV993R (5'-CCC-AAC-CAC-CCA-AAT-TCA-TA-3').

После проведения ПЦР, DIG-меченый ДНК зонд, осаждают в спирте, ресуспендируют в воде и хранят при $t - 20^{\circ}\text{C}$ до использования. Процедура гибридизации in-situ для выявления ВИМН описана Tang с соавт., 2005.

4.3.1.2.3.2. ОТ-ПЦР для выявления ВИМН

Метод гнездовой ОТ-ПЦР был разработан для выявления ВИМН с применением двух наборов ПЦР праймеров, которые продуцируют 328 п.о. одноступенчатый ампликон и 139 п.о. двухступенчатый ампликон. Одноступенчатая ПЦР может выявлять лишь 100 РНК копий ВИМН, а двухступенчатая ПЦР может выявлять порядка 10 копий РНК ВИМН (Poulos & Lightner, 2006).

Вирусную РНК можно выделить с помощью любого тест-набора для выявления РНК, доступного в продаже. Объем требуемой ткани будет зависеть от выбранного набора (напр. Тест-набор Qiagen для экстрагирования РНК, тест-набор Promega и Roche для очистки РНК рекомендуют использовать 25 - 50 мг ткани). В зависимости от используемого тест-набора, объем элюирования у Roche и Qiagen и набор для извлечения РНК с малым объемом элюирования составляет 100 мкл. Набор для извлечения РНК с высоким объемом элюирования Promega составляет 500 мкл. Экстрагированную РНК следует хранить при -20°C перед исследованием, однако, долгосрочное хранение РНК требует поддержание температуры в -70°C .

После извлечения РНК, метод описан в Разделе 4.3.1.2.3.2.1. ниже.

4.3.1.2.3.2.1. РНК матрицы

Замороженная или фиксированная в спирте ткань (плеоподы, головогрудь, мышцы).

Гемолимфа (менее чувствительна, чем другие используемые ткани).

Реакционная смесь ОТ-ПЦР (применяемые биосистемы rTth энзим и 5 × EZ буфер #N808-0178):

Реагент	25 мкл реакция	Конечная концентрация
DD H ₂ O	6.5 мкл	–
5 × EZ буфер	5.0 мкл	1 ×
dNTP микс (10мМ каждый)	3.0 мкл	300 мкМ каждого
Праймер F (100 ng мкл ⁻¹)	1.0 мкл	0.62 мкМ
Праймер R (100 ng мкл ⁻¹)	1.0 мкл	0.62 мкМ
Mn(Oac) ₂ (25 мМ)	2.5 мкл	2.5 мМ
rTth энзим (2.5 Ед мкл ⁻¹)	1.0 мкл	0.1 U мкл ⁻¹
Матрица ^a	1–5 мкл	1–50 нг тотальная РНК

а. Матрицу следует кипятить в течение 3 минут и охладить на льду непосредственно перед добавлением в реакционную смесь.

Условия термоциклирования ОТ-ПЦР:

ПЦР праймеры	Температура (°C)	Время	Кол-во циклов	Длина ампликона
4587F / 4914R	60, 95	30 минут, 2 минут	1	328 п.о.
	95, 60	45 секунд, 45 секунд	39	
	60	7 минут	1	

Гнездовая ПЦР (Amersham Biosciences pure Taq Ready-To-Go Beads #27-9558-01):

Реагент	25 мкл реакция	Конечная концентрация
DD H ₂ O	22.5 мкл	–
Праймер NF (100 нг мкл ⁻¹)	1.0 мкл	0.465 мкМ
Праймер NR (100 нг мкл ⁻¹)	1.0 мкл	0.465 мкМ

Матрица ^а	0.5 мкл	—

а. Матрица для гнездовой реакции является продуктом реакции первого этапа.

Условия термоцклирования гнездовой ПЦР:

ПЦР праймеры	Температура (°C)	Время	Кол-во циклов	Длина ампликона
4725NF / 4863NR	95	2 минуты	1	139 п.о.
	95, 65, 72	30 секунд, 30 секунд, 30 секунд	39	
	72	2 минуты	1	

Последовательности праймеров:

Праймеры	Последовательность (5' по 3')	Длина ампликона	Литература
4587F	CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA	328 п.о.	Poulos & Lightner, 2006
4914R	ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT		
4725NF	GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA	139 п.о.	
4863NR	AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G		

4.3.1.2.3.3. Количественная (в реальном времени) ОТ-ПЦР для выявления ВИМН

Метод количественной (в реальном времени) ОТ-ПЦР был разработан для выявления и количественного определения ВИМН в тканях креветок. Метод может обнаруживать всего лишь 10 РНК копий ВИМН на мкл тотальной РНК (Andrade с соавт., 2007). Опубликованный метод описан ниже.

Применялись программное обеспечение Primer Express (Applied Biosystems) с целью проектирования ПЦР праймеров, а также зонд TaqMan, нацеленный на регион OPC1 генома ВИМН (справочный номер в GenBank AY570982 (Andrade с соавт., 2007; Poulos с соавт., 2006). Праймеры IMNV412F (5'-GGA-CCT-ATC-ATA-CAT-AGC-GTT-GCA-3') и IMNV545R (5'-AAC-CCA-TAT-CTA-TTG-TCG-CTG-GAT-3') амплифицируют 134 п.о. ДНК. Зонд TaqMan, IMNVp1 (5'-6FAM-CCA-CCT-TTA-CTT-TCA-ATA-CTA-CAT-CAT-CCC-CGG-TAMRA-3'), который соответствует нуклеотидам 467-500, мечен флюоресцентными красителями 5-карбоксифлуоросцеином (FAM) на своем 5'-конце и

N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксирадомином (TAMRA) на своем 3'-конце. Фрагмент генома ВИМН амплифицируют с помощью ПЦР тест-системы StepOnePlus и TaqMan Fast virus 1-Step Master Mix (Life Technologies). До проведения ОТ-ПЦР, экстрагированную РНК кипятят при 95–100°C в течение 3 минут с целью денатурации дцРНК и сразу же охлаждают на льду. Реакционная смесь содержит 1 мкл пробы РНК, TaqMan мастер-микса (2×), 300 нМ каждого праймера IMNV412F и IMNV545R, 200 нМ IMNVp1TaqMan зонда в 10–20 мкл конечного объема. Используемые условия термоциклирования количественной ОТ-ПЦР следующие: 50°C в течение 3 минут, 95°C в течение 20 секунд с последующими 40 циклами 95°C в течение 3 секунд и 60°C в течение 30 секунд. В конце реакции измеряют интенсивность флуоресценции, порог устанавливают выше базовой линии. Пробы со значением Ct ниже 40 циклов, считаются положительными. Необходимо включить «безматричный» контроль в каждом прогоне реакции. Цель этого действия исключить присутствие контаминантов флуоресценции в реакционной смеси. Положительный контроль должен также быть включен, и это может быть РНК, экстрагированная из ткани, инфицированной ВИМН, или in-vitro транскрибированная РНК ВИМН, содержащая целевую последовательность (см. ниже).

С целью синтеза РНК стандарта для количественной ОТ-ПЦР в реальном времени, ПЦР праймеры IMNV218F и IMNV682R (5'-GCT-GGA-CTG-TAT-TGG-TTG-AG-3' и 5'-AAC-CAA-GTT-CTT-CTT-CTC-CAG-TT-3', соответственно) используются для амплификации 464 п.о. ДНК продукта из генома ВИМН. ПЦР продукт, очищенный с использованием набора для очистки QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) клонировали в pGEM-T Easy Vector. Рекомбинантный плазмид, pIMNV-1, с подтвержденным содержанием 464 п.о. инсерции с помощью секвенирования, был преобразован к линейному виду с помощью переваривания с использованием PstI, и применялся в качестве матрицы для in-vitro транскрипции РНК при использовании T7 РНК полимеразы и ассоциированных реагентов (Promega). РНК синтезировали при 37°C в течение 2 часов в 50 мкл реакции, содержащей 1 мкг ДНК, с последующим перевариванием ДНазы I при 37°C в течение 30 минут для удаления ДНК. Длина и целостность синтетической ссРНК подтверждается электрофорезом в 1,5% агарозном геле, содержащем бромид этидия. РНК очищают с помощью набора для очистки QIAquick PCR Purification kit, количественно определяют спектофотометром, и хранят при –70°C.

4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

Несмотря на то, что ВИМН был выделен из инфицированной ткани креветки с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (Poulos с соавт., 2006), такой метод не рекомендуется для диагностических целей.

4.3.2. Серологические методы

Не применимы, так как креветки являются беспозвоночными, которые не продуцируют специфичных антител, которые могли бы использоваться для демонстрации инфекции с помощью или до подвергания воздействию ВИМН.

5. Ранжирование диагностических тестов на основании цели использования

Методы, доступные на данный момент для целевого надзора, выявления и диагностики ВИМН перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице, указывают: а = метод является рекомендуемым методом по причине доступности, практичности, диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод может применяться в некоторых ситуациях, но затраты, точность или другие факторы значительно ограничивают диапазон его применения; и d = метод на настоящий момент не рекомендуется для проведения в этих целях. Эти данные неким образом субъективны, так как пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и практичности. Несмотря на то, что все тесты, перечисленные как категория а или b, прошли формальные процедуры стандартизации и валидации, их рутинная природа и тот факт, что они широко использовались без получения сомнительных результатов, делает их пригодными.

Таблица 5.1. Методы, используемые для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предположит ельный диагноз	Подтвержда ющий диагноз
	Личинк и	ПЛ	Молодь	Взросл ые		
Макроскопические признаки	d	d	c	c	c	d
Биопроба	d	d	c	c	c	c
Световая микроскопия (влажные препараты)	d	d	d	d	c	c
Гистопатология	d	d	b	b	a	c
Трансм. электронная микроскопия	d	d	d	d	d	d
Иммунологические анализы	d	d	d	d	c	c

ДНК зонды (гибридизация in-situ)	d	d	b	b	a	a
Гнездовая ОТ-ПЦР или ОТ-ПЦР в реальном времени	a	a	a	a	a	a
Секвенирование	d	d	d	d	a	a

ПЛ = постличинки; ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

6. Тесты, рекомендуемые для целевого надзора с целью объявления свободы от инфекции вирусом инфекционного мионекроза

Как указано в Таблице 5.1., гнездовая ОТ-ПЦР (Раздел 4.3.1.2.3.) является рекомендуемым методом для целевого надзора по причине доступности, целесообразности, а также диагностической специфичности и чувствительности.

При расследовании случаев смертности в результате острого воздействия вируса, что являлось частью программы целевого надзора, обнаружение при проведении гистологии характерных поражений, вызванных ВИМН, в поперечнополосатых мышцах и сильной гипертрофии лимфоидных органов, вызванных формированием сфероидов лимфоидных органов (с наличием подтверждения гибридизации in-situ с использованием ВИМН-специфичных ДНК зондов или без него), является подходящим методом (Таблица 5.1.). Возникновение значительной смертности отличает инфекцию ВИМН от болезни белого хвоста пенеидных креветок, вызываемой PvNV, при которой макроскопические признаки и гистопатология походят на инфекцию ВИМН (Tang с соавт., 2007).

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение случая подозрения

Инфекцию ВИМН подозревают, если, по крайней мере, существует одно соответствие следующим критериям:

- i. Клинические признаки, сопоставимые с ВИМН;
или
- ii. Гистопатология, сопоставимая с инфекцией ВИМН;
или
- iii. Положительный результат в гнездовой ОТ- ПЦР или ОТ-ПЦР в реальном времени

7.2. Определение подтвержденного случая

Инфекция ВИМН считается подтвержденной, если существует соответствие двум или более критериям:

- i. Гистопатология, сопоставимая с инфекцией ВИМН
- ii. Положительный результат в гибридизации in-situ на целевых тканях
- iii. Положительные результаты на ВИМН в одноступенчатой или гнездовой ОТ-ПЦР (с последующим секвенированием) или в ОТ-ПЦР в реальном времени.

8. Список литературы

ANDRADE T.P.D., SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2007). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*, 264, 9–15.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*. Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). *Totiviridae*. In: *Virus*

Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Francisco, California, USA, 571–580.

KUNANOPPARAT A., CHAIVISUTHANGKURA P., SENAPIN S., LONGYANT S., RUKPRATANPORN S., FLEGEL

T.W. & SITHIGORNGUL P. (2011). Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. *J. Virol. Methods*, 171, 141–148.

LEE C.S. & O'BRYEN P.J. (2003). *Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 293 pp.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.*, 36, 229–248.

LIGHTNER D.V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J. Invertebr. Pathol.*, 106, 110–130.

LIGHTNER D.V., PANTOJA C.R., POULOS B.T., TANG K.J.F., REDMAN R.M., PASOS-DE-ANDRADE T. & BONAMI

J.R. (2004). Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, 7, 85.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific Pathogen-Free Shrimp Stocks in Shrimp Farming Facilities as a Novel Method for Disease Control in Crustaceans. In: *Shellfish Safety and Quality*. Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, 384–424.

LOY D.S., LIU S., MOGLER M.A., LOY D.J., BLITVICH B.J. & BARTHOLOMAY L.C. (2015). Characterization of newly

revealed sequences in the infectious myonecrosis virus genome in *Litopenaeus vannamei*. *J. Gen. Virol.*, 96, 1821–1829.

MOSS S.M. & MOSS D.R. (2009). Chapter 17. Selective breeding of penaeid shrimp. In: *Shellfish Safety and Quality*. Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, 425–452.

NAIM S., BROWN J.K. & NIBERT M.L. (2014). Genetic diversification of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus between Indonesia and Brazil. *Virus Res.*, 189, 99–105.

NAIM S., TANG K.F.J., YANG M., LIGHTNER D.V. & NIBERT M.L. (2015). Extended genome sequences of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strains from Brazil and Indonesia. *Arch. Virol.*, 160, 1579–1583.

NIBERT M.L. (2007). ‘2A-like’ and ‘shifty heptamer’ motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. *J. Gen. Virol.*, 88, 1315–1318.

NUNES A.J.P., CUNHA-MARTINS P. & VASCONSELOS-GESTEIRA T.C. (2004). Carcinicultura ameaçada. *Rev. Panoram. Aquic.*, 83, 37–51 (in Portuguese).

POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2006). Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Dis. Aquat. Org., 73, 69–72.

POULOS B.T., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. J. Gen. Virol., 87, 987–996.

SENAPIN S., PHEWSAIYA K., BRIGGS M. & FLEGEL T.W. (2007). Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. Aquaculture, 266, 32–38.

TANG K.F.J., PANTOJA C.R., POULOS B.T., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2005). In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). Dis. Aquat. Org., 63, 261–265.

TANG K.F.J., PANTOJA C.R., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2007). Development of in situ hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. Dis. Aquat. Org., 75, 183–190.

TAUKHID & NUR'AINI Y.L. (2009). Infectious myonecrosis virus (IMNV) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Indonesia. Isr. J. Aquacult., 61, 255–266.

VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. Aquaculture, 241, 31–46.

WHITE-NOBLE B.L., LIGHTNER D.V., TANG K.F.J. & REDMAN R.M. (2010). Lab challenge for selection of IMNV-resistant white shrimp. Global Aquaculture Advocate, July/August, 71–73.

*

* *

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по инфекции вирусом инфекционного мионекроза (см. Таблицу в конце этого Водного Руководства или веб-сайт МЭБ, где приведен актуальный список:

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

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2009 Г.; ПОСЛЕДНЯЯ РЕДАКЦИЯ ОТ 2017 Г.

ГЛАВА 2.2.6.

ИНФИЦИРОВАНИЕ НОДАВИРУСОМ *MACHROBRACHIUM ROSENBERGII* (БОЛЕЗНЬ БЕЛОГО ХВОСТА)

1. Предмет рассмотрения

Инфицирование нодавирусом *Macrobrachium rosenbergii* означает заражение патогенным возбудителем нодавирусом *Macrobrachium rosenbergii* (MrNV) (семейство *Nodaviridae*). Заболевание известно как болезнь белого хвоста (WTD).

2. Информация о болезни

2.1. Патогенные факторы

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Этиологическими агентами являются два вирусных возбудителя, а именно MrNV (основной) и мелкоразмерный вирус (XSV) (вирус-помощник) (Qi и др., 2003; Romestand & Bonami, 2003). MrNV играет важную роль при возникновении вспышек болезней, хотя роль XSV в патогенности остается неясной. Штаммы еще не известны. MrNV принадлежит к семейству *Nodaviridae* (Bonami и др., 2005; Кинг и др., 2012). Вирус XSV является первым секвенированным спутниковым вирусом у животных, а также здесь представлен первый отчет о взаимосвязи нодавируса и вируса-спутника. (Bonami и др., 2005).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Данные относительно выживания вируса вне хозяина неизвестны, однако вирусный инокулят, приготовленный из гомогената ткани и хранившийся при температуре -20°C , вызвал 100% смертность у постличинок *M. rosenbergii* при погружении в воду (Qian и др., 2003; Sahul Hameed и др., 2004a).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Данные о стабильности возбудителя не известны. Однако в процессе термической обработки при 65°C в течение 2 часов инфекционность MrNV и

XSV разрушалась при проведении экспериментов по заражению (Qian и др., 2003).

2.1.4. Жизненный цикл

Данные отсутствуют.

2.2. Факторы, связанные с хозяином

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды, которые соответствуют критериям для включения в список восприимчивых к заражению MrNV в соответствии с главой 1.5. *Кодекса здоровья водных животных (Водный кодекс)*, включают: гигантскую речную креветку (*Macrobrachium rosenbergii*).

2.2.2. Виды с неполным доказательством восприимчивости

Виды, для которых имеются неполные доказательства соответствия критериям для включения в список восприимчивых к заражению MrNV в соответствии с главой 1.5. *Водного кодекса*, включают: гигантскую креветку (*Penaeus vannamei*).

Кроме того, у следующих видов сообщалось о патоген-специфических положительных результатах полимеразной цепной реакции (ПЦР) (но не об активной инфекции): розовая королевская креветка (*Penaeus japonicus*), индийская белая креветка (*Penaeus indicus*), тигровая креветка (*Penaeus monodon*), стрекоза (*Aeshna* sp.), гигантский водяной клоп (*Belostoma* sp.), жук (*Cybister* sp.), backswimmer (*Notonecta* sp.), волосатая речная креветка (*Macrobrachium rude*), муссонная речная креветка (*Macrobrachium malcolmsonii*), рассольные креветки (*Artemia* sp.) и красноклешневый раков (*Cherax quadricarinatus*).

2.2.3. Восприимчивые стадии хозяина

Личинки, постличинки и ранняя молодь восприимчивы, тогда как взрослые особи резистентны (Qian и др., 2003; Sahul Nameed и др., 2004a).

2.2.4. Видовая или субпопуляционная предрасположенность (вероятность обнаружения)

Смертность не наблюдалась ни у естественно, ни экспериментально (MrNV/XSV) зараженных подвзрослых и взрослых особей креветок.

Экспериментальные исследования подтвердили вертикальную передачу от зараженного маточного стада к постличинкам (Sudhakaran и др. al., 2007a).

2.2.5. Целевые органы и инфицированные ткани

Проявления MrNV и XSV ограничиваются жаберной тканью, мышцей головы, сердцем, мышцей живота, яичниками, плеоподами и мышцами хвоста, но не гепатопанкреасом или глазными пятнами (Sahul Hameed и др., 2004a; Sri Widada и др., 2003). Плеоподы являются подходящим источником РНК при проведении неразрушающего скрининга на MrNV и XSV (Sahul Hameed и др., 2004a).

2.2.6. Персистентные инфекции

Результаты экспериментального заражения указывают на длительную персистирующую инфекцию у взрослых особей, а также на возможность передачи MrNV от маточного стада личинкам и постличинкам (Sahul Hameed и др., 2004a; Sudhakaran и др., 2007a).

2.2.7. Векторы

Неизвестно.

2.3. Паттерн болезни

Сообщалось о высоком уровне превалентности инфекции MrNV у выращенных в инкубаторе личинок и постличинок *M. rosenbergii*.

2.3.1. Механизмы передачи

Виды передачи: вертикальная (через яйцеклетку) и горизонтальная (водный путь) (Qian и др., 2003; Sahul Hameed и др., 2004a; Sudhakaran и др., 2007a).

2.3.2. Превалентность

Превалентность варьируется от 10% до 100% в инкубаториях, питомниках и выростных хозяйствах (Arcier и др., 1999; Qian и др., 2003; Sahul Hameed и др., 2004a; Sahul Hameed и др., 2004b).

2.3.3. Географическое распределение

Болезнь впервые была зарегистрирована во Французской Вест-Индии (Arcier и др., 1999), позже в Китае (Народная Республика) (Qian и др., 2003), Индии (Sahul Nameed и др., 2004b), Китайском Тайбэе (Wang и др., 2008), Таиланде (Yoganandhan и др., 2006) и Австралии (Owens и др., 2009).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Личинки, постличинки и молодь *M. rosenbergii* очень чувствительны к заражению MrNV, что часто приводит к высокой смертности на этих этапах жизненного цикла. Смертность может достигать максимума примерно через 5 или 6 дней после появления первых грубых признаков. Очень немногие постличинки с инфекцией MrNV выживают после вспышки в течение более 15 дней, и выжившие постличинки могут вырасти до размера, соответствующего калибру торговых стандартов, как и любые другие обычные постличинки. Взрослые особи устойчивы к заражению MrNV, но выступают в качестве переносчиков инфекции (Qian и др., 2003; Sahul Nameed и др., 2004a).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Мало что известно об экологических факторах. Однако вспышки инфекции MrNV могут быть вызваны быстрыми изменениями солености, температуры и pH воды (Arcier и др., 1999; Qian и др., 2003).

2.4. Контроль и профилактика

Информация о контроле и профилактике заражения MrNV ограничена. Тем не менее, надлежащие профилактические меры, такие как скрининг маточных стад и постличинок, а также применение надлежащих практик управления могут помочь предотвратить заражение MrNV в системах выращивания креветок. Поскольку жизненный цикл *M. rosenbergii* завершается в контролируемых условиях, свободное от специфических патогенов (SPF) маточное стадо и постличинки могут быть получены путем скрининга с использованием чувствительных методов диагностики, таких как полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА) (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada и др., 2003; Yoganandhan и др., 2005).

2.4.1. Вакцинация

В настоящее время отсутствует.

2.4.2. Химиотерапия

О каких-либо известных химиотерапевтических средствах при заражении MrNV не сообщалось.

2.4.3. Иммуностимуляция

Отчеты относительно использования иммуностимуляторов при заражении MrNV отсутствуют.

2.4.4. Разведение резистентных популяций

Не сообщалось.

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

Сообщения о возникновении резистентных видов отсутствуют.

2.4.6. Блокирующие агенты

Не известно.

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Рекомендуются обычные процедуры для контроля вирусных болезней ракообразных. Например, применение формалина или йодофора помогает уничтожить вирус (Chen и др., 1992).

2.4.8. Общие аспекты практики разведения

В процессе экспериментального заражения была подтверждена возможность горизонтальной и вертикальной передачи MrNV в культуральные системы (Qian и др., 2003; Sahul Nameed и др., 2004a; Sudhakaran и др., 2007a). Соответствующие методы ведения хозяйства, такие как надлежащая дезинфекция резервуаров, воды и маточного стада, а также использование маточного поголовья, показавшего отрицательные результаты в ОТ-ПЦР в выростных прудах инкубаториев, могут быть использованы для предотвращения заражения MrNV в системах культивирования (Chen и др., 1992; Sri Widada и др., 2003; Sudhakaran и др., 2008a). Нет данных о том, что севооборот как с рисом, так и выращивание рыбы в поликультуре предотвращает заражение MrNV. Некоторые фермеры рассматривали либо смешанную культуру креветок (*P. monodon*) с *M. rosenbergii*, либо севооборот этих двух видов как жизнеспособную альтернативу для их существования и экономической жизнеспособности. Эта

ситуация предполагает возможность передачи патологически значимых организмов от нативных к ненативным хозяевам, как это было отмечено Sudhakaran и др., 2006 и Рави и др., 2009 в своих исследованиях. Исходя из их результатов, представляется целесообразным избегать смешивания культуры *M. rosenbergii* с *P. monodon* до принятия каких-либо профилактических мер в управлении инфекцией MrNV.

3. Отбор проб

3.1. Отбор индивидуальных образцов

На инфекцию MrNV указывает беловатое окрашивание мышц живота и хвоста (Arcier и др., 1999; Romestand & Bonami, 2003; Sahul Hameed и др., 2004b). Тем не менее, этот клинический признак не является специфическим для инфекции MrNV, и диагностика затруднена, особенно на ранних стадиях инфекции. Постличинки, пораженные инфекцией MrNV, имеют более молочную окраску и становятся непрозрачными. Обычно при появлении этого клинического признака наступает смерть; уровень смертности варьируется и достигает 95%. Наиболее пораженными тканями у умирающих постличинок/ранней молодежи являются поперечно-полосатые мышцы брюшка, головогруды и хвоста. Постличинки, мышцы которых имеют беловатый цвет, подходят для диагностических целей (Sahul Hameed и др., 2004a).

3.2. Сохранение образцов для последующего направления на исследования

Инфицированные личинки/постличинки с явными признаками беловатой мускулатуры в области брюшка отбирают в зоне вспышки болезни. Образцы промывают в стерильном физиологическом растворе, переносят в стерильные пробирки, транспортируют в лабораторию на сухом льду и хранят при -70°C до дальнейшего использования (Sahul Hameed и др., 2004b; Sri Widada и др., 2003; Yoganandhan и др., 2005). Замороженные образцы могут быть использованы для проведения реакции выделения и обнаружения вируса с помощью ОТ-ПЦР или ИФА (Romestand & Бонами, 2003). Образцы для обнаружения вируса методом ОТ-ПЦР можно транспортировать в лабораторию после фиксации в 70% этаноле (Sahul Hameed и др., 2004b; Sri Widada и др., 2003; Yoganandhan и др., 2005). Смотрите также Главу 2.2.0.

3.3. Объединение образцов в пулы

Оценка влияния объединения пробы на диагностическую чувствительность не проводилась, поэтому креветки большего размера следует препарировать и исследовать отдельно. Однако образцы креветок, особенно на постличиночной стадии или особи весом менее 0,5 г, могут быть объединены для получения достаточного материала для молекулярных исследований. Крупные креветки необходимо препарировать по отдельности, так как влияние объединения на диагностическую чувствительность не оценивалось. См. также главу 2.2.0.

3.4. Наиболее подходящие для исследования органы или ткани

Предпочтительно использовать целое тело постличинки (Sahul Nameed и др., 2004b; Sri Widada и др., 2003; Yoganandhan и др., 2005). Все органы, кроме глазных стебельков и гепатопанкреаса, взрослой особи *M. rosenbergii* подходят для скрининга на вирус методом ОТ-ПЦР. Плеоподы (плавательные ноги) являются подходящим источником РНК при проведении неразрушающего скрининга на MrNV и XSV (Sahul Nameed и др., 2004a).

3.5. Не подходящие для исследования образцы/ткани

Глазные стебельки и гепатопанкреас взрослых особей креветок не подходят (Sahul Nameed и др., 2004a; Sri Widada и др., 2003).

4. Диагностические методы

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Инфицированные постличинки становятся непрозрачными и приобретают беловатую окраску, особенно в области брюшка. Помутнение появляется в первую очередь во втором или третьем сегменте брюшной полости и постепенно распространяется как спереди, так и сзади. В тяжелых случаях может произойти дегенерация тельсона и уropода. Смертность может достигать максимума примерно через 5 дней после появления первых явных признаков.

4.1.2. Изменения в поведении

Креветки на постличиной стадии высоко восприимчивы к инфекции MrNV, и смертность достигает максимума примерно через 5 дней после появления беловатой окраски. Плавающий в резервуарах экзувий (сброшенный при линьке покров) имеет нездоровый вид и напоминает «слюдяные хлопья» (Arcier и др., 1999). У инфицированных постличинок развивается анорексия и ухудшается способность плавания (Sahul Nameed и др., 2004a).

4.2. Клинические методы

4.2.1. Грубая патология

Для инфекции MrNV и XSV характерно потемнение мышц брюшной полости. Однако этот клинический признак не является патогномоничным.

4.2.2. Микроскопическая патология

Наиболее пораженной тканью у инфицированной постличинки является поперечно-полосатая мышца головогруды, брюшной полости и хвоста. Гистологические особенности включают в себя наличие острого ценкеровского некроза (описан Ценкером) поперечно-полосатых мышц, характеризующегося выраженной гиалиновой дегенерацией, некрозом и мышечным лизисом. Наблюдаются также умеренный отек и аномальные свободные участки среди пораженных мышечных клеток, а также наличие больших овальных или неправильной формы базофильных цитоплазматических телец-включений

в инфицированных мышцах (Arcier и др., 1999; Hsieh и др., 2006). Патогномоничные овальные или неправильной формы базофильные цитоплазматические тельца-включения выявляют в тканях-мишенях с помощью гистологического исследования (Arcier и др., 1999; Се и др. al., 2006).

Присутствие MrNV в инфицированных клетках может быть выявлено в гистологических срезах с использованием DIG-меченого *in situ* гибридизационного ДНК-зонда, специфичного для MrNV. (Sri Widada и др., 2003).

4.2.3. Влажные препараты

Отсутствуют в настоящее время.

4.2.4. Мазки

Отсутствуют в настоящее время.

4.2.5. Электронная микроскопия / цитопатология

При использовании просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) инфицированные клетки выглядят некротическими с дезорганизованной цитоплазмой. ПЭМ-исследования показали, что в цитоплазме соединительных клеток и мышечных клеток присутствуют два типа непокрытых парасферических вирусных частиц разных размеров. Для MrNV характерны крупные вирусные частицы диаметром 26–27 нм, имеющие пять-шесть сторон. Меньшие вирусные частицы, схожие по структуре (от пяти до шести сторон), но диаметром 14–16 нм, характерны для XSV (Qian и др., 2003).

4.3. Методы выявления и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

Для обнаружения MrNV / XSV доступны методы диагностики на основе генома и антител (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada и др., 2003; Yoganandhan и др., 2005).

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Отсутствуют в настоящее время.

4.3.1.1.2. Мазки

Отсутствуют в настоящее время.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

См. раздел 4.2.2

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток / искусственные среды

MrNV/XSV может легко репродуцировать в клеточной линии комара *Aedes albopictus* C6/36 (Sudhakaran и др., 2007b), и эту клеточную линию можно легко культивировать в среде Лейбовица L-15, содержащей 100 международных единиц мл⁻¹ пенициллина, 100 мкг мл⁻¹ стрептомицина и 2,5 мкг мл⁻¹ фунгизона с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки при температуре 28°C. (Sudhakaran и др., 2007b). Было обнаружено, что клеточная линия C6/36 подходит для размножения этих вирусов, и репликация вируса была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР, окрашивания акридиновым оранжевым, тестов на инфекционность и электронной микроскопии. Специфический цитопатический эффект не наблюдался в клеточных линиях, инфицированных MrNV, но наблюдались множественные вакуолизации. Другие клеточные линии, а именно клеточная линия из ткани рыб CCH-1, частично поддерживали размножение этих вирусов (Hernandez-Herrera и др., 2007).

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигенов на основе антител

Основанные на антителах методы диагностики для MrNV включают ИФА, описанный Romestand & Bonami (Ravi и др., 2009) или сэндвич с тройным антителом (TAS) ELISA на основе моноклонального антитела (Qian и др., 2006).

4.3.1.2.2.1. Протокол ИФА (Romestand & Bonami, 2003)

- i) Инфицированные или здоровые образцы постличинок гомогенизируют в 0,5 мл фосфатно-буферного раствора (ФБР) и центрифугируют при 10 000 g в течение 15 минут. Супернатант собирают и хранят при температуре -20 ° C для диагностических целей.

- ii) На ИФА планшеты наносят по 50 мкл образца супернатанта на лунку и инкубируют в течение ночи при температуре 4°C.
- iii) Блокируют 250 мкл 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФБР в течение 1 часа при температуре 37°C.
- iv) Добавляют 50 мкл антител класса G к вирусу MrNV (IgG анти-MrNV) с 1% БСА и инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре.
- v) Добавляют 50 мкл анти-мышинного IgG, конъюгированного с пероксидазой, в концентрации 0,4 мкг/мл и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.
- vi) Добавляют 50 мкл ортофенилендиамин хромогена в концентрации 0,4 мг/мл⁻¹ в субстратном буфере (лимонная кислота 0,1 М, ацетат натрия 0,1 М, рН 5,4, H₂O₂ в конечной концентрации 0,33%).
- vii) Реакцию останавливают через 15 минут, добавляя 25 мкл H₂SO₄ в каждую лунку.
- viii) С помощью ИФА планшет-ридера измеряют ОП (оптическую плотность) при 492 нм.

ПРИМЕЧАНИЕ: между каждым из вышеописанных этапов необходимо дважды промывать ФБР.

4.3.1.2.2.2. Протокол TAS-ELISA (Qian и др., 2006)

- i) ИФА планшеты сенсibilизируют кроличьими поликлональными антителами к MrNV, инкубируют в течение 2 часов при температуре 37 °C и перед использованием хранят при 4 °C.
- ii) Блокируют 250 мкл 1% БСА в ФБР в течение 1 часа при температуре 37 °C.
- iii) Гомогенизируют инфицированные или здоровые образцы постличинок в 0,5 мл ФБР и центрифугируют при 10000 g в течение 15 минут. Супернатант собирают и хранят при -20 ° C для диагностических целей.
- iv) Добавляют 100 мкл образца в каждую лунку и инкубируют в течение ночи при 4 ° C.
- v) Добавляют 50 мкл моноклонального антитела к MrNV к 1% БСА, и инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре.
- vi) Добавляют 50 мкл анти-мышинного IgG, конъюгированного с пероксидазой, в концентрации 0,4 мкг/мл и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.
- vii) Добавляют 50 мкл ортофенилендиамин хромогена в концентрации 0,4 мг/мл⁻¹ в субстратном буфере (лимонная кислота 0,1 М, ацетат натрия 0,1 М, рН 5,4, H₂O₂ в конечной концентрации 0,33%).
- viii) Реакцию останавливают через 15 минут путем добавления 25 мкл H₂SO₄ в каждую лунку.

- ix) С помощью ИФА планшет-ридера измеряют ОП (оптическую плотность) при 492 нм.

ПРИМЕЧАНИЕ: между каждым из вышеописанных этапов необходимо дважды промывать ФБР.

4.3.1.2.3. Молекулярные техники

4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Во всех случаях рекомендуется протокол ОТ-ПЦР для обнаружения MrNV / XSV, разработанный Sri Widada и др., 2003, Sahul Хамид и др., 2004 и Sahul Nameed и др., 2004b. MrNV и XSV могут быть обнаружены с помощью ОТ-ПЦР отдельно с использованием определенного набора праймеров, или эти два вируса могут быть обнаружены одновременно с использованием одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР (Yoganandhan и др., 2005). Гнездовая ОТ-ПЦР (ОТ-гПЦР) также доступна и рекомендуется для скрининга маточного стада и племенного поголовья. (Sudhakaran и др., 2007a).

Экстракция общей РНК

- i) Отбирают 50 мг постличинкок или 100 мг фрагмента органа (жаберная ткань, мышцы живота, хвостовая мышца или плеоподы) от взрослых креветок и гомогенизируют в 300 мкл буфера TN (20 mM Трис/HCl, 0,4 M NaCl, pH 7,4).
- ii) Гомогенат центрифугируют при 12000 g в течение 15 минут при комнатной температуре и собирают супернатант.
- iii) Берут 150 мкл супернатанта и добавляют 1 мл Тризола. Тщательно перемешивают и инкубируют в течение 5 минут при комнатной температуре.
- iv) Через 5 минут к образцу добавляют 200 мкл хлороформа, хорошо перемешивают и центрифугируют при 12 000 g в течение 15 минут при комнатной температуре.
- v) Собирают водную фазу, переносят в свежую пробирку и осаждают РНК, смешивая с 500 мкл изопропанола.
- vi) Инкубируют образец в течение 10 минут при комнатной температуре и центрифугируют при 12000 g в течение 10 минут при 4 °C.
- vii) Растворяют осадок РНК в 50 мкл ТЕ-буфера (10 mM Трис/HCl, 1 mM ЭДТА [этилендиаминтетрауксусная кислота], pH 7,5) после промывания 75% этиловым спиртом.
- viii) Проводят количественное определение РНК путем измерения

**оптической плотности при 260 нм с использованием УФ-
спектрофотометра и проверку чистоты путем измерения
соотношения ОП_{260 нм}/ ОП_{280 нм}**

Протокол проведения ОТ-ПЦР

Для обнаружения MrNV и XSV описаны три метода ОТ-ПЦР. Первый протокол представляет собой одностадийную ОТ-ПЦР, адаптированную Sri Widada и др., 2003 и Sahul Hameed и др., 2004b, и этот метод может быть использован для подтверждения MrNV и XSV у креветок на постличиночной стадии, отобранных во время предполагаемых вспышек WTD. Вторым протоколом является чувствительным протоколом ОТ-гПЦР, описанным Sudhakaran и др., 2007a. Этот тест может быть использован для скрининга на вирусы здоровых постличинок, молоди и маточного стада. Третий протокол представляет собой мультиплексную процедуру ОТ-ПЦР, который был адаптирован у Yoganandhan и др., 2005. Он может использоваться для одновременного обнаружения MrNV и XSV при вспышках болезней или для скрининга племенного и маточного стада. Во всех описанных здесь протоколах используется коммерческий тест-набор ОТ-ПЦР, позволяющий осуществлять обратную транскрипцию и амплификацию в одной реакционной пробирке.

Протокол 1: ОТ-ПЦР для специфического выявления MrNV или XSV у зараженных постличинок или молоди креветок (Sahul Хамид и др., 2004b; Sri Widada и др., 2003; Sudhakaran и др., 2008b):

Следующие контроли должны быть включены в каждый анализ ОТ-ПЦР на MrNV или XSV: а) известный MrNV/XSV-отрицательный образец ткани; б) известный MrNV/XSV-положительный образец (ткань или очищенный вирус); и в) контроль «без матрицы».

Для ОТ-ПЦР используется коммерческий набор ОТ-ПЦР. Реакцию проводят в 50 мкл буфера ОТ-ПЦР, содержащего 20 пмоль каждого праймера, специфичного для матрицы MrNV или XSV, и матрица РНК (10–100 нг), с использованием следующих циклов: ОТ при 52°C в течение 30 минут; денатурация при 95°C в течение 2 минут с последующими 30 циклами денатурации при 94°C в течение 40 секунд, отжигом при 55°C в течение 40 секунд и элонгацией при 68°C в течение 1 минуты, заканчивающимся дополнительной стадией элонгации в течение 10 минут при 68°C. Продукты ОТ-ПЦР анализируют с помощью электрофореза на 1% агарозном геле, окрашенном бромидом этидия и подходящим лестничным маркером ДНК, и обнаруживают с использованием ультрафиолетового трансиллюминатора.

На положительный результат реакции указывает продукт длиной 425 п.о. в случае MrNV и продукт длиной 546 п.о. в случае XSV. Чувствительность анализа составляет приблизительно 2,5 fg от общей РНК.

Последовательности ПЦР-праймеров для MrNV (температура отжига 55 °C; размер продукта 425 п.о.):

Вперед: 5'-GCG-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG-3'

Реверс: 5'-AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG-3'

Последовательности ПЦР-праймеров для XSV (температура отжига 55 °C; размер продукта 546 п.о.):

Вперед: 5'-CGC-GGA-TCC-GAT-GAA-TAA-GCG-CAT-TAA-TAA-3'

Реверс: 5'-CCG-GAA-TTC-BKT-TAC-TGT-TCG-ГАГ-TCC-CAA-3'

Протокол 2: Гнездовая ОТ-ПЦР для обнаружения MrNV и XSV(Sudhakaran и др., 2007a)

Метод гнездовой ОТ-ПЦР является более чувствительным и подходящим для проведения скрининга племенного и маточного стада.(Sudhakaran и др., 2007a).

При проведении гнездовой ОТ-ПЦР, первый этап ОТ-ПЦР, как описано в протоколе 1, должен выполняться с использованием внешних праймеров, а гнездовая ПЦР должна выполняться с использованием продукта ОТ-ПЦР в качестве матрицы. Для проведения гнездовой ОТ-ПЦР, добавьте 2 мл продукта ОТ-ПЦР в пробирку для ПЦР, содержащую 20 мкл реакционной смеси (10 mM Трис / HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% Тритон X-100, 200 мкМ каждого dNTP, 20 пмоль каждого внутреннего праймера, 1,25 ед. термостабильной ДНК-полимеразы). Протокол ОТ-гПЦР для обоих вирусов

предполагает начальную температуру 95°C в течение 10 минут, затем 30 циклов: в течение 1 минуты при 94°C, 1 минуты при 55°C и 1 минуты при 72°C с окончательной экстензией при 72°C в течение 5 минут. Анализируют продукты гнездовой ОТ-ПЦР с помощью электрофореза на 1% агарозном геле, окрашивают бромидом этидия и подходящим лестничным маркером ДНК и обнаруживают с использованием ультрафиолетового трансиллюминатора.

Если вирусная нагрузка достаточно высока, 425 п.о.-продукт будет амплифицирован для MrNV и 546 п.о.-продукт будет амплифицирован для XSV на первом этапе ПЦР. На этапе гПЦР продукт длиной 205 п.о. указывает на обнаружение MrNV, а продукт длиной 236 п.о. указывает на обнаружение XSV. Чувствительность обнаружения ОТ-гПЦР в ~ 1000 раз выше, чем в одностадийной ОТ-ПЦР.

Последовательность внешних праймеров для MrNV и XSV приведена в протоколе 1, а последовательность внутренних праймеров приведена ниже:

Последовательность внутренних праймеров для MrNV (температура отжига 55 ° С; размер продукта 205 п.о.):

Вперед: 5'-GAT-GAC-CCC-AAC-GTT-ATC-CT-3 '

Реверс: 5'-GTG-TAG-TCA-CTT-GCA-AGA-GG-3'

Последовательность внутренних праймеров для XSV (температура отжига 55°C; размер продукта 236 п.о.):

Вперед: 5'-ACA-TTG-GCG-GTT-GGG-TCA-TA-3 '

Реверс: 5'-GTG-CCT-GTT-GCT-GAA-ATA-CC-3'

Протокол 3: мультиплексный анализ ОТ-ПЦР для одновременного обнаружения MrNV и XSV (Yoganandhan и др., 2005):

Чтобы избежать необходимости проведения двух отдельных реакций ОТ-ПЦР, может быть выполнен модифицированный метод одновременного обнаружения MrNV и XSV методом однопробирочной одноэтапной мультиплексной ОТ-ПЦР. Реакцию проводят в 50 мл буфера для ОТ-ПЦР, содержащего 20 пмоль каждого праймера, специфичного для MrNV и XSV, и матрицы РНК (10–100 нг), используя следующие циклы: ОТ при 52 °С в течение 30 минут; денатурация при 95°C в течение 2 минут с последующими 30 циклами денатурации при 94°C в течение 40 секунд, отжигом при 55°C в течение 40 секунд и экстензией при 68°C в течение 1 минуты, заканчивающимся дополнительной стадией экстензии в течение 10 минут при 68°C. Анализируют продукты ОТ-ПЦР с помощью электрофореза на 1% агарозном геле, окрашивают бромидом этидия и соответствующим лестничным маркером ДНК и обнаруживают с использованием ультрафиолетового трансиллюминатора.

Если в образце присутствуют MrNV и XSV, то будут амплифицированы продукт длиной 681 п.о. для MrNV и продукт длиной 500 п.о. для XSV. Наличие как 681 п.о.-, так и 500 п.о.-продуктов указывает на присутствие MrNV и XSV. Чувствительность определения мультиплексной ОТ-ПЦР составляет приблизительно 25 фг общей РНК.

Последовательности праймеров для ПЦР для MrNV (температура отжига 55 °C; размер продукта 681 п.о.):

Вперед: 5'-GAT-ACA-GAT-CCA-CTA-GAT-GAC-C-3 '

Реверс: 5'-GAC-GAT-AGC-TCT-GAT-AAT-CC-3 '

Последовательности праймеров для ПЦР для XSV (температура отжига 55 °C; размер продукта 500 п.о.):

Вперед: 5'-GGA-GAA-CCA-TGA-GAT-CAC-G-3 '

Реверс: 5'-CTG-CTC-ATT-ACT-GTT-CGG-AGT-C-3 '

Протокол 4: количественный анализ ОТ-ПЦР

Количественный анализ ОТ-ПЦР (ОТ-кПЦР) может быть выполнен для количественной оценки MrNV/XSV в инфицированных образцах с использованием зеленого красителя SYBR на основе метода, описанного Hernandez-Herrera и др., 2007 и Чжан и др., 2006,

- i) **Общую РНК экстрагируют из образцов в соответствии с процедурой, указанной выше.**
- ii) **Образцы РНК инкубируют при 37°C в течение 1 часа в смеси для ОТ (150 нг общей РНК, 8 мкл ⁻¹ мМ-MLV [вирус мышинного лейкоза Молони] ОТ в буфере, 20 нг мкл ⁻¹ гексапримеров и 0,2 мМ dNTP) для получения общей кДНК и количественного определения кДНК путем измерения поглощения при 260 нм.**
- iii) **Выполняют ОТ-кПЦР с использованием смеси для к-ПЦР (1 мкл кДНК [10 нг], 6 мкл стерильной воды, 0,5 мкл каждого праймера, специфичного для MrNV и XSV [концентрация 25 мкМ] и 2 мкл реакционной смеси, содержащей Fast Start *Taq* полимеразу, смесь для dNTP, краситель SYBR зеленый, 10 мМ MgCl₂ и 1 мкл раствора красителя).**
- iv) **Программа ПЦР состоит из начальной активации *Taq*-полимеразы в течение 10 минут при 95°C, затем 40 циклов по 15 секунд при 95°C, 5 секунд при 60°C и 10 секунд при 72°C. Температура плавления будет измеряться при понижении температуры до 70°C в течение 30 секунд и постепенного нагревания до 95°C в течение 10 минут. Реакции отрицательного контроля должны содержать воду вместо матрицы кДНК в каждом цикле, чтобы гарантировать отсутствие вирусов.**
- v) **Количество копий вирусной кДНК в образце определяют с использованием анализатора Light Cycler.**
Последовательности праймеров для ПЦР для MrNV (температура отжига 60 °C; размер продукта 211 п.о.):
Вперед: 5'-AGG-ATC-CAC-TAA-GAA-CGT-GG-3 '

Реверс: 5'-CAC-GGT-CAC-AAT-CCT-TGC-G-3 '

Последовательности праймеров для ПЦР для XSV (температура отжига 58 ° C; размер продукта 68 п.о.):

Вперед: 5'-AGC-CAC-ACT-CTC-GCA-TCT-GA-3 '

Реверс: 5'-CTC-CAG-CAA-AGT-GCG-ATA-CG-3 '

4.3.1.2.3.2. Метод гибридизации in-situ (Sri Widada и др., 2003; Zsica и др., 2004)

- i) Инфицированные постличинки фиксируют в нейтрально-буферном модифицированном фиксаторе Дэвидсона без уксусной кислоты (РНК-соответствующий фиксатор) (Hasson и др., 1997).
- ii) Заливают ткани в парафин в соответствии со стандартными процедурами (Bell & Lightner, 1988) и нарезают срезы толщиной 7 мкм. Срезы помещают на положительно заряженные предметные стекла микроскопа.
- iii) Слайды высушивают в печи при 60°C. Удаляют парафин и регидратируют путем проведения серий превращения этанола в воду.
- iv) Срезы инкубируют дважды в течение 5 минут с Трис/НСl, обработанным диэтилпирокарбонатом (DEPC) (0,2 М, рН 7,4), и затем в течение 10 минут с трис/НСl, обработанным DEPC, содержащим 100 мМ глицина.
- v) Срезы обрабатывают в течение 5 минут при 37°C с помощью ТЕ-буфера (10 мМ Трис/НСl, 5 мМ ЭДТА, рН 8,0), содержащего 10 мкг мл⁻¹ РНКаз-свободной протеиназы К.
- vi) Срезы постфиксируют DEPC-обработанным ФБР, содержащим 4% формальдегида, в течение 5 минут.
- vii) Срезы ацетируют в течение 10 минут 0,1 М триэтаноламиновым (ТЭА) буфером, рН 8, содержащим 0,25% (об. / об.) уксусного ангидрида.
- viii) После дегидратации инкубируют предметные стекла при 42°C в течение 16 часов во влажной камере с гибридизационным буфером, содержащим 40% деионизированного формамида, 10% декстрансульфата, 1 × раствор Денхарта, 4 × SSC (стандартный солевой цитрат), 10 мМ дитиотрептола (DTT).), 1 мг мл⁻¹ дрожжевой tРНК, 1 мг мл⁻¹ денатурированной и расщепленной ДНК спермы лосося и 40 нг мл⁻¹ денатурированной дигоксигенин-меченой ДНК-зонда, специфичной для MrNV.
- ix) Слайды промывают при 37 ° C в течение 10 минут с 1 × SSC, в течение 10 минут с 0,5 × SSC и в течение 5 минут дважды с буфером III (100 мМ Трис/НСl [рН 7,5], 150 мМ NaCl).

- x) Инкубируют в течение 20 минут в буфере IV (буфер III, 1% нормальная сыворотка козы) при комнатной температуре.
- xi) Слайды инкубируют в течение 1 часа во влажной камере с буфером III, содержащим 1% нормальной сыворотки козы и 0,1% овечьей анти-DIG щелочной фосфатазы.
- xii) Слайды последовательно промывают три раза буфером III в течение 10 минут и дважды буфером V в течение 5 минут (100 mM Трис/HCl [pH 9,5], 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂).
- xiii) Реакцию продолжают, инкубируя слайды в буфере V, содержащем NBT и BCIP, в темной и влажной камере в течение минимум 2 часов или в течение ночи. Реакцию останавливают, инкубируя слайды в буфере III 2× в течение 15 минут.
- xiv) Слайды сенсibiliзируют 1% -ным коричневым бисмарком, закрепляют покровным стеклом и осматривают с помощью светлопольного микроскопа.
- xv) Положительная гибридизация проявляется в виде темно-синего или черного осадка на фоне желтого до коричневого оттенка.

4.3.1.2.3.3. Петлевая изотермическая амплификация (Haridas и др., 2010; Pillai и др., 2006; Puthawibool и др., 2010)

Haridas и др., 2010, а также Pillai и др., 2006 применили петлевую изотермическую амплификацию (LAMP) для быстрой диагностики MrNV и XSV у пресноводной креветки. Набор из четырех праймеров (двух внешних и двух внутренних) был отдельно разработан для обнаружения MrNV и XSV. Кроме того, для ускорения реакции LAMP была использована пара петлевых праймеров, специфичных для MrNV и XSV.

- i) Экстрагирование суммарной РНК из образцов было проведено в соответствии с процедурой, указанной выше.
- ii) В реакционной смеси проводят реакцию RT-LAMP (2 мкМ каждого из внутренних праймеров FIP и BIP, 0,2 мкМ каждого из внешних праймеров F3 и B3, 1400 мкМ смеси dNTP, 0,6 М бетаина, 6 mM MgSO₄, 8 ед. Bst ДНК-полимеразы вместе с 1 × поставляемым буфером, 0,125 ед. РТазы AMV и указанное количество матрицы РНК в конечном объеме 25 мкл) при температуре 55, 60, 63 и 65°C для каждого с последующей инактивацией путем нагревания при 80°C в течение 2 минут для прекращения реакции. Неинфицированные образцы и реакционная смесь без матрицы служат отрицательным контролем.
- iii) Проводят анализ продуктов LAMP с помощью электрофореза на 2% агарозном геле, окрашивание бромидом этидия и подходящим лестничным маркером ДНК и осуществляют детекцию с использованием ультрафиолетового трансиллюминатора.
- iv) Амплификацию ДНК можно обнаружить без использования электрофореза в агарозе, добавив 1,0 мкл 10% разбавленного зеленого SYBR к реакционной смеси и наблюдая за изменением

цвета.

4.3.1.2.3.4. Секвенирование

Для подтверждения предполагаемых новых хозяев MrNV/XSV фрагмент ДНК, амплифицированный из ПЦР, должен быть секвенирован в соответствии со стандартными протоколами. (Sambrook и Russell, 2001).

4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

MrNV и XSV могут быть очищены в соответствии с протоколом, описанным Bonami и др., 2005. Подробная процедура очистки вируса приведена ниже:

- i) **Отбирают достаточное количество зараженных постличинок и гомогенизируют в ФБР (pH 7,4), измельчая ткани блендером.**
- ii) **Центрифугируют при 10 000 g в течение 25 минут при температуре 4 °С. Супернатант собирают и снова центрифугируют при 160000 g в течение 4 часов при температуре 4 °С.**
- iii) **Суспендируют осадок в ФБР и экстрагируют два или три раза с фреоном (1,1,2-трихлор-2,2,1-трифторэтан).**
- iv) **Собирают водный слой и центрифугируют при 160 000 g в течение 4 часов при температуре 4 °С.**
- v) **Суспендируют осадок в буфере TN и разделяют два вируса 15–30% (вес/объем в ФБР) градиентом сахарозы с последующим градиентом CsCl.**
- vi) **Оценивают уровень очистки вирусов с помощью ПЭМ, используя сетки с коллоидон-углеродным покрытием, отрицательно окрашенные 2% ФВК (фосфорновольфрамовой кислоты), pH 7,0.**

4.3.2. Серологические методы

Не разработаны.

5. Рейтинг тестов по назначению

Методы, доступные в настоящее время для целевого наблюдения и диагностики инфекции MrNV, перечислены в таблице.5.1. Обозначения, используемые в таблице, указывают на следующее: а = метод является рекомендуемым методом в силу доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с надлежащей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод имеет применение в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы серьезно ограничивают его применение; и d = метод в настоящее время не рекомендуется для этой цели. Обозначения

несколько субъективны, так как параметр соответствия включает вопросы надежности, чувствительности, специфичности и полезности. Поскольку не все тесты, перечисленные как категории а или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы целевого надзора и диагностики *MrNV*

Метод	Целевой надзор				Предполагаемый диагноз	Подтверждающий диагноз
	Постличинки	Постличинки	Постличинки	Постличинки		
Визуальные признаки					с	
Гистопатологический анализ					с	
Световой ММ					с	
Гистопатология					б	
Иммунофлуоресценция ЭМ					d	
Анализы на основе антител					б	
<i>In situ</i> ДНК-зонды					a	
ПЦР в реальном времени, ОТ-ПЦР					a	
Квентирования					d	

PLs = постличинки; CM = световая микроскопия; ЭМ = электронная микроскопия; ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

6. Тест (ы), рекомендуемые для целевого надзора, с целью объявления свободы от инфекции нодавирусом *Macrobrachium rosenbergii* (болезнь белого хвоста).

Методом целевого надзора с целью объявления свободы от MrNV является гнездовая ОТ-ПЦР.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение случая подозрения

Наличие инфекции MrNV подозревают, если соответствие хотя бы одному из следующих критериев:

- i) **клинические признаки соответствуют инфекции MrNV или**
- ii) **гистопатология соответствует инфекции MrNV или**
- iii) **положительный результат при ОТ-ПЦР или**
- iv) **положительный результат ОТ-ПЦР в реальном времени.**

7.2. Определение подтвержденного случая

Заражение MrNV считается подтвержденным, если выполнены два или более из следующих критериев:

- i) **гистопатологические признаки соответствуют инфекции MrNV**
- ii) **положительный результат в реакции in-situ гибридизации (ISH) на тканях-мишенях**
- iii) **ОТ-ПЦР (с последующим секвенированием).**
- iv) **ОТ-ПЦР в реальном времени.**

8. Список литературы

ARCIER J.-M., HERMAN F., LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.R. (1999). A viral disease

associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 177–181.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1–114.

BONAMI J.R., SHI Z., QIAN D. & SRI WIDADA J. (2005). White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. *J. Fish Dis.*, **28**, 23–31.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of monodon baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

HARIDAS D.V., PILLAI D., MANOJKUMAR B., NAIR C.M. & SHERIEF P.M. (2010). Optimisation of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus in *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Virol. Methods*, **167**, 61–67.

HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.

HERNANDEZ-HERRERA R.I., CHAPPE-BONNICHON V., ROCH P., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2007). Partial susceptibility of the SSN-1 fish cell line to a crustacean virus: a defective replication study. *J. Fish Dis.*, **30**, 673–679.

HSIEH C.Y., WU Z.B., TUNG M.C., TU C., LO S.P., CHANG T.C., CHANG C.D., CHEN S.C., HSIEH Y.C. & TSAI S.S. (2006). *In situ* hybridization and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **29**, 665–671.

KING A.M.Q., ADAMS M.J., CARSTENS E.B. & LEFKOWITZ E.J. (2012). Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, USA, p.1327.

OWENS L., LA FAUCE K., JUNTUNEN K., HAYAKIKOSOL O. & ZENG C. (2009). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus disease (white tail disease) in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 175–180.

PILLAI D., BONAMI J.R. & SRI WIDADA J. (2006). Rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV), the pathogenic agents of white tail

disease of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), by loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **29**, 275–283.

PUTHAWIBOOL T., SENAPIN S., FLEGEL T.W. & KIATPATHOMCHAI W. (2010). Rapid and sensitive detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawns by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Molecular Cellular Probes*, **24**, 244–249.

QIAN D., LIU W., JIANXIANG W. & YU L. (2006). Preparation of monoclonal antibody against *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus and application of TAS-ELISA for virus diagnosis in post-larvae hatcheries in east China during 2000–2004. *Aquaculture*, **261**, 1144–1150.

QIAN D., SHI Z., ZHANG S., CAO Z., LIU W., LI L., XIE Y., CAMBOURNAC I. & BONAMI J.R. (2003). Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Fish Dis.*, **26**, 521–527.

RAVI M., NAZEER BASHA A., SARATHI M., ROSA IDALIA H.H., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2009). Studies on the occurrence of white tail disease (WTD) caused by MrNV and XSV in hatchery-reared post-larvae of *Penaeus indicus* and *P. monodon*. *Aquaculture*, **292**, 117–120.

RAVI M., NAZEER BASHA A., TAJU G., RAM KUMAR R. & SAHUL HAMEED A.S. (2010). Clearance of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) and immunological changes in experimentally injected *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol.*, **28**, 428–433.

ROMESTAND B. & BONAMI J.R. (2003). A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of MrNV in the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *J. Fish Dis.*, **26**, 71–75.

SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004a). Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and its associated small virus (XSV). *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 191–196.

SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004b). Studies on the occurrence of

Macrobrachium rosenbergii nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of

M. rosenbergii in India by RT-PCR detection. *Aquaculture*, **238**, 127–133.

SAMBROOK J. & RUSSELL D.W. (2001). Chapter 12 DNA Sequencing. *In*: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Editions. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, USA, 1–120.

SRI WIDADA J., DURAND S., CAMBOURNAC I., QIAN D., SHI Z., DEJONGHE E., RICHARD V. & BONAMI J.R.

(2003). Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. *J. Fish Dis.*, **26**, 583–590.

SUDHAKARAN R., HARIBABU P., RAJESH KUMAR S., SARATHI M., ISHAQ AHMED V.P., SARATH BABU V.,

VENKATESAN C. & SAHUL HAMEED A.S. (2008a). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii*

nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV). *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 141–145.

SUDHAKARAN R., ISHAQ AHMED V.P., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL

HAMEED A.S. (2007a). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *J. Fish Dis.*, **30**, 27–35.

SUDHAKARAN R., PARAMESWARAN V. & SAHUL HAMEED A.S. (2007b). *In vitro* replication of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus (XSV) in C6/36 mosquito cell line. *J. Virol. Methods*, **146**, 112–118.

SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., GOPAL C. & SAHUL HAMEED A.S.

(2006). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*, **257**, 136–141.

SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., RAJESH KUMAR S., SARATHI M. & SAHUL HAMEED A.S. (2008b).

Cloning and sequencing of capsid protein of Indian isolate of extra small virus from *Macrobrachium rosenbergii*. *Virus Res.*, **131**, 283–287.

WANG C.S., CHANG J.S., WEN C.M., SHIH H.H. & CHEN S.N. (2008). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in *M. rosenbergii* (de Man) with white tail disease cultured in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **31**, 415–422.

YOGANANDHAN K., LEARTVIBHAS M., SRIWONGPUK S. & LIMSUWAN C. (2006). White tail disease of the giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand. *Dis. Aquatic. Org.*, **69**, 255–258.

YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2005). Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. *J. Fish Dis.*, **28**, 65–69.

ZHANG H., WANG J., YUAN J., LI L., ZHANG J., BONAMI J.R. & SHI Z. (2006). Quantitative relationship of two viruses (*MrNV* and *XSV*) in white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 11–17.

ZSIKLA V., BAUMANN M. & CATHOMAS G. (2004). Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *J. Clin. Pathol.*, **57**, 654–656.

*

* *

NB: В настоящее время референтная лаборатория
МЭБ по инфекции нодавирусом *Macrobrachium rosenbergii* (болезнь белого хвоста) отсутствует

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

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2009 ГОДУ; ПОСЛЕДНИЕ ОБНОВЛЕНИЯ
ПРИНЯТЫ В 2017 ГОДУ.

ГЛАВА 2.2.7.

ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ СИНДРОМА ТАУРА

1. Предмет рассмотрения

Инфекция вирусом синдрома Таура обозначает заражение патогенным возбудителем – вирусом синдрома Таура (TSV), род *Aparavirus*, семейство *Dicistroviridae*, отряд *Picornavirales*.

2. Описание болезни

2.1. Факторы о возбудителе

1.1.1. Этиологический агент, штаммы возбудителя

TSV описан в качестве причины болезни, общеизвестной как синдром Таура, Bonami *с соавт.* (Bonami *с соавт.*, 1997) и Mari *с соавт.* (Mari *с соавт.*, 1998; Mari *с соавт.*, 2002). На основании секвенирования гена, кодирующего VP1, самого большого и предположительно преобладающего из трех основных структурных белков вируса, документально подтверждено не менее четырех генотипов (штаммов) TSV. На основании вариаций последовательностей VP1 эти генотипические последовательности следующие: 1) американская группа; 2) юго-восточно-азиатская группа; 3) белизская группа; и 4) венесуэльская группа (Chang *с соавт.*, 2004; Erickson *с соавт.*, 2002; Erickson *с соавт.*, 2005; Nielsen *с соавт.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Wertheim *с соавт.*, 2009).

Не менее двух различных антигенных вариантов выявлено согласно их дифференциальной реактивности на моноклональное антитело MAb 1A1, выработанное против референтного изолята из Северной и Южной Америки (TSV USA-HI94 – GenBank AF277675) (Mari *с соавт.*, 2002; Poulos *с соавт.*, 1999): Тип А представляет те из них, которые реагируют на MAb 1A1 (в твердофазном иммуноферментном анализе [ИФА], вестерн-блоттинге и иммуногистохимическим анализе [ИНС] с инфицированными тканями), и те, которые не реагируют. Нереагирующие на MAb 1A1 были подразделены на Тип В (TSV 98 Sinaloa, Mexico) и Тип С (TSV 02 Belize) на основании видов хозяев и вирулентности. Все изоляты TSV из Северной и Южной Америки и большинство, если не все, юго-восточно-азиатские генотипы вступают в реакцию с MAb 1A1. Прямо противоположно, никто из группы белизского генотипа не реагирует на MAb 1A1 (Erickson *с соавт.*, 2002; Erickson *с соавт.*, 2005), так же как и изолят TSV, выделенный на фермах по разведению креветок в Венесуэле во время эпизоотии 2005 года.

Частицы TSV имеют 32 нм в диаметре, представляют собой безоболочечные двенадцатигранники и имеют плавучую плотность 1,338 г мл⁻¹ в CsCl. Геном TSV состоит из линейной, положительно-полярной одноцепочечной РНК длиной 10 205 нуклеотидов, за исключение поли-А хвоста на 3'-конце, и он содержит две большие открытые рамки считывания (ORF). ORF 1 содержит мотивы неструктурных белков, таких как хеликаза, протеаза и РНК-зависимая РНК-полимераза. ORF 2 содержит последовательности структурных белков TSV,

включая три основных капсидных белка VP1, VP2 и VP3 (55, 40, и 24 кДа, соответственно). Вирус реплицируется в цитоплазме клеток хозяина (Bonami с соавт., 1997; Mari с соавт., 1998; Mari с соавт., 2002; Robles-Sikisaka с соавт., 2001).

Другие регистрируемые случаи синдрома Таура: Синдром Таура в Эквадоре изначально связывали с контаминацией ферм по разведению креветок фунгицидами, что являлось предметом спора, который поддерживался судебным разбирательством в течение ~ 16 лет, до того как было научно подтверждена вирусная этиология болезни (Bonami с соавт., 1997; Hasson с соавт., 1995; Lightner, 2005). Таким образом, некоторые авторы опубликованных статей предлагают токсическую этиологию синдрома Таура (с соавт., 1997; Jimenez, 1992; Jimenez с соавт., 2000).

1.1.2. Выживаемость вне хозяина

Информация отсутствует.

2.1.1. Устойчивость возбудителя (эффективные методы инактивации)

Информация отсутствует.

2.1.2. Жизненный цикл

Неприменимо.

2.2. Факторы о хозяевах

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды, отвечающие критериям для перечисления в качестве восприимчивых к инфекции TSV согласно положениям Главы 1.5. *Кодекса по водным животным (Водный кодекс)*, включают следующие: толстоспинная креветка (*Metapenaeus ensis*), северная коричневая креветка (*Penaeus aztecus*), гигантская тигровая креветка (*P. monodon*), северная белая креветка (*P. setiferus*), голубая тигровая креветка (*P. stylirostris*) и белоногая креветка (*P. vannamei*).

2.2.2. Виды, в отношении которых недостаточно данных о восприимчивости

Виды, в отношении которых недостаточно данных о восприимчивости к инфекции TSV согласно положениям Статьи 1.5. *Водного кодекса*, включают следующие: китайская белая креветка (*Penaeus chinensis*), гигантская пресноводная креветка (*Macrobrachium rosenbergii*), веслоногий рак (*Ergasilus manicatus*), и усоногие раки (*Chelonibia patula* и *Octolasmis muelleri*).

Кроме того, у следующих видов регистрировали положительные патоген-специфичные результаты полимеразной цепной реакции (ПЦР), но активной инфекции не демонстрировали: северная розовая креветка (*Penaeus duorarum*), курума (*Penaeus japonicus*), южная белая креветка (*Penaeus schmitti*), гольф-киллифиш (*Fundulus grandis*), голубой краб (*Callinectes sapidus*), крабы (*Uca vocans* и *Sesarma mederi*), и мангровый краб (*Scylla serrata*).

2.2.3. Стадии восприимчивости хозяина

Инфекция TSV документально описана на всех стадиях жизненного цикла (т.е. постличиночная стадия (ПЛ), молодь и взрослые особи) *P. vannamei* кроме икры, зигот и личинок (Lightner, 1996a).

2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Все постличиночные стадии *P. vannamei*, а также популяции других известных восприимчивых видов.

2.2.5. Органы-мишени и инфицированные ткани

TSV инфицирует, а также, как продемонстрировано, реплицируется в кутикулярном эпителии (или гиподерме) основного экзоскелета, передней кишки, задней кишки, жабр и конечностей, и зачастую в соединительных тканях, гемопоэтических тканях, лимфоидных органах (ЛО) и антеннальной железе. В брюшных органах (энтодермальный эпителий слизистой гепатопанкреаса, средней кишки и слепого отростка средней кишки), а также в гладкой, сердечной и поперечно-полосатой мускулатуре и в вентральном нервном столбе, его ответвлениях и ганглиях обычно не проявляются гистологические признаки инфекции TSV, и они обычно отрицательны в ISH (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Hasson с соавт., 1997; Hasson с соавт., 1999a; Hasson с соавт., 1999b; Jimenez с соавт., 2000; Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a; Lightner & Redman, 1998b; Lightner с соавт., 1995; Srisuvan с соавт., 2005).

2.2.6. Персистентная инфекция

Некоторые представители популяций *P. vannamei* или *P. stylirostris*, которые выживают после заражения TSV могут носить вирус в течение всей жизни (Hasson с соавт., 1999a; Hasson с соавт., 1999b) и, несмотря на то, что это документально не подтверждено, считается, что они передают вирус своему потомству посредством вертикальной передачи.

2.2.7. Векторы

Морские птицы: Продemonстрировано, что TSV остается инфекционным до 48 часов (после поедания тушек инфицированной TSV креветки) в фекалиях, переносимых дикими или отловленными чайками (*Larus atricilla*) и курами (*Gallus gallus*, используемые в качестве лабораторного заменителя всех поедающих креветки птиц), что позволяет предположить, что вирус может сохранять инфекционность при прохождении через желудочно-кишечную систему всех видов птиц. Эти результаты подразумевают, что птицы являются важным вектором передачи вируса на инфицированных фермах и в регионах разведения (Garza с соавт., 1997; Vanpatten с соавт., 2004).

Водные насекомые: гребляк (*Trichocorixa reticulata* [Corixidae], водное насекомое, которое питается тушками креветок в прудах, где разводят креветок) также описан в качестве механического вектора (Brock, 1997; Lightner, 1995, Lightner, 1996a, Lightner, 1996b).

2.3. Паттерн болезни

Инфекция TSV наиболее известна как болезнь *P. vannamei* в фазе выращивания, которая возникает в период с ~14 по 40 день содержания постиличинок в выростных прудах или резервуарах. Таким образом, креветки, инфицированные TSV, - обычно небольшая молодь массой от ~0.05 г до <5 г. Более крупные креветки также могут быть поражены, особенно если они не подвергались воздействию вируса до момента подростой молодки или взрослого состояния (Brock, 1997; Brock с соавт., 1995; Lightner, 1996a, Lightner, 1996b; Lotz, 1997b).

2.3.1. Механизмы передачи

Горизонтальные или вертикальные пути передачи. Доказана горизонтальная передача за счет каннибализма или с контаминированной водой (Brock, 1997; Hasson с соавт., 1995; Lightner, 1996a, Lightner, 1996b; White с соавт., 2002). Имеются серьезные основания подозревать вертикальную передачу, но она пока экспериментально не подтверждена.

2.3.2. Превалентность

В регионах, где вирус энзоотичен в разводимых на фермах популяциях, превалентность инфекции TSV, выявленная в ходе различных обследований, составляет от 0 до 100% (Brock, 1997; Jimenez с соавт., 2000; Laramore, 1997).

2.3.3. Географическое распространение

В настоящее время TSV широко распространен в регионах по разведению креветок в Северной и Южной Америке, Юго-Восточной Азии и на Среднем Востоке (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Brock, 1997; Chang с соавт., 2004; Hasson с соавт., 1999a; Lightner, 1996a, Lightner, 1996b; Lightner с соавт., 2012; Lotz с соавт., 2005; Nielsen с соавт., 2005; Tang & Lightner, 2005; Tu с соавт., 1999; Yu & Song, 2000; Wertheim с соавт., 2009).

Северная и Южная Америка: после того, как в 1992 году синдром Таура были признан особой болезнью культивируемой *P. vannamei* в Эквадоре (Brock с соавт., 1995; Jimenez, 1992; Lightner с соавт., 1995), за счет транспортировки инфицированных постличинок и маточного стада TSV быстро распространился по многим регионам Северной и Южной Америки, где выращивают креветки (Brock, 1997; Brock с соавт., 1997; Hasson с соавт., 1999a; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Lightner с соавт., 2012). Инфекцию TSV регистрируют практически в любой стране Северной и Южной Америки и на Гавайях, где выращивают пенеидных креветок (Aguirre Guzman & Ascencio Valle, 2000; Brock, 1997; Lightner, 2011; Lightner с соавт., 2012; Robles-Sikisaka с соавт., 2001). TSV энзоотичен в популяциях культивируемой креветки на Тихоокеанском побережье Северной и Южной Америки от Перу и до Мексики, и его иногда выявляют в некоторых диких популяциях *P. vannamei* в этом же регионе (Lightner & Redman, 1998a; Lightner с соавт., 1995). TSV также регистрируют в аквакультурных популяциях пенеидных креветок на побережье Атлантики, Карибского моря и Мексиканского залива в Северной и Южной Америке, также его регистрируют в популяциях дикой креветки в этих же регионах (Hasson с соавт., 1999a; Lightner, 1996a; Lightner, 2005; Lightner, 2011; Lightner с соавт., 2012).

Азия и Средний Восток: Инфекция TSV была занесена из Китайского Тайбэя в 1999 году с инфицированной импортной тихоокеанской белой креветкой, *P. vannamei*, поступившей из источников в Центральной и Южной Америке (Tu с соавт., 1999; Yu & Song, 2000). С момента данного первоначального заноса за счет перемещения маточных стад и постличинок вирус распространился в Китае, Малайзии и Индонезии, где он стал причиной крупномасштабных эпизоотий с высокими уровнями смертности в инфицированных популяциях *P. Vannamei*, где не проведена селекция на предмет резистентности (Chang с соавт., 2004; Nielsen с соавт., 2005; Tang & Lightner, 2005; Lightner, 2011). В течение 2010 и 2011 гг. инфекцию TSV связывали со значительной смертностью аквакультурной *P. indicus* в Саудовской Аравии (Wertheim с соавт., 2009). По результатам филогенетического анализа, основанного на последовательности вирусного

капсидного белка 2 (также называемом VP1), TSV из Саудовской Аравии объединили в новую, отдельную группу (Tang с соавт., 2012; Wertheim с соавт., 2009).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Во время вспышек инфекции TSV на уровне фермы в не подвергавшихся селекции на предмет резистентности популяциях *P. Vannamei*, которая является основным видом хозяев TSV, типичный совокупный уровень смертности колеблется в пределах от 40 до >90% в выращиваемых популяциях постличинок, молоди и подросшей молоди. Существуют TSV-резистентные линии *P. vannamei*, которые демонстрируют уровень выживаемости до 100% при лабораторном контрольном заражении TSV всех четырех генотипов (Lightner с соавт., 2009; Moss с соавт., 2001).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Вспышки инфекции TSV наиболее часты при уровнях солености воды ниже 30 частей на триллион (Jimenez с соавт., 2000).

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Эффективные вакцины против TSV отсутствуют.

2.4.2. Химиотерапия

Научно-подтвержденные сообщения об эффективности химиотерапии отсутствуют.

2.4.3. Стимуляция иммунитета

Научно-подтвержденные данные об эффективных иммуностимулирующих обработках отсутствуют.

2.4.4. Разведение резистентных популяций

После того, как в 1992–1994 гг. синдром Таура появился в Эквадоре, были выявлены *P. stylirostris*, которые обладали резистентностью к инфекции TSV (гентопа 1, МАb 1A1 Типа А). Исходя из этого открытия и вследствие возникновения болезни в Мексике в 1994 г., где она вызвала снижение сборов *P. vannamei*, с 1995 года отобранные линии TSV-резистентных *P. stylirostris* стали доминантными креветками, выращиваемыми на фермах в западной Мексике. Однако в 1998–1999 гг. появился новый «штамм» TSV, и он вызвал массивные эпизоотии среди *P. stylirostris* (Тип В; Erickson с соавт., 2002; Fegan & Clifford, 2001; Lightner, 1999; Lightner, 2005; Zarain-Herzberg & Ascencio-Valle, 2001). За появлением этого нового «штамма» вскоре (в конце 1999 г.) последовал занос вируса синдрома белых пятен (WSSV) на фермы по разведению креветок в западной Мексике, к которому у *P. stylirostris* отсутствовала резистентность, что фактически привело к прекращению любой заинтересованности в культивировании *P. stylirostris* в Мексике.

Выращены TSV-резистентные одомашненные популяции *P. vannamei* и *P. stylirostris*. Некоторые одомашненные линии TSV-резистентных *P. vannamei* (которые также свободны от TSV) широко распространены в секторе промышленного выращивания креветки в Северной и Южной Америке и в Юго-Восточной Азии (Clifford, 1998; Moss с соавт., 2001; White с соавт., 2002). После появления инфекции TSV в Центральной Америке повышенная резистентность к TSV регистрировалась у постличинок промысловой дикой *P. Vannamei*, используемых для заселения ферм по разведению креветок в регионе (Laramore, 1997).

2.4.5. Замена на резистентные виды

Выращены отобранные линии TSV-резистентных *P. vannamei*, которые есть в продаже (Clifford, 1998, Laramore, 1997, Moss с соавт., 2001, White с соавт., 2002).

2.4.6. Блокирующие агенты

Резистентность к инфекции TSV регистрировали посредством экспрессии антисмысловой РНК белка оболочки TSV в зиготах *P. vannamei*. Трансгенная молодь, выращенная из защищенных таким образом зигот, продемонстрировала повышенную резистентность при контрольном заражении TSV перорально или внутримышечно (Lu & Sun, 2005). Аналогичные результаты были получены при инъекции последовательностей короткой случайной двуцепочечной интерферирующей РНК молодежи *P. vannamei* (Robalino с соавт., 2004).

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Несмотря на отсутствие опубликованных данных, подтверждающих данный путь передачи, существует вероятность вертикальной передачи TSV (трансовариальная передача). Дезинфекция икры и личинок (Chen с соавт., 1992) является надлежащей практикой содержания и рекомендуется в связи с ее потенциальной способностью снизить контаминацию отложенной икры и полученных из нее личинок TSV.

2.4.8. Общие стратегии содержания

Некоторые стратегии содержания и контроля болезни и управления ее течением успешно применяются для снижения риска заражения TSV, возникающего в ходе выращивания на ферме. Они включают применение ПЦР для предварительного скрининга выращенного в прудах маточного стада или вымеченной икры/науплий и отбраковку особей, продемонстрировавших положительные результаты тестов на вирус (Fegan & Clifford, 2001), опустошение целых регионов культивирования и введение свободных от TSV популяций (Dixon & Dorado, 1997), а также выведение популяций свободных от специфических патогенов (СПФ) креветок *P. vannamei* и *P. stylirostris* (Lightner, 1996b; Lightner, 2005; Lotz с соавт., 1995; Moss с соавт., 2001; Pruder в соавт., 1995; Wyban, 1992; в соавт., 2004). Признано, что применение последней технологии (СПФ-популяции) является одной из наиболее успешных стратегий содержания и контроля инфекции TSV.

3. Пробоотбор

3.1. Выбор индивидуальных образцов

Образцы, подходящие для тестирования на инфекцию TSV, включают постличинки, молодь и взрослых особей. Поскольку TSV может инфицировать на всех жизненных этапах, тяжесть инфекции и, следовательно, вирусная нагрузка, могут быть ниже уровней выявления в вымеченной икре и на стадиях личинки, поэтому особи на этих этапах жизни не могут быть подходящими образцами для выявления TSV или подтверждения свободы от инфекции TSV.

3.2. Консервирование образцов для отправки

Стандартные гистологические методы или методы молекулярного анализа, а также руководство по консервированию образцов для запланированного метода тестирования см. в Главе 2.2.0.

3.3. Объединение образцов в пулы

Оценка влияния объединения в пулы на диагностическую чувствительность не проводилась, следовательно, крупных креветок следует обрабатывать и тестировать отдельно. Однако особей на начальных этапах жизни, особенно постличинки, или образцы весом до 0,5 г, можно объединять в пулы для получения достаточного количества материала для молекулярного исследования.

3.4. Лучшие органы или ткани

TSV инфицирует ткани эктодермального и мезодермального происхождения. Основания целевая ткань при острой фазе инфекции TSV – кутикулярный эпителий. При хронической инфекции основной целевой тканью являются лимфоидные органы.

При необходимости проведения нелетального тестирования ценного маточного стада могут быть отобраны гемолимфа и плеоподы.

3.5. Образцы/ ткани, которые непригодны

TSV является системным вирусом, и он не реплицируется в тканях брюшной полости (например, гепатопанкреас, средняя кишка или ее слепой отросток). Следовательно, ткани брюшной полости не подходят в качестве образцов для выявления инфекции TSV.

4. Методы диагностики

4.1. Методы диагностики в полевых условиях

4.1.1. Клинические признаки

По клиническим признакам может быть предположительно диагностирована только клиническая инфекция TSV в острой фазе. Описание макроскопических клинических признаков, демонстрируемых креветками с инфекцией TSV в острой фазе, см. в Разделе 4.2.

4.1.2. Поведенческие изменения

Поведенческие изменения проявляют только креветки с клинической инфекцией TSV в острой фазе. Обычно, тяжело пораженным креветкам как будто не хватает кислорода, и они перемещаются к краю или к поверхности пруда, где уровни растворенного кислорода выше. Такие креветки могут привлекать большое количество морской птицы. При вспышках многих болезней именно большое количество морской птицы, привлекаемой к умирающим креветкам, является первым показателем наличия вспышки серьезной болезни (которая зачастую является либо инфекцией TSV, либо вирусом синдрома белых пятен) для менеджера фермы.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопические патологические признаки

Инфекция TSV имеет три четкие фазы: острая, переходная и хроническая, которые макроскопически различимы (Hasson с соавт., 1999a; Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Lightner, 2011; Lightner с соавт., 1995). Макроскопические признаки, демонстрируемые молодью, подростой молодью и взрослыми креветками в переходной фазе инфекции TSV, уникальны и обеспечивают предположительный диагноз болезни.

Острая фаза: макроскопические признаки, демонстрируемые умирающей *P. vannamei* с инфекцией TSV в острой фазе, включают распространение красных хроматофоров, придающих пораженной креветке общую бледно-красную окраску и делающих хвостовой веер и плеоподы ярко красными: поэтому, когда болезнь впервые появилась в Эквадоре, одним из ее названий, данных фермерами, было болезнь «красного хвоста» (Lightner с соавт., 1995). У таких креветок при близком изучении кутикулярного эпителия тонких конечностей (например, кончики уropодов или плеоподов) через линзы с $\times 10$ увеличением видны признаки очагового некроза эпителия. Креветки, демонстрирующие макроскопические признаки острой инфекции TSV, обычно имеют мягкий панцирь, пустой кишечник и зачастую находятся на поздней D-стадии линьки. Обычно, остро инфицированные креветки погибают во время линьки.

Переходная фаза (фаза выздоровления): несмотря на то, что макроскопические признаки, демонстрируемые креветками в переходной фазе, присутствуют только в течение нескольких дней, они могут обеспечить предположительный диагноз инфекции TSV. Во время переходной фазы (которая может происходить в то время, когда многие креветки в составе пораженной популяции все еще находятся в острой фазе, и высоки ежедневные уровни смертности), креветки в инфицированных прудах в количестве от небольшого до умеренного демонстрируют выборочные, многоочаговые, несимметричные меланизированные кутикулярные поражения. Эти меланизированные точки представляют собой скопления гемоцитов, указывающих на участки в кутикулярном эпителии, восстанавливающиеся от поражения TSV. У таких

креветок могут наблюдаться или не наблюдаться мягкие кутикулы и распространение красных хроматофоров, и у них может быть нормальное поведение и аппетит (Brock, 1997; Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; Lightner, 2011).

Хроническая фаза: после успешной линьки креветки от переходной фазы перемещаются к хронической фазе инфекции TSV, при которой персистентно инфицированные креветки не демонстрируют явных признаков болезни (Brock, 1997; Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; Lightner, 2011; Lightner с соавт., 1995). Однако *P. vannamei*, хронически инфицированные TSV, могут быть менее резистентными к нормальным стресс-факторам окружающей среды (например, внезапное снижение солености), чем неинфицированные креветки (Lotz с соавт., 1995).

4.2.2. Клиническая химия

Неприменимо.

4.2.3. Микроскопические патологические признаки (для хозяев-пинеидных)

Синдром Таура в острой и хронической фазе можно диагностировать посредством гистологических методов (Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a). Индуцированные TSV патогномические патологии уникальны при инфекции в острой фазе (Brock с соавт., 1995; Lightner, 1996a; Lightner, 2011). При хронической инфекции TSV единственным поражением, обычно демонстрируемым инфицированными креветками, является увеличенные лимфоидных органов с множественными сфероидными образованиями в лимфоидных органах (ЛОС) (Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 2011), которые невозможно отличить от ЛОС, вызываемыми хроническими инфекциями другими РНК-вирусами (Lightner, 1996a). Если в ходе стандартной гистологии наблюдаются ЛОС и подозревается хроническая инфекция TSV, для подтверждения инфекции TSV рекомендуется использовать молекулярный тест (ИГХ с TSV-специфичными зондами или ПЦР с обратной транскрипцией [ОТ] ПЦР [см. Раздел 4.3.1.2.7]).

4.2.3.1. Острая фаза инфекции вирусом синдрома Таура

Диагностика синдрома Таура в острой фазе болезни зависит от гистологической демонстрации (в препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином [H&E]) многоочаговых зон некроза в кутикулярном эпителии по всей поверхности тела, конечностей, жабр, задней кишки и передней кишки (пищевод, передняя и задняя камеры желудка). Клетки субкутикулярных соединительных тканей и волокна прилегающих поперечных мышц, располагающихся у основания

пораженного кутикулярного эпителия, поражаются редко. В некоторых тяжелых случаях инфекции TSV в острой фазе также разрушается тубулярный эпителий антеннальной железы. В многоочаговых кутикулярных поражениях хорошо выражены видимые очаги пораженных клеток, в которых наблюдаются повышенная эозинофилия цитоплазмы и пикноз или кариорексис ядра. При инфекции TSV в острой фазе в таких поражениях зачастую изобилуют цитоплазматические остатки некротических клеток, которые обычно присутствуют в виде сферических телец (диаметром 1–20 мкм), окрашивание которых варьирует от эозинофильного до бледно-базофильного. Эти структуры, наряду с пикнозом и кариорексисом ядра, придают поражениям при синдроме Таура в острой фазе характерный «присыпанный перцем» или «изрешеченный дробью» внешний вид, который считается патогномическим для синдрома Таура, когда отсутствует сопутствующий некроз клеток паренхимы трубочек лимфоидных органов. Отсутствие некроза лимфоидных органов при инфекциях TSV в острой фазе отличает синдром Таура от инфекции вирусом желтой головы генотипа 1 в острой фазе, при котором в кутикулярном эпителии и жабрах могут возникать особенности некроза, аналогичные индуцируемым TSV (Lightner, 1996a).

В тканях, инфицированных TSV, пикноз или кариорексис ядра дает положительную (ДНК) реакцию Фельгена, что отличает их от менее базофильных или эозинофильных цитоплазматических включений, которые не содержат ДНК. Отсутствие гомоцитного инфильтрата или других признаков значительного воспалительного ответа хозяина отличает острую фазу инфекции TSV от переходной фазы болезни (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Brock, 1997; Brock с соавт., 1995; Brock с соавт., 1997; Erickson с соавт., 2002; Erickson с соавт., 2005; Hasson с соавт., 1995; Hasson с соавт., 1999a; Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; Lightner с соавт., 1995).

4.2.3.2. Переходная фаза (фаза восстановления) инфекции вирусом синдрома Таура

В ходе переходной фазы инфекции TSV количество и тяжесть типичных для острой фазы кутикулярных поражений снижаются и замещаются заметной инфильтрацией и скоплением гемоцитов в областях некроза. Массы гемоцитов могут становиться меланизированными, из-за чего появляются неровные черные пятна, характеризующие переходную фазу болезни. На H&E срезах такие поражения могут демонстрировать эрозию кутикулы, поверхностную колонизацию и инвазию пораженной кутикулы, а также воздействие *Vibrio* spp. на поверхностные гемоциты (Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; 2011). Срезы лимфоидных органов во время переходной фазы инфекции TSV могут выглядеть нормальными при окрашивании H&E. Однако при анализе срезов лимфоидных органов на TSV посредством ИГХ со специфичными кДНК-зондами (или посредством ИГХ с МАт 1A1 к TSV типа А, генотипа 1) видны

большие количества TSV, аккумулирующегося в более периферических клетках паренхимы трубочек лимфоидных органов (Hasson с соавт., 1999b; Srisuvan с соавт., 2005).

4.2.3.3. Хроническая фаза инфекции вирусом синдрома Таура

Креветки в хронической фазе инфекции TSV не демонстрируют макроскопических признаков инфекции, и единственным гистологическим признаком инфекции является присутствие многочисленных явных ЛОС, которые могут ассоциироваться с парными лимфоидными органами или могут отсоединяться от них и становиться эктопическими тельцами ЛОС, которые располагаются в ограниченных пространствах гемоцели (т.е. в сердце, жабрах, в субкутикулярных соединительных тканях и т.д.). такие ЛОС – это сферические скопления клеток лимфоидных органов и гемоцитов, и их можно отличить от нормальных тканей лимфоидных органов по их сферическому виду и отсутствию центрального сосуда, который является типичным для нормальных трубочек лимфоидных органов. При анализе посредством ИГХ с кДНК-зондом на TSV (или с МАт 1А1 посредством ИГХ) некоторые клетки ЛОС демонстрируют положительную реакцию на вирус, в то время как другие целевые клетки не реагируют (Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b; 2011).

4.2.4. Влажные препараты

Для демонстрации (и проведения предварительной диагностики инфекции TSV в острой фазе) очаговых поражений в кутикулярных эпителиальных клетках при острой фазе инфекции TSV можно использовать прямую микроскопию простых неокрашенных влажных препаратов из иссеченных кусочков жабр, кончиков конечностей и т.д., проведенную посредством фазо-контрастного микроскопа или микроскопа с пониженным уровнем освещенности. Препараты, представляющие инфекцию TSV в острой фазе, будут содержать многочисленные сферические структуры (см. гистопатологические методы в Разделе 4.2.3 выше), которые являются пикнозом или кариорексисом ядра и цитоплазматическим остатками некротических клеток.

4.2.5. Мазки

Неприменимо.

4.2.6. Фиксированные срезы

См. Раздел 4.2.3

4.2.7. Электронная микроскопия/ цитопатология

В настоящее время в диагностических целях не применяется.

4.3. Методы выявления и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямой детекции

4.3.1.1. Методы микроскопического анализа

4.3.1.1.1. Влажные препараты

См. Раздел 4.2.4

4.3.1.1.2. Мазки

См. Раздел 4.2.5

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

См. Раздел 4.2.3

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственная среда

TSV не выращивают *in vitro*, т.к. линий клеток ракообразных не существует (Lightner, 1996a; Pantoja с соавт., 2004). Несмотря на то, что в одной публикации ошибочно сообщалось о том, что TSV инфицирует линии клеток человека и обезьяны (Audelo del Valle с соавт., 2003), две другие лаборатории, которые повторили данное исследование, выявили, что TSV не инфицирует и не реплицируется в линиях клеток приматов или человека, которые чувствительны к пикорнавирусам человека (Luo с соавт., 2004; Pantoja с соавт., 2004).

4.3.1.2.2. Методы выявления антигена на основе антител

Для анализа образцов гемолимфы, гомогенатов ткани или тканевых срезов креветок, фиксированных раствором Дэвидсона, можно использовать МАт для выявления TSV (Erickson с соавт., 2002; Erickson с соавт., 2005; Poulos с соавт., 1999). МАт TSV 1A1 можно использовать для дифференциации некоторых вариантов или «штаммов» TSV от других штаммов (Erickson с соавт., 2002; Erickson с соавт., 2005).

4.3.1.2.3. Метод биопробы

Подтверждение инфекции TSV может быть проведено посредством метода биопробы животных с подозрением TSV с использованием СПФ-молоди *P. vannamei* в качестве индикатора вируса (Brock с соавт., 1997; Garza с соавт., 1997; Hasson с соавт., 1999b; Hasson с соавт., 1995; Lightner, 1996a; Lotz, 1997b; Overstreet с соавт., 1997). Можно использовать протоколы перорального или инъекционного введения. Метод перорального введения относительно прост для применения и применяется посредством скармливания измельченных тушек креветок с подозрением СПФ-молоди *P. vannamei* в небольших резервуарах (White с соавт., 2002). Необходимо использовать резервуар с отрицательным контролем в виде индикаторных креветок, которые получают только СПФ-ткани (без TSV) и обычные корма для креветок. При использовании для биопробы на TSV протокола скармливания тушек (перорально) TSV-положительные индикаторные креветки (по макроскопическим признакам и результатам гистопатологических исследований) обычно видны уже через 3-4 дня после первого воздействия, а значительная смертность наблюдается к 3-8 дню после первого воздействия. Отрицательные контрольные креветки должны оставаться отрицательными (в течение не менее 10-15 дней) по показателям макроскопических и гистологических признаков синдрома Таура и атипичной смертности (Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; White с соавт., 2002).

При использовании инъекционного протокола биопробы на TSV можно тестировать различные типы образцов. Целые креветки используются, если они были отобраны во время вспышки инфекции TSV. Только головы следует использовать, если креветки демонстрируют макроскопические поражения переходной фазы (многоочаговые меланизированные пятна на кутикуле), или при отсутствии клинических признаков инфекции (хроническая фаза), т.к. вирус, если он присутствует, будет концентрироваться в лимфоидных органах (Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a). Для проведения нелетального тестирования маточного стада можно отбирать образцы гемолимфы и использовать для введения индикаторным креветкам посредством внутримышечной инъекции (Lightner, 1996a).

Для проведения биопробы на TSV с использованием внутримышечной инъекции:

Следует учесть, что в течение выполнения всего протокола ткани и полученный из них гомогенат следует держать охлажденными посредством хранения их на льду.

- i) Подготовить смесь в пропорции 1:2 или 1:3 голов или целых креветок с подозрением на инфекцию TSV и TN буфера (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,4 M NaCl) или стерильного 2% солевого раствора, приготовленного с дистиллированной водой.
- ii) Гомогенизировать смесь с использованием гомогенизатора или блендера. Не позволять смеси нагреваться за счет чрезмерной гомогенизации или измельчения.
- iii) Очистить гомогенат посредством центрифугирования при 3000 g в течение 10 минут. Декантировать и оставить надосадочную жидкость.
- iv) Центрифугировать надосадочную жидкость при 27 000 g в течение 20–30 минут при температуре 4°C. Декантировать и оставить надосадочную жидкость.
- v) Развести надосадочную жидкость, полученную на этапе iv, стерильным 2% солевым раствором в соотношении от 1/10 до 1/100. Теперь данный раствор можно использовать в качестве инокулята, инъецируемого контрольным креветкам (или для стерилизации фильтрацией как описано на этапе vi).
- vi) Фильтровать разведенную надосадочную жидкость, полученную на этапе v, используя стерильный шприц (размер зависит от итогового объема разведенного супернатанта) и стерильный шприцевой фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Фильтрат следует собрать в стерильную тестовую пробирку или мензурку. Раствор можно хранить в замороженном виде при температуре –20°C (или при –80°C в случае долгосрочного хранения) или сразу же использовать для инъекции индикаторным креветкам.
- vii) Индикаторные креветки должны происходить из популяций, восприимчивых к инфекции СПФ- *P. vannamei* (например, «популяция Кона») (Moss с соавт., 2001), которые имеются в продаже у ряда поставщиков в Северной и Южной Америке, но не из отобранных линий креветок, которые известны как популяции, резистентные в инфекции TSV.
- viii) Инъецировать 0,01 мл на грамм массы тела с использованием 1 мл туберкулинового шприца. Инъекцию индикаторным креветкам проводят внутримышечно в третий сегмент хвоста. Если исследуемые креветки погибают в течение минут после инъекции, инокулят содержит чрезмерное количество белкового материала, и его следует дополнительно разбавить, прежде чем проводить инъекции другим индикаторным креветкам. Внезапная смерть после инъекции рассматривается как «белковый шок» и возникает в результате системного свертывания гемолимфы креветок в ответ на инокулят (Lightner, 1996a, White с соавт., 2002).

- ix) Образцы гемолимфы можно развести (1/10 или 1/20 в TN буфере), стерилизовать фильтрацией (если необходимо) и инъецировать индикаторным креветкам без дополнительной подготовки.
- x) Если в инокуляте присутствовал TSV, гибель индикаторных креветок должна наступить в течение 24–48 часов после инъекции. При низких дозах вируса для установления смертельной инфекции может потребоваться более длительный период, и креветок следует наблюдать в течение не менее 10-15 дней после инъекции.
- xi) Наличие (или отсутствие) TSV у индикаторных креветок следует подтверждать посредством гистологических анализов (и/или ИГХ с генетическим зондом, если есть) умирающих креветок, фиксированных раствором Дэвидсона. При необходимости дополнительного подтверждения помимо демонстрации патогномонических поражений TSV можно провести ОТ-ПЦР с секвенированием полученного ампликона.

4.3.1.2.4. *Метод биопробы с использованием сигнальных креветок*

В качестве вариации метода биопробы можно использовать систему «сигнальных креветок». Например, TSV-восприимчивые популяции небольшой молодежи СПФ-*P. vannamei* можно содержать в садках в резервуарах или в одной системе водоснабжения с другими креветками с неизвестным статусом инфекции TSV для биопробы на предмет наличия инфекционных возбудителей, таких как TSV.

4.3.1.2.5. *Метод дотиммуоблоттинга*

- i) Для проведения дотиммуоблоттинга 1 мкл исследуемого антигена (очищенный вирус, гемолимфа инфицированных креветок или гемолимфа СПФ-креветок) каплями наносят на поверхность аналитических планшетов МА-НА-N45 (Millipore)¹.
- ii) После высушивания на воздухе в течение 1 часа при комнатной температуре лунки блокируют 20 мкл буфера, содержащего фосфатно-буферный раствор и 0,05% Tween 20 (ФБРТ), смешанного с 10% нормальной козьей сыворотки (Life Technologies) и 2% казеина Хаммерштайна (Amersham Life Sciences).
- iii) Все лунки трижды промывают ФБРТ и затем проводят реакцию с 100 мкл первичного антитела (МАт или мышинные поликлональные антитела) в течение 30 минут при комнатной температуре.
- iv) Меченые щелочной фосфатазой козы анти-мышинные IgG, специфичные к цепи γ , вторичное антитело (Zymed), разведенные 1/1000 в ФБРТ плюс 10% нормальной козьей сыворотки, используют для детекции (30 минут при комнатной температуре).

¹ Указание конкретных коммерческих продуктов в качестве примера не означает их утверждение МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, указываемым в данном *Руководстве по водным животным*.

- v) После трехкратной промывки с ФБРТ, однократной ФБР и однократной дистиллированной водой реакцию визуализируют по ее развитию в течение 15 минут при комнатной температуре с использованием нитросинего тетразолия и бром-хлор-индолил сульфата (Roche Diagnostics) в 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl буфера, содержащего 50 mM MgCl₂, pH 9,5.
- vi) Реакции останавливают дистиллированной водой.
- vii) Реакции градуируют, используя шкалу от 0 до +4, где наиболее интенсивная реакция эквивалентна реакции, полученной с использованием МАт против референтного контроля, состоящего из полуочищенного TSV. Отрицательная реакция – это реакция, при которой в лунке не визуализируются окрашенные пятна.

4.3.1.2.6. *Другие методы на основе антител*

МАт 1А1 против TSV можно использовать для других форматов тестов на основе антител (например, непрямой иммунофлуоресцентный анализ [IFAT] или иммуногистохимические [ИГХ] тесты с мазками ткани, замороженными срезами или депарафинизированными зафиксированными тканями). МАт 1А1 применим в формате ИГХ с использованием тканевых срезов, фиксированных раствором Дэвидсона AFA (Erickson с соавт., 2002; Erickson с соавт., 2005).

Непредвиденные результаты, полученные в ходе тестов на основе МАт, рекомендуется интерпретировать в контексте клинических признаков, истории болезни и совместно с результатами других тестов (например, результаты ОТ-ПЦР или результаты гистологии или гибридизации *in situ* (ISH) с TSV-специфичным ДНК-зондом – см. соответствующие разделы в данной главе).

4.3.1.2.7. *Молекулярные методы*

Разработаны тесты ISH и ОТ-ПЦР для детекции TSV, и наборы для проведения ОТ-ПЦР на TSV имеются в продаже. Метод дот-блоттинга для детекции TSV отсутствует.

4.3.1.2.7.1. *ДНК-зонды для приложений ISH с нерадиокативными кДНК-зондами*

Нереактивные DIG-меченные кДНК-зонды для детекции TSV могут быть получены в лаборатории. Метод ISH обеспечивает более высокую диагностическую чувствительность, чем более традиционные методы для выявления и диагностики TSV, использующие классические гистологические методы (Hasson с соавт., 1999a; Lightner, 1996a; Lightner, 1999; Lightner & Redman, 1998b; Mari с соавт., 1998). ISH стандартных гистологических срезов, полученных в острой и переходной фазе из поражений в кутикулярном

эпителии, других тканей или из ЛОС, образовавшихся в переходной или хронической фазе, с использованием DIG-меченного кДНК-зонда к TSV обеспечивает дифференциальный диагноз инфекции TSV (Hasson с соавт., 1999a; Hasson с соавт., 1999b; Lightner, 1996a; Lightner, 1996b). Патогномонические TSV-положительные поражения в ходе реакции с кДНК-зондами демонстрируют четкие синие или сине-черные области в цитоплазме пораженных клеток. В реакцию с зондом не вступают области ядра с выраженным кариорексисом и ядра с пикнозом, которые обуславливают «изрешеченный дробью» внешний вид патогномонических поражений при синдроме Таура (Lightner, 1996a; Mari с соавт., 1998). (см. Описание метода ISH см. в Главе 2.2.4 Заражение инфекционным вирусом гиподермального и гематопозитического некроза и описание процедуры использования фиксирующего раствора Дэвидсона AFA см. в Главе 2.2.0 Раздел 7.1.6.3.).

При использовании тканей, фиксированных раствором Дэвидсона, могут возникать ложноотрицательные результаты ISH в том случае, если зафиксированные ткани оставляют в фиксирующем растворе на срок более 24-48 часов. Низкий уровень pH фиксирующего раствора Дэвидсона вызывает кислотный гидролиз генома TSV с одноцепочечными РНК, что приводит к ложноотрицательным результатам. Такого гидролиза можно избежать, если использовать нейтральные фиксаторы, включая «РНК-безвредные» фиксаторы, разработанные для креветок, или при правильном использовании фиксатора Дэвидсона (избегая превышения 24-часового периода фиксации) (Hasson с соавт., 1997; Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998b).

4.3.1.2.7.2. Метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ)

Образцы ткани (гемолимфа, плеоподы, целые небольшие креветки и т.д.) можно анализировать на TSV посредством ОТ-ПЦР. Праймеры, указанные как 9992F и 9195R, амплифицируют последовательность длиной 231 пара оснований (п.о.) генома TSV (Nunan с соавт., 1998). Амплифицированный фрагмент – это часть консервативной последовательности, расположенной в межгенной области и ORF 2 TSV. Праймер 9992F расположен у 3'-конца межгенной области, 9195R расположен на ORF 2 в VP2 (= CP1) (Mari с соавт., 2002; Nunan с соавт., 1998). Разработана новая пара праймеров TSV (7171F и 7511R), и доказано, что она обладает повышенной чувствительностью для детекции TSV (Navarro с соавт., 2009). Эти замещающие праймеры названы 9992F/9195R, и они расположены в ORF 2.

Праймер	Продукт	Последовательность	Темп.	Температура
9992F	231 п.о.	5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3'	94°C	94°C
9195R		5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'	94°C	94°C
7171F	341 п.о.	5'-CGA-CAG-TTG-GAC-ATC-TAG-TG-3'	94°C	
7511R		5'-GAG-CTT-CAG-ACT-GCA-ACT-TC-3'	94°C	

Метод ОТ-ПЦР, описанный ниже для выявления TSV, в целом отвечает методу, использованному Nunan с соавт., 1998.

- i) **Подготовка матрицы РНК:** РНК можно экстрагировать из свежих, замороженных или законсервированных в этаноле тканей. Экстракцию РНК следует проводить с использованием коммерческих наборов для экстракции РНК, например набор High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Penzberg, Германия), следуя инструкциям производителя для получения качественных матриц РНК.
- ii) ОТ-ПЦР проводится в растворе, используя в качестве матрицы 10 мкл общей РНК, экстрагированной из гемолимфы, замороженных тканей креветок, ткани, фиксированной в этаноле (концентрация РНК = 1–100 нг мл⁻¹).
- iii) В каждый анализ ОТ-ПЦР на TSV следует включить следующие контроли: а) известный TSV-отрицательный образец ткани; б) известный TSV-положительный образец (ткань или очищенный вирус); и с) «нематричный» контроль.
- iv) Для проведения всех реакций амплификации, описанных здесь, использовали ПЦР-набор GeneAmp® EZ rTth RNA PCR kit (Applied Bioscience, Forster City, CA). Для данного анализа можно использовать и адаптировать альтернативные наборы.
- v) Оптимизированные условия для ОТ-ПЦР (итоговая концентрация в 50 мкл общего объема) для детекции TSV в образцах ткани креветок следующие: праймеры (0,62 мкМ каждого), dNTPs (300 мкМ каждого), ДНК-полимераза rTth (2,5 ед 50 мкл⁻¹), ацетат марганца (2,5 мМ), в 5 × EZ буфера (25 мМ бисин, 57,5 мМ ацетата калия, 40% [в/о] глицерина, pH 8,2).
- vi) Если у термоциклера отсутствует нагревательная крышка, на поверхность 50 мкл реакционных смесей вносят легкое минеральное масло (50 мкл) во избежание конденсации или испарения во время термоциклирования.
- vii) Матрицу РНК и все реагенты объединяют и оставляют для проведения обратной транскрипции при температуре 60°C в течение 30 минут, и затем при температуре 94°C в течение 2 минут.

Примечание: Описанные здесь условия реакции оптимизировали с использованием автоматического термоциклера Thermal Cycler GeneAmp 980 (Applied Biosystems). Условия следует оптимизировать для каждого термоциклера, используя известные положительные контроли.

- viii) По завершении обратной транскрипции образцы амплифицируют в течение 40 циклов при следующих условиях: денатурация при температуре 94°C в течение 45 секунд, затем отжиг/удлинение при температуре 60°C в течение 45 секунд. За финальным этапом удлинения в течение 7 минут при температуре 60°C следует

последний цикл, и процесс завершается термической обработкой при 4°C.

- ix) После окончания ОТ-ПЦР растворы амплифицированной кДНК извлекают из-под минерального масла и помещают в 0,5 мл микроцентрифужные пробирки.
- x) Затем 10 мкл образца амплифицированного продукта добавляют в лунку с 2,0% агарозным гелем, окрашивают этидия бромидом (0,5 г мл⁻¹) и проводят электрофорез в 0,5 × TBE (Tris, борная кислота, Этилендиаминтетрауксусная кислота [ЭДТА]).
- xi) ДНК-лестницу 1 т.п.о (Invitrogen, Carlsbad, CA) используют в качестве маркера.
- xii) Описание используемого здесь состава реагентов и буферов см. в Главе 2.2.4. Инфекция вирусом инфекционного некроза гемопоэтической ткани.

4.3.1.2.7.3. Метод ПЦР в реальном времени для выявления TSV

Для выявления TSV разработаны методы ОТ-ПЦР в реальном времени. Эти методы имеют преимущества по параметрам скорости, специфичности и чувствительности. Чувствительность ОТ-ПЦР в реальном времени составляет ~100 копий целевых последовательностей генома TSV (Dhar с соавт., 2002; Tang с соавт., 2004).

Описанный ниже метод ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием зонда TaqMan в целом соответствует методу, описанному Tang с соавт. (Tang с соавт., 2004).

- i) ПЦР-праймеры и зонд TaqMan отбирают из области ORF1 геномной последовательности TSV (GenBank AF4277675), которая кодирует неструктурные белки. Праймеры и зонд TaqMan разрабатывали в программе Primer Express (Life Technologies). Последовательности прямого праймера (TSV1004F) и обратного праймера (TSV1075R) следующие: 5'-TTG-GGC-ACC-AAA-CGA-CAT-T-3' и 5'-GGG-AGC-TTA-AAC-TGG-ACA-CAC-TGT-3'), соответственно. Зонд TaqMan, TSV-P1 (5'-CAG-CAC-TGA-CGC-ACA-ATA-TTC-GAG-CAT-C-3'), который соответствует области от нуклеотида 1024 до нуклеотида 1051, синтезировали и метили флуоресцентными красителями: 5-карбоксифлуоресцеином (FAM) на 5'-конце и N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксиродамином (TAMRA) на 3'-конце.
- ii) *Подготовка РНК-матрицы:* процедура экстракции и очистки РНК-матрицы из гемолимфы или тканей креветок та же, что описана в разделе для традиционной ОТ-ПЦР.
- iii) В каждый цикл реакции следует включить «контроль без матрицы». Это необходимо для исключения присутствия контаминантов в реакционной смеси. Также следует включить положительный контроль. Это может быть транскрибированная *in-vitro* РНК,

содержащая целевую последовательность, очищенные вирионы или РНК, экстрагированную из ткани, инфицированной TSV.

- iv) Реакционная смесь для ОТ-ПЦР в реальном времени содержит: мастер-микс TaqMan Fast virus 1-Step Master Mix (Life Technologies), 0,3 мкМ каждого праймера, 0,1 мкМ зонда TaqMan, 5–50 нг РНК и воду в объеме реакционной смеси, составляющем 10 мкл.
- v) Приложение можно выполнять с использованием ПЦР-системы StepOnePlus (Life Technologies или эквивалентные системы для ПЦР в реальном времени). Циклическая обработка состоит из обратной транскрипции при температуре 50°C в течение 30 минут, начальной денатурации при температуре 95°C в течение 20 секунд с последующими 40 циклами денатурации при температуре 95°C в течение 3 секунд и отжига/ удлинения при температуре 60°C в течение 30 секунд.
- vi) По окончании реакции анализируют показатели флуоресценции в реальном времени. Пороговое значение устанавливают на уровне выше базовой линии. Образцы определяют как отрицательные при отсутствии показателя Ct (пороговый цикл) после 40 циклов. Образцы с показателем Ct ниже 40 циклов считаются положительными.

4.3.1.2.7.4. Секвенирование

Продукты ОТ-ПЦР можно при необходимости секвенировать для подтверждения инфекции TSV или идентификации ложноположительной или неспецифической амплификации (Mari с соавт., 2002; Nielsen с соавт., 2005; Srisuvan с соавт., 2005; Tang & Lightner, 2005; Wertheim с соавт., 2009).

4.3.1.2.8. Очистка возбудителя

Разработаны методы выделения и очистки TSV (Bonami с соавт., 1997, Hasson с соавт., 1995, Mari с соавт., 2002, Poulos с соавт., 1999), но они не рекомендованы для стандартной диагностики синдрома Таура.

4.3.2. Серологические методы

Не применяются, т.к. креветки – это беспозвоночные животные, которые не продуцируют специфические антитела, которые могут быть использованы для демонстрации инфекции во время или после воздействия TSV.

5. Оценка тестов по цели применения

Имеющиеся в настоящее время методы надзора, выявления и диагностики инфекции TSV перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, использованные в Таблице, означают: а = метод рекомендован по причине доступности, практичности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы значительно ограничивают его применение; и d = в настоящее время метод не рекомендуется и/или недоступен для этой цели. Это, в некоторой мере, субъективно, т.к. пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и практичности. Несмотря на то, что не все тесты, перечисленные в категории а или b, прошли официальные процедуры стандартизации и валидации, их рутинная суть и факт их широкого применения без сомнительных результатов делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы надзора, выявления и диагностики

Метод	Надзор				Предварительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	постличинки	постличинки	постличинки	постличинки		
микроскопические поражения					b	
испытание					c	
влажная световая микроскопия (влажный препарат)					c	
гистопатология					a	
иммунофлуоресцентная электронная микроскопия					c	
анализы на основе антител					b	
И-зонды <i>in situ</i>					a	
ПЦР, ОТ-ПЦР в реальном времени					a	
квентирование					d	

PL = постличинки; ОТ-ПЦР = полимерная цепная реакция с обратной транскрипцией.

6. Тест(ы), рекомендованные для целевого надзора в целях признания благополучия по инфекции вирусом синдрома Таура

Согласно Таблице 5.1., ОТ-ПЦР (Раздел 4.3.1.2.7.2) или ОТ-ПЦР в реальном времени (Раздел 4.3.1.2.7.3) являются рекомендованными методами для целевого надзора по причине их доступности, практичности и диагностической специфичности и чувствительности.

При расследовании эпизодов смертности в составе целевого надзора подходит метод демонстрации патогномонических TSV-индуцированных поражений в кутикулярном

эпителии посредством гистологии (с подтверждением посредством ИГХ с TSV-специфичными ДНК-зондами или без подтверждения) (Таблица 5.1.).

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Определение случая подозрения

Инфекцию TSV подозревают, если выполнен по крайней мере один из следующих критериев:

- i) результаты гистопатологии указывают на инфекцию TSV или**
- ii) положительный результат ОТ-ПЦР или ОТ-ПЦР в реальном времени.**

7.2. Определение подтвержденного случая

Инфекция TSV считается подтвержденной, если выполнен один или более из следующих критериев:

- i) результаты гистопатологии указывают на инфекцию TSV**
- ii) положительный результат ИГХ в целевых тканях**
- iii) ОТ-ПЦР (с последующим секвенированием) или ОТ-ПЦР в реальном времени с положительными результатами по TSV.**

8. Библиография

AGUIRRE GUZMAN G. & ASCENCIO VALLE F. (2000). Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Res. Dev. Microbiol.*, **4**, 333–348.

AUDELO DEL VALLE J., CLEMENT-MELLADO O., MAGANA-HERNANDEZ A., FLISSER A., MONTIEL-AGUIRRE F.

& BRISENO-GARCIA B. (2003). Infection of cultured human and monkey cell lines with extract of penaeid shrimp infected with Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**, 265–266.

BONAMI J.R., HASSON K.W., MARI J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1997). Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *J. Gen. Virol.*, **78**, 313–319.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (EDS) (2001). Asia Diagnostic

Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. Rome, FAO, 240 pp.

BROCK J.A. (1997). Special topic review: Taura syndrome, a disease important to shrimp farms in the Americas. *World*

J. Microbiol & Technol., **13**, 415–418.

BROCK J.A., GOSE R., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1995). An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 84–94.

BROCK J.A., GOSE R.B., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1997). Recent developments and an overview of Taura Syndrome of farmed shrimp in the Americas. In: Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 275–283.

CHANG Y.S., PENG S.E., YU H.T., LIU F.C., WANG C.H., LO C.F. & KOU G.H. (2004). Genetic and phenotypic

variations of isolates of shrimp Taura syndrome virus found in *Penaeus monodon* and *Metapenaeus ensis* in Taiwan. *J. Gen. Virol.*, **85**, 2963–2968.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In: Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress, D.E. Jory, ed., Panama City, Panama, 1–11.

DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2002). Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry. *J. Virol. Methods*, **104**, 69–82.

DIXON H. & DORADO J. (1997). Managing Taura syndrome in Belize: a case study. *Aquaculture Magazine*,
May/June, 30–42.

ERICKSON H.S., POULOS B.T., TANG K.F.J., BRADLEY-DUNLOP D. & LIGHTNER D.V. (2005). Taura syndrome virus from Belize represents a unique variant. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 91–98.

ERICKSON H.S., ZARAIN-HERZBERG M. & LIGHTNER D.V. (2002). Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostic methods: diagnostic implications in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 1–10.

FEGAN D.F. & CLIFFORD H.C. III. (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms. *In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 168–198.

GARZA J.R., HASSON K.W., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (1997). Demonstration of infectious taura syndrome virus in the feces of sea gulls collected during an epizootic in Texas. *J. Aquat. Anim. Health*,
9, 156–159.

HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.

HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MARI J., BONAMI J.R., POULOS B.T., MOHNEY L.L., REDMAN R.M. & BROCK J.R. (1999a). The geographic distribution of Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas: determination by histology and *in situ* hybridization using TSV-specific cDNA probes. *Aquaculture*, **171**, 13–26.

HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T. & WHITE B.M. (1999b). Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 81–93.

HASSON K.W., LIGHTNER D.V., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L., BROCK J.A. & BONAMI J.R. (1995).

Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 115–126.

INTRIAGO P., JIMENEZ R., MACHUCA M., BARNIOL R., KRAUSS E. & SALVADOR X. (1997). Experiments on

toxicosis as the cause of Taura Syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) in Ecuador. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*. Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 365–379.

JIMENEZ R. (1992). Síndrome de Taura (Resumen). *In: Acuicultura del Ecuador*. Cámara Nacional de Acuicultura, Guayaquil, Ecuador, 1–16.

JIMENEZ R., BARNIOL R., DE BARNIOL L. & MACHUCA M. (2000). Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 91–99.

KING A., ADAMS M., CARSTENS E. & LEFKOWITZ E.J. (2011). Virus Taxonomy, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, Academic Press, London, UK, 797–801.

LARAMORE C.R. (1997). Shrimp culture in Honduras following the Taura syndrome virus. *In: Proceedings of the 4th Symposium on Aquaculture in Central America: Focusing on Shrimp and Tilapia*, Tegucigalpa, Honduras, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1–7.

LIGHTNER D.V. (1995). Taura syndrome: an economically important viral disease impacting the shrimp farming industries of the Americas including the United States. *In: Proceedings of the 99th Annual Meeting US Animal Health Association*, Reno, Nevada, USA, 36–52.

LIGHTNER D.V. (ED.) (1996a). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.

LIGHTNER D.V. (1996b). Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. sci. tech. Office int. Epiz.*, **15**, 579–601.

LIGHTNER D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquaculture*, **9**, 27–52.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. (2011). Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. *In: Diseases in Asian Aquaculture VII*, Bondad-Reantaso M.G., Jones J.B., Corsin F. & Aoki T., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, 121–134.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998a). Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.*, **33**, 165–180.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998b). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, 384–424.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., HASSON K.W. & PANTOJA C.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 53–59.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.

LOTZ J.M. (1997a). Disease control and pathogen status assurance in an SPF-based shrimp aquaculture industry, with particular reference to the United States. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 243–254.

LOTZ J.M. (1997b). Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 45–51.

LOTZ J.M., ANTON L.S. & SOTO M.A. (2005). Effect of chronic Taura syndrome virus infection on salinity tolerance of

Litopenaeus vannamei. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 75–78.

LOTZ J.M., BROWDY C.L., CARR W.H., FRELIER P.F. & LIGHTNER D.V. (1995). USMSFP suggested procedures

and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed. *In*: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 66–75.

LOTZ J.M., FLOWERS A.M. & BRELAND V. (2003). A model of Taura syndrome virus (TSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **83**, 168–176.

LU Y. & SUN P.S. (2005). Viral resistance in shrimp that express an antisense Taura syndrome virus coat protein gene.

Antiviral Res., **67**, 141–146.

LUO P., HU C.Q., REN C.H. & SUN Z.F. (2004). Taura syndrome virus and mammalian cell lines. *Emerg. Infect. Dis.*,

10, 2260–2261.

MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1998). Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 11–17.

MARI J., POULOS B.T., LIGHTNER D.V. & BONAMI J.R. (2002). Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses. *J. Gen. Virol.*, **83**, 915–926.

MOSS S.M., ARCE S., ARGUE B.J., OTOSHI C.A., CALDERON F.R.O. & TACON A.G.J. (2001). *In*: The New Wave,

Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1–19.

NAVARRO S.A., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2009). An improved Taura syndrome virus (TSV) RT-PCR using newly designed primers. *Aquaculture*, **293**, 290–292.

NIELSEN L., SANG-OUM W., CHEEVADHANARAK S. & FLEGEL T.W. (2005). Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 101–106.

NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 87–91.

OVERSTREET R.M., LIGHTNER D.V., HASSON K.W., MCILWAIN S. & LOTZ J. (1997). Susceptibility to TSV of some penaeid shrimp native to the Gulf of Mexico and southeast Atlantic Ocean. *J. Invertebr. Pathol.*, **69**, 165–176.

PANTOJA C.R., NAVARRO S.A., NARANJO J., LIGHTNER D.V. & GERBA C.P. (2004). Nonsusceptibility of primate cells to Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2106–2112.

POULOS B.T., KIBLER R., BRADLEY-DUNLOP D., MOHNEY L.L. & LIGHTNER D.V. (1999). Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 99–106.

PRUDER G.D., BROWN C.L., SWEENEY J.N. & CARR W.H. (1995). High health shrimp systems: seed supply – theory and practice. In: *Swimming through Troubled Water*, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 40–52.

ROBALINO J., BROWDY C.L., PRIOR S., METZ A., PARNELL P., GROSS P. & WARR G. (2004). Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J. Virol.*, **78**, 10442–10448.

ROBLES-SIKISAKA R., GARCIA D.K., KLIMPEL K.R. & DHAR A.K. (2001). Nucleotide sequence of 3'-end of the genome of Taura syndrome virus of shrimp suggests that it is related to insect picornaviruses. *Arch. Virol.*, **146**, 941–952.

SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Experimental infection of *Penaeus monodon* with Taura syndrome virus (TSV). *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 1–8.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Phylogenetic analysis of Taura syndrome virus isolates collected between 1993 and 2004 and virulence comparison between two isolates representing different genetic variants. *Virus Research*, **112**, 69–76.

TANG K.F.J., NAVARRO S.A., PANTOJA C.R., ARANGUREN F.L. & LIGHTNER D.V. (2012). New genotypes of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) from the Kingdom of Saudi Arabia. *Dis. Aquat. Org.*, **99**, 179–185.

TANG K.F.J., WANG J. & LIGHTNER D.V. (2004). Quantitation of Taura syndrome virus by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. *J. Virol. Methods*, **115**, 109–114.

TU C., HUANG H.T., CHUANG S.H., HSU J.P., KUO S.T., LIN J., HUS T.L., LI M.C. & LIN S.Y. (1999). Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 159–161.

VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.

WERTHEIM J.O., TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2009). A quick fuse and the emergence of Taura syndrome virus. *Virology*, **390**, 324–329.

WHITE B.L., SCHOFIELD P.J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2002). A laboratory challenge method for estimating Taura Syndrome virus resistance in selected lines of Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, **33**, 341–348.

WYBAN J.A. (1992). Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 257–268.

WYBAN J., WHITE B. & LIGHTNER D.V. (2004). TSV Challenges Advance Selective Breeding in Pacific White Shrimp.

Global Aquaculture Advocate, 7, 40–41.

YU C.I. & SONG Y.L. (2000). Outbreaks of Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Fish Pathol.*, **35**, 21–24.

ZARAIN-HERZBERG M. & ASCENCIO-VALLE F. (2001). Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*, **193**, 1–9.

*

* *

NB: Существует Референтная лаборатория МЭБ по вирусу синдрома Таура (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 об инфекции вирусом синдрома Таура

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2000 ГОДУ; ПОСЛЕДНИЕ ОБНОВЛЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2017 ГОДУ.

ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ, ВЫЗЫВАЮЩИМ БОЛЕЗНЬ БЕЛЫХ ПЯТЕН

1. Предмет рассмотрения

Заражение вирусом, вызывающим болезнь белых пятен означает заражение патогенным агентом вируса, вызывающего болезнь белых пятен (WSSV), рода *Whispovirus*, семейства *Nimaviridae*.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы агента

2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

WSSV был определен Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) как единственный представитель рода *Whispovirus* в семействе *Nimaviridae*. Вирионы WSSV имеют яйцевидную, эллипсоидную или палочкообразную форму, правильную симметричную форму и размеры 80–120 нм в диаметре и 250–380 нм в длину. На одном конце вириона может наблюдаться жгутоподобное расширение (придасток). Сегодня, несмотря на то, что были идентифицированы различные географические изоляты с генотипической изменчивостью, все они классифицируются как один вид (вирус, вызывающий болезнь белых пятен) в пределах рода *Whispovirus* (Lo с соавт., 2012).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Агент жизнеспособен в течение не менее 30 дней при 30°C в морской воде в лабораторных условиях (Мотоуата с соавт., 1998); и в прудах в течение не менее 3–4 дней (Накано и др., 1998). Лабораторные модели водоемов с системой дренажа и без нее позволяют предположить, что вирус больше не является инфекционным

после 21 дня высыхания на солнце или после 40 дней в затопленном осадке водоема (Satheesh Kumar с соавт., 2013).

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

Агент инактивируют через <120 минут при температуре 50°C и <1 минуты при температуре 60°C (Nakano с соавт., 1998). При лабораторных исследованиях, WSSV инактивировали при следующих условиях:

Нагрев: 55°C в течение 90 минут, 70°C в течение 5 минут (Chang с соавт., 1998); 50 °C в течение 60 минут; 60°C в течение 1 минуты; 70°C в течение 0,2 минут (Nakano et al, 1998)

Сушка: WSSV, адсорбированный на фильтровальной бумаге и оставленный для сушки, впоследствии инактивировали через 1 час при 30°C и через 3 часа при 26°C (Maeda с соавт., 1998; Nakano с соавт., 1998).

pH: pH 3 в течение 60 минут; pH 12 в течение 10 минут (Balasubramanian с соавт., 2006; Chang с соавт., 1998).

УФ-излучение: Общая доза 9.30×10^5 мкВн/см² (Chang с соавт., 1998).

Озон: Общая концентрация остаточных окислителей 0,5 мкг / мл в течение 10 минут (Chang с соавт., 1998).

Гипохлорит натрия: общая концентрация свободного хлора 100 ч / млн в течение 10 минут (Chang с соавт., 1998).

Хлорид бензалкония: 100 ч / млн в течение 10 минут (Balasubramanian с соавт., 2006).

Йодофор: Общая концентрация свободного йода 100 ч / млн в течение 10 минут (Chang с соавт., 1998).

Жизненный цикл

Исследования *in vitro* с использованием первичной культуры клеток и исследования *in vivo* с использованием постличинки (PL) показывают, что цикл репликации составляет приблизительно 20 часов при 25°C (Chang с соавт., 1996; Chen с соавт., 2011; Wang с соавт. 2000).

2.2. Факторы хозяина

Вирус может инфицировать широкий спектр водных ракообразных, особенно десятиногих ракообразных, включая креветок, крабов, раков и омаров, обитающих в морской, солоноватой и пресной воде (Maeda с соавт., 1998).

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Из всех видов, которые были исследованы на сегодняшний день, десятиногие ракообразные (отряд Decapoda) из источников с морской, солоноватой или пресной водой, как сообщается, не устойчивы к заражению WSSV (Flegel, 1997; Lightner, 1996; Lo & Kou, 1998).; Maeda с соавт., 1998; Stentiford с соавт., 2009).

2.2.2. Стадии восприимчивости хозяина

Все стадии жизни потенциально восприимчивы, от яиц до маточного стада (Lightner, 1996; Venegas с соавт., 1999). Генетический материал WSSV был обнаружен в репродуктивных органах (Lo с соавт., 1997), но восприимчивость гамет к инфекции WSSV не была определена окончательно.

2.2.3. Вероятность обнаружения видов и субпопуляций

Лучшими стадиями жизни ракообразных для обнаружения вируса WSSV являются поздние постличиночные стадии, молодь и взрослые особи. Вероятность обнаружения может быть увеличена при воздействии стрессовых условий (например, абляция глазного стебля, нерест, линька, изменения солености, температуры или pH, а также во время цветения планктона).

2.2.4. Целевые органы и инфицированная ткань

Основные ткани-мишени WSSV имеют эктодермальное и мезодермальное эмбриональное происхождение, особенно кутикулярный эпителий и подкожные соединительные ткани (Momoуama с соавт., 1994; Wu с соавт., 2013). Несмотря на то, что WSSV инфицирует нижележащую соединительную ткань гепатопанкреаса и средней кишки ракообразных, клетки цилиндрического эпителия этих двух органов имеют эндодермальное происхождение и не инфицируются.

2.2.5. Устойчивая инфекция

Было продемонстрировано, что многие виды десятиногих субклинически инфицированы WSSV и считаются носителями (Lo & Kou, 1998).

2.2.6. Векторы

Вирус может передаваться напрямую от хозяина к хозяину без участия биологического вектора.

2.2.7. Известные или подозрительные дикие водные животные-носители

Известно, что дикие десятиногие ракообразные являются резервуарами инфекции WSSV, включая *Mysis sp.* (Huang с соавт., 1995), *Acetes sp.*, *Alpheus sp.*, *Callinassa sp.*, *Echopalaemon sp.*, *Helice sp.*, *Hemigrapsus sp.*, *Macrophthalmus sp.*, *Macrophthel sp.*, *Metaplex sp.*, *Orithyia sp.*, *Palaemonoidea sp.*, *Scylla sp.*, *Sesarma sp.*, *Stomatopoda sp.* (He & Zhou, 1996; Lei с соавт., 2002). Эти виды могут демонстрировать симптомы болезни при подходящих условиях окружающей среды. Тем не менее, ракообразные, не относящиеся к десятиногим, такие как веслоногие ракообразные (Huang с соавт., 1995), коловратки (Yan с соавт., 2004), *Balanus sp.* (Lei с соавт., 2002) и *Tachypleidue sp.* (He & Zhou, 1996) могут быть, по-видимому, здоровыми животными-носителями. Существуют неубедительные доказательства статуса носителя WSSV у *Artemia salina* (Chang с соавт., 2002). Другие морские моллюски, полихеты (Vijayan с соавт., 2005), а также водные членистоногие, не являющиеся ракообразными, такие как морские ракушки (Isopoda) и личинки насекомых *Euphydradae*, могут механически переносить вирус без признаков инфекции (Lo & Kou, 1998).

2.3. Клиническая картина болезни

Заражение вирусом WSSCV иногда вызывает клиническое течение болезни (Tsai с соавт., 1999), в зависимости от факторов, которые еще недостаточно изучены, но связаны с устойчивостью видов и триггерами окружающей среды. При соответствующей дозе инфекции, достаточной для обеспечения достаточного времени до смерти, у животных, восприимчивых к болезни наблюдается большое количество вирионов, циркулирующих в гемолимфе (Lo с соавт., 1997), но это также может происходить и у устойчивых видов, у которых смертность не регистрируется. Таким образом, высокие вирусные нагрузки сами по себе не вызывают болезни или смертности для всех восприимчивых видов.

2.3.1. Механизмы передачи

Инфекция вирусом WSSV может передаваться горизонтально путем потребления инфицированной ткани (например, каннибализм, хищничество и т. д.) и по водным путям. Передача WSSV может происходить от практически здоровых животных при отсутствии болезни. Мертвые и умирающие животные могут быть источником передачи болезни (Lo & Kou, 1998).

Достоверная вертикальная передача (внутри яйцеклетки) WSSV к потомству не была продемонстрирована.

2.3.2. Превалентность

Превалентность инфекции WSSV сильно варьирует: от <1% в инфицированных диких популяциях до 100% в популяциях, содержащихся в неволе (Lo & Kou, 1998).

2.3.3. Географическое распределение

Заражение вирусом WSSV было выявлено у ракообразных в Китае (Народная Республика), Японии, Корее (Республика), Юго-Восточной Азии, Южной Азии, на Индийском континенте, на Средиземном море (Stentiford & Lightner, 2011), в Среднем Востоке и Северной и Южной Америках. В этих регионах имеются зоны и компартменты, свободные от инфекции WSSV (Lo с соавт., 2012).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Все виды креветок-пенеидов очень чувствительны к заражению вирусом WSSV, что часто приводит к высокой смертности. Крабы, раки, пресноводные креветки, лангусты и омары подвержены заражению вирусом WSSV, но заболеваемость и смертность от инфекции сильно варьируют (Lo & Kou, 1998). Высокие уровни инфекции WSSV известны у некоторых десятиногих при отсутствии клинического заболевания.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Вспышки болезни могут быть вызваны стрессовыми факторами, такими как быстрые изменения солености. Температура воды оказывает сильное влияние на проявление болезни, при этом средние температуры воды от 18 до 30°C способствуют вспышкам вируса WSSV (Song с соавт., 1996; Vidal с соавт., 2001). В условиях экспериментального заражения WSSV-индуцированная смертность у креветок снижается при повышении температуры выше 32°C (Vidal с соавт., 2001).

2.4. Контроль и профилактика

Несмотря на то, что основной механизм остается неизвестным, лабораторные эксперименты показали, что у «привитых» креветок и раков лучшая выживаемость после заражения вирусом WSSV. Впервые было показано, что креветки *Penaeus*

japonicus, которые выжили при естественных и экспериментальных заражениях вирусом WSSV, продемонстрировали устойчивость к последующему заражению вирусом WSSV (Venegas с соавт., 2000). Более поздние исследования показали, что внутримышечная инъекция инаktivированных вирионов WSSV или рекомбинантного структурного белка (VP28) обеспечивала креветкам некоторую защиту от экспериментальной инфекции вирусом WSSV. Кроме того, креветки, которым скармливали пищевые гранулы, покрытые инаktivированными бактериями, сверх-экспрессирующими VP28, показали лучшую выживаемость после заражения вирусом WSSV (Witteveldt с соавт., 2004). Однако, несмотря на то, что эти результаты казались многообещающими, защита была эффективной только тогда, когда креветки были инфицированы низкой дозой вируса WSSV. Кроме того, эффект обычно длился всего несколько дней, а в случае раков - около 20 дней. Другим потенциальным средством защиты креветок от заражения вирусом WSSV является использование РНК-интерференции (РНКи). Ген-специфические двухцепочечные (дц) РНК вируса WSSV продуцировали сильную активность против WSSV, защищая креветок от инфекции WSSV, но то же исследование показало, что длинная двухцепочечная РНК индуцировала как зависимые от последовательности, так и независимые противовирусные ответы у креветок (Robalino с соавт. al., 2005). Более недавнее исследование показало, что даже пероральное введение бактериально экспрессированной VP28 дцРНК может защитить креветку от инфекции WSSV (Sarathi с соавт., 2008). Тем не менее, хотя технология дцРНК продолжает изучаться, данных о полевых испытаниях вакцинации или подходе, основанном на РНКи, до сих пор нет.

2.4.1. Вакцинация

Эффективные методы вакцинации против инфекции вирусом WSSV не разработаны.

2.4.2. Химиотерапия

Опубликованные или валидированные методы отсутствуют.

2.4.3. Стимуляция иммунитета

Имеется несколько сообщений о том, что бета-глюкан, витамин С, экстракты водорослей (Several reports have shown that beta-glucan, vitamin C, seaweed extracts (фукоидан) и другие стимуляторы иммунитета могут повысить устойчивость к инфекции WSSV (Chang с соавт., 2003; Chotigeat с соавт., 2004).

2.4.4. Разведение устойчивых видов

Имеется сообщения об успехах в разведении *P. vannamei* с целью повышения устойчивости к инфекции вирусом WSSV has been reported (Cuéllar-Anjel et al., 2012; Huang с соавт., 2012).

2.4.5. Восполнение поголовья устойчивыми видами

Не применимо к инфекции вирусом WSSV.

2.4.6. Блокирующие агенты

В настоящее время нет эффективных блокирующих агентов, которые можно рекомендовать. rVP28 оказывает влияние, но его пока нельзя использовать в качестве практического блокирующего агента.

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

В отношении передачи через икру дезинфекция икры, вероятно, будет эффективной (Lo & Kou, 1998), но это еще не подтверждено в официальных научных исследованиях.

2.4.8. Общие практики содержания

Для борьбы с инфекцией WSSV был успешно использован ряд методов выращивания, таких как отказ от посадки в холодное время года, использование маточного поголовья, свободного от специфической патогенной микрофлоры (SPF) или демонстрирующего отрицательные результаты в полимеразной цепной реакции (ПЦР), использование биологически безопасной воды и системы разведения (Withyachumnarnkul, 1999) и поликультуры креветок и рыб (He с соавт., неопубликованные данные).

3. Отбор образцов

3.1. Выбор индивидуальных образцов

Образцы умирающих креветок или креветок, у которых наблюдаются клинические признаки (см. Раздел 4.1.1) или которые демонстрируют поведенческие изменения (раздел 4.1.2), должны быть отобраны на исследования с целью обнаружения вируса WSSV.

3.2. Консервирование образцов для представления

Смотрите Главу 2.2.0 для рекомендаций по консервированию образцов для предполагаемого метода исследования.

3.3. Объединение образцов в пул

Влияние объединения в пул на диагностическую чувствительность не оценивалось, поэтому исследование особей на более поздних стадиях жизненного цикла должно осуществляться отдельно. Однако может потребоваться объединение в пул особей на ранних жизни, например, постличинки, для получения достаточного материала для экстракции нуклеиновой кислоты и проведения молекулярных исследований.

3.4. Наиболее подходящие органы и ткани

Анализ тканевого тропизма как из экспериментально инфицированных креветок, так и из отловленных в дикой природе самок показывает, что ткани, происходящие из эктодермы и мезодермы, особенно кутикулярный эпителий и подкожные соединительные ткани, а также другие ткани-мишени (например, антеннальная железа, кроветворный орган и т. д.), являются основными тканями-мишенями для заражения вирусом WSSV. Образцы плеоподов, жабр, гемолимфы, живота или брюшной мышцы рекомендуются для исследований (Lo с соавт., 1997).

Для скрининга с сохранением жизнеспособности ценного маточного поголовья с помощью ПЦР подходят гемолимфа или плеоподы. Пожалуйста, см. Раздел 4.3.1.2.4.1 для получения подробной информации о процедуре отбора образцов. (Lo с соавт., 1997).

3.5. Неподходящие образцы/ткани

Несмотря на то, что WSSV инфицирует нижнюю соединительную ткань в гепатопанкреасе и средней кишке креветок, столбчатые эпителиальные клетки этих двух органов имеют эндодермальное эмбриональное происхождение (Lo с соавт., 1997), и они не подходят для обнаружения. Фасетчатый глаз может содержать ингибитор ПЦР (Lo с соавт., 1997), и поэтому он не подходит для диагностики на основе ПЦР.

4. Методы диагностики

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Белые пятна внутри внешнего скелета являются наиболее часто наблюдаемым клиническим признаком. У большинства креветок эти пятна варьируются от едва видимых до 3 мм в диаметре, и они иногда объединяются в более крупные пятна. Однако следует отметить, что факторы стресса окружающей среды, такие как высокая щелочность или бактериальные заболевания, также могут вызывать белые пятна на панцире креветок, и что у умирающих креветок при заражении WSSV может наблюдаться небольшое количество белых пятен, или могут не наблюдаться вообще. Следовательно, появление белых пятен не является достоверным диагностическим признаком заражения WSSV. В заболевших популяциях наблюдается высокая степень изменения цвета с преобладанием красноватых или розоватых обесцвеченных креветок.

Инфекции вирусом WSSV могут быть субклиническими или проявляться как клиническое заболевание. Креветки-пенеиды в аквакультуре обычно демонстрируют клинические признаки, связанные с высокой заболеваемостью и смертностью. Некоторые животные могут умереть без каких-либо клинических признаков. Виды, не относящиеся к пенеидам (например, краб, лобстер) обычно имеют субклинические инфекции в естественных условиях.

4.1.2. Поведенческие изменения

У пораженных животных могут наблюдаться летаргия, сниженное потребление корма или отказ от него, и ненормальное поведение при плавании - медленное плавание, плавание на боку, плавание у поверхности воды и кучкование вокруг краев отсеков для выращивания (Corbel с соавт., 2001; Sahul Hameed с соавт., 1998 Sahul Hameed с соавт., 2001). В течение нескольких дней после появления поведенческих признаков можно ожидать очень высокий уровень смертности в популяции креветок.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

В дополнение к клиническим и поведенческим признакам в разделе 4.1.1 и 4.1.2 выше, у клинически пораженной пенеидной креветки отмечена следующая макропатология: неплотное прилегание панцыря с кутикулярным эпителием внизу (Sánchez-Paz, 2010), поэтому панцирь может легко удалить (Zhan с соавт., 1998); пустой желудочно-кишечный тракт вследствие анорексии (Escobedo-Bonilla с соавт., 2008); задержка свертывания гемолимфы (Heidarieh с соавт., 2013); чрезмерное обрастание жабр (Wu с соавт., 2013) и внешний скелет.

4.2.2. Клиническая химия

Гемолимфа, извлеченная из креветок, инфицированных вирусом WSSV- всегда демонстрирует отсроченную (или иногда полностью отсутствующую) реакцию свертывания.

4.2.3. Микроскопия патологических изменений

4.2.3.1. Влажные препараты

Демонстрация гипертрофированных ядер в давленных препаратах жабр и / или кутикулярного эпителия, которые могут быть окрашены или не окрашены.

4.2.3.1.1. Т-Е окрашивание

Окрашивающий раствор Т-Е может быть приготовлен из 0,6% трипанового синего, 0,2% эозина Y, 0,5% NaCl, 0,5% фенола и 20% глицерина (Huang & Yu, 1995) и использоваться следующим образом:

- i) Кусочек пораженной ткани (например, кусочек жабры или эпителия желудка без кутикулы) помещают на предметное стекло и измельчают скальпелем.
- ii) Добавляют 1–2 капли окрашивающего раствора Т-Е в измельченную ткань, перемешивают и оставляют для окрашивания на 3–5 минут.
- iii) Покровное стекло помещают на испачканную салфетку и накрывают несколькими кусочками впитывающей бумаги. Используют большой палец, чтобы раздавить измельченную ткань для получения одного слоя клеток.

Если образец был отобран от сильно инфицированной креветки, то гипертрофированные ядра и внутриядерные эозинофильные или вакуумоподобные тела включения легко заметить под световым микроскопом 400-1000 ×.

4.2.3.2. Мазки

Демонстрация агрегатов вирионов WSSV в неокрашенных мазках гемолимфы методом темнопольной микроскопии.

ПРИМЕЧАНИЕ. Это самый простой из микроскопических методов, который рекомендуется людям с ограниченным опытом диагностики инфекции, вызванной WSSV. Агрегаты выглядят как небольшие отражающие пятна диаметром 0,5 мкм (Мотоуата с соавт., 1995).

4.2.3.3. Зафиксированные срезы

Гистологические изменения, обычно отмечаемые у восприимчивых видов, включают в себя: гипертрофированные ядра с маргинизированным материалом хроматина в инфицированных вирусом клетках; окрашенные эозинофильные или бледно-базофильные (окрашивание гематоксилином и эозином) внутриядерные вирусные включения в гипертрофированных ядрах и мультифокальный некроз, ассоциированный с пикнотическими и кариоректическими ядрами в пораженных тканях эктодермального и мезодермального происхождения. Инфицирование вирусом инфекционного иподермального и гематопозитического некроза, другим ДНК-вирусом, приводит к сходным включениям, которые необходимо отличать от включений WSSV.

4.2.3.4. Гибридизация *in-situ*

Использование WSSV-специфических ДНК-зондов с гистологическими срезами для демонстрации присутствия нуклеиновой кислоты WSSV в инфицированных клетках.

4.2.3.5. Иммуногистохимия

Использование WSSV-специфических антител с гистологическими срезами или влажными препаратами для демонстрации присутствия антигена WSSV в инфицированных клетках.

4.2.4. Электронная микроскопия/цитопатология

Демонстрация вируса в срезах тканей или в полуочищенных отрицательно окрашенных вирусных препаратах (например, из гемолимфы). См. Раздел 2.1.1 для морфологии вирионов.

4.3. Методы обнаружения и идентификации агента

4.3.1. Прямые методы обнаружения

Данные отсутствуют.

4.3.1.1. Микроскопические методы.

Смотрите Раздел 4.2.3 выше.

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Смотрите Раздел 4.2.3.1 выше.

4.3.1.1.2. Смывы

Смотрите Раздел 4.2.3.2 выше

4.3.1.1.3. Зафиксированные срезы.

Смотрите Раздел 4.2.3.3 выше.

4.3.1.2. Выделение и идентификация агента

4.3.1.2.1. Метод биопробы

Если доступны SPF-креветки, следующий метод биопробы, основанный на Nunan с соавт., 1998 и Durand с соавт., 2000, подходит для диагностики WSSV.

- i) Для биопробы плеоподов удаляют от креветок, предположительно инфицированных WSSV, и гомогенизируют в буфере TN (0,02 М Трис / HCl, 0,4 М NaCl, pH 7,4).
- ii) После центрифугирования при 1000 g в течение 10 минут разбавляют надосадочную жидкость 1/10 2% NaCl и отфильтровывают (фильтр 0,2 мкм).
- iii) Вводят 0,2 мл инокулята в дорсо-латеральную часть четвертого брюшного сегмента индикаторной креветки (например, SPF *Penaeus vannamei* на ювенильной стадии), вводя между тергальными пластинами в мышцу третьего брюшного сегмента.
- iv) Умирающих креветок обследуют с применением макроскопических методов или с использованием методов, описанных выше. Если через 3–5 дней после инокуляции все еще нет умирающих креветок и все результаты теста отрицательные, то можно с уверенностью сделать вывод, что результаты биопробы отрицательные.

4.3.1.2.2. Культура клеток/искусственная среда

WSSV может быть выделен из первичных культур лимфоидных клеток или клеток яичников. Тем не менее, НЕ рекомендуется использовать клеточную культуру в качестве обычного метода выделения из-за: 1) высокого риска контаминации, и из-за того, что 2) состав среды варьируется в зависимости от типа ткани, вида хозяина и экспериментальной цели; то есть на сегодняшний день не существует стандартных или признанных сред, которые можно было бы рекомендовать. Поскольку первичную культуру клеток так сложно получить и поддерживать для целей выделения вируса, метод биопробы должен быть основным средством размножения вируса.

4.3.1.2.3. Методы обнаружения антигена на основе антител

Как поликлональные, так и моноклональные антитела, полученные против вируса или рекомбинантного вирусного структурного белка, использовались в различных иммунологических анализах, включая вестерн-блоттинг, иммунодоттинг, непрямую реакцию иммунофлуоресценции (РНИФ), иммуногистохимию (ИНС) или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления WSSV (Huang с соавт., 1995; Poulos с соавт., 2001; Sithigorngul с соавт., 2006; Yoganandhan с соавт., 2004). Методы, основанные на антителах, могут быть быстрыми, удобными и применимыми для использования в полевых условиях, но, поскольку они имеют примерно ту же чувствительность, что и одноэтапная ПЦР, их рекомендуется использовать только для подтверждения острой инфекции WSSV.

4.3.1.2.4. Методы молекулярных исследований

4.3.1.2.4.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Протокол ПЦР, описанный здесь, заимствован у Lo с соавт., 1996a и Lo с соавт., 1996b, и использует методы отбора проб Lo с соавт., 1997. Он рекомендуется для всех ситуаций, когда требуется заражение с диагнозом WSSV. Положительный результат на первом этапе этого стандартного протокола подразумевает серьезное заражение WSSV, тогда как, когда положительный результат получается только на втором этапе амплификации, указывается латентная инфекция или инфекция в состоянии носительства. Также были разработаны альтернативные ПЦР-анализы (например, Nunan & Lightner, 2011), но перед их использованием их следует сначала сравнить с протоколом, описанным здесь.

Коммерческие наборы для ПЦР доступны для обнаружения WSSV и являются приемлемыми, если они были валидированы как пригодные для этой цели. Пожалуйста, обратитесь к Списку МЭБ чтобы получить информацию о наборах, которые были сертифицированы МЭБ

Экстракция ДНК

- i) Отбирают 100–200 мг креветочной ткани (от плеоподов живых особей креветки от ювенольного до переходного периода, пост-личинки 11 и выше [PL11 выше] с удаленными головами или целые PL10 или используют 100 мкл гемолимфы) в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку с 600 мкл раствора для лизиса (100 mM NaCl, 10 mM Трис / HCl, pH 8, 25 mM ЭДТА [этилендиаминтетрауксусная кислота], 0,5% SLS [N-лаурилсаркозинат натрия] или 2% SDS [додецилсульфат натрия] и 0,5 мг мл⁻¹ протеиназы К добавляют непосредственно перед использованием). Для неразрушающего скрининга плеоподы могут быть удалены раскаленным пинцетом. Для этой процедуры животное должно быть завернуто во влажное полотенце, чтобы оставался открытым только орган, подлежащий удалению.
- ii) Используя одноразовую палочку, тщательно гомогенизируют ткань в пробирке.
- iii) После гомогенизирования инкубируют при температуре 65°C в течение 1 часа.
- iv) Добавляют 5 M NaCl до получения конечной концентрации 0,7 M. Затем медленно добавляют 1/10 объема раствора N-цетил N, N, N-триметиламмоний бромида (СТАВ/ЦТАБ) / NaCl (10% ЦТАБ в 0,7 M NaCl) и тщательно перемешивают.

ПРИМЕЧАНИЕ. В дополнение к методу экстракции ЦТАБ, описанному здесь, коммерческие наборы для экстракции часто используются во время обычной деятельности по надзору.

- v) Инкубируют при 65 °C в течение 10 минут, а затем при комнатной температуре добавляют равный объем хлороформа / изоамилового спирта (24/1) и осторожно перемешивают. Центрифугируют при 13000 g в течение 5 минут, а затем переносят водный раствор (верхний слой) в свежую 1,5 мл пробирку и добавляют равный объем фенола.
- vi) Последний верхний слой переносят в новую пробирку, осторожно смешивают с двумя объемами хлороформа / изоамилового спирта (24/1) и центрифугируют при 13000 g в течение 5 минут.
- vii) Верхний слой переносят в новую пробирку и осаждают ДНК, добавляя два объема 95% или абсолютного этилового спирта с последующим выдерживанием при -20°C в течение 30 минут или при -80°C в течение 15 минут.
- viii) Центрифугируют при 13000 g в течение 30 минут и удаляют этиловый спирт. Промывают осажденную ДНК 70% этиловым спиртом, высушивают и ресуспендируют в 100 мкл стерилизованной дважды дистиллированной воды при 65°C в течение 15 минут
- ix) 1 мкл данного раствора ДНК используют для одной ПЦР.

Примечание: следующие процедуры "вложенной" ПЦР хорошо разработаны и обеспечивают надежные результаты диагностики при указанных условиях. Однако следует позаботиться о том, чтобы образцы ДНК были приготовлены из рекомендованных органов и чтобы точно соблюдался температурный режим, требуемый для проведения ПЦР (особенно для отжига, рекомендуемая температура составляет 55 ° С). Чтобы предотвратить возможность ложноположительных результатов, важно придерживаться указанных процедур, особенно когда они используются для тестирования новых хозяев-кандидатов, таких как *Cherax quadricarinatus* (Claydon с соавт., 2004), а также *Procambarus clarkii* (Луизианский рак) и *Procambarus zonangulus* (белый речной рак). Для диагностированных случаев заражения WSSV у нового хозяина или в ранее свободной зоне следует использовать секвенирование ДНК для подтверждения положительных результатов.

Первый этап ПЦР

- i) Добавляют 1 мкл матричного раствора ДНК (содержащего около 0,1–0,3 мкг ДНК) в пробирку для ПЦР, содержащую 100 мкл реакционной смеси (10 mM Трис / HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% Тритон X- 100, 200 мкМ каждого dNTP, 100 пмоль каждого праймера, 2 единицы термостабильной ДНК-полимеразы).
- ii) Последовательности внешнего праймера: 146F1, 5'-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCTAG-3' и 146R1, 5'-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3'.
- iii) Профиль ПЦР - один цикл при 94 ° С в течение 4 минут, 55° С в течение 1 минуты и 72°С в течение 2 минут, после чего следует 39 циклов при 94 °С в течение 1 минуты, 55°С в течение 1 минуты и 72 ° С в течение 2 минут и окончательное 5-минутное удлинение при 72°С. WSSV-специфичный ампликон этой реакции составляет 1447 п.н. Чувствительность составляет примерно 20000 копий плазмидной матрицы.

Второй этап («вложенной») ПЦР

Данный второй этап необходим для обнаружения WSSV у креветок на стадии носительства.

- i) Добавляют 10 мкл продукта первого этапа ПЦР к 90 мкл ПЦР-смеси с таким же составом, как указано выше, за исключением того, что он содержит вторую (внутреннюю) пару праймеров: 146F2 (5'-GTA-ACT-GCC-CCT) - TCC-ATC-TCC-A-3 ') и 146R2 (5'-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3').
- ii) Используют тот же протокол амплификации ПЦР, что и выше. WSSV-специфичный ампликон данной реакции составляет 941 п.н. Общая чувствительность обоих этапов составляет приблизительно 20 копий плазмидной матрицы WSSV.
- iii) Для визуализации, проводят электрофорез 10 мкл продуктов реакции

ПЦР на 1% агарозных гелях, содержащих бромид этидия в концентрации 0,5 мкг мл⁻¹.

- iv) Специфичные для десятиногих ракообразных праймеры (143F 5'-TGC-CTT-ATC-AGCTNT-CGA-TTG-TAG-3' и 145R 5'-TTC-AGN-TTT-GCA-ACC-ATA-CTT-CCC-3', позволяющие получить ампликон длиной 848 п.н; N представляет G, A, T или C) должны использоваться в контрольных реакциях для подтверждения качества экстрагированной ДНК и целостности реакции ПЦР. У креветок-пенеидов *P. aztecus* продукт ПЦР, генерируемый этой парой специфических для десятиногих ракообразных праймеров, соответствует нуклеотидной последовательности 352–1200 рРНК 18s. Последовательность десятиногих ракообразных 18s РНК высоко консервативна и производит продукт ПЦР одинакового размера почти у всех десятиногих ракообразных. Положительный контроль (матрица ДНК WSSV) и отрицательный контроль (без матрицы ДНК и матрицы креветок) должны быть включены в каждый анализ.

4.3.1.2.4.2. ДНК секвенирование продуктов ПЦР

Ампликон из двухэтапной "вложенной" диагностической ПЦР должен быть секвенирован. Протоколы клонирования и секвенирования, описанные здесь, заимствованы у Claydon с соавт., 2004.

- i) Иссекают фрагменты ДНК, отобранные для дальнейшего анализа, из агарозных гелей и очищают их с помощью любого из имеющихся в продаже ПЦР наборов для очистки.
- ii) Слабые ампликоны могут быть клонированы в векторные плазмиды перед секвенированием, если это необходимо. Для секвенирования ДНК усиливают и очищают рекомбинантную плазмиду.
- iii) Для секвенирования ампликона используют подходящие праймеры.
- iv) Последовательности, полученные с использованием доступных баз данных, и инструмента поиска локального выравнивания (BLAST) сравнивают для определения приблизительной филогенетической принадлежности.

4.3.1.2.4.3. ПЦР в реальном времени (по технологии TaqMan)

Протокол, описанный здесь, заимствован у Durand & Lightner, 2002. Этот метод обнаружения очень специфичен для WSSV, чрезвычайно чувствителен (четыре копии) и имеет широкий динамический диапазон (логарифмов).

Конструирование вектора положительного контроля и стандартной кривой

Фрагмент ДНК размером 69 п.н., амплифицированный прямыми и обратным праймерами (указан ниже), клонируют в pGEM-T easy или других

подходящих векторах, а затем подтверждают секвенированием. Плазмидную ДНК очищают с помощью любых коммерческих наборов для экстракции плазмид, а концентрацию определяют с использованием спектрофотометра или других методов. Число копий гена определяют в соответствии с молярной массой, полученной из плазмидной ДНК, содержащей вставку длиной 69 п.н. Затем плазмидные ДНК серийно разбавляют в 10 раз, чтобы получить стандартные кривые в диапазоне от 101 до 107 копий.

Экстракция ДНК

Экстракцию ДНК следует выполнять в соответствии с описанным выше протоколом для ПЦР (4.3.1.2.4.1) или используя коммерческий набор. Концентрация очищенной ДНК может быть определена спектрофотометром или другими методами.

ПЦР в реальном времени

Анализ TaqMan проводят с использованием TaqMan Universal PCR Master Mix, который содержит ДНК-полимеразу AmpliTaq Gold, AmpErase UNG, dNTP с dUTP и оптимизированные компоненты буфера (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Последовательности праймеров: WSS1011F: 5'-TGG-TCC-CGT-CCT-CAT-CTC-AG-3', WSS1079R: 5'-GCT-GCC-TTG-CCG-GAA-ATT-A-3', зонд Taqman: 5'-AGC-CAT-GAA-GAA-TTK-BKT-CTO-TC-CAC-A-3'.

- i) Добавляют образец 10-50 нг ДНК, чтобы создать 25 мкл реакционной смеси, содержащей 0,3 мкМ каждого праймера и 0,15 мкМ зонда TaqMan.
- ii) Профиль ПЦР представляет собой один цикл при 50°C в течение 2 минут для урацил-N-гликозилазы AmpErase (UNG) и 95°C в течение 10 минут для активации AmpliTaq с последующими 40 циклами при 95°C в течение 15 секунд и 60°C в течение 1 минуты.
- iii) Чтобы определить количество копий WSSV в экстрагированных образцах ДНК, образцы подвергают реакции ПЦР вместе с серийно разведенным стандартом плазмидной ДНК. После реакции программное обеспечение, прилагаемое к системе ПЦР, автоматически определяет значение Ct для каждого образца ПЦР. На основе значений Ct программа рассчитывает стандартную кривую для стандартного разведения и определяет количество копий WSSV для образцов ДНК путем экстраполяции значений из стандартной кривой.

4.3.1.2.4.4. Метод гибридизации in-situ (ISH)

Протокол, описанный здесь, основан на протоколе, разработанном Nunan & Lightner, 1997.

- i) Переболевшую креветку фиксируют в фиксаторе Davidson's AFA на 24–48 часов.
- ii) Ткани помещают в парафин и разрезают на срезы размером 5 мкм. Срезы помещают на положительно заряженные предметные стекла.
- iii) Предметное стекло нагревают при температуре 65°C в течение 30 минут.
- iv) Депарафинизируют, регидратируют и затем обрабатывают в течение 2–30 минут (в зависимости от типа ткани) с использованием 100 мкг/мл протеиназы K в буфере Tris / NaCl / EDTA (TNE) при 37°C.
- v) Предметные стекла вторично фиксируют путем охлаждения в предварительно охлажденном 0,4% формальдегиде в течение 5 минут при 4°C и промывают в 2 × стандартном солевом растворе цитрата (SSC; 1 × SSC = 150 mM NaCl, 15 mM тринатрийцитрат, pH 7,0) при комнатной температуре.
- vi) Предметные стекла предварительно гибридизируют с использованием раствора для предварительной гибридизации (50% формамид, 0,2% фиколл 400, 0,2% поливинилпирролидон, 0,2% бычий сывороточный альбумин, 5 × SSC, 1 mM ЭДТА, 50 mM Трис / HCl, pH 8) в течение 30 минут при 42°C.
- vii) Затем выполняют гибридизацию с WSSV-специфичным ПЦР ампликоном длиной 1447 п.н. (см. Выше раздел 4.3.1.2.4.1 «Реакция ПЦР на первом этапе»), который был помечен диоксигенином. Рекомендуется пометить зонд путем включения DIG-dNTP методом ПЦР. Оптимальную концентрацию следует определять путем тестирования и корректировки до получения высокого специфического сигнала на низком фоне.
- viii) Для гибридизации кипятят зонд в течение 10 минут и немедленно помещают на лед. Разводят зонд до 30–50 нг/мл в растворе для предварительной гибридизации и наносят 500 мкл на каждое предметное стекло.
- ix) Предметное стекло помещают на нагревательную пластину с температурой 85–95°C на 6–10 минут (убедитесь, что точка кипения не достигнута), предметное стекло охлаждают на льду в течение 5 минут, а затем переносят во влажную камеру на 16–20 часов при 42°C.
- x) После гибридизации предметные стекла промывают дважды по 15 минут, каждый раз 2 × SSC при комнатной температуре, дважды по 5 минут 1 × SSC при 37°C и дважды в течение 5 минут 0,5 × SSC при 37°C.
- xi) Для определения гибридизации предметные стекла промывают буфером малеиновой кислоты (100 mM малеиновой кислоты, 150 mM NaCl, pH 7,5) в течение 5 минут при комнатной температуре.
- xii) Предметные стекла блокируют блокирующим раствором (2% нормальной козьей сыворотки и 0,3% Triton X-100 в буфере

малеиновой кислоты) в течение 30 минут при 37°C.

- xiii) Добавляют 250 мкл раствора антитела, конъюгированного с щелочной фосфатазой (AP) против DIG (1 мкл / мл-1 фрагмент анти-DIG / AP-Fab в буфере малеиновой кислоты, содержащем 1% нормальной козьей сыворотки и 0,3% Triton X-100) на каждое предметное стекло и инкубируют при 37°C в течение 30 минут.
- xiv) Предметные стекла дважды промывают буфером малеиновой кислоты в течение 10 минут каждое и один раз буфером для детекции (100 mM Трис/HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5) при комнатной температуре.
- xv) Добавляют 500 мкл проявочного раствора (приготовьте непосредственно перед использованием, добавив 45 мкл раствора соли NBT [75 мг/мл в 70% диметилформамиде], 35 мкл 5-бром-4-хлор-3-индоилфосфата, толуидиновой соли [X -фосфат] [50 м /мл в диметилформамиде] и 1 мл 10% PVA в 9 мл буфера для детекции) на каждое предметное стекло и инкубируют в темноте во влажной камере в течение 1–3 часов.
- xvi) Реакцию останавливают, промывая предметные стекла в буфере TE (10 mM Tri / HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) в течение 15 минут при комнатной температуре. Предметные стекла промывают в дистиллированной воде десять раз, окрашивают в 0,5% водном растворе Bismarck Brown Y примерно в течение 5 минут, а затем промывают водой. Препарат заключают с использованием водной среды для заключения для немедленного наблюдения или предметные стекла дегидратируют и фиксируют с использованием среды для заключения для длительного хранения.
- xvii) Предметные стекла закрепляют покровными стеклами и исследуют их с помощью светопольного микроскопа. Положительная гибридизация проявляется в виде осадка от темно-синего до черного цвета на фоне контрастного окрашивания от желтого до коричневого.

4.3.1.2.4.5. Изотермическая амплификация с формированием петель (ИАФП)

Описанный здесь протокол заимствован у Коно с соавт., 2004. Метод ИАФП является чувствительным и быстрым, и он амплифицирует целевые нуклеиновые кислоты в изотермических условиях, поэтому не требует сложного оборудования для термоциклирования.

Экстракция ДНК

Экстракцию ДНК можно проводить в соответствии с описанным выше протоколом для ПЦР (4.3.1.2.4.1) или другими подходящими методами или с помощью коммерческих наборов.

Реакция ИАФП

- i) ДНК добавляют в пробирку, чтобы получить 25 мкл реакционной смеси (20 mM Трис / HCl, pH 8,8, 10 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Твин 20, 0,8 M бетаин, 1,4 mM каждого dNTP, 40 пмоль праймеров WSSV-FIP и -BIP, 5 пмоль праймеров WSSV-F3 и -B3).
- ii) Последовательности праймеров - WSSV-FIP: 5'-GGG-TCG-TCG-AAT-GTT-GCC-CAT-TTT-GCC-TAC- GCA-CCA-ATC-TGT-G-3', WSSV-BIP: 5'-AAA-GGA-CAA-TCC-CTC-TCC-TGC-GTT-TTA-GAA- CGG-AAG-AAA-CTG-CC-TT-3', WSSV-F3: ACG-GAC-GGA-GGA-CCC-AAA-TCG-A-3', WSSV-B3: 5'-GCC-TCT-GCA-ACA-TCC-TTT-CC-3'.
- iii) Смесь нагревают при 50°C в течение 5 минут и при 95°C в течение 5 минут, затем охлаждают на льду и добавляют 1 мкл (8 ед.) Bst ДНК-полимеразы .
- iv) Смесь инкубируют при 65 ° C в течение 60 минут, а затем реакцию останавливают при 80 ° C в течение 10 минут.
- v) Для визуализации, проводят электрофорез 2 мкл продуктов реакции ИАФП на 2% агарозных гелях, содержащих бромид этидия в концентрации 0,5 мкг/мл. В результате реакции получают продукты ИАФП, специфичные для WSSV, с множеством полос различного размера от примерно 200 пар оснований на загрузочную лунку.

Надежные коммерческие наборы ИАФП могут быть альтернативой для диагностики WSSV.

4.3.1.2.5. Очистка агента

Вирион WSSV может быть очищен на льду, как описано ранее, с небольшими модификациями (Хіе с соавт., 2005). Если коротко, то собирают пять или шесть умирающих раков или креветок (по 20-25 г каждый) через 3 дня –1 неделю после заражения. Гомогенизируют все ткани, за исключением гепатопанкреаса, в течение 2 минут с использованием механического гомогенизатора в 1200 мл буфера TNE (50 mM Трис / HCl, 400 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, pH 8,5), содержащего ингибиторы протеаз (1 mM фенилметилсульфонилфторид, 1 mM бензамидин и 1 mM Na₂S₂O₅). Центрифугируют при 3500 g в течение 5 минут. Сохраняют супернатант и повторно гомогенизируют осадок в 1 200 мл буфера TNE. Отфильтровывают объединенный в пул супернатант через нейлоновую сетку (400 mesh) и центрифугируют при 30 000 g в течение 30 минут. Удаляют супернатант и осторожно промывают верхний рыхлый слой (розовый) осадка с помощью пипетки Пастера. Ресуспендируют нижний компактный слой (серый) в 10 мл буфера TM (50 mM Трис / HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,5). Объединяют неочищенную суспензию вируса и центрифугируют при 3000 g в течение 5

минут. Снова центрифугируют супернатант при 30 000 g в течение 20 минут. Удаляют супернатант и розовый рыхлый слой и ресуспендируют белый осадок в 1,2 мл буфера ТМ, содержащего 0,1% NaN₃. Переносят в пробирку Эппендорфа объемом 1,5 мл. Центрифугируют суспензию три-пять раз при 650 g в течение 5 минут каждый раз для удаления розовых примесей. Наконец, суспензию чистого вируса, подобную молоку, оставляют на хранение при температуре 4 °C до использования.

Серологические методы

Не разработаны.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Методы, доступные в настоящее время для целевого надзора и диагностики инфекции WSSV, перечислены в таблице 5.1. Обозначения, используемые в таблице: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности, диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод может применяться 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 пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и полезности. Хотя не все тесты, перечисленные в категории А или В, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их стандартный характер и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Вспомогательная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Идентификация	Генотипирование	Мониторинг	Исследования отдельных особей		
Наблюдение микроскопических признаков					с	
Метод биопробы					с	
Жидкие препараты и мазки					с	

Table 5.1. Methods for targeted surveillance and diagnosis

Метод	Целевой надзор				Подтверждающая диагностика	Подтверждающая диагностика
	Постличинки	Постличинки	Постличинки	Постличинки		
Гистопатология					a	
Просвечивающая электронная микроскопия (ЕМ)					d	
Тесты на основе антител					a	
К зонды <i>In-situ</i>					a	
Р в реальном времени					a	
Традиционная ПЦР					b	
Термическая амплификация с формированием петель (LAMP)					a	
Последовательность					d	

PLs = постличинки; LM = световая микроскопия; EM = электронная микроскопия; PCR/ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Исследования, рекомендованные для целевого надзора с целью провозглашения свободы от болезни белых пятен

ПЦР в реальном времени - это рекомендуемый тест для целевого надзора, для провозглашения свободы от инфекции вирусом, вызывающим болезнь белых пятен.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение подозрительного случая

Подозрение на WSSV возникает, если удовлетворен хотя бы один из следующих критериев:

- i) Макроскопические признаки, характерные для инфекции WSSV;
- ii) Гистопатологические изменения, характерные для инфекции with WSSV;
- iii) Положительные результаты традиционной ПЦР;
- iv) Положительные результаты ПЦР в реальном времени;
- v) Положительные результаты LAMP.

7.2. Определение подтвержденного случая

Заражение WSSV считается подтвержденным, если выполняется один или несколько из следующих критериев:

- i) Гистопатологические признаки соответствует WSSV и результаты гибридизации *in situ* положительные;
- ii) Положительные результаты традиционной ПЦР и традиционной ПЦР, нацеленной на другую область генома WSSV, с анализом последовательности, соответствующим WSSV;
- iii) Положительные результаты ПЦР в реальном времени и традиционной ПЦР, нацеленной на другую область генома WSSV, с анализом последовательности, соответствующим WSSV;
- iv) Положительные результаты LAMP и традиционной ПЦР, нацеленной на другую область генома WSSV, с анализом последовательности, соответствующим WSSV.

8. Библиография

BALASUBRAMANIAN G., SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., SARATHI M. & SAHUL HAMEED A.S. (2006).

Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. *J. Fish Dis.*, **29**, 569–572.

CHANG C.-F., SU M.-S., CHEN H.-Y. & LIAO I.C. (2003). Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, **15**, 297–310.

CHANG P.S., CHEN H.C. & WANG Y.C. (1998). Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by *in situ* hybridization. *Aquaculture*, **164**, 233–242.

CHANG P.S., LO C.F., WANG Y.C. & KOU G.H. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 131–139.

CHANG Y.S., LO C.F., PENG S.E., LIU K.F., WANG C.H. & KOU G.H. (2002). White spot syndrome virus (WSSV)

PCR-positive *Artemia* cysts yield PCR-negative nauplii that fail to transmit WSSV when fed to shrimp postlarvae. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 1–10.

CHEN I.T., AOKI T., HUANG Y.T., HIRONO I., CHEN T.C., HUANG J.Y., CHANG G.D., LO C.F. & WANG H.C. (2011).

White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J. Virol.*, **85**, 12919–12928.

CHOTIGEAT W., TONGSUPA S., SUPAMATAYA K. & PHONGDARA A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, **233**, 23–30.

CLAYDON K., CULLEN B. & OWENS L. (2004). OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in

Cherax quadricarinatus. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 265–268.

CORBEL V., ZUPRIZAL Z., SHI C., HUANG, SUMARTONO, ARCIER J.-M. & BONAMI J.-R. (2001). Experimental

infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *J. Fish Dis.*, **24**, 377–382.

CUÉLLAR-ANJEL J., WHITE-NOBLE B., SCHOFIELD P., CHAMORRO R. & LIGHTNER D.V. (2012). Report of

significant WSSV-resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a Panamanian breeding program. *Aquaculture*, **368–369**, 36–39.

DURAND S.V. & LIGHTNER D.V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Dis.*, **25**, 381–389.

DURAND S.V., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 128–135.

ESCOBEDO-BONILLA C.M., ALDAY-SANZ V., WILLE M., SORGELOOS P., PENSAERT M.B. & NAUWYNCK H.J.

(2008). A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *J. Fish Dis.*, **31**, 1–18.

FLEGEL T.W. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 433–442.

HE J. & ZHOU H. (1996). Infection route and host species of white spot syndrome baculovirus. *Acta Sci. Natur. Univ. Sunyatseni*, **38**, 65–69.

HEIDARIEH M., SOLTANI M., MOTAMEDI SEDEH F. & SHEIKHZADEH N. (2013). Low water temperature retards white spot syndrome virus replication in *Astacus leptodactylus* Crayfish. *Acta Sci. Vet.*, **41**, 1–6.

HUANG J. & YU J. (1995). A new staining method for on-site observation of viral inclusion bodies of penaeid shrimp. *Mar. Fish. Res. (Chinese J.)*, **16**, 31–39.

HUANG J., YU J., WANG X.-H., SONG X.-L., MA C.-S., ZHAO F.-Z. & YANG C.-H. (1995). Survey on the pathogen and route of transmission of baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis in shrimp by ELISA of monoclonal antibody. *Mar. Fish. Res. (Chinese J.)*, **16**, 40–50.

HUANG Y., YIN Z., WENG S., HE J. & LI S. (2012). Selective breeding and preliminary commercial performance of *Penaeus vannamei* for resistance to white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, **364–365**, 111–117.

KONO T., SAVAN R., SAKAI M. & ITAMI T. (2004). Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, **115**, 59–65.

LEI Z.-W., HUANG J., SHI C.-Y., ZHANG L.-J. & YU K.-K. (2002). Investigation into the hosts of white spot syndrome virus (WSSV). *Oceanol. Limnol. Sin.*, **33**, 250–258.

LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

LO C.F., AOKI T., BONAMI J.R., FLEGEL T.W., LEU J.H., LIGHTNER D.V., STENTIFORD G., SÖDERHÄLL K.,

WALKER P.W., WANG H.C., XUN X., YANG F. & VLAK J.M. (2012). *Nimaviridae*. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA, 229–234.

LO C.F., HO C.H., CHEN C.H., LIU K.F., CHIU Y.L., YEH P.Y., PENG S.E., HSU H.C., LIU H.C., CHANG C.F., SU

M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 53–72.

LO C.F., HO C.H., PENG S.E., CHEN C.H., HSU H.C., CHIU Y.L., CHANG C.F., LIU K.F., SU M.S., WANG C.H. &

KOU G.H. (1996b). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crab and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 215–225.

LO C.F. & KOU G.H. (1998). Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathol.*, **33**, 365–371.

LO C.F., LEU J.H., HO C.H., CHEN C.H., PENG S.E., CHEN Y.T., CHOU C.M., YEH P.Y., HUANG C.J., CHOU H.Y.,

WANG C.H. & KOU G.H. (1996a). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.

MAEDA M., ITAMI T., MIZUKI E., TANAKA R., YOSHIZU Y., DOI K., YASUNAGA-AOKI C., TAKAHASHI Y. &

KAWARABATA T. (2000). Red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*): an alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus. *Acta Virol.*, **44**, 371–374.

MAEDA M., KASORNCHANDRA J., ITAMI T., SUZUKI N., HENNIG O., KONDO M., ALBALADEJO J.D. &

TAKAHASHI Y. (1998). Effect of Various Treatments on White Spot Syndrome Virus (WSSV) from *Penaeus japonicus*

(Japan) and *P. monodon* (Thailand). *Fish Pathol.*, **33**, 381–387.

MOMOYAMA K., HIRAOKA M., INOUE K., KIMURA T. & NAKANO H. (1995). Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 263–269.

MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H., KOUBE H., INOUE K. & OSEKO N. (1994). Mass mortalities of cultured

kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Histopathological study. *Fish Pathol.*, **29**, 141–148.

MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H. & SAMESHIMA M. (1998). Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. *Fish Pathol.*, **33**, 95–96.

NAKANO H., HIRAOKA M., SAMESHIMA M., KIMURA T. & MOMOYAMA K. (1998). Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viraemia (PAV), by chemical and physical treatments. *Fish Pathol.*, **33**, 65–71.

NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (1997). Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **63**, 193–201.

NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2011). Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **171**, 318–321.

NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, **160**, 19–30.

POULOS B.T., PANTOJA C.R., BRADLEY-DUNLOP D., AGUILAR J. & LIGHTNER D.V. (2001). Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 13–23.

ROBALINO J., BARTLETT T., SHEPARD E., PRIOR S., JARAMILLO G., SCURA E., CHAPMAN R.W., GROSS P.S., BROWDY C.L. & WARR G.W. (2005). Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response. *J. Virol.*, **79**, 13561–13571.

SAHUL HAMEED A.S., ANILKUMAR M., STEPHEN RAJ M.L. & JAYARAMAN K. (1998). Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture*, **160**, 31–45.

SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SATHISH S., RASHEED M., MURUGAN V. & JAYARAMAN K. (2001).

White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture*, **201**, 179–186.

SÁNCHEZ-PAZ A. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet. Res.*, **41**, 43.

SARATHI M., SIMON M.C., VENKATESAN C. & HAMEED A.S. (2008). Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *J. Mar. Biotechnol.*, **10**, 242–249.

SATHEESH KUMAR S., ANANDA BHARATHI R., RAJAN J.J.S., ALAVANDI S.V., POORNIMA M.,

BALASUBRAMANIAN C.P. & PONNIAH A.G. (2013). Viability of white spot syndrome virus (WSSV) in sediment during sun-drying (drainable pond) and under non-drainable pond conditions indicated by infectivity to shrimp. *Aquaculture*, **402–403**, 242–249.

SITHIGORNGUL W., RUKPRATANPORN S., PECHARABURANIN N., LONGYANT S., CHAIVISUTHANGKURA P. &

SITHIGORNGUL P. (2006). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 101–106.

SONG X., HUANG J., WANG C., YU J., CHEN B. & YANG C. (1996). Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* with hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus. *J. Fish. China*, **20**, 374–378.

STENTIFORD G.D., BONAMI J.R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura Syndrome, yellow head disease and white spot disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, **291**, 1–17.

STENTIFORD G.D. & LIGHTNER D.V. (2011). Cases of white spot disease (WSD) in European shrimp farms.

Aquaculture, **319**, 302–306.

TSAI M.F., KOU G.H., LIU H.C., LIU K.F., CHANG C.F., PENG S.E., HSU H.C., WANG C.H. & LO C.F. (1999).

Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks.

Dis. Aquat. Org., **38**, 107–114.

VENEGAS C.A., NONAKA L., MUSHIAKE K., NISHIZAWA T. & MUROG K. (2000). Quasi-immune response of

Penaeus japonicus to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 83–89.

VENEGAS C.A., NONAKA L., MUSHIAKE K., SHIMIZU K., NISHIZAWA T. & MUROGA K. (1999). Pathogenicity of

penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. *Fish Pathol.*, **34**, 19–23.

VIDAL O.M., GRANJA C.B., ARANGUREN F., BROCK J.A. & SALAZAR M. (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquac. Soc.*, **32**, 364–372.

VIJAYAN K.K., STALIN RAJ V., BALASUBRAMANIAN C.P., ALAVANDI S.V., THILLAI SEKHAR V. & SANTIAGO T.C.

(2005). Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 107–111.

WANG C.H., YANG H.N., TANG C.Y., LU C.H., KOU G.H. & LO C.F. (2000). Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 91–104.

WITHYACHUMNARNKUL B. (1999). Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 21–27.

WITTEVELDT J., CIFUENTES C.C., VLAK J.M. & VAN HULTEN M.C. (2004). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J. Virol.*, **78**, 2057–2061.

WU W., WU B., YE T., HUANG H., DAI C., YUAN J. & WANG W. (2013). TCTP is a critical factor in shrimp immune response to virus infection. *PloS One*, **8**, e74460.

WANG C.H., YANG H.N., TANG C.Y., LU C.H., KOU G.H. & LO C.F. (2000). Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 91–104.

XIE X., LI H., XU L. & YANG F. (2005). A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. *Virus Res.*, **108**, 63–67.

YAN D.C., DONG S.L., HUANG J., YU X.M., FENG M.Y. & LIU X.Y. (2004). White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis. Aquat. Org.*, **59**, 69–73.

YOGANANDHAN K., SYED MUSTHAQ S., NARAYANAN R.B. & SAHUL HAMEED A.S. (2004). Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. *J. Fish Dis.*, **27**, 517–522.

ZHAN W.B., WANG Y.H., FRYER J.L., YU K.K., FUKUDA H. & MENG Q.X. (1998). White Spot Syndrome Virus

Infection of Cultured Shrimp in China. *J. Aquat. Anim. Health*, **10**, 405–410.

*

* *

NB: Существуют референтные лаборатории МЭБ по инфекции вирусом, вызывающим болезнь белых пятен.

(см. Таблицу в конце настоящего 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 Референтными лабораториями МЭБ для получения дополнительной информации об инфекции вирусом, вызывающим болезнь белых пятен.

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 1997 ГОДУ КАК БОЛЕЗНЬ БЕЛЫХ ПЯТЕН; НАИБОЛЕЕ ПОСЛЕДНИЕ ОБНОВЛЕНИЯ, ПРИНЯТЫ В 2018 ГОДУ.

ГЛАВА 2.2.9.

ИНФИЦИРОВАНИЕ ВИРУСОМ СИНДРОМА ЖЕЛТОЙ ГОЛОВЫ ГЕНОТИПА 1

1. Предмет рассмотрения

Инфицирование вирусом синдрома желтой головы генотипа 1 означает инфицирование патогенным возбудителем, вирусом синдрома желтой головы генотипа 1 (YHV1) рода *Okavirus* и семейства *Roniviridae*.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Вирус синдрома желтой головы генотипа 1 (YHV1) - один из восьми известных генотипов комплекса вирусов синдрома желтой головы и единственный известный возбудитель, вызывающий синдром желтой головы. YHV1 и другие генотипы в комплексе синдрома желтой головы официально классифицированы Международным комитетом по таксономии вирусов как единственный вид (ассоциированный с жабрами вирус) в роде *Okavirus*, семействе *Roniviridae*, отряде *Nidovirales* (Cowley с соавт., 2012). Вирус синдрома желтой головы генотипа 2 является общеизвестным ассоциированным с жабрами вирусом (GAV). Четыре других генотипа в данном комплексе (генотипы 3-6) обычно присутствуют у здоровых особей *Penaeus monodon* в Восточной Африке, Азии и Австралии и лишь в редких случаях или никогда не ассоциируются с болезнью (Walker с соавт., 2001; Wijegoonawardane с соавт., 2008a). Недавно были зарегистрированы два новых генотипа YHV-комплекса, один, обозначенный как YHV7, был выявлен у больных *P. monodon* в Австралии (Mohr с соавт., 2015) и восьмой генотип был обнаружен у *Penaeus chinensis*, в отношении которых подозревалось, что они больны острым гепатопанкреатическим некрозом (Liu с соавт., 2014). Имеются свидетельства о наличии генетической рекомбинации между генотипами (Wijegoonawardane с соавт., 2009).

YHV1 образует покрытые оболочкой палочкообразные частицы 40–50 нм × 150–180 нм (Chantanachookin с соавт., 1993; Wongteerasupaya с соавт., 1995). Оболочки усеяны выпуклыми пепломерами, выступающими примерно на 11 нм над поверхностью. Нуклеокапсиды представляют собой палочки (диаметром 20–30 нм) и имеют спиралевидную симметрию с периодичностью в 5–7 нм. Вирионы состоят из трех структурных белков (нуклеопротеин р20 и оболочечные гликопротеины gp64 и gp116) и ~26 т.н. генома в одноцепочечной РНК положительного смысла.

2.1.2. Выживание вне хозяина

YHV1 остается жизнеспособным в аэрированной морской воде в течение 72 часов (Flegel с соавт., 1995b).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

YHV1 можно инактивировать посредством нагревания при 60°C в течение 15 минут (Flegel с соавт., 1995b). Мало информации имеется о других методах инактивации, но вирус, по-видимому, чувствителен к обработке хлором, при 30 частях на миллион (0,03 мг мл⁻¹) (Flegel с соавт., 1997).

2.1.4. Жизненный цикл

Отсутствуют сообщения о высокой множественности YHV1 заражений в культуре клеток. Инфицирование при множественности заражения в 0,001 в первичных культурах клеток лимфоидных органов показало, что максимальные титры вируса получают через 4 дня после инфицирования (Assavalapsakul с соавт., 2003). Клинические признаки YHV1 инфицирования появляются у *P. monodon* в течение 7–10 дней после подвергания воздействию. YHV1 реплицируется в цитоплазме инфицированных клеток, в которых в большом количестве присутствуют длинные филаментные пред-нуклеокапсиды, наблюдается баддинг вирионов в цитоплазматические везикулы в плотно упакованных паракристаллических структурах для выхода на цитоплазматическую мембрану (Chantanachookin с соавт., 1993).

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды-хозяева

Виды, которые удовлетворяют критериям включения в список, как восприимчивые к инфекции YHV1, в соответствии с Главой 1.5 *Ветеринарно-санитарного кодекса по водным животным (Водный кодекс)*, являются

следующими: восточная голубая креветка (*Penaeus stylirostris*), травяная креветка (dagger blade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*)), гигантская тигровая креветка (*Penaeus monodon*), креветка jinga (*Metapenaeus affinis*) и белоногая креветка (*Penaeus vannamei*).

2.2.2. Виды, данные о восприимчивости которых являются неполными

Виды, данные о восприимчивости которых в соответствии с Главой 1.5. *Водного кодекса* являются неполными, включают: банановую креветку (*Penaeus merguensis*), креветку Carpenter (*Palaemon serrifer*), розовую королевскую креветку (*Penaeus japonicus*), северную коричневую креветку (*Penaeus aztecus*), северную розовую креветку (*Penaeus duorarum*), северную белую креветку (*Penaeus setiferus*), тихоокеанскую голубую креветку (*Palaemon styliferus*), австралийского красноклешневого рака (*Cherax quadricarinatus*), речную креветку Sunda (*Macrobrachium sintangense*) и желтую креветку (*Metapenaeus brevicornis*).

Кроме того, сообщалось о получении патоген-специфичных положительных результатах полимеразной цепной реакции при исследовании следующих видов, у которых активная инфекция не была выявлена: морской желудь (*Chelonibia patula*), голубой краб (*Callinectes sapidus*), циклопоидные веслоногие рачки (*Ergasilus manicatus*), морская уточка (*Octolasmis muelleri*), большой фундулюс (*Fundulus grandis*) и очень мелкие креветки (*Acetes* sp.).

2.2.3. Восприимчивые стадии хозяина

Penaeus monodon восприимчивы к YHV1 инфекции в возрасте старше PL15 (Khongpradit с соавт., 1995).

2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность обнаружения)

YHV1 инфекции обычно выявляют только, когда болезнь становится явно выраженной, в то же время у здоровых *P. monodon* данные инфекции обычно не наблюдаются, инфекции были выявлены в здоровой дикой популяции *P. stylirostris* (Castro-Longoria с соавт., 2008). Можно предположить, что во время вспышек в аквакультурных прудах, превалентность YHV1 инфекции – высокая. Естественные YHV1 инфекции были выявлены у *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus*, *M. ensis* и *P. styliferus* (Cowley с соавт., 2002; Flegel с соавт., 1995a; Flegel с соавт., 1995b), но данных о превалентности в естественной среде очень мало.

2.2.5. Целевые органы и инфицируемые ткани

YHV1 целенаправленно поражает ткани эктодермального и мезодермального происхождения, включая лимфоидные органы, гемоциты, гемопоэтическую ткань, жаберные лепестки и губчатую соединительную ткань подкожного слоя, кишечник, сляжковую железу, гонады, нервные пучки и ганглии (Chantanachookin с соавт., 1993; Lightner, 1996).

2.2.6. Персистентное инфицирование

YHV1 был обнаружен с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) у клинически здоровых диких *P. stylirostris*, отобранных для проведения надзора в Калифорнийском заливе в 2003 г. (Castro-Longoria с соавт., 2008). Инфекционная природа обнаруженного YHV1 была подтверждена посредством экспериментальных заражений. Также имеются данные о том, что YHV1 может сохраняться у особей, выживших после экспериментального заражения (Longyant с соавт., 2005; Longyant с соавт., 2006).

2.2.7. Переносчики

Известных переносчиков YHV1 нет.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

YHV1 инфекция может передаваться горизонтально посредством инъекции, потребления внутрь инфицированной ткани, погружения в морскую воду, содержащую экстракты тканей, профильтрованные для удаления бактерий, или посредством совместного обитания не подвергавшихся никакому воздействию креветок с инфицированными креветками (Flegel с соавт., 1995b; Lightner, 1996). Также было произведено укоренение инфекции у креветок посредством инъекции экстрактов очень мелких креветок (*Acetes* sp.), собранных в инфицированных прудах (Flegel с соавт., 1995a). Динамика распространения YHV1 инфекции в аквакультурных прудах не изучалась. Однако быстрое увеличение уровня совокупной смертности во время вспышек болезни позволяет предположить, что горизонтальная передача происходит очень эффективно.

2.3.2. Превалентность

Превалентность инфекции, ассоциированной с вирусами синдрома желтой головы, у здоровых *P. monodon* (как было выявлено посредством исследования с помощью гнездовой ПЦР с обратной транскрипцией [ОТ-ПЦР]) может быть высокой (50–100%) в разводимых на ферме и диких популяциях в Австралии, Азии и Восточной Африке, а также у *P. vannamei*, разводимых на ферме в Мексике (Cowley с соавт., 2004; Sanchez-Barajas с соавт., 2009; Walker с соавт., 2001; Wijegoonawardane с соавт., 2008a). Превалентность отдельных генотипов варьирует в зависимости от географического происхождения креветок. Использование методов обнаружения, обладающих меньшей чувствительностью, чем гнездовая ПЦР (например, гистология, иммуноблоттинг, дот-блоттинг, гибридизация *in-situ*), скорее всего приведет к недооценке в большинстве случаев реальной превалентности инфекции в популяциях креветок.

2.3.3. Географическое распространение

YHV1 был зарегистрирован в Тайване, Индонезии, Малайзии, Филиппинах, Шри-Ланке, Таиланде и Вьетнаме (Walker с соавт., 2001). GAV и другие генотипы синдрома желтой головы были выявлены у здоровых *P. monodon* из Австралии, Тайваня, Индии, Индонезии, Малайзии, Мозамбика, Филиппин, Таиланда и Вьетнама (Wijegoonawardane с соавт., 2008a). YHV1 также был выявлен у *P. vannamei* в Мексике (Sanchez-Barajas с соавт., 2009).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

У разводимых в прудах *P. monodon* болезнь, вызванная YHV1, может стать причиной почти 100% смертности в течение 3–5 дней после первого появления клинических признаков (Chantanachookin с соавт., 1993). Хотя экспериментальное подвергание *P. monodon* воздействию вирусов YHV1 или GAV может быстро привести к гибели, исследования методом биопробы, показали, что YHV1 является намного более вирулентным (примерно 10^6 -кратно по результатам анализа с целью определения 50% летальной дозы [LD₅₀] в конечной точке) (Oanh с соавт., 2011). Генотипы 3, 4, 5 и 6 пока с болезнью не ассоциируются (Wijegoonawardane с соавт., 2008a).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Повышенные уровни вирусной инфекции, сопровождающиеся болезнью, могут снижаться при физиологическом стрессе, вызванном внезапными изменениями в уровне pH или уровнях растворенного кислорода или при воздействии других факторов окружающей среды (Flegel с соавт., 1997).

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Эффективные методы вакцинации не разработаны.

2.4.2. Химиотерапия

Эффективные коммерческие противовирусные препараты пока отсутствуют.

2.4.3. Иммуностимуляция

Научно-подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.4. Выведение резистентных особей

Сообщений нет.

2.4.5. Восполнение популяции резистентными особями

Все морские креветки, используемые для коммерческого разведения, восприимчивы к YHV1.

2.4.6. Блокирующие агенты

Инъектирование креветок с помощью двухцепочечной РНК, гомологичной ORF 1a/1b областям гена YHV1 или GAV (таким образом, нацеленной на полногеномную вирусную РНК) может подавлять репликацию вируса и предотвращать гибель после экспериментального контрольного заражения. Противовирусное действие двухцепочечной РНК, по-видимому, использует путь РНК интерференции (RNAi) (Tirasophon с соавт., 2007).

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Сообщения отсутствуют.

2.4.8. Общие практики ведения хозяйства

Для снижения риска болезни можно использовать свободные от специфических патогенных факторов (СПФ) или ПЦР-негативные маточные популяции или не контаминированную патогенами воду (биологически защищенная вода) и системы разведения с биологической защитой.

3. Отбор образцов

3.1. Выбор отдельных образцов

Для проведения диагностики во время вспышки болезни, самым предпочтительным источником материала для исследования являются умирающие креветки, собираемые по краю прудов. Из тех же прудов следует также отбирать внешне здоровых креветок. Для проведения надзора с целью выявления присутствия инфекции в популяциях внешне здоровых креветок полезными для исследования могут быть ткани, отобранные на мизидной стадии развития креветки и далее (мизидная стадия, пост-личиночная [PL], ювенильная и взрослая стадии).

3.2. Сохранение образцов для представления для исследования

Умирающие креветки (или ткани, отобранные у умирающей креветки) должны быть подвергнуты быстрой заморозке в сухом льду или безводном спирте в месте их отбора и хранятся замороженными в сухом льду, жидком азоте или морозильнике при -80°C . Замораживание при -20°C или выше является неприемлемым.

Образцы тканей, предназначенные для ПЦР скрининга, должны сохраняться в 80–90% аналитическом/химически чистом (абсолютном) этаноле. Объем используемого этанола должен быть как минимум в десять раз больше объема ткани. Не рекомендуется использовать этанол более низкого качества (лабораторный или технический этанол).

Образцы ткани для гистологии следует отбирать у свежих креветок и помещать для сохранения в фиксирующий раствор Дэвидсона (Davidson's fixative). В качестве полезной альтернативы можно использовать раствор формалина (10%) в морской воде. Объем используемого фиксирующего раствора должен быть как минимум в десять раз больше объема ткани.

Ткани для проведения электронной микроскопии следует отбирать у живых креветок.

См. Главу 2.2.0., где изложено руководство по способам сохранения образцов для предполагаемых методов тестирования.

3.3. Объединение образцов в пулы

Для обнаружения YHV1 инфекции в больших популяциях креветок, допустимо объединять образцы тканей в пулы в целях проведения скрининга или надзора за партиями креветок на мизидной или пост-личиночной стадиях развития из инкубаторного садка или за партиями креветок на ювенильной стадии развития в пруду. Общее количество креветок, от которых следует отобрать образцы, как для одного пула, так и для нескольких более мелких пулов, определяется исходя из ожидаемой превалентности инфекции и требуемых доверительных интервалов обнаружения. Обычно, в популяциях, насчитывающих более 100 000 креветок, при превалентности инфекции выше 5%, для обнаружения YHV1 с 95% доверительным уровнем необходимо будет протестировать 60 особей в пулах соответствующих размеров. Однако при очень низких нагрузках YHV1 у инфицированных креветок или при использовании тестов с меньшей чувствительностью, чем у двухэтапной ОТ-ПЦР или ОТ-ПЦР в реальном времени, точное определение может быть поставлено под угрозу. См. также Главу 2.2.0.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

У умирающих креветок, в отношении которых имеется подозрение об их инфицировании YHV1, наиболее подходящими тканями для отбора в качестве образца являются лимфоидные органы и жабры. Для проведения скрининга или надзора за ювенильными или взрослыми креветками, которые внешне являются здоровыми, предпочтительными является лимфоидный орган. Для прижизненного отбора образцов можно использовать жабры и гемолимфу.

3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

Не установлены.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Креветки, начиная с пост-личиночной стадии развития и далее, могут быть инфицированы YHV1 экспериментально. У разводимых креветок инфицирование может приводить к массовой гибели, которая обычно происходит на стадиях, предшествующих поздним ювенильным стадиям. У умирающих креветок может наблюдаться общая внешняя бледность и пожелтение головогрудного отдела, вызванное пожелтением находящегося внутри гепатопанкреаса, который может

быть необычно мягким по сравнению с коричневым гепатопанкреасом здоровой креветки. Во многих случаях в течение нескольких дней после первого появления креветок с макроскопическими признаками YHD1 вся популяция креветок в пруду утрачивается (Chantanachookin с соавт., 1993). Однако эти признаки болезни не являются особыми отличительными признаками и при отсутствии других более патогномоничных макроскопических признаков не являются достоверными, даже для предварительного диагностирования YHV1.

4.1.2. Изменения в поведении

Может наблюдаться чрезвычайно высокая активность питания с последующим резким прекращением питания в течение 2-4 дней после появления макроскопических клинических признаков болезни и гибель. Умирающие креветки могут скапливаться у края прудов возле поверхности (Chantanachookin с соавт., 1993).

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

См. Раздел 4.1

4.2.2. Клиническая химия

Не описана.

4.2.3. Микроскопическая патология

Зафиксировать ткани головогруди умирающей креветки, в отношении которой имеется подозрение, что она поражена YHV1, в фиксирующем растворе Дэвидсона, приготовить срезы тканей и окрасить их гематоксилином Майера и эозином (H&E), используя стандартные гистологические процедуры (Lightner, 1996). Исследовать ткани эктодермального и мезодермального происхождения методом световой микроскопии на наличие умеренных до больших количеств глубоко базофильных, равномерно окрашенных, сферических цитоплазматических включений, примерно 2 мкм в диаметре или меньше (Chantanachookin с соавт., 1993). Очень информативными являются ткани лимфоидного органа, выстилки желудка и жабр.

4.2.4. Влажные препараты

Произвести фиксацию целой креветки или жаберных волокон с помощью фиксирующего раствора Дэвидсона (Lightner, 1996). После фиксации тщательно промыть некоторые жаберные волокна водопроводной водой для удаления фиксирующего раствора и окрасить гематоксилином и эозином (H&E) (Lightner, 1996). После окрашивания и дегидратации, когда ткани находятся в ксилене, поместить жаберное волокно на предметное стекло микроскопа в капле ксилена и с помощью пары тонких иголок (полезно использовать стереомикроскоп) оторвать несколько вторичных волокон. Заменить основное волокно в ксилене, в котором оно может храниться неопределенно долгий срок в герметично закрытом флаконе в качестве перманентного референтного материала. Следует соблюдая осторожность и не допуская высыхания ксилена, расправить вторичные волокна и удалить любые крупные фрагменты или частицы, которые будут приводить к ненужному утолщению залитого в среду препарата. Добавить каплю жидкости для заливки, разместить сверху покровное стекло и слегка надавить для максимально возможного уплощения залитого в среду препарата. Данную процедуру можно также использовать для тонких слоев тканей выстилки. Исследовать под световым микроскопом, используя $\times 40$ линзы объектива. В образцах, отобранных от пораженных YHV1 креветок, будут наблюдаться средние-до больших количества глубоко базофильных, равномерно окрашенных, сферических цитоплазматических включений (примерно 2 мкм в диаметре или меньше) (Flegel с соавт., 1997). Выявленные свидетельства наличия такой патологии следует использовать для подтверждения результатов исследования мазков гемолимфы (см. ниже) при предварительной диагностике YHV1. Как и в случае зафиксированных тканей и жаберных волокон, зафиксированных в ксилене, эти предметные стекла с цельным залитым в среду препаратом можно сохранять в качестве материала для постоянного учета.

Если требуется быстро получить результаты, этап фиксации можно сократить всего лишь до 2 часов, заменив уксусную кислоту, являющуюся компонентом фиксирующего раствора Дэвидсона, на 50% разведение концентрированной HCl. Для хорошей фиксации, данный фиксирующий раствор следует хранить не более нескольких дней до его использования. После этапа фиксации тщательно промыть для удаления фиксирующего раствора и проверить, чтобы уровень pH вернулся к почти нейтральному уровню перед окрашиванием. Не следует проводить фиксацию в течение более длительных периодов и при температуре выше 25°C, поскольку это может привести к чрезмерному повреждению ткани и затруднить или сделать невозможной идентификацию специфичной патологии.

4.2.5. Электронная микроскопия/цитопатология

Для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ), наиболее подходящими тканями от креветки, в отношении которой подозревается, что она инфицирована YHV1, являются лимфоидный орган и жабры. Для скрининга и надзора за внешне здоровыми креветками наиболее подходящей тканью является лимфоидный орган. Оглушить живую креветку посредством погружения в ледяную воду до её обездвиживания или убить посредством инъекции фиксирующего раствора. Быстро расщепить и отобрать маленькие порции целевой ткани (не более чем несколько мм в

диаметре) и зафиксировать в 6 % глутаральдегиде, объем которого должен как минимум в 10 раз превышать объем ткани, выдержать при 4°C и забуферить раствором какодилата натрия

($\text{Na}[\text{CH}_3]_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (8,6 г какодилата натрия, 10 г NaCl, дистиллированная вода до доведения объема до 100 мл, откорректированный уровень pH до 7 с помощью 0,2 N HCl) или раствором фосфата (0,6 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,5 г Na_2HPO_4 ; 1 г NaCl; 0,5 г сахарозы; дистиллированная вода до доведения объема до 100 мл, откорректированный с помощью 0,2 N HCl уровень pH = 7). Произвести фиксацию в течение не менее 24 часов перед последующей подготовкой. Для длительного хранения в фиксирующем растворе при 4°C, снизить концентрацию глутаральдегида до 0,5–1,0%. Последующая подготовка включает пост-фиксацию с помощью 1% четырёхокси осмия, дегидратацию, заливку препарата, изготовление срезов и окрашивание ацетатом уранила и лимоннокислым свинцом в соответствии с реагентами и методами стандартной трансмиссионной электронной микроскопии (TEM) (Lightner, 1996).

В цитоплазме клеток, инфицированных YHV1, наблюдаются как предшественники нуклеокапсидов, так и вирионы с полной оболочкой. Предшественники нуклеокапсидов представляют собой длинные волокна примерно 15 нм в диаметре, которые могут заметно варьировать по длине (80–450 нм) и иногда могут быть плотно упакованы в паракристаллические структуры. Вирионы представляют собой палочковидные покрытые оболочкой частицы (40–50 нм × 150–180 нм) с закругленными концами и выпуклыми выступами (8–11 нм) над поверхностью. В клеточной цитоплазме вирионы локализованы или плотно упакованы во внутриклеточные везикулы. Может наблюдаться баддинг вирионов у цитоплазматической мембраны и в интерстициальных пространствах. Вирионы и нуклеокапсиды GAV невозможно отличить от HV1 при исследовании трансмиссионной электронной микроскопией (TEM).

У здоровых *P. monodon*, хронически инфицированных YHV1 или GAV, обычно наблюдаются сфероиды лимфоидного органа, часто болезнь сопровождается некрозом лимфоидного органа (Spann с соавт., 1997). Однако образование сфероидов и структурная дегенерация ткани лимфоидного органа могут быть также следствием инфицирования другими вирусами креветок (Lightner, 1996).

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

См. раздел 4.2.4

4.3.1.1.2. Мазки

См. раздел 4.2.5

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

См. раздел 4.2.3

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные срезы

Хотя имеются методы культивирования в первичных клетках креветки, данные методы не рекомендуется использовать в качестве рутинного диагностического метода для выделения и идентификации YHV1, ввиду высокого риска контаминации адвентициальными возбудителями. В настоящее время пока еще отсутствуют перевиваемые клеточные линии, пригодные для культивирования YHV1.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигена

Опубликованы реагенты и процедуры для обнаружения белков YHV1 с помощью антител (Loh с соавт., 1998; Lu с соавт., 1994). Вирионы, очищенные от гемолимфы экспериментально инфицированных креветок, были использованы для получения антисыворотки на новозеландских белых кроликах. Из данной антисыворотки производили очищение иммуноглобулина (IgG) с помощью белок-G-связанных колонок и удаляли перекрестно реагирующие нормальные антигены креветки посредством адсорбции на высушенной ацетоном размолотой мышечной ткани и гемолимфы креветки. Для обнаружения белков YHV1 методом вестерн-блоттинга разводят 0,1 мл гемолимфы, отобранной от живой креветки в объеме, равном объему цитратного буфера и либо проводят немедленное исследование, либо хранят при -80°C до использования. Центрифугируют 200 мкл образца при 8000 *g* в течение 5 минут, а затем осаждают вирионы из осветленного супернатанта посредством ультрацентрифугирования при 140 000 *g* в течение 5 минут. Ресуспенсируют осадок в 100 мкл 2 × загрузочного буфера (2,5 мл 0,5 мМ Tris/HCl pH 6,8; 4 мл 10% додецилсульфата натрия [SDS]; 2 мл глицерина; 1 мкл β-мекраптоэтанола; 0,5 мл деионизированной дистиллированной воды) и нагревают при 95°C в течение 5 минут. Вносят 10 мкл образца и осуществляют электрофорез при 200 В. Переносят гель для блоттинга на нитроцеллюлозную

мембрану с размером пор 0,1 мкм в буфере для блоттинга (3,03 г Tris-основы; 14,4 г глицина; 200 мл метанола на один литр) при 100 В в течение 1 часа. Промывают мембрану с помощью забуференного фосфата физиологического раствора (ФБР, pH 7,4), блокируют в 5% обезжиренном молоке (в ФБР) в течение одного часа, и промывают ФБР в течение 5 минут. Промачивают мембрану 1/1000 разведением анти-YNV1 антитела (IgG) в течение одного часа, промывают три раза с помощью ФБР в течение 5 минут, а затем промачивают в течение одного часа в 1/2500 разведении конъюгата козьего антикроличьего IgG – пероксидазы хрена. Промывают мембрану три раза с помощью ФБР в течение 5 минут, а затем замачивают в субстрате пероксидазы хрена 3,3',5,5'-тетраметилбензидине до проявления окрашивания в сине-фиолетовый цвет. Производят остановку реакции посредством замачивания мембраны в дистиллированной воде. Все этапы инкубации следует проводить при 25°C ± 2°C. В качестве положительного контроля используют очищенный вирусный препарат, который применяется для идентификации позиций 116 кДа, 64 кДа и 20 кДа структурных белков YNV1. Чувствительность вестерн-блоттинга для обнаружения YNV1 составляет примерно 0,4 нг YNV1 белка (около 10⁶ вирионов).

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Описаны три процедуры ОТ-ПЦР. Первая представляет собой одноэтапную ОТ-ПЦР, адаптированную из Wongteerasupaya с соавт., 1997, которую можно использовать для обнаружения YNV1 у пораженных креветок. При использовании данной процедуры будет производиться обнаружение YNV1, но не GAV или любого из других трех установленных в настоящее время генотипов. Вторая процедура представляет собой более чувствительную мультиплексную гнездовую ОТ-ПЦР, адаптированную из Cowley с соавт., 2004. Она может быть использована для дифференциации YNV1 и GAV у больных креветок или скрининга с целью выявления здоровых носителей. Обнаружение YNV7 производилось на первой стадии или этапе мультиплексной гнездовой ОТ-ПЦР (первичная ОТ-ПЦР) (Mohr с соавт., 2015). И ОТ-ПЦР, и гнездовая ПЦР (вторая стадия или этап) выявляли новый генотип YNV из Китая (Китайская Народная Республика) (Liu с соавт., 2014). Данный тест можно приобрести в соответствующем модифицированном виде (YNV/GAV IQ2000, GeneReach Biotechnology Corp., Chinese Taipei). Однако данный набор в настоящее время не включен в список, как прошедший официальную процедуру МЭБ по валидации и сертификации коммерческих тестов (список сертифицированных тест-наборов и производителей размещен на вебсайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/registration-of-diagnostic-kits/background-information/>).

Третья процедура – чувствительная мультиплексная гнездовая ОТ-ПЦР, описанная Wijegoonawardane с соавт., 2008b. Данный тест можно использовать для скрининга креветок на наличие любого из семи генотипов

вирусов комплекса болезни желтой головы, но он не дифференцирует генотипы. Определение генотипа можно произвести посредством анализа ОТ-ПЦР продукта методом нуклеотидного секвенирования. Неизвестно, будет ли данный анализ обнаруживать генотип YHV, выделенный недавно в Китае (Китайская Народная Республика).

4.3.1.2.3.1.1. Подготовка образцов

У ювенильных и взрослых креветок для получения полной РНК можно использовать ткани лимфоидного органа и жабр а также гемолимфу. Предпочтительно использовать свежие ткани. Также для получения полной РНК подходят ткани лимфоидного органа и жабр, законсервированные в 80–95% этаноле аналитической чистоты или хранящиеся замороженными при –70°C. Разорвать на более мелкие кусочки 10-20 г тканей лимфоидного органа или жабр или использовать 50 мкл гемолимфы в 500 мкл TrizolTM¹ реагента и произвести экстракцию полной РНК в соответствии с руководством по указанному продукту. Ресуспендировать РНК в 25 мкл воды, обработанной DEPC (диэтил-пирокарбонад), нагревать при 55°C в течение 10 минут, охладить на льду и сразу же использовать или хранить при –70°C, пока не понадобится. Выход РНК будет варьировать в зависимости от типа и свежести тканей, качества использованного консерванта и продолжительности периода времени в течение которого ткань подвергалась консервации. Однако, можно ожидать, что количество полученной РНК из свежих тканей будет варьировать от 0,2 до 2,0 мкг мкл⁻¹ и около половины данных количеств при получении РНК из законсервированных в спирту тканей. Ткани можно также гомогенизировать посредством толчения вместе с бусами и экстрагировать с помощью имеющихся в продаже наборов (например, QIAmp Viral RNA Mini Kit) (Mohr с соавт., 2015).

Из емкости для выращивания креветок на пост-личиночной стадии или емкости для выращивания креветок на протяжении всего их жизненного цикла, содержащей примерно 100,000 креветок на пост-личиночной стадии (PL) или более, отбирают образец примерно в 1000 PL в каждой из 5 различных точек. Образцы объединяют в пул в резервуаре, осторожно перемешивают воду в круговую, а затем отбирают образцы живых PL, которые собираются в центре резервуара. Количество PL, предназначенных для объединения в пул и тестирования, определяются исходя из предполагаемой или имеющейся превалентности инфекции. Гомогенизировать образцы тканей в соответствующем объеме TrizolTM¹ реагента и экстрагировать РНК в соответствии с руководством по указанному продукту. В соответствии со стандартной процедурой TrizolTM экстракции подходящими являются массы тканей равные 25–30 × PL5, 15 ×

¹ Указание конкретных коммерческих продуктов в качестве примеров не подразумевает их одобрения со стороны МЭБ. Это касается всех коммерческих продуктов, упоминаемых в данном *Руководстве по водным животным*.

PL10 и 5 × PL15, при использовании которых получают полную РНК высокого качества свободную от контаминации белками.

Для каждого набора РНК образцов, подлежащего тестированию, в качестве отрицательных и положительных контролей следует включать DEPC-обработанную воду и экстракты, в отношении которых известно, что они содержат РНК YHV1 или РНК GAV (как целесообразно для указанного теста), соответственно.

4.3.1.2.3.1.2. Процедура 1: ОТ-ПЦР для специфического обнаружения YHV1 у больных креветок

В основу данной процедуры, используемой в Референтной лаборатории МЭБ, положен метод Mohr с соавт., 2015, и она является следующей: Матрицу (2 мкл) добавляют в 23 мкл реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл 2× реакционной смеси, 1 мкл Superscript III RT/Platinum Taq смеси (Invitrogen), 180 нМ каждого праймера и воду молекулярной чистоты. После одного цикла при 50°C в течение 30 минут и 94°C в течение 2 минут, ПЦР амплификация включает 40 циклов при 94°C в течение 30 секунд, 58°C в течение 45 секунд, 68°C в течение 45 секунд, с последующим при 68°C в течение 7 минут. Вместе с подходящей ДНК-лестницей, вносят 20 мкл аликвоту ПЦР в 1,5% агарозный/ТАЕ (Tris-ацетат-ЭДТК [этилен диамин тетрауксусная кислота]) гель, содержащий SYBR-safe (краситель), и после электрофореза производят выявление 135 п.н ДНК полосы, ожидаемой для YHV, с помощью трансиллюминатора с голубым светом.

Чувствительность данной ПЦР составляет примерно 0,01 пг очищенной РНК YHV1 (примерно 10³ геномов).

Последовательности ПЦР праймеров:

10F: 5'-CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG-3'

144R: 5'-AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT-3'

4.3.1.2.3.1.3. Процедура 2: гнездовая ОТ-ПЦР для дифференциального обнаружения YHV1 и GAV у здоровых и больных креветок

В основу данной процедуры, используемой в Референтной лаборатории МЭБ, положен метод Mohr с соавт., 2015, и она является следующей: Для первичной ПЦР, 2 мкл матрицы добавляют в 23 мкл реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл 2× реакционной смеси, 1 мкл Superscript III RT/Platinum Taq смеси (Invitrogen), 180 нМ каждого GY1 и GY4 праймера и

воды молекулярной чистоты. После одного цикла при 50°C в течение 30 минут и 94°C в течение 2 минут ПЦР амплификация включает 35 циклов при 95°C в течение 30 секунд, 66°C в течение 30 секунд и 68°C в течение 45 секунд с последующим конечным удлинением при 68°C в течение 7 минут. Для второго этапа – гнездовой ПЦР, готовят 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл ПЦР продукта первого этапа, 12,5 мкл HotStarTaq мастер микса (Qiagen), 360 нМ каждого праймера: GY2, Y3 и G6, воду молекулярной чистоты. ПЦР амплификация включает один цикл при 95°C в течение 15 минут с последующими 35 циклами при 95°C в течение 30 секунд, при 66°C в течение 30 секунд, и при 72°C в течение 45 секунд, с последующей конечной элонгацией при 72°C в течение 7 минут. Вместе с подходящей ДНК-лестницей, вносят 20 мкл аликвоту ПЦР в 1,5% агарозный/ТАЕ (Tris-ацетат-ЭДТК) гель, содержащий SYBR-safe (краситель), и после электрофореза производят выявление ампликонов с помощью трансиллюминатора с голубым светом.

Если вирусная нагрузка достаточно высокая, 794 п.н. ДНК будет амплифицирована либо из GAV, либо из YHV1 на первом ПЦР этапе. На втором ПЦР этапе, 277 п.н. продукт является индикатором обнаружения YHV, а 406 п.н продукт является индикатором обнаружения GAV. Присутствие обоих 406 п.н и 277 п.н. продуктов указывает на заражение двумя вирусами, GAV и YHV1. Чувствительность обнаружения ПЦР второго этапа ~ в 1000 раз выше, чем у ПЦР первого этапа, и РНК GAV или YHV1 можно обнаружить до предела в 10 фг полной РНК лимфоидного органа. Гнездовую ПЦР можно проводить как два отдельных анализа, специфичных для YHV1 или GAV, не включая либо G6, либо Y3 праймер, соответственно. Праймер содержит участок ошибочного спаривания оснований для GAV, но является специфичным для YHV1. Для GAV, седьмое основание слева (Т) заменяется на С, таким образом, чтобы последовательность праймера для GAV была: 5'-CAT-CTG-CCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3', в соответствии с данным о последовательности для генома GAV (номера доступа в базе данных: NC_010306.1 и AF227196.2).

Последовательности ОТ-ПЦР праймеров, универсальных для GAV и YHV (GY) или специфичных для GAV (G) или YHV (Y) являются следующими:

GY1: 5'-GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG-3'

GY2: 5'-CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3'

GY4: 5'-GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG-3'

GY5: 5'-GAG-CTG-GAA-TTC-AGT-GAG-AGA-ACA-3'

Y3: 5'-ACG-CTC-TGT-GAC-AAG-CAT-GAA-GTT-3'

G6: 5'-GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT-3'

NB: В связи с сообщениями о проблемах со специфичностью праймеров для некоторых эмерджентных штаммов, все ПЦР продукты, полученные при использовании процедуры 2, должны быть секвенированы для подтверждения генотипа вируса.

4.3.1.2.3.1.4. Процедура 3: гнездовая ОТ-ПЦР для обнаружения всех охарактеризованных в настоящее время генотипов в комплексе вирусов синдрома желтой головы, YHV1 до YHV7

В основу данной процедуры, используемой в Референтной лаборатории МЭБ, положен метод Mohr с соавт., 2015, и она является следующей: Для первичной ПЦР 2 мкл матрицы добавляют в 23 мкл реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл 2 × реакционной смеси, 1 мкл Superscript III RT/Platinum Taq смеси (Invitrogen), 180 нМ каждого из YC-F1ab и YC-R1ab праймерных пулов и воду молекулярной чистоты. После одного цикла при 50°C в течение 30 минут и 94°C в течение 2 минут, ПЦР амплификация включает один цикл при 95°C в течение 15 минут с последующими 35 циклами при 94°C в течение 45 секунд, 60°C в течение 45 секунд, and 68°C в течение 45 секунд, с последующей конечной элонгацией при 68°C в течение 7 минут. Для второго этапа, гнездовой ПЦР, готовят 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл ПЦР продукта первого этапа, 12,5 мкл HotStarTaq мастер микса (Qiagen), 180 нМ каждого пула YV-F2ab и YC-R2ab праймеров, и воду молекулярной чистоты. ПЦР амплификация включает один цикл при 95° C в течение 15 минут с последующими 35 циклами при 94°C в течение 45 секунд, 60°C в течение 45 секунд, и 72°C в течение 45 секунд, и конечную элонгацию при 72°C в течение 7 минут. Вместе с подходящей ДНК-лестницей, вносят 20 мкл аликвоту ПЦР в 1,5% агарозный/ТАЕ (Tris-ацетат-ЭДТК) гель, содержащий SYBR-safe (краситель), и после электрофореза производят выявление ампликонов с помощью трансиллюминатора с голубым светом.

Если вирусная нагрузка достаточно высокая, 358 п.н. ДНК будет амплифицирована в ходе ПЦР первого этапа. В ходе второго этапа, гнездовой ПЦР, производится амплификация 146 п.н. продукта. Возможно дальнейшее определение генотипа (если требуется) посредством анализа нуклеотидной последовательности каждого ПЦР продукта с последующим сравнением с последовательностями известных генотипов посредством множественного выравнивания последовательностей и филогенетического

анализа. Пределы чувствительности обнаружения ПЦР первого этапа и гнездовой ПЦР второго этапа составляют 2500 и 2.5 РНК матриц, соответственно.

Последовательности ПЦР праймеров (каждый праймер содержит пул равных количеств двух родственных олигонуклеотидных последовательностей):

YC-F1ab пул: 5'-ATC-GTC-GTC-AGC-TAC-CGC-AAT-ACT-GC-3'

5'-ATC-GTC-GTC-AGY-TAY-CGT-AAC-ACC-GC-3'

YC-R1ab пул: 5'-TCT-TCR-CGT-GTG-AAC-ACY-TTC-TTR-GC-3'

5'-TCT-GCG-TGG-GTG-AAC-ACC-TTC-TTG-GC-3'

YC-F2ab пул: 5'-CGC-TTC-CAA-TGT-ATC-TGY-ATG-CAC-CA-3'

5'-CGC-TTY-CAR-TGT-ATC-TGC-ATG-CAC-CA-3'

YC-R2ab пул: 5'-RTC-DGT-GTA-CAT-GTT-TGA-GAG-TTT-GTT-3'

5'-GTC-AGT-GTA-CAT-ATT-GGA-GAG-TTT-RTT-3'

Коды смешанных оснований:

R(AG), Y(CT), M(AC), K(GT), S(GC), W(AT),
H(ACT), B(GCT), V(AGC), D(AGT),
N(AGCT).

4.3.1.2.3.2. Гибридизация *in-situ*

Для обнаружения YHV1 или GAV подходит процедура, описанная Tang с соавт., 2002 (Tang & Lightner, 1999). Для сохранения доступности вирусной РНК фиксируют образцы тканей, отобранные у живых креветок, в нейтральном-забуференном модифицированном фиксирующем растворе Дэвидсона без уксусной кислоты (RF-фиксатив) (Hasson с соавт., 1997). Для обеспечения хорошего сохранения тканей при одновременном сохранении доступности РНК можно использовать нормальный фиксирующий раствор Дэвидсона, при условии что время фиксации не будет превышать 24 часов (максимум 48 часов). Производят обработку зафиксированной ткани с помощью стандартных гистологических методов и готовят срезы толщиной

4 мкм на Superfrost Plus предметных стеклах (Fisher Scientific, Pennsylvania, США). Перед гибридизацией инкубируют срезы при 65°C в течение 45 минут, удаляют парафин с помощью Hemo-De (Fisher Scientific, Pennsylvania, США), и производят регидратацию посредством серии снижающихся концентраций этанола в воде. Производят расщепление срезов с помощью протеиназы К (100 мкг мл⁻¹, в 50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 10 mM NaCl; 1 mM ЭДТА) в течение 15 минут при 37°C, с последующей пост-фиксацией в 0,4% формальдегиде в течение 5 минут. Промывают в 2 × SSC (стандартный цитратно-солевой раствор), затем проводят пред-гибридизацию с использованием 500 мкл предгибридизационного раствора (4 × SSC; 50% формамид; 1 × Denhardt's; 0,25 мг мл⁻¹ дрожжевая РНК; 0,5 мг мл⁻¹ стриженной ДНК спермы лосося; 5% сульфат декстрана) при 42°C в течение 30 минут. Для гибридизации нанести на срезы сверху 250 мкл гибридизационного раствора, содержащего меченый дигоксигенином ДНК зонд (20–40 нг мл⁻¹), при 42°C и оставить на ночь. На следующий день промыть срезы следующим образом: 2 × SSC один раз в течение 30 минут при комнатной температуре; 1 × SSC два раза в течение 5 минут при 37°C; 0,5 × SSC два раза в течение 5 минут при 37°C. Инкубировать срезы с конъюгатом овечьего анти-дигоксигенина-щелочной фосфатазы (Roche) при 37°C в течение 30 минут. Промыть с помощью 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl два раза в течение 10 минут при комнатной температуре и ополоснуть с помощью 0,1 M Tris/HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl. Инкубировать вместе с нитросиним тетразолием и 5-бromo-4-хлоро-3-индоил фосфатом в темноте в течение 1–2 часов для проявления цвета. Произвести контрастное окрашивание с помощью бисмарка коричневого Y (0,5%), дегидратировать в серии этанола и Hemo-De (растворитель), добавить Permount (среда для заливки) (Fisher Scientific, Pennsylvania, США) и накрыть покровным стеклом. YHV-инфицированные клетки дают синий до пурпурно-черного цвета на фоне коричневого контрастного красителя. Следует включать положительные контроли YHV-инфицированной ткани и отрицательные контроли неинфицированной ткани креветки. Меченный дигоксигенином ДНК зонд можно получить посредством ПЦР мечения с использованием следующих праймеров:

YHV1051F: 5'-ACA-TCT-GTC-CAG-AAG-GCG-TC-3'

YHV1051R: 5'-GGG-GGT-GTA-GAG-GGA-GAG-AG-3'

4.3.1.2.3.3. Очистка возбудителя

Описан метод очистки YHV1, в основу которого положено ультрацентрифугирование в градиенте плотности (Wongteerasupaya с соавт., 1995). В качестве источника для вируса, предназначенного для очистки, в идеале следует использовать 250 здоровых ювенильных *P. monodon* (или *P. vannamei*) креветок (приблизительно 10 г). После акклиматизации в течение нескольких дней в резервуарах объемом 1500 литров (приблизительно 80

креветок в одном резервуаре) при солености воды 3,5 части на тысячу (мг мл^{-1}), каждой креветке внутримышечно вводят 100 мкл 1/100 суспензии экстракта жабр, полученного от инфицированных YHV креветок. Через 2 дня после инфицирования собирают умирающих креветок с типичными признаками YHV1. С помощью шприца вытягивают гемолимфу из синусов у основания ходильных ног и осторожно перемешивают на льду с таким же количеством среды из гемолимфы омара (LHM) (486 mM NaCl; 15 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 0,5 mM Na₂HPO₄; 8,1 mM MgSO₄; 36 mM NaHCO₃; 0,05% декстрозы в минимальной среде Игла, при откорректированном с помощью 1 н NaOH pH =7,6). Центрифугируют смесь при 480 g в течение 30 минут при 4°C для удаления клеточного дебриса. Производят ультрацентрифугирование супернатанта при 100,000 g в течение одного часа при 4°C. Сливают супернатант и осторожно ресуспендируют осадок в течение ночи при 4°C в 1 мл LHM. Данную суспензию наносят слоем на непрерывный градиент из 20–40% урографина и производят ультрацентрифугирование при 100,000 g в течение одного часа при 4°C. После центрифугирования собирают вирусную полоску с помощью пастеровской пипетки и разводят с помощью NTE буфера (0,02 М ЭДТК; 0,2 М NaCl; 0,2 М Tris/HCl [pH 7,4]) до конечного объема в 12 мл. Производят ультрацентрифугирование суспензии при 100,000 g в течение одного часа при 4°C и ресуспендируют осадок (очищенный вирус) в 100 мкл TE буфера (10 mM Tris/HCl; 1 mM ЭДТА [pH 7,4]) и хранят в 20 мкл аликвотах при –80°C, пока не потребуется.

4.3.1.2.4. Биопроба

В основу анализа методом биопробы положена процедура, описанная Spann с соавт., 1997, но сходные процедуры были описаны несколькими другими авторами (Lu с соавт., 1994). Биопроба должна проводиться на восприимчивых креветках (см. Раздел 2.2 выше), которые в идеале были сертифицированы как СПФ и получены с предприятия по разведению с высокой степенью биозащиты. Альтернативно, восприимчивые дикие или разводимые на ферме креветки, предназначенные для биопробы, должны быть обследованы с помощью гнездовой ОТ-ПЦР с использованием РНК, экстрагированной из ткани или гемолимфы, в целях подтверждения отсутствия ранее существующих у них хронических инфекций вирусами комплекса YHV или родственными вирусами. В течение всей процедуры исследования креветки должны содержаться в условиях оптимальных для выживания данных видов в резервуарах лабораторных систем.

Собрать умирающих креветок из зараженных YHV1 прудов или креветок, в отношении которых имеется подозрение, что они являются носителями инфекции, и выдержать при 4°C или на льду. Удалить и выбросить хвост и конечности. Если необходимо целую креветку или сохраненную голову можно подвергнуть быстрой заморозке и хранить при –80°C или в жидком азоте, пока не понадобятся. Произвести быстрое оттаивание хранящихся

образцов на 37°C водяной бане в двух пластиковых пакетах с защелкивающимся уплотнением, а затем держать при 4°C или на льду в течение всех процедур. Удалить карапакс и известковые ротовые части. Суспендировать оставшиеся ткани в шести объемах TN буфера (0,02 M Tris/HCl; pH 7,4; 0.4 M NaCl) и гомогенизировать в измельчителе тканей до образования однородной суспензии. Центрифугировать гомогенат для осветления при 1300 *g* в течение 20 минут при 4°C. Удалить жидкость супернатанта ниже липидного слоя и пропустить через 0,45 мкм фильтр. Хранить фильтрат при 4°C для немедленного использования или подвергнуть быстрой заморозке и хранить в аликвотах при –80°C или в жидком азоте. Произвести быстрое оттаивание фильтрата при 37°C и сохранять на льду до его использования.

Как минимум 12 ювенильных (1–5 г) креветок известных восприимчивых видов (*P. monodon*, *P. esculentus*, *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. vannamei*, *P. stylirostris*) вводят посредством инъекции 5 мкл фильтрата на один грамм веса тела во второй абдоминальный сегмент с помощью иглы 26 калибра. Инъектируют две эквивалентные группы по как минимум 12 креветок TN буфером и фильтрованным тканевым экстрактом, полученным из неинфицированных креветок. Одна дополнительная группа из как минимум 12 креветок должна быть инфицирована последней известным и калиброванным инокулятом положительного контроля из креветок, инфицированных YHV1. Во время анализа методом биопробы следует содержать каждую группу креветок в отдельном крытом резервуаре с индивидуальной системой подачи воды. Следует обеспечить отсутствие непреднамеренного перемещения воды между резервуарами, применяя принципы надлежащей лабораторной практики. Следует производить наблюдение за креветками и регистрировать количество погибших в течение не менее 21 дня или до проведения тестирования и пока смертность в группе положительных контролей не достигнет 100%. Отбирают как минимум одну умирающую креветку из каждой из четырех групп для исследования методом гистологии, трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ), *in-situ* гибридизации нуклеиновых кислот и ПЦР или вестерн-блоттинга для подтверждения присутствия YHV1 в образце (см. разделы выше по процедурам тестирования).

ПРИМЕЧАНИЕ: Креветки, подлежащие тестированию, в отношении которых подозреваются, что они являются носителями низкоуровневых хронических инфекций, могут продуцировать инокулят, содержащий очень низкую дозу вируса. При проведении биопробы, такой инокулят не всегда обязательно вызывает гибель, появление макроскопических признаков болезни или дает гистологические данные, характерные для летальной инфекции. В этом случае для креветок, исследуемых методом биопробы, необходимо применять молекулярные тесты (ПЦР или гибридизацию *in-situ*) или трансмиссионную электронную микроскопию (ТЕМ).

4.3.2. Серологические методы

Не применимы.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для целевого надзора и диагностики YHV1 указаны в таблице 5.1. Используемые в таблице обозначения означают: а = данный метод является рекомендованным методом ввиду его наличия, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = данный метод применяется в некоторых ситуациях, но его стоимость, точность или другие факторы значительно ограничивают его применение; и d = данный метод в настоящее время не рекомендуется использовать для этой цели. Данные рекомендации в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает аспекты достоверности, чувствительности, специфичности и полезности. Хотя не все тесты, обозначенные, как категория а или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются без получения сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Дети	Пост-личинная стадия	Пилула-стадия	Взрослые		
Макроскопические признаки					c	
Проба					c	
Прямая световая микроскопия					a	
Гистопатология					a	
Трансмиссионная микроскопия					d	
Анализы на основе антител					a	
- <i>situ</i> ДНК зонды					b	
ПЦР					a	
Секвенирование					d	

ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Тест(-ты), рекомендованные для целевого надзора в целях объявления свободы от инфекции вирусом желтой головы генотипа 1

Гнездовая ОТ-ПЦР (раздел 4.3.1.2.3.1.4) с последующим подтверждающим секвенированием амплифицированного ПЦР продукта является предписанным методом для объявления свободы от инфекции. Требуется, чтобы результаты двухэтапной ПЦР были отрицательными.

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Подозрительный случай YHV1 инфекции определяется, как вспышка болезни у морских креветок с быстро нарастающим количеством случаев гибели (до 100%) на ранней до поздней ювенильной стадиях, которой может предшествовать прекращение питания и скопление креветок у края пруда. У умирающих креветок может наблюдаться общая бледность и пожелтение головогруди, вызванное расположенным под этим отделом желтым гепатопанкреасом. При гистологическом исследовании зафиксированных тканей лимфоидного органа выявляют средние до больших количества глубоко базофильных, равномерно окрашенных, сферических цитоплазматических включений (приблизительно 2 мкм в диаметре или меньше).

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Наличие YHV1 можно подтвердить посредством обнаружения высоких уровней распространения инфекции в тканях эктодермального и мезодермального происхождения путем исследования методом гибридизации *in-situ* в сочетании с обнаружением амплифицированных продуктов предписанного размера с помощью дифференцирующих анализов методом ОТ-ПЦР и секвенирования, как описано в разделе 4.3 данной главы.

8. Список литературы

ASSAVALAPSAKUL W., SMITH D.R. & PANYIM S. (2003). Propagation of infectious yellow head virus particles prior to cytopathic effect in primary lymphoid cell cultures of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 253–258.

CASTRO-LONGORIA R., QUINTERO-ARREDONDO N., GRIJALVA-CHON J.M. & RAMOS-PAREDES J. (2008). Detection of the yellow-head virus (YHV) in wild blue shrimp,

Penaeus stylirostris, from the Gulf of California and its experimental transmission to the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Fish Dis.*, **31**, 953–956.

CHANTANACHOOKIN C., BOONYARATPALIN S., KASORNCHANDRA J., DIREKBUSARAKOM S., AEKPANITHANPONG U., SUPAMATAYA K., SRIURAIATANA S. & FLEGEL T.W. (1993). Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 145–157.

COWLEY J.A., CADOGAN L.C., WONGTEERASUPAYA C., HODGSON R.A.J., SPANN K.M., BOONSAENG V. & WALKER P.J. (2004). Differential detection of gill-associated virus (GAV) from Australia and yellow head virus (YHV) from Thailand by multiplex RT-nested PCR. *J. Virol. Methods*, **117**, 49–59.

COWLEY J.A., HALL M.R., CADOGAN L.C., SPANN K.M. & WALKER P.J. (2002). Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 95–104.

COWLEY J.A., WALKER P.J., FLEGEL T.W., LIGHTNER D.V., BONAMI J.R., SNIJDER E.J. & DE GROOT R.J. (2012). Family *Roniviridae*. In: Virus Taxonomy, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. King A., Adams M., Carstens E. & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier, Academic Press, London, UK, 797–801.

FLEGEL T.W., BOONYARATPALIN S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1997). Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In: Diseases in Asian Aquaculture III. Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 285–296.

FLEGEL T.W., FEGAN D.F. & SRIURAIATANA S. (1995a). Environmental control of infectious shrimp diseases in Thailand. In: Diseases in Asian Aquaculture II. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 65–79.

FLEGEL T.W., SRIURAIATANA S., WONGTEERASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1995b). Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*. In: Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 76–83.

HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological assay using cDNA probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.

KHONGPRADIT R., KASORNCHANDRA J. & BOONYARATPALIN S. (1995). Susceptibility of the postlarval stages of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to yellow-head baculovirus (YBV). *In: Diseases in Asian Aquaculture II*. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 6.

LIGHTNER D.V. (1996). Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.

LIGHTNER D.V., HASSON K.W., WHITE B.L. & REDMAN R.M. (1998). Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **10**, 271–281.

LIU Q., HUANG J., YANG H.-L., YANG B., WANT H.-L., WANT Q.-T., LIU F. & ZHANG Q.-L. (2014). Detection of a new genotype of yellow-head virus in farmed shrimp suspicious of EMS/AHPNS infection. *Oceanol. Limnol. Sin.*, **45**, 703–709.

LOH P.C., CESAR E., NADALA B. Jr, TAPAY L.M. & LU Y. (1998). Recent developments in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. *In: Advances in Shrimp Biotechnology* Flegel T.W., ed. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand, 255–259.

LONGYANT S., SATTAMAN S., CHAIVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & SITHIGORNGUL P. (2006). Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV). *Aquaculture*, **257**, 83–91.

LONGYANT S., SITHIGORNGUL P., CHAIVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & MENASVETA P. (2005). Differences in the susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 5–12.

LU Y., TAPAY L.M., BROCK J.A. & LOH P.C. (1994). Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **17**, 649–656.

- MA H., OVERSTREET R.M. & JOVONOVICH J.A. (2009). Daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*): A reservoir host for yellow-head virus (YHV). *J. Invert. Pathol.*, **101**, 112–118.
- MOHR P.G., MOODY N.J.G., HOAD J., WILLIAMS L.M., BOWATER R.O., CUMMINS D.M., COWLEY J.A. & CRANE M.STJ. (2015). New yellow head virus genotype (YHV7) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* indigenous to northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **115**, 263–268.
- OANH D.T., VAN HULTEN M.C., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2011). Pathogenicity of gill-associated virus and Mourilyan virus during mixed infections of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Gen. Virol.*, **92**, 893–901.
- SANCHEZ-BARAJAS M., LINAN-CABELLO M.A. & MENA-HERRERA A. (2009). Detection of yellow-head disease in intensive freshwater production systems of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Int.*, **17**, 101–112.
- SENAPIN S., THAOWBUT Y., GANGNONNGIW W., CHUCHIRD N., SRIURAIATANA S. & FLEGEL T.W. (2010). Impact of yellow head virus outbreaks in the whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in Thailand. *J. Fish Dis.*, **33** (5), 421–430.
- SPANN K.M., COWLEY J.A., WALKER P.J. & LESTER R.J.G. (1997). A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 169–179.
- SPANN K.M., DONALDSON R.A., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2000). Differences in susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 221–225.
- SPANN K.M., MCCULLOCH R.J., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2003). Detection of gill-associated virus (GAV) by *in situ* hybridisation during acute and chronic infections in *Penaeus monodon* and *Penaeus esculentus* shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 1–10.
- STENTIFORD G.D., BONAMI J.R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, **291**, 1–17.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (1999). A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 165–173.

TANG K.F.J., SPANN K.M., OWENS L. & LIGHTNER D.V. (2002). *In situ* detection of Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe. *Aquaculture*, **205**, 1–5.

TIRASOPHON W., YODMUANG S., CHINNIRUNVONG W., PLONGTHONGKUM N. & PANYIM S. (2007). Therapeutic inhibition of yellow head virus multiplication in infected shrimps by YHV-protease dsRNA. *Antiviral Res.*, **74**, 150–155.

WALKER P.J., COWLEY J.A., SPANN K.M., HODGSON R.A.J., HALL M.R. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2001). Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001. Browdy C.L. & Jory D.E., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 292–302.

WIJEGOONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., SITTIDILOKRATNA N., PHETCHAMPAI N., COWLEY J.A., GUDKOV N. & WALKER P.J. (2009). Homologous genetic recombination in the yellow head complex of nidoviruses infecting *Penaeus monodon* shrimp. *Virology*, **390** (1), 79–88.

WIJEGOONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., PHAN T., HODGSON R.A.J., NIELSEN L., KIATPATHOMCHAI W. & WALKER P.J. (2008a). Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. *Virology*, **380**, 213–225.

WIJEGOONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2008b). Consensus RT-nested PCR to detect yellow head virus genotypes in penaeid shrimp. *J. Virol. Methods*, **153**, 168–175.

WONGTEERASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1997). Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 181–186.

WONGTEERASUPAYA C., SRIURAIRATANA S., VICKERS J.E., AKRAJAMORN A., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1995). Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.*, **22**, 45–50.

*

* *

NB: Имеется Референтная лаборатория МЭБ по инфекции вирусом синдрома желтой головы генотипа 1 (см. таблицу в конце данного *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Просим обращаться в Референтные лаборатории МЭБ для получения любой дополнительной информации по инфекции вирусом болезни желтой головы генотипа 1.

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 1995 г., ПОД НАЗВАНИЕМ БОЛЕЗНЬ ЖЕЛТАЯ ГОЛОВА, САМАЯ ПОСЛЕДНЯЯ ОБНОВЛЕННАЯ ВЕРСИЯ ПРИНЯТА В 2019 г.

ГЛАВА 2.2.9.

ИНФИЦИРОВАНИЕ ВИРУСОМ СИНДРОМА ЖЕЛТОЙ ГОЛОВЫ ГЕНОТИПА 1

7. Предмет рассмотрения

Инфицирование вирусом синдрома желтой головы генотипа 1 означает инфицирование патогенным возбудителем, вирусом синдрома желтой головы генотипа 1 (YHV1) рода *Okavirus* и семейства *Roniviridae*.

8. Информация о болезни

8.1. Факторы возбудителя

8.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Вирус синдрома желтой головы генотипа 1 (YHV1) - один из восьми известных

генотипов комплекса вирусов синдрома желтой головы и единственный известный возбудитель, вызывающий синдром желтой головы. YHV1 и другие генотипы в комплексе синдрома желтой головы официально классифицированы Международным комитетом по таксономии вирусов как единственный вид (ассоциированный с жабрами вирус) в роде *Okavirus*, семействе *Roniviridae*, отряде *Nidovirales* (Cowley с соавт., 2012). Вирус синдрома желтой головы генотипа 2 является общеизвестным ассоциированным с жабрами вирусом (GAV). Четыре других генотипа в данном комплексе (генотипы 3-6) обычно присутствуют у здоровых особей *Penaeus monodon* в Восточной Африке, Азии и Австралии и лишь в редких случаях или никогда не ассоциируются с болезнью (Walker с соавт., 2001; Wijegoopawardane с соавт., 2008a). Недавно были зарегистрированы два новых генотипа YHV-комплекса, один, обозначенный как YHV7, был выявлен у больных *P. monodon* в Австралии (Mohr с соавт., 2015) и восьмой генотип был обнаружен у *Penaeus chinensis*, в отношении которых подозревалось, что они больны острым гепатопанкреатическим некрозом (Liu с соавт., 2014). Имеются свидетельства о наличии генетической рекомбинации между генотипами (Wijegoopawardane с соавт., 2009).

YHV1 образует покрытые оболочкой палочкообразные частицы 40–50 нм × 150–180 нм (Chantanachookin с соавт., 1993; Wongteerasupaya с соавт., 1995). Оболочки усеяны выпуклыми пепломерами, выступающими примерно на 11 нм над поверхностью. Нуклеокапсиды представляют собой палочки (диаметром 20–30 нм) и имеют спиралевидную симметрию с периодичностью в 5-7 нм. Вирионы состоят из трех структурных белков (нуклеопротеин р20 и оболочечные гликопротеины gp64 и gp116) и ~26 т.н. генома в одноцепочечной РНК положительного смысла.

8.1.2. Выживание вне хозяина

YHV1 остается жизнеспособным в аэрированной морской воде в течение 72 часов (Flegel с соавт., 1995b).

8.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

YHV1 можно инактивировать посредством нагревания при 60°C в течение 15 минут (Flegel с соавт., 1995b). Мало информации имеется о других методах инактивации, но вирус, по-видимому, чувствителен к обработке хлором, при 30 частях на миллион (0,03 мг мл⁻¹) (Flegel с соавт., 1997).

8.1.4. Жизненный цикл

Отсутствуют сообщения о высокой множественности YHV1 заражений в культуре клеток. Инфицирование при множественности заражения в 0,001 в первичных культурах клеток лимфоидных органов показало, что максимальные титры вируса получают через 4 дня после инфицирования (Assavalapsakul с соавт., 2003). Клинические признаки YHV1 инфицирования появляются у *P. monodon* в течение 7–10 дней после подвергания воздействию. YHV1 реплицируется в цитоплазме инфицированных клеток, в которых в большом количестве

присутствуют длинные филаментные пред-нуклеокапсиды, наблюдается баддинг вирионов в цитоплазматические везикулы в плотно упакованных паракристаллических структурах для выхода на цитоплазматическую мембрану (Chantanachookin с соавт., 1993).

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды-хозяева

Виды, которые удовлетворяют критериям включения в список, как восприимчивые к инфекции YHV1, в соответствии с Главой 1.5 *Ветеринарно-санитарного кодекса по водным животным (Водный кодекс)*, являются следующими: восточная голубая креветка (*Penaeus stylirostris*), травяная креветка (dagger blade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*)), гигантская тигровая креветка (*Penaeus monodon*), креветка jinga (*Metapenaeus affinis*) и белоногая креветка (*Penaeus vannamei*).

2.2.2. Виды, данные о восприимчивости которых являются неполными

Виды, данные о восприимчивости которых в соответствии с Главой 1.5. *Водного кодекса* являются неполными, включают: банановую креветку (*Penaeus merguensis*), креветку Carpenter (*Palaemon serrifer*), розовую королевскую креветку (*Penaeus japonicus*), северную коричневую креветку (*Penaeus aztecus*), северную розовую креветку (*Penaeus duorarum*), северную белую креветку (*Penaeus setiferus*), тихоокеанскую голубую креветку (*Palaemon styliferus*), австралийского красноклешневого рака (*Cherax quadricarinatus*), речную креветку Sunda (*Macrobrachium sintangense*) и желтую креветку (*Metapenaeus brevicornis*).

Кроме того, сообщалось о получении патоген-специфичных положительных результатах полимеразной цепной реакции при исследовании следующих видов, у которых активная инфекция не была выявлена: морской желудь (*Chelonibia patula*), голубой краб (*Callinectes sapidus*), циклопоидные веслоногие рачки (*Ergasilus manicatus*), морская уточка (*Octolasmis muelleri*), большой фундулюс (*Fundulus grandis*) и очень мелкие креветки (*Acetes* sp.).

2.2.3. Восприимчивые стадии хозяина

Penaeus monodon восприимчивы к YHV1 инфекции в возрасте старше PL15 (Khongpradit с соавт., 1995).

2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность обнаружения)

YHV1 инфекции обычно выявляют только, когда болезнь становится явно выраженной, в то же время у здоровых *P. monodon* данные инфекции обычно не

наблюдаются, инфекции были выявлены в здоровой дикой популяции *P. stylirostris* (Castro-Longoria с соавт., 2008). Можно предположить, что во время вспышек в аквакультурных прудах, превалентность YHV1 инфекции – высокая. Естественные YHV1 инфекции были выявлены у *P. japonicus*, *P. merguiensis*, *P. setiferus*, *M. ensis* и *P. styliferus* (Cowley с соавт., 2002; Flegel с соавт., 1995a; Flegel с соавт., 1995b), но данных о превалентности в естественной среде очень мало.

2.2.5. Целевые органы и инфицируемые ткани

YHV1 целенаправленно поражает ткани эктодермального и мезодермального происхождения, включая лимфоидные органы, гемоциты, гемопоэтическую ткань, жаберные лепестки и губчатую соединительную ткань подкожного слоя, кишечник, сязговую железу, гонады, нервные пучки и ганглии (Chantanachookin с соавт., 1993; Lightner, 1996).

2.2.6. Персистентное инфицирование

YHV1 был обнаружен с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) у клинически здоровых диких *P. stylirostris*, отобранных для проведения надзора в Калифорнийском заливе в 2003 г. (Castro-Longoria с соавт., 2008). Инфекционная природа обнаруженного YHV1 была подтверждена посредством экспериментальных заражений. Также имеются данные о том, что YHV1 может сохраняться у особей, выживших после экспериментального заражения (Longyant с соавт., 2005; Longyant с соавт., 2006).

2.2.7. Переносчики

Известных переносчиков YHV1 нет.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

YHV1 инфекция может передаваться горизонтально посредством инъекции, потребления внутрь инфицированной ткани, погружения в морскую воду, содержащую экстракты тканей, профильтрованные для удаления бактерий, или посредством совместного обитания не подвергавшихся никакому воздействию креветок с инфицированными креветками (Flegel с соавт., 1995b; Lightner, 1996). Также было произведено укоренение инфекции у креветок посредством инъекции экстрактов очень мелких креветок (*Acetes* sp.), собранных в инфицированных прудах (Flegel с соавт., 1995a). Динамика распространения YHV1 инфекции в аквакультурных прудах не изучалась. Однако быстрое увеличение уровня совокупной смертности во время вспышек болезни позволяет предположить, что горизонтальная передача происходит очень эффективно.

2.3.2. Превалентность

Превалентность инфекции, ассоциированной с вирусами синдрома желтой головы, у здоровых *P. monodon* (как было выявлено посредством исследования с помощью гнездовой ПЦР с обратной транскрипцией [ОТ-ПЦР]) может быть высокой (50–100%) в разводимых на ферме и диких популяциях в Австралии, Азии и Восточной Африке, а также у *P. vannamei*, разводимых на ферме в Мексике (Cowley с соавт., 2004; Sanchez-Barajas с соавт., 2009; Walker с соавт., 2001; Wijegoonawardane с соавт., 2008a). Превалентность отдельных генотипов варьирует в зависимости от географического происхождения креветок. Использование методов обнаружения, обладающих меньшей чувствительностью, чем гнездовая ПЦР (например, гистология, иммуноблоттинг, дот-блоттинг, гибридизация *in-situ*), скорее всего приведет к недооценке в большинстве случаев реальной превалентности инфекции в популяциях креветок.

2.3.3. Географическое распространение

YHV1 был зарегистрирован в Тайване, Индонезии, Малайзии, Филиппинах, Шри-Ланке, Таиланде и Вьетнаме (Walker с соавт., 2001). GAV и другие генотипы синдрома желтой головы были выявлены у здоровых *P. monodon* из Австралии, Тайваня, Индии, Индонезии, Малайзии, Мозамбика, Филиппин, Таиланда и Вьетнама (Wijegoonawardane с соавт., 2008a). YHV1 также был выявлен у *P. vannamei* в Мексике (Sanchez-Barajas с соавт., 2009).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

У разводимых в прудах *P. monodon* болезнь, вызванная YHV1, может стать причиной почти 100% смертности в течение 3–5 дней после первого появления клинических признаков (Chantanachookin с соавт., 1993). Хотя экспериментальное подвергание *P. monodon* воздействию вирусов YHV1 или GAV может быстро привести к гибели, исследования методом биопробы, показали, что YHV1 является намного более вирулентным (примерно 10^6 -кратно по результатам анализа с целью определения 50% летальной дозы [LD₅₀] в конечной точке) (Oanh с соавт., 2011). Генотипы 3, 4, 5 и 6 пока с болезнью не ассоциируются (Wijegoonawardane с соавт., 2008a).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Повышенные уровни вирусной инфекции, сопровождающиеся болезнью, могут снижаться при физиологическом стрессе, вызванном внезапными изменениями в уровне pH или уровнях растворенного кислорода или при воздействии других факторов окружающей среды (Flegel с соавт., 1997).

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Эффективные методы вакцинации не разработаны.

2.4.2. Химиотерапия

Эффективные коммерческие противовирусные препараты пока отсутствуют.

2.4.3. Иммуностимуляция

Научно-подтвержденные сообщения отсутствуют.

2.4.4. Выведение резистентных особей

Сообщений нет.

2.4.5. Восполнение популяции резистентными особями

Все морские креветки, используемые для коммерческого разведения, восприимчивы к YHV1.

2.4.6. Блокирующие агенты

Инъектирование креветок с помощью двухцепочечной РНК, гомологичной ORC 1a/1b областям гена YHV1 или GAV (таким образом, нацеленной на полногеномную вирусную РНК) может подавлять репликацию вируса и предотвращать гибель после экспериментального контрольного заражения. Противовирусное действие двухцепочечной РНК, по-видимому, использует путь РНК интерференции (RNAi) (Tirasophon с соавт., 2007).

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Сообщения отсутствуют.

2.4.8. Общие практики ведения хозяйства

Для снижения риска болезни можно использовать свободные от специфических патогенных факторов (СПФ) или ПЦР-негативные маточные популяции или не контаминированную патогенами воду (биологически защищенная вода) и системы разведения с биологической защитой.

9. Отбор образцов

9.1. Выбор отдельных образцов

Для проведения диагностики во время вспышки болезни, самым предпочтительным источником материала для исследования являются умирающие креветки, собираемые по краю прудов. Из тех же прудов следует также отбирать внешне

здоровых креветок. Для проведения надзора с целью выявления присутствия инфекции в популяциях внешне здоровых креветок полезными для исследования могут быть ткани, отобранные на мизидной стадии развития креветки и далее (мизидная стадия, пост-личиночная [PL], ювенильная и взрослая стадии).

9.2. Сохранение образцов для представления для исследования

Умиравшие креветки (или ткани, отобранные у умирающей креветки) должны быть подвергнуты быстрой заморозке в сухом льду или безводном спирте в месте их отбора и храниться замороженными в сухом льду, жидком азоте или морозильнике при -80°C . Замораживание при -20°C или выше является неприемлемым.

Образцы тканей, предназначенные для ПЦР скрининга, должны сохраняться в 80–90% аналитическом/химически чистом (абсолютном) этаноле. Объем используемого этанола должен быть как минимум в десять раз больше объема ткани. Не рекомендуется использовать этанол более низкого качества (лабораторный или технический этанол).

Образцы ткани для гистологии следует отбирать у свежих креветок и помещать для сохранения в фиксирующий раствор Дэвидсона (Davidson's fixative). В качестве полезной альтернативы можно использовать раствор формалина (10%) в морской воде. Объем используемого фиксирующего раствора должен быть как минимум в десять раз больше объема ткани.

Ткани для проведения электронной микроскопии следует отбирать у живых креветок.

См. Главу 2.2.0., где изложено руководство по способам сохранения образцов для предполагаемых методов тестирования.

9.3. Объединение образцов в пулы

Для обнаружения YHV1 инфекции в больших популяциях креветок, допустимо объединять образцы тканей в пулы в целях проведения скрининга или надзора за партиями креветок на мизидной или пост-личиночной стадиях развития из инкубаторного садка или за партиями креветок на ювенильной стадии развития в пруду. Общее количество креветок, от которых следует отобрать образцы, как для одного пула, так и для нескольких более мелких пулов, определяется исходя из ожидаемой превалентности инфекции и требуемых доверительных интервалов обнаружения. Обычно, в популяциях, насчитывающих более 100 000 креветок, при превалентности инфекции выше 5%, для обнаружения YHV1 с 95% доверительным уровнем необходимо будет протестировать 60 особей в пулах соответствующих размеров. Однако при очень низких нагрузках YHV1 у инфицированных креветок или при использовании тестов с меньшей чувствительностью, чем у двухэтапной ОТ-ПЦР или ОТ-ПЦР в реальном времени, точное определение может быть поставлено под угрозу. См. также Главу 2.2.0.

9.4. Наиболее подходящие органы или ткани

У умирающих креветок, в отношении которых имеется подозрение об их инфицировании YHV1, наиболее подходящими тканями для отбора в качестве образца являются лимфоидные органы и жабры. Для проведения скрининга или надзора за ювенильными или взрослыми креветками, которые внешне являются здоровыми, предпочтительными является лимфоидный орган. Для прижизненного отбора образцов можно использовать жабры и гемолимфу.

9.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

Не установлены.

10. Диагностические методы

10.1. Методы полевой диагностики

10.1.1. Клинические признаки

Креветки, начиная с пост-личиночной стадии развития и далее, могут быть инфицированы YHV1 экспериментально. У разводимых креветок инфицирование может приводить к массовой гибели, которая обычно происходит на стадиях, предшествующих поздним ювенильным стадиям. У умирающих креветок может наблюдаться общая внешняя бледность и пожелтение головогрудного отдела, вызванное пожелтением находящегося внутри гепатопанкреаса, который может быть необычно мягким по сравнению с коричневым гепатопанкреасом здоровой креветки. Во многих случаях в течение нескольких дней после первого появления креветок с макроскопическими признаками YHD1 вся популяция креветок в пруду утрачивается (Chantanachookin с соавт., 1993). Однако эти признаки болезни не являются особыми отличительными признаками и при отсутствии других более патогномоничных макроскопических признаков не являются достоверными, даже для предварительного диагностирования YHV1.

10.1.2. Изменения в поведении

Может наблюдаться чрезвычайно высокая активность питания с последующим резким прекращением питания в течение 2-4 дней после появления макроскопических клинических признаков болезни и гибель. Умирающие креветки могут скапливаться у края прудов возле поверхности (Chantanachookin с соавт., 1993).

10.2. Клинические методы

10.2.1. Макроскопическая патология

См. Раздел 4.1

10.2.2. Клиническая химия

Не описана.

10.2.3. Микроскопическая патология

Зафиксировать ткани головогруды умирающей креветки, в отношении которой имеется подозрение, что она поражена YHV1, в фиксирующем растворе Дэвидсона, подготовить срезы тканей и окрасить их гематоксилином Майера и эозином (H&E), используя стандартные гистологические процедуры (Lightner, 1996). Исследовать ткани эктодермального и мезодермального происхождения методом световой микроскопии на наличие умеренных до больших количеств глубоко базофильных, равномерно окрашенных, сферических цитоплазматических включений, примерно 2 мкм в диаметре или меньше (Chantanachookin с соавт., 1993). Очень информативными являются ткани лимфоидного органа, выстилки желудка и жабр.

10.2.4. Влажные препараты

Произвести фиксацию целой креветки или жаберных волокон с помощью фиксирующего раствора Дэвидсона (Lightner, 1996). После фиксации тщательно промыть некоторые жаберные волокна водопроводной водой для удаления фиксирующего раствора и окрасить гематоксилином и эозином (H&E) (Lightner, 1996). После окрашивания и дегидратации, когда ткани находятся в ксилене, поместить жаберное волокно на предметное стекло микроскопа в капле ксилена и с помощью пары тонких иголок (полезно использовать стереомикроскоп) оторвать несколько вторичных волокон. Заменить основное волокно в ксилене, в котором оно может храниться неопределенно долгий срок в герметично закрытом флаконе в качестве перманентного референтного материала. Следует соблюдать осторожность и не допуская высыхания ксилена, расправить вторичные волокна и удалить любые крупные фрагменты или частицы, которые будут приводить к ненужному утолщению залитого в среду препарата. Добавить каплю жидкости для заливки, разместить сверху покровное стекло и слегка надавить для максимально возможного уплощения залитого в среду препарата. Данную процедуру можно также использовать для тонких слоев тканей выстилки. Исследовать под световым микроскопом, используя $\times 40$ линзы объектива. В образцах, отобранных от пораженных YHV1 креветок, будут наблюдаться средние-до больших количества глубоко базофильных, равномерно окрашенных, сферических цитоплазматических включений (примерно 2 мкм в диаметре или меньше) (Flegel с соавт., 1997). Выявленные свидетельства наличия такой патологии следует использовать для подтверждения результатов исследования мазков гемолимфы (см. ниже) при предварительной диагностике YHV1. Как и в случае зафиксированных тканей и жаберных волокон, зафиксированных в ксилене, эти предметные стекла с цельным залитым в среду препаратом можно сохранять в качестве материала для постоянного учета.

Если требуется быстро получить результаты, этап фиксации можно сократить всего лишь до 2 часов, заменив уксусную кислоту, являющуюся компонентом фиксирующего раствора Дэвидсона, на 50% разведение концентрированной HCl.

Для хорошей фиксации, данный фиксирующий раствор следует хранить не более нескольких дней до его использования. После этапа фиксации тщательно промыть для удаления фиксирующего раствора и проверить, чтобы уровень pH вернулся к почти нейтральному уровню перед окрашиванием. Не следует проводить фиксацию в течение более длительных периодов и при температуре выше 25°C, поскольку это может привести к чрезмерному повреждению ткани и затруднить или сделать невозможной идентификацию специфичной патологии.

10.2.5. Электронная микроскопия/цитопатология

Для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ), наиболее подходящими тканями от креветки, в отношении которой подозревается, что она инфицирована YHV1, являются лимфоидный орган и жабры. Для скрининга и надзора за внешне здоровыми креветками наиболее подходящей тканью является лимфоидный орган. Оглушить живую креветку посредством погружения в ледяную воду до её обездвиживания или убить посредством инъекции фиксирующего раствора. Быстро рассечь и отобрать маленькие порции целевой ткани (не более чем несколько мм в диаметре) и зафиксировать в 6 % глutarальдегиде, объем которого должен как минимум в 10 раз превышать объем ткани, выдержать при 4°C и забуферить раствором какодилата натрия

($\text{Na}[\text{CH}_3]_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (8,6 г какодилата натрия, 10 г NaCl, дистиллированная вода до доведения объема до 100 мл, откорректированный уровень pH до 7 с помощью 0,2 N HCl) или раствором фосфата (0,6 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,5 г Na_2HPO_4 ; 1 г NaCl; 0,5 г сахарозы; дистиллированная вода до доведения объема до 100 мл, откорректированный с помощью 0,2 N HCl уровень pH = 7). Произвести фиксацию в течение не менее 24 часов перед последующей подготовкой. Для длительного хранения в фиксирующем растворе при 4°C, снизить концентрацию глutarальдегида до 0,5–1,0%. Последующая подготовка включает пост-фиксацию с помощью 1% четырёхокси осмия, дегидратацию, заливку препарата, изготовление срезов и окрашивание ацетатом уранила и лимоннокислым свинцом в соответствии с реагентами и методами стандартной трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ) (Lightner, 1996).

В цитоплазме клеток, инфицированных YHV1, наблюдаются как предшественники нуклеокапсидов, так и вирионы с полной оболочкой. Предшественники нуклеокапсидов представляют собой длинные волокна примерно 15 нм в диаметре, которые могут заметно варьировать по длине (80–450 нм) и иногда могут быть плотно упакованы в паракристаллические структуры. Вирионы представляют собой палочковидные покрытые оболочкой частицы (40–50 нм × 150–180 нм) с закругленными концами и выпуклыми выступами (8–11 нм) над поверхностью. В клеточной цитоплазме вирионы локализованы или плотно упакованы во внутриклеточные везикулы. Может наблюдаться баддинг вирионов у цитоплазматической мембраны и в интерстициальных пространствах. Вирионы и нуклеокапсиды GAV невозможно отличить от HV1 при исследовании трансмиссионной электронной микроскопией (ТЕМ).

У здоровых *P. monodon*, хронически инфицированных YHV1 или GAV, обычно

наблюдаются сфероиды лимфоидного органа, часто болезнь сопровождается некрозом лимфоидного органа (Spann с соавт., 1997). Однако образование сфероидов и структурная дегенерация ткани лимфоидного органа могут быть также следствием инфицирования другими вирусами креветок (Lightner, 1996).

10.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

10.3.1. Методы прямого обнаружения

10.3.1.1. Микроскопические методы

10.3.1.1.1. Влажные препараты

См. раздел 4.2.4

10.3.1.1.2. Мазки

См. раздел 4.2.5

10.3.1.1.3. Фиксированные срезы

См. раздел 4.2.3

10.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

10.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные срезы

Хотя имеются методы культивирования в первичных клетках креветки, данные методы не рекомендуется использовать в качестве рутинного диагностического метода для выделения и идентификации YHV1, ввиду высокого риска контаминации адвентициальными возбудителями. В настоящее время пока еще отсутствуют перевиваемые клеточные линии, пригодные для культивирования YHV1.

10.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигена

Опубликованы реагенты и процедуры для обнаружения белков YHV1 с помощью антител (Loh с соавт., 1998; Lu с соавт., 1994). Вирионы, очищенные от гемолимфы экспериментально инфицированных креветок, были использованы для получения антисыворотки на новозеландских белых кроликах. Из данной антисыворотки производили очищение иммуноглобулина (IgG) с помощью белок-G-связанных колонок и удаляли перекрестно реагирующие нормальные антигены креветки посредством адсорбции на высушенной ацетоном размолотой мышечной ткани и гемолимфы креветки. Для обнаружения белков YHV1 методом вестерн-блоттинга разводят 0,1 мл гемолимфы, отобранной от живой креветки в объеме, равном объему цитратного буфера и либо проводят немедленное исследование, либо хранят при -80°C до использования. Центрифугируют 200 мкл образца при 8000 *g* в

течение 5 минут, а затем осаждают вирионы из осветленного супернатанта посредством ультрацентрифугирования при 140 000 *g* в течение 5 минут. Ресуспенсируют осадок в 100 мкл 2 × загрузочного буфера (2,5 мл 0,5 мМ Tris/HCl pH 6,8; 4 мл 10% додецилсульфата натрия [SDS]; 2 мл глицерина; 1 мкл β-мекраптоэтанола; 0,5 мл деионизированной дистиллированной воды) и нагревают при 95°C в течение 5 минут. Вносят 10 мкл образца и осуществляют электрофорез при 200 В. Переносят гель для блоттинга на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,1 мкм в буфере для блоттинга (3,03 г Tris-основы; 14,4 г глицина; 200 мл метанола на один литр) при 100 В в течение 1 часа. Промывают мембрану с помощью забуференного фосфатом физиологического раствора (ФБР, pH 7,4), блокируют в 5% обезжиренном молоке (в ФБР) в течение одного часа, и промывают ФБР в течение 5 минут. Промачивают мембрану 1/1000 разведением анти-YNV1 антитела (IgG) в течение одного часа, промывают три раза с помощью ФБР в течение 5 минут, а затем промачивают в течение одного часа в 1/2500 разведении конъюгата козьего антикроличьего IgG – пероксидазы хрена. Промывают мембрану три раза с помощью ФБР в течение 5 минут, а затем замачивают в субстрате пероксидазы хрена 3,3',5,5'-тетраметилбензидине до проявления окрашивания в сине-фиолетовый цвет. Производят остановку реакции посредством замачивания мембраны в дистиллированной воде. Все этапы инкубации следует проводить при 25°C ± 2°C. В качестве положительного контроля используют очищенный вирусный препарат, который применяется для идентификации позиций 116 кДа, 64 кДа и 20 кДа структурных белков YNV1. Чувствительность вестерн-блоттинга для обнаружения YNV1 составляет примерно 0,4 нг YNV1 белка (около 10⁶ вирионов).

10.3.1.2.3. Молекулярные методы

10.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Описаны три процедуры ОТ-ПЦР. Первая представляет собой одноэтапную ОТ-ПЦР, адаптированную из Wongteerasupaya с соавт., 1997, которую можно использовать для обнаружения YNV1 у пораженных креветок. При использовании данной процедуры будет производиться обнаружение YNV1, но не GAV или любого из других трех установленных в настоящее время генотипов. Вторая процедура представляет собой более чувствительную мультиплексную гнездовую ОТ-ПЦР, адаптированную из Cowley с соавт., 2004. Она может быть использована для дифференциации YNV1 и GAV у больных креветок или скрининга с целью выявления здоровых носителей. Обнаружение YNV7 производилось на первой стадии или этапе мультиплексной гнездовой ОТ-ПЦР (первичная ОТ-ПЦР) (Mohr с соавт., 2015). И ОТ-ПЦР, и гнездовая ПЦР (вторая стадия или этап) выявляли новый генотип YNV из Китая (Китайская Народная Республика) (Liu с соавт., 2014). Данный тест можно приобрести в соответствующем модифицированном виде (YNV/GAV IQ2000, GeneReach Biotechnology Corp., Chinese Taipei). Однако данный набор в настоящее время не включен в список, как прошедший официальную процедуру МЭБ по валидации и сертификации коммерческих тестов (список сертифицированных тест-наборов и

производителей размещен на вебсайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/registration-of-diagnostic-kits/background-information/>.

Третья процедура – чувствительная мультиплексная гнездовая ОТ-ПЦР, описанная Wijegoonawardane с соавт., 2008b. Данный тест можно использовать для скрининга креветок на наличие любого из семи генотипов вирусов комплекса болезни желтой головы, но он не дифференцирует генотипы. Определение генотипа можно произвести посредством анализа ОТ-ПЦР продукта методом нуклеотидного секвенирования. Неизвестно, будет ли данный анализ обнаруживать генотип YHV, выделенный недавно в Китае (Китайская Народная Республика).

10.3.1.2.3.1.1. Подготовка образцов

У ювенильных и взрослых креветок для получения полной РНК можно использовать ткани лимфоидного органа и жабр а также гемолимфу. Предпочтительно использовать свежие ткани. Также для получения полной РНК подходят ткани лимфоидного органа и жабр, законсервированные в 80–95% этаноле аналитической чистоты или хранящиеся замороженными при –70°C. Разорвать на более мелкие кусочки 10-20 г тканей лимфоидного органа или жабр или использовать 50 мкл гемолимфы в 500 мкл TrizolTM¹ реагента и произвести экстракцию полной РНК в соответствии с руководством по указанному продукту. Ресуспендировать РНК в 25 мкл воды, обработанной DEPC (диэтил-пирокарбонад), нагревать при 55°C в течение 10 минут, остудить на льду и сразу же использовать или хранить при –70°C, пока не понадобится. Выход РНК будет варьировать в зависимости от типа и свежести тканей, качества использованного консерванта и продолжительности периода времени в течение которого ткань подвергалась консервации. Однако, можно ожидать, что количество полученной РНК из свежих тканей будет варьировать от 0,2 до 2,0 мкг мкл⁻¹ и около половины данных количеств при получении РНК из законсервированных в спирту тканей. Ткани можно также гомогенизировать посредством толчения вместе с бусами и экстрагировать с помощью имеющихся в продаже наборов (например, QIAmp Viral RNA Mini Kit) (Mohr с соавт., 2015).

Из емкости для выращивания креветок на пост-личиночной стадии или емкости для выращивания креветок на протяжении всего их жизненного цикла, содержащей примерно 100,000 креветок на пост-личиночной стадии (PL) или более, отбирают образец примерно в 1000 PL в каждой из 5 различных точек. Образцы объединяют в пул в резервуаре, осторожно перемешивают воду в круговую, а затем отбирают образцы живых PL, которые собираются в центре резервуара. Количество PL, предназначенных для объединения в пул и тестирования, определяются исходя из предполагаемой или имеющейся превалентности инфекции. Гомогенизировать образцы тканей в соответствующем объеме TrizolTM¹ реагента и экстрагировать РНК в соответствии с руководством по

¹ Указание конкретных коммерческих продуктов в качестве примеров не подразумевает их одобрения со стороны МЭБ. Это касается всех коммерческих продуктов, упоминаемых в данном *Руководстве по водным животным*.

указанному продукту. В соответствии со стандартной процедурой Trizol™ экстракции подходящими являются массы тканей равные 25–30 × PL5, 15 × PL10 и 5 × PL15, при использовании которых получают полную РНК высокого качества свободную от контаминации белками.

Для каждого набора РНК образцов, подлежащего тестированию, в качестве отрицательных и положительных контролей следует включать DEPC-обработанную воду и экстракты, в отношении которых известно, что они содержат РНК YHV1 или РНК GAV (как целесообразно для указанного теста), соответственно.

10.3.1.2.3.1.2. Процедура 1: ОТ-ПЦР для специфического обнаружения YHV1 у больных креветок

В основу данной процедуры, используемой в Референтной лаборатории МЭБ, положен метод Mohr с соавт., 2015, и она является следующей: Матрицу (2 мкл) добавляют в 23 мкл реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл 2× реакционной смеси, 1 мкл Superscript III RT/Platinum Taq смеси (Invitrogen), 180 нМ каждого праймера и воду молекулярной чистоты. После одного цикла при 50°C в течение 30 минут и 94°C в течение 2 минут, ПЦР амплификация включает 40 циклов при 94°C в течение 30 секунд, 58°C в течение 45 секунд, 68°C в течение 45 секунд, с последующим при 68°C в течение 7 минут. Вместе с подходящей ДНК-лестницей, вносят 20 мкл аликвоту ПЦР в 1,5% агарозный/ТАЕ (Tris-ацетат-ЭДТК [этилен диамин тетрауксусная кислота]) гель, содержащий SYBR-safe (краситель), и после электрофореза производят выявление 135 п.н ДНК полосы, ожидаемой для YHV, с помощью трансиллюминатора с голубым светом.

Чувствительность данной ПЦР составляет примерно 0,01 пг очищенной РНК YHV1 (примерно 10³ геномов).

Последовательности ПЦР праймеров:

10F: 5'-CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG-3'

144R: 5'-AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT-3'

10.3.1.2.3.1.3. Процедура 2: гнездовая ОТ-ПЦР для дифференциального обнаружения YHV1 и GAV у здоровых и больных креветок

В основу данной процедуры, используемой в Референтной лаборатории МЭБ, положен метод Mohr с соавт., 2015, и она является следующей: Для первичной ПЦР, 2 мкл матрицы добавляют в 23 мкл реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл 2× реакционной смеси, 1 мкл Superscript III RT/Platinum Taq смеси (Invitrogen), 180 нМ каждого GY1 и GY4 праймера и воды молекулярной чистоты. После одного цикла при 50°C в течение 30

минут и 94°C в течение 2 минут ПЦР амплификация включает 35 циклов при 95°C в течение 30 секунд, 66°C в течение 30 секунд и 68°C в течение 45 секунд с последующим конечным удлинением при 68°C в течение 7 минут. Для второго этапа – гнездовой ПЦР, готовят 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл ПЦР продукта первого этапа, 12,5 мкл HotStarTaq мастер микса (Qiagen), 360 нМ каждого праймера: GY2, Y3 и G6, воду молекулярной чистоты. ПЦР амплификация включает один цикл при 95°C в течение 15 минут с последующими 35 циклами при 95°C в течение 30 секунд, при 66°C в течение 30 секунд, и при 72°C в течение 45 секунд, с последующей конечной элонгацией при 72°C в течение 7 минут. Вместе с подходящей ДНК-лестницей, вносят 20 мкл аликвоту ПЦР в 1,5% агарозный/ТАЕ (Tris-ацетат-ЭДТК) гель, содержащий SYBR-safe (краситель), и после электрофореза производят выявление ампликонов с помощью трансиллюминатора с голубым светом.

Если вирусная нагрузка достаточно высокая, 794 п.н. ДНК будет амплифицирована либо из GAV, либо из YHV1 на первом ПЦР этапе. На втором ПЦР этапе, 277 п.н. продукт является индикатором обнаружения YHV, а 406 п.н продукт является индикатором обнаружения GAV. Присутствие обоих 406 п.н и 277 п.н. продуктов указывает на заражение двумя вирусами, GAV и YHV1. Чувствительность обнаружения ПЦР второго этапа ~ в 1000 раз выше, чем у ПЦР первого этапа, и РНК GAV или YHV1 можно обнаружить до предела в 10 фг полной РНК лимфоидного органа. Гнездовую ПЦР можно проводить как два отдельных анализа, специфичных для YHV1 или GAV, не включая либо G6, либо Y3 праймер, соответственно. Праймер содержит участок ошибочного спаривания оснований для GAV, но является специфичным для YHV1. Для GAV, седьмое основание слева (Т) заменяется на С, таким образом, чтобы последовательность праймера для GAV была: 5'-CAT-CTG-CCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3', в соответствии с данным о последовательности для генома GAV (номера доступа в базе данных: NC_010306.1 и AF227196.2).

Последовательности ОТ-ПЦР праймеров, универсальных для GAV и YHV (GY) или специфичных для GAV (G) или YHV (Y) являются следующими:

GY1: 5'-GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG-3'

GY2: 5'-CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3'

GY4: 5'-GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG-3'

GY5: 5'-GAG-CTG-GAA-TTC-AGT-GAG-AGA-ACA-3'

Y3: 5'-ACG-CTC-TGT-GAC-AAG-CAT-GAA-GTT-3'

G6:

5'-GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT-3'

NB: В связи с сообщениями о проблемах со специфичностью праймеров для некоторых эмерджентных штаммов, все ПЦР продукты, полученные при использовании процедуры 2, должны быть секвенированы для подтверждения генотипа вируса.

10.3.1.2.3.1.4. Процедура 3: гнездовая ОТ-ПЦР для обнаружения всех охарактеризованных в настоящее время генотипов в комплексе вирусов синдрома желтой головы, YHV1 до YHV7

В основу данной процедуры, используемой в Референтной лаборатории МЭБ, положен метод Mohr с соавт., 2015, и она является следующей: Для первичной ПЦР 2 мкл матрицы добавляют в 23 мкл реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл 2 × реакционной смеси, 1 мкл Superscript III RT/Platinum Taq смеси (Invitrogen), 180 нМ каждого из YC-F1ab и YC-R1ab праймерных пулов и воду молекулярной чистоты. После одного цикла при 50°C в течение 30 минут и 94°C в течение 2 минут, ПЦР амплификация включает один цикл при 95°C в течение 15 минут с последующими 35 циклами при 94°C в течение 45 секунд, 60°C в течение 45 секунд, and 68°C в течение 45 секунд, с последующей конечной элонгацией при 68°C в течение 7 минут. Для второго этапа, гнездовой ПЦР, готовят 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл ПЦР продукта первого этапа, 12,5 мкл HotStarTaq мастер микса (Qiagen), 180 нМ каждого пула YV-F2ab и YC-R2ab праймеров, и воду молекулярной чистоты. ПЦР амплификация включает один цикл при 95° С в течение 15 минут с последующими 35 циклами при 94°C в течение 45 секунд, 60°C в течение 45 секунд, и 72°C в течение 45 секунд, и конечную элонгацию при 72°C в течение 7 минут. Вместе с подходящей ДНК-лестницей, вносят 20 мкл аликвоту ПЦР в 1,5% агарозный/ТАЕ (Tris-ацетат-ЭДТК) гель, содержащий SYBR-safe (краситель), и после электрофореза производят выявление ампликонов с помощью трансиллюминатора с голубым светом.

Если вирусная нагрузка достаточно высокая, 358 п.н. ДНК будет амплифицирована в ходе ПЦР первого этапа. В ходе второго этапа, гнездовой ПЦР, производится амплификация 146 п.н. продукта. Возможно дальнейшее определение генотипа (если требуется) посредством анализа нуклеотидной последовательности каждого ПЦР продукта с последующим сравнением с последовательностями известных генотипов посредством множественного выравнивания последовательностей и филогенетического анализа. Пределы чувствительности обнаружения ПЦР первого этапа и гнездовой ПЦР второго этапа составляют 2500 и 2.5 РНК матриц, соответственно.

Последовательности ПЦР праймеров (каждый праймер содержит пул равных количеств двух родственных олигонуклеотидных последовательностей):

YC-F1ab пул: 5'-ATC-GTC-GTC-AGC-TAC-CGC-AAT-ACT-GC-3'
 5'-ATC-GTC-GTC-AGY-TAY-CGT-AAC-ACC-GC-3'

YC-R1ab пул: 5'-TCT-TCR-CGT-GTG-AAC-ACY-TTC-TTR-GC-3'
 5'-TCT-GCG-TGG-GTG-AAC-ACC-TTC-TTG-GC-3'

YC-F2ab пул: 5'-CGC-TTC-CAA-TGT-ATC-TGY-ATG-CAC-CA-3'
 5'-CGC-TTY-CAR-TGT-ATC-TGC-ATG-CAC-CA-3'

YC-R2ab пул: 5'-RTC-DGT-GTA-CAT-GTT-TGA-GAG-TTT-GTT-3'
 5'-GTC-AGT-GTA-CAT-ATT-GGA-GAG-TTT-RTT-3'

Коды смешанных оснований:

R(AG), Y(CT), M(AC), K(GT), S(GC), W(AT),
 H(ACT), B(GCT), V(AGC), D(AGT),
 N(AGCT).

10.3.1.2.3.2. Гибридизация *in-situ*

Для обнаружения YHV1 или GAV подходит процедура, описанная Tang с соавт., 2002 (Tang & Lightner, 1999). Для сохранения доступности вирусной РНК фиксируют образцы тканей, отобранные у живых креветок, в нейтральном-забуференном модифицированном фиксирующем растворе Дэвидсона без уксусной кислоты (RF-фиксатив) (Hasson с соавт., 1997). Для обеспечения хорошего сохранения тканей при одновременном сохранении доступности РНК можно использовать нормальный фиксирующий раствор Дэвидсона, при условии что время фиксации не будет превышать 24 часов (максимум 48 часов). Производят обработку зафиксированной ткани с помощью стандартных гистологических методов и готовят срезы толщиной 4 мкм на Superfrost Plus предметных стеклах (Fisher Scientific, Pennsylvania, США). Перед гибридизацией инкубируют срезы при 65°C в течение 45 минут, удаляют парафин с помощью Hemo-De (Fisher Scientific, Pennsylvania, США), и производят регидратацию посредством серии снижающихся концентраций этанола в воде. Производят расщепление срезов с помощью протеиназы К (100 мкг мл⁻¹, в 50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 10 mM NaCl; 1 mM ЭДТА) в течение 15 минут при 37°C, с последующей пост-фиксацией в 0,4% формальдегиде в течение 5 минут. Промывают в 2 × SSC (стандартный цитратно-солевой раствор), затем проводят пред-гибридизацию с использованием 500 мкл предгибридизационного раствора (4 × SSC; 50% формамид; 1 × Denhardt's; 0.25 мг мл⁻¹ дрожжевая РНК; 0,5 мг мл⁻¹ стриженной ДНК спермы лосося;

5% сульфат декстрана) при 42°C в течение 30 минут. Для гибридизации нанести на срезы сверху 250 мкл гибридизационного раствора, содержащего меченый дигоксигенином ДНК зонд (20–40 нг мл⁻¹), при 42°C и оставить на ночь. На следующий день промыть срезы следующим образом: 2 × SSC один раз в течение 30 минут при комнатной температуре; 1 × SSC два раза в течение 5 минут при 37°C; 0,5 × SSC два раза в течение 5 минут при 37°C. Инкубировать срезы с конъюгатом овечьего анти-дигоксигенина-щелочной фосфатазы (Roche) при 37°C в течение 30 минут. Промыть с помощью 0,1 М Tris/HCl, pH 7,5; 0,15 М NaCl два раза в течение 10 минут при комнатной температуре и ополоснуть с помощью 0,1 М Tris/HCl, pH 9,5; 0,1 М NaCl. Инкубировать вместе с нитросиним тетразолием и 5-бromo-4-хлоро-3-индоил фосфатом в темноте в течение 1–2 часов для проявления цвета. Произвести контрастное окрашивание с помощью бисмарка коричневого Y (0,5%), дегидратировать в серии этанола и Hemo-De (растворитель), добавить Permount (среда для заливки) (Fisher Scientific, Pennsylvania, США) и накрыть покровным стеклом. YHV-инфицированные клетки дают синий до пурпурно-черного цвета на фоне коричневого контрастного красителя. Следует включать положительные контроли YHV-инфицированной ткани и отрицательные контроли неинфицированной ткани креветки. Меченный дигоксигенином ДНК зонд можно получить посредством ПЦР мечения с использованием следующих праймеров:

YHV1051F: 5'-ACA-TCT-GTC-CAG-AAG-GCG-TC-3'

YHV1051R: 5'-GGG-GGT-GTA-GAG-GGA-GAG-AG-3'

10.3.1.2.3.3. Очистка возбудителя

Описан метод очистки YHV1, в основу которого положено ультрацентрифугирование в градиенте плотности (Wongteerasupaya с соавт., 1995). В качестве источника для вируса, предназначенного для очистки, в идеале следует использовать 250 здоровых ювенильных *P. monodon* (или *P. vannamei*) креветок (приблизительно 10 г). После акклиматизации в течение нескольких дней в резервуарах объемом 1500 литров (приблизительно 80 креветок в одном резервуаре) при солености воды 3,5 части на тысячу (мг мл⁻¹), каждой креветке внутримышечно вводят 100 мкл 1/100 суспензии экстракта жабр, полученного от инфицированных YHV креветок. Через 2 дня после инфицирования собирают умирающих креветок с типичными признаками YHV1. С помощью шприца вытягивают гемолимфу из синусов у основания ходильных ног и осторожно перемешивают на льду с таким же количеством среды из гемолимфы омара (LHM) (486 mM NaCl; 15 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 0,5 mM Na₂HPO₄; 8,1 mM MgSO₄; 36 mM NaHCO₃; 0,05% декстрозы в минимальной среде Игла, при откорректированном с помощью 1 н NaOH pH =7,6). Центрифугируют смесь при 480 g в течение 30 минут при 4°C для удаления клеточного дебриса. Производят ультрацентрифугирование супернатанта при 100,000 g в течение одного часа при 4°C. Сливают супернатант и осторожно ресуспендируют осадок в

течение ночи при 4°C в 1 мл LHM. Данную суспензию наносят слоем на непрерывный градиент из 20–40% урографина и производят ультрацентрифугирование при 100,000 *g* в течение одного часа при 4°C. После центрифугирования собирают вирусную полоску с помощью пастеровской пипетки и разводят с помощью NTE буфера (0,02 М ЭДТК; 0,2 М NaCl; 0,2 М Tris/HCl [pH 7,4]) до конечного объема в 12 мл. Производят ультрацентрифугирование суспензии при 100,000 *g* в течение одного часа при 4°C и ресуспендируют осадок (очищенный вирус) в 100 мкл TE буфера (10 mM Tris/HCl; 1 mM ЭДТА [pH 7,4]) и хранят в 20 мкл аликвотах при –80°C, пока не потребуется.

10.3.1.2.4. Биопроба

В основу анализа методом биопробы положена процедура, описанная Spann с соавт., 1997, но сходные процедуры были описаны несколькими другими авторами (Lu с соавт., 1994). Биопроба должна проводиться на восприимчивых креветках (см. Раздел 2.2 выше), которые в идеале были сертифицированы как СПФ и получены с предприятия по разведению с высокой степенью биозащиты. Альтернативно, восприимчивые дикие или разводимые на ферме креветки, предназначенные для биопробы, должны быть обследованы с помощью гнездовой ОТ-ПЦР с использованием РНК, экстрагированной из ткани или гемолимфы, в целях подтверждения отсутствия ранее существующих у них хронических инфекций вирусами комплекса YHV или родственными вирусами. В течение всей процедуры исследования креветки должны содержаться в условиях оптимальных для выживания данных видов в резервуарах лабораторных систем.

Собрать умирающих креветок из зараженных YHV1 прудов или креветок, в отношении которых имеется подозрение, что они являются носителями инфекции, и выдержать при 4°C или на льду. Удалить и выбросить хвост и конечности. Если необходимо целую креветку или сохраненную головогрудь можно подвергнуть быстрой заморозке и хранить при –80°C или в жидком азоте, пока не понадобятся. Произвести быстрое оттаивание хранящихся образцов на 37°C водяной бане в двух пластиковых пакетах с защелкивающимся уплотнением, а затем держать при 4°C или на льду в течение всех процедур. Удалить карапакс и известковые ротовые части. Суспендировать оставшиеся ткани в шести объемах TN буфера (0,02 М Tris/HCl; pH 7,4; 0,4 М NaCl) и гомогенизировать в измельчителе тканей до образования однородной суспензии. Центрифугировать гомогенат для осветления при 1300 *g* в течение 20 минут при 4°C. Удалить жидкость супернатанта ниже липидного слоя и пропустить через 0,45 мкм фильтр. Хранить фильтрат при 4°C для немедленного использования или подвергнуть быстрой заморозке и хранить в аликвотах при –80°C или в жидком азоте. Произвести быстрое оттаивание фильтрата при 37°C и сохранять на льду до его использования.

Как минимум 12 ювенильных (1–5 г) креветок известных восприимчивых видов (*P. monodon*, *P. esculentus*, *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. vannamei*, *P.*

stylirostris) вводят посредством инъекции 5 мкл фильтрата на один грамм веса тела во второй абдоминальный сегмент с помощью иглы 26 калибра. Инъецируют две эквивалентные группы по как минимум 12 креветок TN буфером и фильтрованным тканевым экстрактом, полученным из неинфицированных креветок. Одна дополнительная группа из как минимум 12 креветок должна быть инфицирована последней известным и калиброванным инокулятом положительного контроля из креветок, инфицированных YHV1. Во время анализа методом биопробы следует содержать каждую группу креветок в отдельном крытом резервуаре с индивидуальной системой подачи воды. Следует обеспечить отсутствие непреднамеренного перемещения воды между резервуарами, применяя принципы надлежащей лабораторной практики. Следует производить наблюдение за креветками и регистрировать количество погибших в течение не менее 21 дня или до проведения тестирования и пока смертность в группе положительных контролей не достигнет 100%. Отбирают как минимум одну умирающую креветку из каждой из четырех групп для исследования методом гистологии, трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ), *in-situ* гибридизации нуклеиновых кислот и ПЦР или вестерн-блоттинга для подтверждения присутствия YHV1 в образце (см. разделы выше по процедурам тестирования).

ПРИМЕЧАНИЕ: Креветки, подлежащие тестированию, в отношении которых подозреваются, что они являются носителями низкоуровневых хронических инфекций, могут продуцировать инокулят, содержащий очень низкую дозу вируса. При проведении биопробы, такой инокулят не всегда обязательно вызывает гибель, появление макроскопических признаков болезни или дает гистологические данные, характерные для летальной инфекции. В этом случае для креветок, исследуемых методом биопробы, необходимо применять молекулярные тесты (ПЦР или гибридизацию *in-situ*) или трансмиссионную электронную микроскопию (ТЕМ).

10.3.2. Серологические методы

Не применимы.

11. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для целевого надзора и диагностики YHV1 указаны в таблице 5.1. Используемые в таблице обозначения означают: а = данный метод является рекомендованным методом ввиду его наличия, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = данный метод применяется в некоторых ситуациях, но его стоимость, точность или другие факторы значительно ограничивают его применение; и d = данный метод в настоящее время не рекомендуется использовать для этой цели. Данные рекомендации в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает

2019 © OIE - Руководство по диагностическим тестам для водных животных - 14/11/2019

аспекты достоверности, чувствительности, специфичности и полезности. Хотя не все тесты, обозначенные, как категория а или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются без получения сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	Пост-личиночная стадия	Ювенильная стадия	Взрослые		
Макроскопические признаки	d	d	c	c	c	d
Биопроба	d	d	d	d	c	b
Прямая световая микроскопия	d	d	d	d	a	d
Гистопатология	d	d	c	c	a	d
Трансмиссионная микроскопия	d	d	c	c	d	b
Анализы на основе антител	d	d	c	c	a	b
<i>In-situ</i> ДНК зонды	d	d	c	c	b	a
ПЦР	a	a	a	a	a	a
Секвенирование	a	a	a	a	d	a

ПЦР = полимеразная цепная реакция.

12. Тест(-ты), рекомендованные для целевого надзора в целях объявления свободы от инфекции вирусом желтой головы генотипа 1

Гнездовая ОТ-ПЦР (раздел 4.3.1.2.3.1.4) с последующим подтверждающим секвенированием амплифицированного ПЦР продукта является предписанным методом для объявления свободы от инфекции. Требуется, чтобы результаты двухэтапной ПЦР были отрицательными.

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Подозрительный случай YHV1 инфекции определяется, как вспышка болезни у морских креветок с быстро нарастающим количеством случаев гибели (до 100%) на ранней до поздней ювенильной стадиях, которой может предшествовать прекращение питания и скопление креветок у края пруда. У умирающих креветок

может наблюдаться общая бледность и пожелтение головогруды, вызванное расположенным под этим отделом желтым гепатопанкреасом. При гистологическом исследовании зафиксированных тканей лимфоидного органа выявляют средние до больших количества глубоко базофильных, равномерно окрашенных, сферических цитоплазматических включений (приблизительно 2 мкм в диаметре или меньше).

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Наличие YHV1 можно подтвердить посредством обнаружения высоких уровней распространения инфекции в тканях эктодермального и мезодермального происхождения путем исследования методом гибридизации *in-situ* в сочетании с обнаружением амплифицированных продуктов предписанного размера с помощью дифференцирующих анализов методом ОТ-ПЦР и секвенирования, как описано в разделе 4.3 данной главы.

8. Список литературы

ASSAVALAPSAKUL W., SMITH D.R. & PANYIM S. (2003). Propagation of infectious yellow head virus particles prior to cytopathic effect in primary lymphoid cell cultures of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 253–258.

CASTRO-LONGORIA R., QUINTERO-ARREDONDO N., GRIJALVA-CHON J.M. & RAMOS-PAREDES J. (2008). Detection of the yellow-head virus (YHV) in wild blue shrimp, *Penaeus stylirostris*, from the Gulf of California and its experimental transmission to the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Fish Dis.*, **31**, 953–956.

CHANTANACHOOKIN C., BOONYARATPALIN S., KASORNCHANDRA J., DIREKBUSARAKOM S., AEKPANITHANPONG U., SUPAMATAYA K., SRIURAIATANA S. & FLEGEL T.W. (1993). Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 145–157.

COWLEY J.A., CADOGAN L.C., WONGTEERASUPAYA C., HODGSON R.A.J., SPANN K.M., BOONSAENG V. & WALKER P.J. (2004). Differential detection of gill-associated virus (GAV) from Australia and yellow head virus (YHV) from Thailand by multiplex RT-nested PCR. *J. Virol. Methods*, **117**, 49–59.

COWLEY J.A., HALL M.R., CADOGAN L.C., SPANN K.M. & WALKER P.J. (2002). Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 95–104.

COWLEY J.A., WALKER P.J., FLEGEL T.W., LIGHTNER D.V., BONAMI J.R., SNIJDER E.J. & DE GROOT R.J. (2012). Family *Roniviridae*. In: Virus Taxonomy, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. King A., Adams M., Carstens E. & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier, Academic Press, London, UK, 797–801.

FLEGEL T.W., BOONYARATPALIN S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1997). Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand.*In: Diseases in Asian Aquaculture III*. Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 285–296.

FLEGEL T.W., FEGAN D.F. & SRIURAIATANA S. (1995a). Environmental control of infectious shrimp diseases in Thailand.*In: Diseases in Asian Aquaculture II*. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 65–79.

FLEGEL T.W., SRIURAIATANA S., WONGTEERASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1995b). Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*.*In: Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*. Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 76–83.

HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological assay using cDNA probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.

KHONGPRADIT R., KASORNCHANDRA J. & BOONYARATPALIN S. (1995). Susceptibility of the postlarval stages of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to yellow-head baculovirus (YBV).*In: Diseases in Asian Aquaculture II*. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 6.

LIGHTNER D.V. (1996). Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.

LIGHTNER D.V., HASSON K.W., WHITE B.L. & REDMAN R.M. (1998). Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **10**, 271–281.

LIU Q., HUANG J., YANG H.-L., YANG B., WANT H.-L., WANT Q.-T., LIU F. & ZHANG Q.-L. (2014). Detection of a new genotype of yellow-head virus in farmed shrimp suspicious of EMS/AHPNS infection. *Oceanol. Limnol. Sin.*, **45**, 703–709.

LOH P.C., CESAR E., NADALA B. Jr, TAPAY L.M. & LU Y. (1998). Recent developments in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens.*In: Advances in Shrimp Biotechnology* Flegel T.W., ed. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand, 255–259.

LONGYANT S., SATTAMAN S., CHAIVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & SITHIGORNGUL P. (2006). Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV). *Aquaculture*, **257**, 83–91.

LONGYANT S., SITHIGORNGUL P., CHAIVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & MENASVETA P. (2005). Differences in the susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 5–12.

- LU Y., TAPAY L.M., BROCK J.A. & LOH P.C. (1994). Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **17**, 649–656.
- MA H., OVERSTREET R.M. & JOVONOVICH J.A. (2009). Daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*): A reservoir host for yellow-head virus (YHV). *J. Invert. Pathol.*, **101**, 112–118.
- MOHR P.G., MOODY N.J.G., HOAD J., WILLIAMS L.M., BOWATER R.O., CUMMINS D.M., COWLEY J.A. & CRANE M.STJ. (2015). New yellow head virus genotype (YHV7) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* indigenous to northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **115**, 263–268.
- OANH D.T., VAN HULTEN M.C., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2011). Pathogenicity of gill-associated virus and Mourilyan virus during mixed infections of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Gen. Virol.*, **92**, 893–901.
- SANCHEZ-BARAJAS M., LINAN-CABELLO M.A. & MENA-HERRERA A. (2009). Detection of yellow-head disease in intensive freshwater production systems of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Int.*, **17**, 101–112.
- SENAPIN S., THAOWBUT Y., GANGNONNGIW W., CHUCHIRD N., SRIURAIRATANA S. & FLEGEL T.W. (2010). Impact of yellow head virus outbreaks in the whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in Thailand. *J. Fish Dis.*, **33** (5), 421–430.
- SPANN K.M., COWLEY J.A., WALKER P.J. & LESTER R.J.G. (1997). A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 169–179.
- SPANN K.M., DONALDSON R.A., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2000). Differences in susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 221–225.
- SPANN K.M., MCCULLOCH R.J., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2003). Detection of gill-associated virus (GAV) by *in situ* hybridisation during acute and chronic infections in *Penaeus monodon* and *Penaeus esculentus* shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 1–10.
- STENTIFORD G.D., BONAMI J.R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, **291**, 1–17.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (1999). A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 165–173.
- TANG K.F.J., SPANN K.M., OWENS L. & LIGHTNER D.V. (2002). *In situ* detection of

Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe. *Aquaculture*, **205**, 1–5.

TIRASOPHON W., YODMUANG S., CHINNIRUNVONG W., PLONGTHONGKUM N. & PANYIM S. (2007). Therapeutic inhibition of yellow head virus multiplication in infected shrimps by YHV-protease dsRNA. *Antiviral Res.*, **74**, 150–155.

WALKER P.J., COWLEY J.A., SPANN K.M., HODGSON R.A.J., HALL M.R. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2001). Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region. In: *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. Browdy C.L. & Jory D.E., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 292–302.

WIJEGOONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., SITTIDILOKRATNA N., PHETCHAMPAI N., COWLEY J.A., GUDKOV N. & WALKER P.J. (2009). Homologous genetic recombination in the yellow head complex of nidoviruses infecting *Penaeus monodon* shrimp. *Virology*, **390** (1), 79–88.

WIJEGOONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., PHAN T., HODGSON R.A.J., NIELSEN L., KIATPATHOMCHAI W. & WALKER P.J. (2008a). Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. *Virology*, **380**, 213–225.

WIJEGOONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2008b). Consensus RT-nested PCR to detect yellow head virus genotypes in penaeid shrimp. *J. Virol. Methods*, **153**, 168–175.

WONGTEERASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1997). Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 181–186.

WONGTEERASUPAYA C., SRIURAIRATANA S., VICKERS J.E., AKRAJAMORN A., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1995). Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.*, **22**, 45–50.

*

* *

NB: Имеется Референтная лаборатория МЭБ по инфекции вирусом синдрома желтой головы генотипа 1 (см. таблицу в конце данного *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Просим обращаться в Референтные лаборатории МЭБ для получения любой дополнительной информации по инфекции вирусом болезни желтой головы генотипа 1.

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 1995 г., ПОД НАЗВАНИЕМ БОЛЕЗНЬ ЖЕЛТАЯ ГОЛОВА, САМАЯ ПОСЛЕДНЯЯ ОБНОВЛЕННАЯ ВЕРСИЯ ПРИНЯТА В 2019 г.

ГЛАВА 2. 2. 10.

СФЕРИЧЕСКИЙ БАКУЛОВИРУС (БАКУЛОВИРУС ТИПА *PENAEUS MONODON*)

1. Область применения⁴⁰

В целях настоящей главы, сферический бакуловirus рассматривается в качестве инфекции бакуловirusом типа *Penaeus monodon*. Синонимы: MBV от *P. monodon* был определен как PmSNPV (virus ядерного полиэдроза в единичной оболочке от *P. monodon*) в соответствии с руководствами по вирусной номенклатуре, опубликованными Международным комитетом по Таксономии вирусов (ICTV) (Murphy с соавт., 1995), также он представлен сомнительными видами *P. monodon* NPV или PemoNPV, в 7-ом и 8-ом Отчетах ICTV (Fauquet с соавт., 2005; Van Regenmortel с соавт., 2000). Несмотря на то, что PemoNPV может являться наиболее правильным названием вируса, в большинстве случаев для обозначения этого вируса в настоящем *Водном Руководстве* будет использоваться термин бакуловirus *P. monodon* (MBV).

2. Информация о болезни

⁴⁰ NB: Версия, принятая Мировой Ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2012 г. Настоящая болезнь более не входит в список МЭБ.

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Этиологический возбудитель: бакуловирус *P. monodon* (MBV), описанный Lightner и Redman, 1981, Lightner с соавт., 1983 и Mari с соавт., 1993.

Международный комитет по таксономии вирусов называют MBV (Spherical Baculovirosis) в качестве одного из предположительных видов PemoNPV рода Nucleopolyherdovirus (Fauquet с соавт., 2005).

Штаммы возбудителя: в связи с широким ареалом и разнообразием видов-хозяев MBV, вероятно существование различных штаммов MBV. Тесты с полимеразной цепной реакцией (ПЦР), созданные для восточных и юго-восточных изолятов MBV с недавних пор демонстрируют ложноотрицательные результаты у *P. Monodon* (гигантская тигровая креветка) из Африки, зараженной MBV (Lightner, неопубликованные данные), предполагая также, что MBV (или виды PemoNPV) состоит более чем из одного штамма.

2.1.2. Выживаемость за пределами хозяина

Информация отсутствует.

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Информация отсутствует.

2.1.4. Жизненный цикл

Не применимо.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяина

Инфекции MBV отмечались у одного и более видов рода и подрода семейства Penaeidae (последние написаны в скобках): *Penaeus* (*Penaeus*), *Penaeus* (*Metapenaeus*), *Penaeus* (*Fenneropenaeus*) и *Penaeus* (*Melicertus*) (Doubrovsky с соавт., 1988; Hao с соавт., 1999; Lester с соавт., 1987; Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1981; Spann & Lester, 1996). Экспериментальное водное и пероральное заражение японской тигровой креветки *Penaeus* (*Marsupenaeus*) *japonicus*, однодневных постличинок (PL) MBV не дало инфекций, поддающихся обнаружению (Fukuda с соавт., 1988). Таким же образом, несмотря на симультанную культуру MBV-инфицированных тигровых креветок (*P. monodon*) в ряде ферм в различных странах Северной и Южной Америки (Эквадор, Бразилия, Пуэрто-Рико, штаты Техаса, Южная Калифорния и Гавайи Соединенных штатов Америки), и последующее подвергание прямому воздействию MBV определенных представителей семейства Penaeidae из этого региона (а именно *Penaeus vannamei*, *P. stylirostris* и *P. Californiensis*), вирус не продуцировал инфекции в этих видах, а

также не был установлен на фермах по разведению креветок или в диких стадах в регионах, подвергнутых воздействию (Lightner, 1996; Lightner с соавт., 1983).

2.2.2. Восприимчивые этапы хозяина

Восприимчивые стадии хозяина: все жизненные этапы, за исключением икринок и науплии, восприимчивы к инфекции MBV.

2.2.3. Предрасположенность видов и субпопуляции (вероятность обнаружения)

Информация отсутствует.

2.2.4. Органы-мишени и зараженная ткань

MBV является исключительно кишечным вирусом, инфицирующим слизистые эпителиальные клетки сосудов гепатопанкреаса и передней средней кишки (Anderson с соавт., 1987; Brock & Lightner, 1990; Couch, 1991; Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996; Lightner с соавт., 1983).

2.2.5. Персистирующая инфекция с пожизненными носителями

Персистирующая инфекция и пожизненные носители: персистирующая инфекция возникает обычно у представителей семейства Penaeidae – хозяев MBV. Было доказано, что дикие взрослые женские особи *P. monodon*, которые сильно заражены MBV, выделяют фекалии, загрязненные MBV во время нереста, загрязняя таким образом икринки, и передавая вирус следующему поколению. (Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996).

2.2.6. Переносчики инфекции

Неизвестны переносчики при естественных инфекциях.

2.2.7. Известные или предполагаемые дикие водные животные-переносчики

Информация отсутствует.

2.3. Клиническая картина болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача MBV происходит горизонтально, путем поглощения зараженной ткани (канибализм), фекалий, окклюзивных телец или вирус-загрязненного детрита, или воды (Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996). MBV передавался экспериментальным путем в лаборатории путем подвергания личинок или молодых особей *P. monodon* водному или пероральному заражению. Окклюзивные тельца MBV выявлялись через два дня после заражения в гепатопанкреатических клетках, когда PL-1 были заражены при 28°C в 33 ppt морской воде (Natividad & Lightner, 1992a; Natividad & Lightner, 1992b; Paynter с соавт., 1992).

2.3.2. Превалентность

Превалентность MBV крайне изменчива, от <1% в диких и культивируемых популяциях до 100% в культивируемых популяциях в бассейнах для выращивания личинок и прудах для молоди (Anderson с соавт., 1987; Chayaburakul с соавт., 2004; Chen с соавт., 1989b; Chen с соавт., 1989c; Chen с соавт., 1990; Lightner, 1996; Natividad & Lightner, 1992a; Vijayan с соавт., 1995).

2.3.3. Географическое распределение

MBV является энзоотическим вирусом у диких представителей семейства penaeids в следующих регионах, граничащих с Индо-тихоокеанским: Восточная и юго-восточная Азия, Индостан, Средний Восток, Австралия, Индонезия, Новая Каледония, Восточная Африка и Мадагаскар. За пределами нормального географического распространения *P. monodon*, MBV не был обнаружен у диких пенеидных креветок. Однако, сообщения о MBV поступали из мест, в которых завезенные креветки *P. monodon* культивировались на Средиземноморье, Западной Африке, Таити и Гавайских островах, а также из различных мест в Северной и Южной Америке и Карибских островах, но только в завезенных стадах *P. monodon* (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner, 1996).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Стадии личинки (а именно протозоа и мизидная стадия) и ранние стадии PL являются жизненными стадиями, во время которых могут наблюдаться значительная смертность, и особи наиболее легко инфицируются в лабораторных контрольных заражениях (Chen с соавт., 1989b; Natividad & Lightner, 1992a; Paynter с соавт., 1992). В энзоотических регионах, в которых культивируют *P. monodon*, превалентность MBV и тяжесть инфекции могут быть высокими (от 50% и почти до 100%) у молодых и взрослых особей, но без ассоциированной смертности и заболеваемости. Инфекции MBV по всей видимости хорошо переносятся *P. monodon*, если они не отягощены (Chayaburakul с соавт., 2004; Chen с соавт., 1989a; Chen с соавт., 1989b; Chen с соавт., 1989c; Lightner, 1996; Lightner с соавт., 1992; Natividad & Lightner, 1992b). Тем не менее, тяжелые инфекции MBV у искусственно выращенных *P. monodon* могут подавлять уровень роста, приводить к сниженной выживаемости и снижать общее функционирование культуры (Anderson с соавт., 1987; Baticados с соавт., 1991; Chayaburakul с соавт., 2004; Fegan с соавт., 1991; Lightner, 1996; Nash с соавт., 1988; Natividad & Lightner, 1992b).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Информация отсутствует.

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Не было разработано эффективных методов вакцинации от MBV.

2.4.2. Химиотерапия

Научно-обоснованные сообщения об эффективной химиотерапии отсутствуют.

2.4.3. Иммуностимуляция

Научно-обоснованные сообщения об эффективной иммуностимуляции отсутствуют.

2.4.4. Резистентное разведение

MBV-резистентных стад с восприимчивыми видами не наблюдалось.

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

Неприменимо в отношении MBV.

2.4.6. Блокирующие агенты

О блокирующих агентах не сообщалось.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

В виду того, что MBV передается от взрослых особей их потомству через фекальную контаминацию нерестовых личинок, профилактика инфекции в инкубаториях может быть достигнута за счет принятия дополнительных мер во избежание фекальной контаминации нерестовых икринок и личинок за счет тщательной промывки науплии или икринок формалином, йодофорами и чистой морской водой (Chen с соавт., 1990).

2.4.8. Общие практики животноводства

2.4.8.1. Инкубатор

Для профилактики инфекций и болезни MBV применялись различные практики животноводства. Предварительный скрининг маточного стада на MBV был в некоторой степени эффективен для обнаружения тяжело пораженных переносчиков вируса, снижая таким образом передачу болезни от родителя к потомству. Используя не летальные методы тестирования, это достигается путем простого микроскопического исследования фекальных нитей при свете (или ПЦР исследование фекальных нитей, в случае если оборудование для ПЦР тестирования доступно для использования). В другом варианте, маточное стадо может быть умерщвлено после нереста и может проводиться простое исследование в оптическом микроскопе давленного препарата гепатопанкреаса (или иссеченный гепатопанкреас может быть исследован при помощи ПЦР), чтобы определить статус инфекции MBV у нерестующей особи. В виду того, что MBV передается от взрослых особей их потомству путем фекальной контаминации нерестовых икринок, профилактика инфекции в инкубаторах может быть достигнута за счет принятия дополнительных мер во избежание фекальной контаминации нерестовых икринок и личинок путем тщательной промывки науплии или икринок формалином, йодофорами и чистой морской водой (Chen с соавт., 1990).

2.4.8.2. Пруды для молоди и нагульные пруды

MBV инфекции остаются частым явлением в прудах с земляным дном в Индо-Тихоокеанском регионе, где вирус является энзоотическим (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Chayaburakul с соавт., 2004; Lightner, 1996), но частота возникновения и превалентность MBV инфекций может быть снижена в облицованных прудах для молоди и нагульных прудах.

3. Отбор образцов

3.1. Отбор индивидуальных образцов

Подходящие образцы для тестирования на инфекцию MBV с использованием молекулярных методов (Например, ПЦР, *in-situ* гибридизация и т.д.) включают постличинок (PL), молодые и взрослые особи. Наряду с тем, что MBV может подвергаться инфицированию все жизненные этапы, тяжесть инфекции, и, следовательно, вирусная нагрузка может быть ниже уровней обнаружения у нерестовых икринок и в личиночных стадиях, эти жизненные этапы могут быть не подходящими образцами для обнаружения MBV или подтверждения свободы от болезни MBV.

3.2. Сохранение образцов для представления

Для получения информации о рутинной гистологии или молекулярных исследованиях, а также руководства по сохранению образцов для предполагаемого метода тестирования, см. Главу 2.2.0.

3.3. Объединение образцов

Образцы, отобранные для молекулярных тестов, могут быть скомбинированы в качестве объединенных образцов, представляющих собой не более пяти видов на объединенный образец молодых, подросших и взрослых особей. Однако для икринок, личинок и постличинок (PL) объединение большого количества (например, ~150 или более икринок или личинок, или 50-150 постличинок в зависимости от их размера/возраста) может быть необходимо для получения достаточного материала образца (выделенная нуклеиновая кислота) для проведения диагностического исследования. См. также Главу 2.2.0.

3.4. Наиболее подходящие органы и ткани

MBV это кишечный вирус и может обнаруживаться в гепатопанкреасе.

Фекальные образцы могут быть отобраны, когда требуется проведение нелетального тестирования (например, нелетальное тестирование ценного маточного стада).

3.5. Неподходящие образцы/ткани

MBV это кишечный вирус (например, гепатопанкреас, средняя кишка и ее пилорический придаток) и не реплицирует систематически.

4. Методы диагностики

4.1. Полевые диагностические методы

4.1.1. Клинические признаки

См. Раздел 4.2 для получения информации о макропатологических клинических признаках, которые проявляют креветки, зараженные MBV.

Инфицирование гепатопанкреаса бакуловиром типа *P. monodon* (MBV) является одной из болезней тигровых креветок мелкого и крупного размера. Ооклюзивные тельца, сформированные вирусом, очень заметны и легко проявляются с помощью прямой оптической микроскопии со свежими образцами или посредством рутинных гистологических методов с фиксированными срезами. Прямые микроскопические методы наиболее подходят для стадий постличинок, которые подвергаются частым перемещениям при региональной или международной торговле. Высокочувствительные молекулярные методы для MBV также доступны и предусматривают наиболее чувствительные методы для программ наблюдения, в особенности для нелетального тестирования маточного стада.

4.1.1.1. Прямое микроскопическое исследование

4.1.1.1.1. Влажные препараты свежей ткани

Диагноз инфекций MBV ставится за счет демонстрации единичных или множественных, преимущественно сферических ооклюзивных телец во влажных образцах давленных препаратов гепатопанкреаса или средней кишки, исследованных фазово-контрастной или светопольной микроскопией. В тщательно подготовленных неокрашенных препаратах, ооклюзивные тельца MBV визуализируются как единичные или множественные, в незначительной степени рефракционные, зеленоватые внутриядерные включения, диаметр которых составляет от менее 0.1 мкм - до приблизительно 20 мкм. Окрашивание давленного препарата ткани 0.05% водным раствором малахитового зеленого способствует демонстрации ооклюзивных телец за счет их более интенсивного окрашивания, чем у подобных сферических объектов аналогичного размера, таких как нормальные ядра клеток-хозяина, ядрышки, секреторные гранулы, фаголизосомы и липидные капли (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner, 1988; Lightner, 1996; Lightner с соавт., 1983).

4.1.1.1.2. Влажные препараты фекальных нитей

Этот метод может использоваться в качестве нелетального метода скрининга переносчиков MBV. Настоящий метод можно применять к молодым или более взрослым креветкам, и он, вероятно, наиболее подходит в качестве нелетального метода скрининга ценного маточного стада. Фекальные нити отбирают с помощью прозрачной сифонной лопатки (воздухопровод, оснащенный секцией с пластиковой пипеткой в качестве наконечника, является идеальным вариантом) и помещают в лабораторный стакан, чашу или другой подходящий контейнер. Фекальные нити могут быть преобразованы во влажные препараты

и напрямую исследоваться на окклюзивные тельца. Окклюзивные тельца MBV условно представляют собой сферические, рефракционные тельца, которые могут возникать единично или кластерами. В очень свежих фекальных нитях, они могут возникать кластерами, скрепленными ядерной мембраной. Добавление капли 0.05% водного раствора малахитового зеленого во влажный препарат способствует демонстрации окклюзивных телец MBV за счет окрашивания их в более интенсивный зеленый, чем другие круглые объекты в фекалиях (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner, 1996).

4.1.1.1.3. Отобранные фекальные образцы

Отобранные фекалии также могут использоваться в качестве примера нелетального тестирования на MBV методом ПЦР. ПЦР обеспечит большую диагностическую чувствительность для стертых инфекций по сравнению с прямым микроскопическим исследованием (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner & Redman, 1998).

4.1.2. Изменения в поведении

Помимо вялости у сильно пораженных постличинок, о поведенческих изменениях зараженных носителей не сообщалось.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

В протозоа, мизидной стадии и ранней постличиночной стадии с тяжелыми ВР инфекциями может наблюдаться белесая средняя кишка (в виду присутствия окклюзивных телец и клеточного детрита в фекальном материале) (Lightner, 1996). Молодые и взрослые особи не демонстрируют макропатологических признаков, имеющих диагностическую значимость, также, как и личинки с менее тяжелыми инфекциями.

4.2.2. Клиническая биохимия

Не предусмотрено.

4.2.3. Микроскопическая патология

См. Раздел 4.2.6

4.2.4. Влажные препараты.

См. Раздел 4.1.1

4.2.5. Мазки

Не предусмотрено.

4.2.6. Фиксированные срезы

4.2.6.1. Гистопатология

Гистология может использоваться для доказательной диагностики инфекции MBV. Поскольку 10% забуференный формалин и другие фиксаторы обеспечивают, в лучшем случае, достаточную фиксацию только гепатопанкреаса креветки (основной орган-мишень для MBV), использование фиксатора Дэвидсона (содержащего 33% этилового спирта [95%], 20% формалина [приблизительно 37% формальдегида], 11.5% безводной уксусной кислоты и 33.5% дистиллированной или водопроводной воды) строго рекомендуется для всех рутинных гистологических исследований креветок (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996). Для получения наилучших результатов не следует использовать мертвых креветок. Следует выбирать только живых, умирающих или ослабленных креветок для фиксации и гистологического обследования. Отобранных креветок умерщвляют инъекцией фиксатора непосредственно в гепатопанкреас; оболочка на голове и груди и брюшинной полости ровно поперечная относительно спинной средней линии вскрывается хорошо заточенными хирургическими ножницами, чтобы усилить проникновение фиксатора (брюшная полость может быть удалена или выброшена), цельную креветку (или голову, за исключением брюшинного отдела) помещают в фиксатор на 24 - 48 часов (не более) и затем переносят в 70% этиловый спирт для хранения. После переноса в 70% этиловый спирт, фиксированные образцы могут транспортироваться (по почте или курьером в диагностическую лабораторию), завернутыми в ткань или бумажное полотенце, пропитанное 70% этиловым спиртом и упакованными в герметичные пластиковые пакеты.

Для начала гистологической процедуры, фиксированную креветку «надрезают» (см. Bell & Lightner, 1988, чтобы увидеть руководство с фотографиями этой процедуры), чтобы способствовать последующему изготовлению срезов гепатопанкреаса и средней кишки. После дегидратации, образцы заливают в парафин и делают срезы толщиной 4–6 мкм. Рутинные гистологические окрашивания, такие как гематоксилин по Майеру или Харрису, и эозин (H&E) могут использоваться для демонстрации диагностических сферических окклюзивных телец MBV в гепатопанкреасе, эпителиальных клетках или просвете кишки. В большинстве случаев, гепатопанкреатические (или в редких случаях, присущие средней кишке) клетки, зараженные MBV, будут представлять явно гипертрофированные ядра с единичными, или более часто, множественными эозинофильными окклюзивными тельцами наряду с диминуцией и маргинацией хроматина. Окклюзивные тельца могут быть окрашены ярко красным при использовании гематоксилина и эозина, и интенсивно, но многообразно при окрашивании тканей по Грамму. Например, гистологическая окраска по Грамму методом Брауна-Брена, несмотря на то, что оно неспецифично для окклюзивных телец бакуловируса, приводит к более интенсивному окрашиванию окклюзий (в красный или пурпурный, в зависимости от толщины среза, времени обесцвечивания и т.п.), чем окружающая ткань, что может способствовать

обнаружению их присутствия при вялотекущих инфекциях (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Brock & Lightner, 1990; Lester с соавт., 1987; Lightner, 1988; Lightner, 1996; Vogt, 1992).

4.2.6.2. Метод аутофлуоресценции с окрашиванием флоксином

Другой метод обнаружения окклюзивных телец MBV основывается на флуоресценции флоксин-окрашенных окклюзивных телец. Водный 0.001% раствор флоксина можно добавить в давленные препараты ткани для того, чтобы сделать влажные препараты гепатопанкреаса или фекалий для прямого исследования. Гистологические срезы, окрашенные рутинным ГЭ, содержащим 0,005% флоксина, также доступны для этой процедуры. Окклюзии MBV во влажных препаратах ткани, фекалий или в гистологических срезах высвечиваются ярко желто-зеленым на бледно-зеленом фоне при эпифлуоресценции (барьерный фильтр 0-515 нм и 490 нм фильтр излучения возбuditеля). Другие объекты в тканях и окклюзивные тельца бакуловируса насекомых не высвечиваются этим методом. Следовательно, этот метод может обеспечивать быстрый и специфичный диагноз (Bondad-Reantaso с соавт., 2001; Lightner, 1996; Thurman с соавт., 1990).

4.2.6.3. In situ гибридизация

См. Раздел 4.3.1.2.3 ниже.

4.2.6.4. Методы на основе антител

Поликлональные антитела, продуцированные в кроликах для обнаружения полиэдрина тетраэдрического бакуловируса (BP) (Lewis, 1986) дают перекрестную реакцию с MBV при использовании методов непрямой иммунофлуоресценции (IFAT) (Lightner, 1996), но недоступны для рутинной диагностики инфекций MBV.

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Инфекция MBV может быть подтверждена путем демонстрации вируса (или патогномических окклюзивных телец с окклюзированными вирионами) в срезах, или демонстрацией вируса в частично очищенном вирусном препарате, приготовленном из гепатопанкреаса (Couch, 1991; Fegan с соавт., 1991; Johnson & Lightner, 1988; Lightner с соавт., 1983; Lu с соавт., 1996; Mari с соавт., 1993).

4.3. Обнаружение возбудителя и методы идентификации

4.3.1. Прямые методы обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

См. Раздел 4.1.1

4.3.1.1.2. Мазки

См. Раздел 4.2.5

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

См. Раздел 4.2.6

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственная среда

На сегодняшний день сообщений нет.

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе антител

См. Раздел 4.2.6

4.3.1.2.3. Молекулярные техники

4.3.1.2.3.1. Молекулярные методы с использованием ДНК для MBV

Были разработаны нерадиоактивные ДИГ-маркированные генетические зонды для MBV (Lightner с соавт., 1994; Lu с соавт., 1995; Mari с соавт., 1993; Spann с соавт., 1993). ДИГ-маркированные ДНК зонды для MBV доступны на рынке в виде наборов ShrimProbe™, выпускаемых DiagXotics (Lawrenceville, New Jersey, USA). Зонды имеют маркировку нерадиоактивных, дигоксигенин -11-dUTP (DIG). Эти зонды хорошо работают только с методом *in-situ* гибридизации с гистологическими срезами, поскольку в гепатопанкреасе и фекалиях креветки присутствуют субстанции, которые дают как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты с образцами, которые напрямую окрашены и не удаляются перед зондированием.

4.3.1.2.3.2. Процедура дот-блот гибридизации для MBV

Хотя специфические ДНК зонды доступны, их применение в процедурах дот-блот гибридизации не рекомендовано для наиболее рутинных диагностических областей применения. Пигменты, присутствующие в гепатопанкреасе, оставляют окрашенное пятно на мембране для гибридизации, которое может привести к маскировке положительного теста или ложной интерпретации отрицательного теста. Аналогичным образом, хитиновая крошка (которая неспецифично связывает ДНК-зонды), пигменты и другие материалы, присутствующие в фекальном образце, также могут привести к ложноположительным и ложноотрицательным тестам дот-блот гибридизации. Выделение ДНК из гепатопанкреаса или фекалий перед блоттингом или использование хемилюминесцентных или радиоактивно маркированных зондов, может обойти эти проблемы и рекомендовано. Тем не менее, адекватность других тестовых методов (например, прямые влажные препараты, гистология, ПЦР) не указало на необходимость дальнейшего совершенствования и применения дот-блот метода (Lightner, 1996; Lightner с соавт., 1983).

4.3.1.2.3.3. Процедура *in-situ* гибридизации

Протокол *in-situ* гибридизации, подробно представленный для тетраэдрического бакуловируса (ВР) в Разделе 4.3.1.2.3 Главы 2.2.10, использует аналогичный метод, за исключением того, что используется ДИГ-маркированный зонд для MBV.

4.3.1.2.3.4. Полимеразная цепная реакция для MBV

Некоторые ПЦР методики были разработаны для MBV и могут подходить для определенных областей применения (Chang с соавт., 1993; Lu с соавт., 1993; Umesha с соавт., 2003; Vickers с соавт., 1992; Vickers с соавт., 1994). Однако, в последнее время были разработаны и продемонстрированы более чувствительные методы для обнаружения MBV из различных географических регионов (Belcher & Young, 1998; Surachetpong с соавт., 2005).

Обнаружено, что вещества в гепатопанкреасе и фекалиях креветок ингибируют ДНК полимеразу, используемую в ПЦР анализе. Следовательно, необходима экстракция ДНК до того момента, когда можно успешно применить ПЦР для обнаружения этого вируса (Belcher & Young, 1998; Chang с соавт., 1993; Hsu с соавт., 2000). Наборы для выделения ДНК удобны и имеются в продаже.

В каждое ПЦР исследование для MBV должны быть включены следующие контроли: известный отрицательный образец ткани или фекалий, известный положительный образец ткани или фекалий (это может быть клон ДНК из которого был создан специфичный набор праймеров); и «безматричный» контроль.

Метод гнездовой ПЦР для MBV (Belcher & Young, 1998): такой метод гнездовой ПЦР способен обнаруживать низкие концентрации MBV (вплоть до 8 вирусных геномных эквивалентов). Два внешних и внутренних праймера были созданы с использованием ДНК последовательности, полученной из плазмиды р4Ес196, которая была сконструирована из 7.4 кб *EcoRI* фрагмента австралийского изолята MBV. Последовательности праймеров:

Праймер	Последовательность	Температура
MBV1.4F	5'-CGA-TTC-CAT-ATC-GGC-CGA-ATA-3'	62°C (68.9°C)
MBV1.4r	5'-TTG-GCA-TGC-ACT-CCC-TGA-GAT-3'	64°C (70.8°C)
MBV1.4NF	5'-TCC-AAT-CGC-GTC-TGC-GAT-ACT-3'	64°C (70.8°C)
MBV1.4NR	5'-CGC-TAA-TGG-GGC-ACA-AGT-CTC-3'	66°C (72.8°C)

Температура плавления праймеров соответствует формуле $2(A+T) + 4(G+C)$, или процентам метода ГХ (значения указаны в скобках).

4.3.1.2.3.4.1. ДНК экстракция

- i) Belcher & Young, 1998 было отмечено, что ингибиторы ПЦР присутствовали в ДНК образцах ДНК, приготовленных из целых образцов постличинок *Penaeus monodon*, зараженных MBV, при использовании метода экстракции, рекомендованного Wang с соавт., 1996 для ВР, который включает протеиназу К. Однако при использовании горячего фенола для экстракции ДНК, этот ингибирующий эффект был устранен.
- ii) При использовании метода с горячим фенолом, образец, предназначенный для тестирования (постличинки, гепатопанкреас, фекалии) лиофилизируют и измельчают до порошкообразного состояния в жидком азоте с помощью мотора или пестика.
- iii) Приблизительно 300 мг готового материала незамедлительно помещают в 400 мкл предварительно нагретого (65°C) лизирующего буфера (100 mM Трис/HCl, 100 mM этилендиаминтетрауксусная кислота [ЭДТА], 1% додецилсульфат натрия, pH 8.0) и инкубируют при 65°C в течение 5–10 минут.
- iv) Полученную суспензию подвергают грубой гомогенизации путем спот-центрифугирования и гомогенизации с помощью пестика в микроцентрифужной пробирке. Добавляют Трис/HCl-забуференный фенол, pH 8.0 (600 мкл) и инкубируют смесь в течение 2 часов при 65°C с эпизодической инверсией.
- v) После центрифугирования при 12,000 *g* в течение 10 минут при комнатной температуре водный слой переносят в свежую микроцентрифужную пробирку и проводят экстракцию дважды с равным объемом фенола/хлороформа (1/1). Затем 50 мкл водного слоя переносят в свежую микроцентрифужную пробирку, содержащую 150 мкл буфера для разведения и проводят экстракцию еще раз с равным объемом фенола/хлороформа (1/1) с последующей экстракцией хлороформа.
- vi) Ацетат аммония добавляют в водный слой до итоговой концентрации 2.5 М, быстро перемешивают, и добавляют два объема этанола (–20°C) с 1 мкл 20 мг литр⁻¹ гликогена для осаждения ДНК.
- vii) ДНК выделяется путем инкубации при –20°C в течение ночи или путем инкубации при –70°C в течение 1 часа.

- viii) ДНК осаждается центрифугированием при 12,000 *g* в течение 15 минут при 4°C. Получившуюся осажденную ДНК промывают дважды, сначала 500 мкл 80% холодного этанола и центрифугируют при 12,000 *g* в течение 10 минут при 4°C, далее проводят аналогичное промывание и центрифугирование при комнатной температуре.
- ix) Конечную осажденную ДНК высушивают *в вакууме*, ресуспензируют в 100 мкл буфере для разведения (10 mM Трис/HCl, pH 8.0, 0.1 mM ЭДТА, pH 8.0) при комнатной температуре в течение ночи или при 37°C в течение 2 часов. После спектрофотометрического анализа и перед ПЦР, ДНК разводят до 50 нг мкл⁻¹ в буфере для разведения.

4.3.1.2.3.4.2. Этапы гнездовой ПЦР, Belcher & Young, 1998

- i) Перед ПЦР, выделенную общую ДНК денатурируют в кипящей воде в течение трех минут с последующим быстрым охлаждением в ледяной воде.
- ii) Всего 100 нг выделенной ДНК используется в качестве матрицы.
- iii) Каждая реакционная пробирка содержит 50 mM KCl, 10 mM Трис/HCl, pH 9, 0.1% Тритон X-100, по 0.2 mM каждого из ранее указанных дНТФ, 1.5 mM MgCl₂, по 0.25 μM каждого из ранее указанных MBV1.4F и MBV1.4R, 2.5 U *Taq*, и доводят до конечного объема 50 мкл.
- iv) Реакционные смеси покрывают минеральным маслом (при необходимости).
- v) Условия для первого этапа амплификации: один цикл при 96°C в течение 5 минут; 40 циклов по 94°C в течение 30 секунд, 65°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 60 секунд; и один цикл при 72°C в течение 7 минут.
- vi) Второй этап гнездовой ПЦР выполняется с 0.5 мкл первичной ПЦР реакции, используемой в качестве матрицы с внутренними праймерами.
- vii) Второй этап реакции амплификации включает 50 mM KCl, 10 mM Трис/HCl, pH 9.0, 0.1% Тритон X-100, 1.5 mM MgCl₂, по 0.2 mM каждой из ранее указанных дНТФ, по 0.25 μM каждого из ранее указанных праймеров MBV1.4NF и MBV1.4NR, и 2.5 U *Taq*, и доводят до конечного объема 50 мкл.

- viii) Реакционные смеси покрывают минеральным маслом (при необходимости).
- ix) Условия для второго этапа амплификации: один цикл при 96°C в течение 5 минут; 35 циклов при 94°C в течение 30 секунд, 60°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 60 секунд; и один цикл при 72°C в течение 7 минут.
- x) Демонстрация продуктов ПЦР (533 бр первый этап и 361 бр второй этап) сопровождается добавлением 1 мкл гелевого загрузочного буфера (0.25% [масса/объем] бромфенолового синего, 15% [масса/объем] Фикола - 400, 100 mM ЭДТА, pH 8.0) к 10 мкл каждой перечисленной реакционной смеси и электрофорезом с 0.8% агарозным гелем в ТАЕ буфере (40 mM Трис-ацетат, 1 mM ЭДТА, pH 8.0), содержащим 0.5 г литр⁻¹ бромида этидия.

4.3.1.2.3.4.3. Альтернативный одноэтапный ПЦР-метод

Альтернативный одноэтапный ПЦР-метод используется Референтной лабораторией МЭБ в Университете Аризоны, поскольку он менее подвержен контаминации (Surachetpong с соавт., 2005). Этот метод использует вид образца и методы экстракции, которые описаны ранее в этом разделе.

Праймеры: одна пара прямого и обратного праймера (261F/261R), отобранная из клона GC7 и помещенная в базу генетических данных под учетным номером AY819785 продуцирует ампликон размером 261 п.о. (Surachetpong с соавт., 2005).

Последовательности для этих праймеров:

261F	5'-AAT-CCT-AGG-CGA- TCT-TAC-CA-3'
261R	5'-CGT-TCG-TTG-ATG- AAC-ATC-TC-3'

4.3.1.2.3.4.3.1. Матрицы ДНК

- i) Выделенные из гепатопанкреаса (замороженные или фиксированные этанолом);
- ii) Выделенные из цельных постличинок (замороженные или фиксированные этанолом);
- iii) Выделенные из фекалий (замороженные или фиксированные этанолом).

4.3.1.2.3.4.3.2. Реакционная смесь для ПЦР

Реагент (концентрация)	25 µl ПЦР «шарики» ¹
Дистиллированная H ₂ O	23.5 мкл
Праймер 261F (0.3 µM)	0.5 мкл
Праймер 261R (0.3 µM)	0.5 мкл
Матрица ДНК (50–450 нг ДНК)	0.5 мкл

¹ PuReTaq™ Ready-To-Go PCR beads™, Amersham Biosciences, Бакингемпшир, Великобритания.

4.3.1.2.3.4.3.3. Параметры цикла ПЦР

Праймеры	Смесь/«шарики»	Время	Температура °C	Кол-во циклов
261F/261R	«Шарики» ¹	5 минут	95	1
		30 секунд	94	35
		30 секунд	60	
		30 секунд	72	
		7 минут	72	1

4.3.1.2.4. Обеззараживание возбудителя

Отсутствует.

4.3.2. Серологические методы

Не применяются.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели их применения

Методы, доступные в настоящее время для надзора, выявления и диагностики MBV перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице, указывают: a = метод является рекомендуемым методом исходя из соображений доступности, функциональности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод представляет собой стандартный метод с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы существенно ограничивают его применение; и d = метод, в настоящее время не рекомендованный и/или недоступный для этой цели. Это несколько субъективно, поскольку соответствие метода охватывает вопросы надежности, чувствительности, специфичности и функциональности. Несмотря на это, не все тесты, перечисленные под категориями a или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинное применение и тот факт, что они широко использовались без неточных результатов, делает их приемлемыми.

Таблица 5.1. Сферический бакуловирус (бакуловирус типа *Penaeus monodon*): наблюдение, выявление и диагностические методы

Метод	Целевой надзор				Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	PLs	Молодые особи	Взрослые особи		
Макропатологические признаки	c	d	d	d	d	d
Биопроба	d	d	d	d	c	c
Прямая LM	b	b	c	c	a	a
Гистопатология	b	b	c	c	a	a
Передача ЕМ	d	d	d	d	d	a
Анализы на основе антител	d	d	d	c	d	d
ДНК зонды <i>in situ</i>	c	c	c	c	a	a
ПЦР	a	a	a	a	a	a
Секвенирование	d	d	d	d	d	a

PLs = постличинки; LM = оптическая микроскопия; ЕМ = электронная микроскопия; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Тест (ы) рекомендуемые для целевого надзора для признания свободы от инфекции сферического бакуловируса (бакуловирус типа *Penaeus monodon*)

Два года истории негативных результатов тестов на MBV с использованием:

- ПЦР, проводимой на образцах соответствующего вида и размера;
- Влажных проб и/или гистологических результатов, в которых не наблюдалось сферических окклюзивных телец в образцах соответствующего вида и размера.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Для личинок (в особенности, мизидная стадия и ранние постличиночные стадии) восприимчивых видов: смертность с личинками, представляющими белые средние кишки. Для молодых особей: плохой рост или плохая эффективность культуры в популяциях, имеющих историю инфекции MBV или в регионах, в которых превалирует MBV.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Комбинация минимум двух из трех нижеперечисленных методов (с положительными результатами):

- Обнаружение на микроскопическом уровне сферических окклюзивных телец в влажных пробах целой личинки или иссеченных гепатопанкреатических желез. Для более взрослых постличинок, молодых и взрослых особей: сферические окклюзивные тельца, видимые в давленных препаратах влажных препаратов и/или гистологических срезах гепатопанкреатической железы или фекалий.
- *In situ* гибридизация с положительным гистологическим сигналом на поражения, типичные для MBV (т.е. гипертрофированное ядро с содержанием или без патогномичных сферических окклюзивных телец).
- Положительные результаты ПЦР на MBV.

8. Список литературы

ANDERSON I.G., SHARIFF M., NASH G. & NASH M. (1987). Mortalities of juvenile shrimp *Penaeus monodon*, associated with *Penaeus monodon* baculovirus, cytoplasmic reo-like virus and rickettsial and bacterial infections, from Malaysian brackish water ponds. *Asian Fish. Sci.*, **1**, 47–64.

BATICADOS M.C.L., PITOGO C.L., PANER M.G., DE LA PEZA L.D. & TENDENCIA E.A. (1991). Occurrence and pathology of *Penaeus monodon* baculovirus infection in hatcheries and ponds in the Philippines. *Israeli J. Aquaculture Bamidgeh*, **43**, 35–41.

BELCHER C.R. & YOUNG P.R. (1998). Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* postlarvae. *J. Virol. Methods*, **74**, 21–29.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 240 pp.

BROCK J.A. & LIGHTNER D.V. (1990). Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganisms. In: Diseases of Marine Animals, Vol. III. Kinne O., ed. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 245–349. CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANPIPAT P., SRIURAIRATANA S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.

- CHANG P.S., LO C.F., KOU G.H. & SHEN S.N. (1993). Purification and amplification of DNA from *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). *J. Invertebr. Pathol.*, **62**, 116–120.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1989a). Observation on pathogenicity and epizootiology of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in cultured shrimps in Taiwan. *Fish Pathol.*, **24**, 189–195.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1990). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- CHEN S.N., CHANG P.S., KOU G.H. & LIGHTNER D.V. (1989b). Studies on virogenesis and cytopathology of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and the red tail prawn (*Penaeus penicillatus*). *Fish Pathol.*, **24**, 89–100.
- CHEN S.N., LO C.F., LIU S.M. & KOU G.H. (1989c). The first identification of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in cultured sand shrimp, *Metapenaeus ensis*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **9**, 62–64.
- COUCH J.A. (1991). Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Viruses. Part 2. Nuclear Polyhedrosis Viruses of Invertebrates Other Than Insects. In: Atlas of Invertebrate Viruses. Adams J.R. & Bonami J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 205–226.
- DOUBROVSKY A., PAYNTER J.L., SAMBHI S.K., ATHERTON J.G. & LESTER R.J.G. (1988). Observations on the ultrastructure of baculovirus in Australian *Penaeus monodon* and *Penaeus merguensis*. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, **39**, 743–749.
- FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 1259 pp.
- FEGAN D.F., FLEGEL T.W., SRIURAIRATANA S. & WAIYAKRUTTHA M. (1991). The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in Southern Thailand. *Aquaculture*, **96**, 205–217.
- FUKUDA H., MOMOYAMA K. & SANO T. (1988). First detection of monodon baculovirus in Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 45–48.
- HAO N.V., THUY D.T., LOAN L.T.T., PHI T.T., PHUOC L.H., DUONG H.H.T., CORSIN F. & CHANRATCHAKOOL P. (1999). Presence of the two viral pathogens WSSV and MBV in three wild shrimp species (*Penaeus indicus*, *Metapenaeus ensis* and *Metapenaeus lysianassa*) cultured in the mangrove forest of Ca Mau Province. *Asian Fish. Sci.*, **12**, 309–325.
- HSU Y.L., WANG K.H., YANG Y.H., TUNG M.C., HU C.H., LO C.F., WANG C.H. & HSU T. (2000). Diagnosis of *Penaeus monodon*-type baculovirus by PCR and by ELISA of occlusion bodies. *Dis. Aquat. Org.*, **40**, 93–99.

- JOHNSON P.T. & LIGHTNER D.V. (1988). Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans: gut-infecting species. *Dis. Aquat. Org.*, **5**, 123–141.
- LESTER R.J.G., DOUBROVSKY A., PAYNTER J.L., SAMBHI S.K. & ATHERTON J.G. (1987). Light and electron microscope evidence of baculovirus infection in the prawn *Penaeus plebejus*. *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 217–219.
- LEWIS D.H. (1986). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting penaeid baculovirus. *J. Fish Dis.*, **9**, 519–522.
- LIGHTNER D.V. (1988). Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. *In*: Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. Sindermann C.J. & Lightner D.V., eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 8–127.
- LIGHTNER D.V. (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.
- LIGHTNER D.V., BELL T.A., REDMAN R.M., MOHNEY L.L., NATIVIDAD J.M., RUKYANI A. & POERNOMO A. (1992). A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indopacific. *In*: Diseases in Asian Aquaculture I. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 57–80.
- LIGHTNER D.V., HEDRICK R.P., FRYER J.L., CHEN S.N., LIAO I.C. & KOU G.H. (1987). A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. *Fish Pathol.*, **22**, 127–140.
- LIGHTNER D.V., POULOS B.T., BRUCE L., NUNAN L., PANTOJA C., MARI J. & BONAMI J.R. (1994). Development and application of genomic probes for use as diagnostic and research reagents for the penaeid shrimp parvoviruses IHNV and HPV and the baculoviruses MBV and BP. USMSFP 10th Anniversary Review, GCRL Special Publication No. 1, 59–85.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1981). A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *J. Invertebr. Pathol.*, **38**, 299–302.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BELL T.A. (1983). Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, **32**, 209–233.
- LU C.C., TANG K.F.J. & CHEN S.N. (1996). Morphogenesis of the membranous labyrinth in penaeid shrimp cells infected with *Penaeus monodon* baculovirus (MBV). *J. Fish Dis.*, **19**, 357–364.

LU C.C., TANG K.F.J., KOU G.H. & CHEN S.N. (1993). Development of a *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) DNA probe by polymerase chain reaction and sequence analysis. *J. Fish Dis.*, **16**, 551–559.

LU C.C., TANG K.F.J., KOU G.H. & CHEN S.N. (1995). Detection of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) infection in *Penaeus monodon* Fabricius by in situ hybridization. *J. Fish Dis.*, **18**, 337–345.

MARI J., BONAMI J.R., POULOS B. & LIGHTNER D.V. (1993). Preliminary characterization and partial cloning of the genome of a baculovirus from *Penaeus monodon* (PmSNPV = MBV). *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 207–215.

MURPHY F.A., FAUQUET C.M., MAYO M.A., JARVIS A.W., GHABRIAL S.A., SUMMERS M.D., MARTELLI G.P. & BISHOP D.H.L. (1995). Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* (Suppl. 10). Springer-Verlag, Vienna, Austria and New York, USA, 586 pp.

NASH G., POERNOMO A. & NASH M.B. (1988). Baculovirus infection in brackishwater pond cultured *Penaeus monodon* Fabricius in Indonesia. *Aquaculture*, **73**, 1–6.

NATIVIDAD J.M. & LIGHTNER D.V. (1992a). Prevalence and geographic distribution of MBV and other diseases in cultured giant tiger prawns (*Penaeus monodon*) in the Philippines. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*. Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 139–160.

NATIVIDAD J.M. & LIGHTNER D.V. (1992b). Susceptibility of the different larval and postlarval stages of black tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius, to monodon baculovirus (MBV). *In: Diseases in Asian Aquaculture I*. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 111–125.

PAYNTER J.L., VICKERS J.E. & LESTER R.J.G. (1992). Experimental transmission of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). *In: Diseases in Asian Aquaculture I*. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 97–110.

POULOS B.T., MARI J., BONAMI J.R., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1994). Use of non-radioactively labeled DNA probes for the detection of a baculovirus from *Penaeus monodon* by in situ hybridization on fixed tissue. *J. Virol. Methods*, **49**, 187–194.

SPANN K.M. & LESTER R.J.G. (1996). Baculovirus of *Metapenaeus bennettiae* from the Moreton Bay region of Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 53–58.

SPANN K.M., LESTER R.J.G. & PAYNTER J.L. (1993). Efficiency of chlorine as a disinfectant against monodon baculovirus (MBV). *Asian Fish. Sci.*, **6**, 295–301.

SURACHETPONG W., POULOS B.T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Improvement of PCR method for the detection of monodon baculovirus (MBV) in penaeid shrimp. *Aquaculture*, **249**, 69–75.

- THURMAN R.B., LIGHTNER D.V., BELL T.A. & HAZANOW S. (1990). Unique physicochemical properties of the occluded penaeid shrimp baculoviruses and their use in diagnosis of infections. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**, 128–131.
- UMESHA R.K., UMA A., OTTA S.K., KARUNASAGAR I. & KARUNASAGAR I. (2003). Detection by PCR of hepatopancreatic parvovirus (HPV) and other viruses in hatchery-reared *Penaeus monodon* postlarvae. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 141–146.
- VAN REGENMORTEL M.H.V., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., CARSTENS E.B., ESTES M.K., LEMON S.M., MANIOFF J., MAYO M.A., MCGEOCH D.J., PRINGLE C.R. & WICKNER R.B. (2000). Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, California, USA, 1162 pp.
- VICKERS J.E., LESTER R.J.G., SPRADBROW P.B. & PEMBERTON J.M. (1992). Detection of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) in digestive glands of postlarval prawns using polymerase chain reaction. *In: Diseases in Asian Aquaculture I*. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 127–133.
- VICKERS J.E., LESTER R.J.G., SPRADBROW P.B. & PEMBERTON J.M. (1994). Evidence for homology between polyhedrin genes of baculoviruses of a prawn and an insect. *J. Invertebr. Pathol.*, **63**, 207–208.
- VIJAYAN K.K., ALAVANDI S.V., RAJENDRAN K.V. & ALAGARSWAMI K. (1995). Prevalence and histopathology of monodon baculovirus (MBV) infection in *Penaeus monodon* and *P. indicus* in shrimp farms in the south-east coast of India. *Asian Fish. Sci.*, **8**, 267–272.
- VOGT G. (1992). Transformation of anterior midgut and hepatopancreas by monodon baculovirus (MBV) in *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquaculture*, **107**, 239–248.
- WANG S.Y., HONG C. & LOTZ J.M. (1996). Development of a PCR procedure for the detection of *Baculovirus penaei* in shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 123–131.

*
* *

NB: В настоящий момент нет Референтной лаборатории МЭБ по Сферическому бакуловирусу (бакуловирус типа *Penaeus monodon*) (см. Таблицу в конце настоящего *Водного Руководства* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Глава 2.2.11.
ТЕТРАЭДРИЧЕСКИЙ БАКУЛОВИРУС
(*BACULOVIRUS PENAEI*)

1. Предмет рассмотрения⁴¹

В целях настоящей главы тетраэдрический бакуловирус рассматривается как инфекция *Baculovirus penaei*. Синонимы PvSNPV (Вирус одиночно-капсидного ядерного полиэдроза креветки *Penaeus vannamei*)

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

Этиологический агент: *Baculovirus penaei* (BP), описанный Couch (Couch, 1974; Couch, 1991), Summers, 1977, Overstreet, 1994 и Bonami et al, 1995.

Fauquet et al, 2005, в восьмом докладе Международного комитета по таксономии вирусов приводит родственный вирус MBV (сферический бакуловирус) как предполагаемый вид в роде *Nucleopolyherdovirus*. Таким образом, BP также следует рассматривать как предполагаемый вид в этом роде.

2.1.1. Этиологический агент, штаммы возбудителя

Штаммы возбудителей: имеется по меньшей мере три географических штамма: 1) юго-восточное побережье Атлантики, побережье Мексиканского залива в США и Карибского бассейна; 2) Тихоокеанское побережье Южной, Центральной и Северной Америки; и 3) Гавайи (Brock et al, 1986; Bruce et al, 1993; Durand et al, 1998).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Нет данных.

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Нет данных.

2.1.4. Жизненный цикл

Не применимо.

⁴¹ NB: Версия принята Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 года. Данная болезнь больше не входит в список болезней МЭБ

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Инфекции ВР были зарегистрированы у одного или нескольких видов следующих представителей рода или подрода Penaeid (последние указаны в скобках): *Penaeus* (*Litopenaeus*), (*Farfantepenaeus*), (*Fenneropenaeus*), (*Melicertus*), (*Penaeus*), *Trachypenaeus* и *Protrachypene* (Bueno et al, 1990; Durand et al, 1998; Le Blanc et al, 1991; Lightner, 1996; Lightner et al, 1989; Machado et al, 1995; Overstreet, 1994). Все виды Penaeid могут быть потенциальными хозяевами (Lightner, 1996; Lightner, 1999; Overstreet, 1994).

2.2.2. Стадии восприимчивости хозяина

Стадии восприимчивости хозяина: хозяева являются восприимчивыми к инфекции ВР на всех стадиях жизни, кроме стадии яиц и науплий.

2.2.3. Видовая или субпопуляционная предрасположенность (вероятность обнаружения)

Нет данных.

2.2.4. Целевые органы и инфицированные ткани

ВР - это исключительно кишечная инфекция, которая инфицирует слизистые эпителиальные клетки гепатопанкреасовых канальцев и передней средней кишки (Brock & Lightner, 1990; Couch, 1974; Couch, 1991; Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996).

2.2.5. Персистирующая инфекция, передающаяся с пожизненными носителями

Персистирующая инфекция обычно встречается у пенеидных хозяев ВР. Имеются сведения, что дикие взрослые самки *P. vannamei*, зараженные ВР, выделяют зараженные ВР фекалии во время нереста, тем самым заражая яйца и передавая вирус следующему поколению (Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996).

2.2.6. Векторы

Ни один из них не известен в естественных условиях, однако при экспериментальном заражении для передачи вируса личинкам *P. vannamei* в качестве пассивных носителей ВР использовали коловраток *Brachionus plicatilis* и науплии *Artemia salina* (Overstreet et al, 1988; Stuck & Wang, 1996).

2.2.7. Известные или предполагаемые носители среди диких водных животных

Не выявлены.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача ВР происходит горизонтально при попадании в организм инфицированных тканей (каннибализм), фекалий, окклюзионных телец, контаминированного детрита или воды (Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996; Overstreet et al, 1988).

2.3.2. Превалентность

Высокая вариабельность, от <1% в диких и выращенных популяциях до 100% в искусственно выращенных популяциях, в резервуарах для разведения личинок и прудах для молоди (Brock & Lightner, 1990; Lightner, 1996).

2.3.3. Географическое распределение

ВР является энзоотическим для диких представители семейства Penaeidae в Северной и Южной Америке и на Гавайях. Вирус не был зарегистрирован у диких или культивируемых пенеидных креветок в восточном полушарии, несмотря на многочисленные ввозы американских пенеидных креветок в Азию и Индо-Тихоокеанский регион (Bondad-Reantaso et al, 2001; Brock et al, 1986; Lightner, 1996).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

В лабораторных контрольных исследованиях заражение происходило проще всего на личиночной стадии (конкретно протозоа и мизидная стадия) и в начале пост-личиночной (ПЛ) стадии (Bruce et al, 1994; Hammer et al, 1998; Le Blanc & Overstreet, 1990; Overstreet et al, 1988; Stuck & Overstreet, 1994; Stuck et al, 1996; Stuck & Wang, 1996). На этих стадиях на фермах по разведению пенеидной креветки также может наблюдаться самый высокий уровень смертности. Высокие уровни смертности по причине ВР не характерны для молоди и взрослых особей, но инфекция может быть причиной плохого роста и снижения выживаемости в прудах для выращивания личинок или в выростных прудах (Brock & Main, 1994; Lightner, 1996; Overstreet, 1994).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Нет данных.

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Нет каких-либо разработанных эффективных методов вакцинации против ВР.

2.4.2. Химиотерапия

Нет научно подтвержденных сообщений об эффективности химиотерапии.

2.4.3. Иммуностимуляция

Нет научно подтвержденных сообщений об эффективных методах иммуностимуляции.

2.4.4. Разведение резистентных к штаммам популяций

Доказан потенциал селективного разведения для выработки резистентности к ВР.

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

Не применимо к ВР.

2.4.6. Блокирующие агенты

О блокирующих агентах не сообщалось.

2.4.7. Дезинфекция яиц и личинок

Сообщалось об инаktivации ВР с помощью дезинфицирующих средств, низкого pH, тепла и ультрафиолетового излучения (Le Blanc & Overstreet, 1991).

2.4.8. Общая практика ведения хозяйства

2.4.8.1. Инкубатории

Для профилактики инфекций ВР и болезни был применен ряд методов. Предварительный скрининг маточного поголовья на ВР оказался довольно эффективным при обнаружении тяжело инфицированных носителей и позволил, таким образом, снизить передачу болезни от родителей потомству. Если говорить о нелетальных методах тестирования – то это осуществляется путем исследованием фекальных нитей под простым световым микроскопом (или с помощью полимеразной цепной реакции [ПЦР] для исследования фекальных нитей, при наличии соответствующего оборудования для проведения ПЦР). В качестве альтернативного метода, можно умертвить отработавшее маточное поголовье после нереста и провести микроскопическое исследование препарата гепатопанкреаса (или с помощью ПЦР с использованием иссеченного гепатопанкреаса) для определения инфекционного статуса по ВР нерестующей особи. Поскольку ВР передается от взрослых особей к потомству путем контаминации фекалиями нерестовых яиц, профилактика инфекции в инкубаториях может быть достигнута с помощью дополнительных мер по устранению загрязнений фекалиями нерестовых яиц и личинок путем тщательной промывки науплий или яиц формалином, йодофорами и чистой морской водой (Chen et al, 1990). Рутинная дезинфекция нерестовых яиц от инфицированного или потенциально инфицированного маточного поголовья снизило частоту эпизоотий ВР в инкубаториях (Lightner & Redman, 1998).

2.4.8.2. Инкубатории и выростные пруды

Инфекции ВР остаются распространенными в прудах с глинистым дном в регионах Северной и Южной Америки, где вирус является энзоотическим (Bondad-Reantaso et al, 2001; Lightner, 1996), однако частоту и распространенность инфекций ВР можно снизить в обшитых инкубаториях и выростных прудах.

3. Отбор проб

3.1. Отбор индивидуальных образцов

Подходящие образцы для тестирования на инфекцию ВР с использованием молекулярных методов (например, ПЦР, гибридизация *in-situ* и т. д.) включают постличинки (ПЛ), молодь и взрослых особей, когда у них уже присутствуют кишечные ткани или органы. Несмотря на то что инфицирование может произойти на любой стадии жизни, тяжесть инфекции и, следовательно, вирусная нагрузка может быть ниже пределов обнаружения в вымеченной икре и на личиночной стадии, поэтому эти стадии жизни могут быть не самыми подходящими образцами для обнаружения ВР или подтверждения благополучия по ВР.

3.2. Сохранение образцов для представления

Для рутинной гистологии или молекулярных анализов, а также руководства по сохранению образцов для предполагаемого метода испытаний см. Главу 2.2.0.

3.3. Объединение проб в пулы

Образцы, отобранные для молекулярных тестов, можно объединить (не более пяти образцов на объединенную выборку молоди, подросшей молоди и взрослых особей). Однако, что касается яиц, личинок и постличинок (ПЛ) - для проведения диагностического испытания может потребоваться объединение большего количества образцов (например, ~150 или более яиц или личинок или 50-150 постличинок, в зависимости от их размера/возраста) для получения достаточного количества материала (экстрагированной нуклеиновой кислоты). См. также Главу 2.2.0.

3.4. Самые подходящие органы или ткани

ВР является кишечным вирусом и может быть обнаружен в гепатопанкреасе.

Когда требуется прибегнуть к нелетальному методу исследования (например, исследование ценного маточного поголовья), можно использовать образцы фекалий.

3.5. Неподходящие образцы / ткани

ВР - это кишечный вирус (т.е. гепатопанкреас, средняя кишка или ее пилорический придаток), который не реплицируется системно.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

См. Раздел 4.2 для описания макроскопических клинических признаков, наблюдаемых у креветок, инфицированных ВР.

4.1.1.1. Прямое микроскопическое исследование

4.1.1.1.1. Влажные препараты из свежей ткани

Диагностика инфекций ВР производится путем демонстрации одиночных или множественных тетраэдрических окклюзионных телец в ядрах эпителиальных клеток в препаратах гепатопанкреаса или средней кишки, исследованных с помощью фазово-контрастной или яркочерной микроскопии. Окклюзионные тельца имеют тетраэдрическую или пирамидальную трехмерную форму и варьируются по размеру от менее чем 0,1 мкм до почти 20 мкм от основания пирамиды до пика, с вертикальной длиной 8 мкм. В некоторых публикациях окклюзионные тельца ВР называются PIBs (полиэдрические тельца-включения) (Bondad-Reantaso et al, 2001; Brock & Main, 1994; Lightner, 1996).

4.1.1.1.2. Влажные препараты фекальных нитей

Данный нелетальный метод можно использовать для проведения скрининга в отношении носителей ВР. Метод может быть применен в отношении молоди или более взрослых креветок и, пожалуй, является наиболее практичным нелетальным методом скрининга в отношении ценного маточного стада. Образцы фекалий для исследования можно получить, поместив креветку в аквариум, нерестовую емкость, или другую подходящую емкость на нескольких часов, пока на дне не будут видны фекальные нити. Фекальные нити лучше всего собирать, используя прозрачный пластиковый гидравлический шланг (воздушная магистраль, оснащенная пластиковой пипеткой в качестве наконечника, будет идеальным вариантом) и поместить в лабораторный сосуд, стакан или другую подходящую емкость. Из фекальных нитей можно сделать влажный препарат и исследовать его непосредственно на наличие окклюзионных телец. Окклюзионные тельца ВР визуально хорошо видны, преломления тетраэдров по высоте варьируются от просто отобразимого до почти 20 мкм (Bondad-Reantaso et al, 2001; Brock & Main, 1994; Lightner, 1996).

4.1.1.1.3. Собранные фекалии

Собранные фекалии также могут быть использованы в качестве образца для исследования на ВР с помощью ПЦР. ПЦР обеспечивает большую диагностическую чувствительность при хронических инфекциях, чем прямое микроскопическое исследование (Bondad-Reantaso et al, 2001, Lightner &

Redman, 1998).

4.1.2. Изменение поведения

За исключением выраженной вялости у сильно пораженных постличинок, никаких поведенческих изменений у инфицированных хозяев зарегистрировано не было.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

У особей на стадии протозоа, мизидной и ранней постличиночной стадиях тяжелая инфекция ВР может проявляться побелением средней кишки (по причине присутствия окклюзионных телец и клеточного дебриса в фекалиях). У молоди и взрослых особей отсутствуют макроскопические признаки, представляющие диагностическую ценность, как и у личинок, с менее тяжелой инфекцией.

4.2.2. Клиническая химия

Не применимо.

4.2.3. Микроскопические патологические изменения

См. Раздел 4.2.6

4.2.4. Срезы нефиксированной ткани

См. Раздел 4.1.1

4.2.5. Мазки

Не применимо.

4.2.6. Фиксированные срезы

4.2.6.1. Гистопатология

Чтобы провести окончательную диагностику инфекции ВР можно использовать гистологию. Поскольку 10% забуференный формалин и другие фиксаторы дают, в лучшем случае, посредственную фиксацию гепатопанкреаса креветки (основной целевой орган для ВР и других бакуловирусных инфекций пенеидной креветки), использование фиксатора Дэвидсона (содержащего 33% этилового спирта [95%], 20% формалина [около 37% формальдегида], 11,5% ледяной уксусной кислоты и 33,5% дистиллированной или водопроводной воды) крайне рекомендуется для всех рутинных гистологических исследований креветки (Bondad-Reantaso et al, 2001; Lightner & Redman, 1998). Чтобы увидеть патогномоничные (для ВР) тетраэдрические окклюзионные тельца в

гепатопанкреасе, эпителиальных клетках кишечника, или в просвете кишечника можно использовать такие рутинные гистологические красители, как гематоксилин Майер-Беннетт или Харриса и эозин (H&E) (Bonami et al, 1995; Bondad-Reantaso et al, 2001; Lightner, 1996). Как правило, инфицированные ВР клетки гепатопанкреаса (или иногда средней кишки) демонстрируют заметно гипертрофированные ядра с единичными, или чаще множественными эозинофильными окклюзионными тельцами, а также диминуцию хроматина и окаймление (Bondad-Reantaso et al, 2001; Lightner, 1996). Окклюзионные тельца могут окраситься в ярко-красный цвет при использовании красителя H&E, и сильно, но непостоянно при использовании красителя Грама. Например, окрашивание по Граму методом Брауна-Бренна, хоть и не является специфическим для окклюзионных телец бакуловируса, но имеет тенденцию к более интенсивному окрашиванию окклюзий (в красный или сиреневый цвет, в зависимости от толщины среза, времени обесцвечивания и т.д.) по сравнению с окружающими тканями, что может помочь при доказательстве их присутствия при хронических инфекциях (Bondad-Reantaso et al, 2001; Brock & Lightner, 1990; Lightner, 1996).

4.2.6.2. Автофлуоресценция с окрашиванием флоксином

Другой способ обнаружения окклюзионных телец ВР основан на флуоресценции окрашенных флоксином окклюзионных телец. Можно добавить водный флоксин (0,001%) в тканевые препараты для изготовления влажных препаратов гепатопанкреаса или фекалий для непосредственного исследования. Гистологические срезы, окрашенные рутинным красителем H&E, содержащим 0,005% флоксин, также пригодны для этой процедуры. Окклюзии ВР во влажных препаратах раздавленной ткани, в фекалиях или в гистологических срезах, флуоресцируют ярко-желто-зеленым цветом на бледно-зеленом фоне при эпифлуоресценции (пороговый фильтр 0-515 Нм и возбуждающий световый фильтр 490 Нм). Другие объекты в тканях и окклюзионные тельца бакуловируса насекомых не флуоресцируют при данном методе, следовательно, метод может обеспечить быструю и специфическую диагностику (Bondad-Reantaso et al, 2001; Lightner, 1996).

4.2.6.3. Гибридизация *in-situ*

См. Раздел 4.3.1.2.3 ниже.

4.2.7. Электронная микроскопия / цитопатология

Инфекцию ВР можно подтвердить путем демонстрации вируса (или патогномоничных окклюзионных телец) в срезах или путем демонстрации вируса в полуочищенном вирусном препарате, полученном из гепатопанкреаса (Couch, 1974; Couch, 1991; Johnson & Lightner, 1988).

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

См. Раздел 4.1.1

4.3.1.1.2. Мазки

См. Раздел 4.1.2

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы См. Раздел 4.1.2

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток / искусственные среды

На сегодняшний день зарегистрированы.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

Методы на основе антител: разработаны и описаны поликлональные антитела для выявления ВР (Lightner, 1996), но ни одно из них не доступно для рутинной диагностики инфекций ВР.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Гибридизация *in-situ*

Метод гибридизации *in-situ* с использованием DIG-меченого ДНК-зонда для ВР в целом следует методам, изложенным в Poulos et al, 1994 и Lightner, 1996 и приведен ниже.

- i) Встроить зафиксированную в растворе Дэвидсона ткань в парафин и приготовить срезы толщиной 4 мкм (или тоньше). Поместить срезы на положительно заряженные предметные стекла микроскопа. Не использовать желатин в воде для плавающих срезов; использовать только дистиллированную или деионизированную воду.
- ii) Нагревать предметные стекла в течение 30-45 минут при температуре 60°C. Регидрировать ткани следующим образом:

Ксилол (или подходящий заменитель)	3 ×	по 5 минут каждое

Абсолютный алкоголь	2 ×	1 минута каждое
95% спирт	2 ×	10 погружений каждое
80% спирт	2 ×	10 погружений каждое
50% спирт	1 ×	10 погружений каждое

Дистиллированная вода	6 ×	10 погружений каждое (не дайте предметным стеклам высохнуть)
- iii) Пипетировать по 500 мкл 100 г мл⁻¹ протеиназы К, свежее приготовленной в буфере TNE, инкубировать в течение 15 минут при 37°C.
- iv) Промыть предметные стекла в холодном 0,4% формальдегиде в течение 5 минут
- v) Промыть предметные стекла в 2 × SSC в течение 5 минут при комнатной температуре
- vi) Предварительно гибридизировать предметные стекла с использованием 500 мкл гибридизационного буфера и инкубировать в течение 30 минут при температуре 42°C в гибридизационной камере.
- vii) Разбавить DIG- меченый специфический зонд в гибридизационном буфере до соответствующей концентрации и кипятить в течение 10 минут. Остановить реакцию путем помещения на лед на 5 минут.
- viii) Пипетировать 500 мкл зонда на предметное стекло. Поместить на термостат при температуре 85°C на 6-7 минут. Остановить реакцию путем помещения на лед на 5 минут. Инкубировать в течение ночи при температуре 42°C в камере гибридизации.
- ix) Промыть предметные стекла следующим образом
- | | | |
|-----------|-----|------------------------------------|
| 2 × SSC | 2 × | 15 минут при комнатной температуре |
| 1 × SSC | 2 × | 5 минут при температуре 42°C |
| 0,5 × SSC | 2 × | 15 минут при температуре 42°C |
| Буфер I | 1 × | 15 минут при комнатной температуре |
- x) Пипетировать 500 мкл буфера II (блокирующий буфер). Инкубировать при 37°C в течение 30 минут.
- xi) Пипетировать 250 мкл анти-DIG-AP антитела (разбавить 1 мкл в 1 мл буфера II). Инкубировать при 37°C в течение 30 минут.
- xii) Промыть предметные стекла следующим образом:
- | | | |
|----------|-----|------------------------------------|
| Буфер I | 2 × | 10 минут при комнатной температуре |
| Буфер II | 1 × | 5 минут при комнатной температуре |
- xiii) Смешать 4,5 мкл NBT (нитросиний тетразолий) и 3,5 мкл X-фосфата (бром хлор индолил фосфат) для каждого 1 мл буфера III, содержащего 1% поливиниловый спирт. Пипетировать по 500 мкл на каждое предметное стекло и инкубировать в течение 1-3 часов в темноте при

комнатной температуре во влажной камере.

- xiv) Остановить цветную реакцию в буфере IV в течение 5 минут при комнатной температуре.
- xv) Провести контр-окрашивание и дегидратацию предметных стекол следующим образом:

Дистиллированная вода	1 × 10 погружений
0.5% Коричневый Бисмарк	1 × 2-5 минут
95% спирт	3 × 10 погружений каждое
Абсолютный алкоголь	3 × 10 погружений каждое
Ксилол (или подходящий заменитель)	4 × 10 погружений каждое

- xvi) Закрепить с помощью пермаунта и покровного стекла. Проверить на наличие клеточно-ассоциированного фиолетового/черного осадка.

ПРИМЕЧАНИЕ

- Данный протокол может быть выполнен в инкубаторе, предназначенном для гибридизации *in-situ*, или можно использовать пищевой дегидратор в качестве источника тепла для инкубационной камеры *in-situ*. Предметные стекла можно поместить в коробки для пипеток, с водой на дне, закрыть их и поместить в дегидратор. Важно контролировать температуру и влажность.
- Стадия гибридизации (viii) может быть выполнена с использованием покровного стекла для уменьшения испарения. При использовании покровного стекла объем зонда может быть уменьшен до 250 мкл.
- Стадия нагрева при 85°C необходима для денатурации двухцепочечного ДНК-генома. Если реакции не развиваются, то наиболее вероятной причиной является недостаточное нагревание для денатурации генома.
- Протеиназа К необходима для устранения белка, связанного с нуклеиновой кислотой, и увеличения связывания зонда с нуклеиновой кислотой.
- Формулы буферов, используемых в этой процедуре, приведены в разделе Реагенты (ниже).

43.1.23.1.1. Реагенты и буферы для метода гибридизации *in situ*

- i) 10 × Tris/NaCl / EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) (TNE) буфер

0,5 Трис основание	60,57 г
100 ммоль NaCl	5,84 г
1 ммоль EDTA-2H ₂ O	3,72 г
DD H ₂ O	900 мл

Отрегулировать pH до 7,4 с концентрированным или 5 М HCl. QS до 1 л. Автоклавировать. Хранить при температуре 4°C. Чтобы приготовить 1 × TNE - разбавить 100 мл 10 × запаса в 900 мл DD H₂O.

Профильтровать раствор 1 × через фильтр (0,45 мкм).

- ii) Лизоцим, 100 мкг мл⁻¹ (готовят непосредственно перед использованием)

1 × TNE	10 мл
Лизоцим	1 мг

- iii) Протеиназа К, 100 мкг мл⁻¹ (готовят непосредственно перед использованием)

1 × TNE 10 мл

Протеиназа К 100 мкл исходного раствора протеиназы К (10 мг мл⁻¹)

Исходный раствор протеиназы К: добавить 100 мг протеиназы К к 10 мл DDH₂O . Распределить 100 мкл по пробиркам и хранить при температуре - 20°C. Приготовить рабочую концентрацию (100 мкг мл⁻¹) непосредственно перед использованием.

- iv) 0,4% формальдегид

37% формальдегид	5,4 мл
DD H ₂ O	500 мл

Хранить при температуре 4°C. Можно повторно использовать пять раз или хранить в течение 3 месяцев перед тем, как выбросить.

- v) Гибридизационный буфер (конечный объем 50 мл)

4 × SSC	10 мл 20 × SSC
50% формамид	25 мл 100% формамида

1 × раствор Денхарта	2,5 мл 20 × раствора Денхарта
0,5 мг ⁻¹ ДНК спермы лосося	2,5 мл 10 мг мл ⁻¹ раствора
5% декстран сульфат	10 мл 25% декстран сульфата

Хранить при температуре 4°C.

vi) 20 × SSC буфер

3 M NaCl	175,32 г
0 3 M Na цитрат-2H ₂ O	88,23 г
DD H ₂ O	QS до 1000 мл

Отрегулировать pH до 7,0. Автоклавировать. Хранить при температуре 4°C. Чтобы приготовить 2 × SSC, необходимо разбавить 100 мл 20 × SSC в 900 мл DD H₂O. Чтобы приготовить 1 × SSC необходимо разбавить 50 мл 20 × SSC в 950 мл DD H₂O. Чтобы приготовить 0,5 × SSC необходимо разбавить 50 мл 20 × SSC в 1950 мл DD H₂O. Профильтровать растворы с помощью фильтра (0,45 мкм). Хранить при 4°C.

vii) 20 × раствор Денхардта

BSA (фракция V) 0,4 г бычьего сывороточного альбумина

Фиколл 400	0,4 г Фиколла
PVP 360	0,4 г поливинилпирролидина
DD H ₂ O	100 мл

Профильтровать через 0,45 мкм фильтр. Хранить при температуре 4°C.

viii) 25% декстран сульфат

Декстран сульфат	25 г
DD H ₂ O	QS до 100 мл

Нагревать на слабом огне, перемешивая, до полного растворения. Хранить в замороженном виде.

ix) ДНК спермы лосося (10 мг мл⁻¹)

ДНК спермы лосося	0,25 г
DD H ₂ O	25 мл

Медленно добавить ДНК в воду в мензурке с мешалкой. Нагреть и перемешать так, чтобы растворить ДНК, постепенно добавляя еще, пока вся ДНК не растворится. Автоклавировать. Распределить в стерильные пробирки. Хранить при температуре -20°C.

x) 10 × буфер I

1 М Трис-основание	121,1 г
1,5 М NaCl	87,7 г
DD H ₂ O	QS до 1000 мл

Отрегулировать pH до 7,5 с HCl. Автоклавировать. Хранить при температуре 4°C.

Чтобы приготовить 1 × буфер I, необходимо разбавить 100 мл 10 × исходного раствора в 900 мл DD H₂O.

Профильтровать через 0,45 мкм фильтр. Хранить при температуре 4°C.

xi) Буфер II (блокирующий буфер и буфер разбавления Ab)

Genius реагент 11	0,5 г
Буфер I	100 мл

Нагревать на слабом огне, перемешивая в течение 30 минут до растворения. Раствор станет мутным, но с без твердых частиц. Хранить при температуре 4°C до 2 недель.

xii) Буфер III

100 ммоль Трис-основание	12,11 г
100 ммоль NaCl	0,58 г
DD H ₂ O	QS до 1000 мл

Отрегулировать pH до 9,5 с добавлением HCl. Затем добавить:

50 ммоль MgCl ₂ 6H ₂ O	16,10 г

Профильтровать через 0,45 мкм фильтр. Хранить при температуре 4°C.

xiii) 10% поливиниловый спирт (ПВС)

Поливиниловый спирт (30,000-70,000 молекулярный вес)	10 г
DD H ₂ O	100 мл

Размешать ПВС и нагреть, если необходимо, чтобы добавить в раствор. Распределить по 10 мл / пробирка. Хранить при температуре -20°C.

xiv) Проявляющий раствор

Смешать 90 мл буфера III с 10 мл 10% ПВС и хранить при температуре 4°C. Непосредственно перед использованием, для каждого 1 мл буфера III с ПВС добавить:

Соли нитросинего тетразолия	4,5 мкл NBT (75 мг мл ⁻¹ в 70% диметилформамиде)

5-бром-4-хлор-3-индоилфосфат, соль толуидина	3,5 мкл X-фосфата (50 мг мл ⁻¹ в диметилформамиде)

xv) 10 × буфер IV

10 ммоль Tris-основание	1,21 г
1 ммоль EDTA. 2H ₂ O	3,7 г
DD H ₂ O	QS до 1000 мл

Отрегулировать pH до 8,0 с помощью 5 N HCl. Автоклавировать. Хранить при температуре 4°C.

Чтобы приготовить 1 × буфер IV, разбавить 100 мл 10 × исходного раствора в 900 мл DD H₂O.

Профильтровать через фильтр (0,45 мкм). Хранить при температуре 4°C.

xvi) 0,5% Коричневый Бисмарк Y

Коричневый Бисмарк Y	2,5 г
DD H ₂ O	500 мл

Растворить краситель в воде. Профильтровать через фильтр Whatman No 1. Хранить при комнатной температуре.

4.3.1.23.2. Методы полимеразной цепной реакции

Протокол, описанный здесь, модифицирован Wang et al, 1996.

4.3.1.23.2.1. Подходящие образцы

Подходящие образцы - иссеченные гепатопанкреасы, цельные личинки или постличинки (объединенные), или фекалии. Образцы могут быть свежими, замороженными, законсервированными в 90% этаноле или других средах, предназначенных для консервации образцов для амплификации ДНК.

Было обнаружено, что вещества в гепатопанкреасе и фекалиях креветок ингибируют ДНК-полимеразу, используемую в ПЦР. Таким образом, необходимо провести экстракцию ДНК для последующего проведения ПЦР для обнаружения ВР.

4.3.1.23.2.2. Выделение ДНК

Наборы для выделения ДНК удобны и коммерчески доступны. В противном случае подходящая процедура извлечения ДНК заключается в следующем:

- i) Образец фекалий или гепатопанкреаса добавляют в пищеварительный буфер (~1:10 соотношение образца к буферу в ≤ 400 мкл буфера), содержащий 50 ммоль KCl, 10 ммоль Tris/HCl, pH 8,3; 0,1 мг мл⁻¹ желатин, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween 20 и 80 мкг мл⁻¹ протеиназы К, измельчают и диспергируют деревянной зубочисткой или наконечником пипетки.
- ii) После диспергирования образца в пищеварительном буфере нагревать до 60°C в течение 1 часа, а затем до 95°C в течение 10 минут.
- iii) Центрифугировать при 12000 g в течение 2 минут, перелить надосадочную жидкость в новую пробирку и хранить на льду.
- iv) Удалить 50 мкл переваренного образца и разбавить 150 мкл разбавляющего буфера (10 ммоль Tris / HCl, pH 8,0, 0,1 ммоль EDTA) и экстрагировать с помощью 200 мкл фенола / изоамилового спирта / хлороформа (PIC) (25/1/24).
- v) После перемешивания образца на вортексе в течение 5 секунд оставить пробирку на 5 минут, а затем центрифугировать при 12 000 g в течение 2 минут.
- vi) Удалить 160 мкл водной (верхней) фазы и перенести в новую микроцентрифужную пробирку.
- vii) При необходимости этап экстракции можно повторить.
- viii) ДНК осадить добавлением 20 мкг гликогена (1 мкл из 20 мг мл⁻¹ исходного раствора), 65 мкл 7,5 М ацетата аммония и 390 мкл этанола, хранить при -20°C в течение >1 часа, а затем гранулировать ДНК центрифугированием при 12 000 g в течение 5 минут.
- ix) Ополоснуть гранулы ДНК 200 мкл 70% - ного этанола для удаления остаточного ацетата аммония, высушить, а затем растворить гранулу ДНК в 30 мкл разбавляющего буфера или дистиллированной воды перед добавлением образца (матрицы) в реакционную смесь ПЦР и началом ПЦР.

4.3.1.2.3.23. Метод ПЦР (Wang et al, 1996)

4.3.1.2.3.23.1. Праймеры

Сообщается о трех прямых и трех обратных праймера, выбранных из сегмента ~1430 пар оснований (п.о.) гена полиэдрина BP (Wang et al, 1996).
Последовательности данных праймеров

Праймер	Последовательность	Температура

BPA	5' - GAT-CTG-CAA-GAG-GAC-AAA-CC-3'	61°C
BPB	5' - ATC-GCT-AAG-CTC-TGG-CAT-CC-3'	64°C

Праймер	Последовательность	Температура
BPD	5'-TGT-TCT-CAG-CCA-ATA-CAT-CG-3'	62°C
BPE	5'-TAC-ATC-TTG-GAT-GCC-TCT-GC-3'	63°C
BPF	5'-TAC-CCT-GCA-TTC-CTT-GTC-GC-3'	68°C
BPG	5'-ATC-CTG-TTT-CCA-AGC-TCT-GC-3'	64°C

Комбинации этих праймеров амплифицируют сегменты из матричной ДНК ВР: ВРА/BPF-196 п.о., ВРА/BPB - 560 п.о., ВРА/BPG - 933 п.о., BPD/BPB - 207 п.о., BPD/BPG - 580 п.о., и BPE/BPG -221 п.о.

4.3.1.2.3.23.2. Процедура

Следующая процедура ПЦР была адаптирована Wang et al, 1996.

- i) Для ПЦР на ВР, ДНК в каждом экстрагированном образце денатурируют нагреванием на кипящей водяной бане в течение 3 минут с последующим быстрым охлаждением в ледяной воде.
- ii) Добавляют 25 мкл реакционной смеси, содержащей 5 ммоль каждого праймера, 1.5 ммоль MgCl₂, и 0,5-1 единицу ДНК-полимеразы.
- iii) После нагревания реакционной смеси в течение 3 минут при 95°C проводят 30 циклов ПЦР (стадия плавления ДНК при 94°C, стадия отжига праймера при 60°C и стадия удлинения при 72°C) с последующей стадией удлинения в течение 5 минут при 72°C
- iv) Полученные продукты ПЦР могут быть сопоставлены с молекулярными стандартами с помощью электрофореза в 2% агарозном геле или проанализированы с помощью специфического ДНК-зонда для фрагмента после блоттинга по Саузерну.
- v) В каждый ПЦР-анализ на ВР должны быть включены следующие контроли: известный отрицательный образец ткани или фекалий, известный положительный образец ткани или фекалий (это может быть клон ДНК, из которого был разработан определенный набор праймеров) и контроль "без матрицы".

4.3.1.23.2.4. Альтернативный метод ПЦР

Альтернативный метод, используемый референтной лабораторией МЭБ в Университете Аризоны (неопубликованный)

Используйте тип образца и методы извлечения, как описано выше

4.3.1.23.2.4.1. Праймеры

Одна пара прямого и обратного праймеров (6581F/6582R), отобранная из Клона IR36 (названного B1.23 в Bonami et al, 1995 и депонированного в GenBank с регистрационным номером DQ496179), производит ампликон в 644 п.о. Последовательности для этих праймеров

Праймер	Последовательность
6581	5'-TGT-AGC-AGC-AGA-GAA-GAG-3'
6582	5'-CAC-TAA-GCC-TAT-CTC-CAG-3'

4.3.1.23.2.4.2. Процедура

Реакционная смесь для ПЦР:

Таблица 4.1.

Реагент	Реакционная смесь 25	25 мкл гранул для	Конечная
dH ₂ O	16,5 мкл	23,0 мкл	-
10 × буфер	2,5 мкл	-	1 ×
dNTP's	0,5 мкл каждого	-	200 ммоль каждого
Праймер А	0,5 мкл	0,5 мкл	0,31 ммоль
Праймер В	0,5 мкл	0,5 мкл	0,31 ммоль

Таблица 4.1.

Реагент	25 pi reaction mix	25 мкл гранул для	Конечная
MgCl ₂	1,5 мкл	-	1,5 ммоль
Энзим	0,5 мкл	-	2,5 ед
Матрица	1,0 мкл	1,0 мкл	-

1 PuReTap™ Ready-To-Go PCR beads™, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK

Параметры циклов ПЦР:

Праймеры	Смесь / Гранулы	Время	Темп. °C	Кол-во циклов
6581/6582	Смесь / Гранулы ¹	5 минут	95	1
		30 секунд	95	35
		30 секунд	60	
		1 минута	72	
		7 минут	72	1

4.3.1.2.4. Очистка агента

Отсутствует.

4.3.2. Серологические методы

Не применимо.

5. Оценка испытаний по целевому назначению

Методы, доступные в настоящее время для осуществления надзора, обнаружения и диагностики ВР, перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, применимости и

диагностической специфичности и чувствительности, b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью, c = метод имеет применение в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение, и d = метод в настоящее время не рекомендуется и/или недоступен для этой цели. Данные оценки несколько субъективны, поскольку пригодность включает в себя такие аспекты как надежность, чувствительность, специфичность и применимость. Несмотря на то, что не все тесты из категории a или b прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Тетраэдрический бакуловирус (*Baculovirus penaei*) надзор, обнаружение и методы диагностики

Метод	Целевой надзор				Предполагаем ый диагноз	Подтверждающ ий диагноз
	Личинки	ПЛ	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	c	d	d	d	d	d
Биопроба	d	d	d	d	c	c
Прямая СМ	b	b	c	c	a	a
Гистопатология	b	b	c	c	a	a
Просвечивающая ЭМ	d	d	d	d	d	a
Анализы на основе антител	d	d	d	c	d	d
ДНК зонды <i>in situ</i>	c	c	c	c	a	a
ПЦР	a	a	a	a	a	a
Последовательность	d	d	d	d	d	a

ПЛ = постличинка, СМ = световой микроскопии, ЭМ = электронная микроскопия, ПЦР = полимеразная цепная реакция

6. Тест(ы), рекомендованный для целевого надзора, чтобы заявить о свободе от инфекции тетраэдрическим бакуловиром (*Baculovirus penaeid*)

Два года истории отрицательных результатов тестов на ВР с помощью:

- ПЦР, выполняемой на образцах соответствующего типа и размера выборки, и/или
- влажных образцах и / или гистологические результаты, при которых в образцах соответствующего типа и размера не наблюдаются тетраэдрические окклюзионные тельца.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение подозрения на болезнь

Для личинок (особенно протоzoа, мизиса и ранних стадий ПЛ) - смертность, при этом у личинок наблюдается побеление средней кишки. Для молоди - плохой рост в популяциях с предшествующей историей инфекции ВР.

7.2. Определение подтвержденного случая

Любая комбинация, по крайней мере, двух из следующих трех методов (с положительными результатами):

- Демонстрация с помощью микроскопа тетраэдрических окклюзионных телец во влажных препаратах целых личинок или иссеченных гепатопанкреасов. Что касается более взрослых постличинок, молоди и взрослых особей - тетраэдрические окклюзионные тельца видны во влажных препаратах и/или в гистологических срезах гепатопанкреаса или фекалий.
- Положительный гистологический сигнал гибридизации *in-situ* на поражения, характерные для ВР (то есть гипертрофированные ядра с патогномичными тетраэдрическими окклюзионными тельцами или без них).
- Положительные результаты ПЦР на ВР.

8. Справочные материалы

BONAMI J R , BRUCE L D , POULOS B T , MARI J & LIGHTNER D V (1995) Partial characterisation and cloning of the genome of PvSNPV (= BP-type virus) pathogenic for *Penaeus vannamei* *Dis Aquat Org* , 23, 59-66

BONDAD-REANTASO M G , MCGLADDERY S E , EAST I & SUBASINGHE R P (2001) Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2 FAO, Rome, Italy, 240 pp

BROCK JA & LIGHTNER D V (1990) Diseases of crustacea Diseases caused by microorganisms *In Diseases of Marine Animals*, Vol III Kinne O, ed Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg,

Germany, 245-349

BROCK JA & MAIN K (1994) A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei* Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 242 pp

BROCK J A , NAKAGAWA L K , VAN CAMPEN H , HAYASHI T & TERUYA S (1986) A record of *Baculovirus penaei* from *Penaeus marginatus* Randall in Hawaii *J Fish Dis* , 9, 353-355

BRUCE LD, LIGHTNER DV, REDMAN RM & STUCK KC (1994) Application of traditional and molecular detection methods to experimental studies on the development of *Baculovirus penaei* (BP) infections in larval *Penaeus vannamei* *J Aquat Anim Health*, 6, 355-359

BRUCE LD, REDMAN RM, LIGHTNER DV & BONAMI JR (1993) Application of gene probes to detect a penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using *in situ* hybridization *Dis Aquat Org* , 17, 215-221

BUENO SLS, NASCIMENTO R M & NASCIMENTO I (1990) *Baculovirus penaei* infection in *Penaeus subtilis* A new host and a new geographic range of the disease *J World Aquaculture Soc*, 21, 235-237

CHEN S N, CHANG PS & KOU G H (1990) Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon* In Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States Fulks W & Main K L , eds Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177-184

COUCH JA (1974) An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp ultrastructure, prevalence, and enhancement *J Invertebr Pathol*, 24, 311-331

COUCH JA (1991) Baculoviridae Nuclear Polyhedrosis Viruses Part 2 Nuclear Polyhedrosis Viruses of Invertebrates Other Than Insects In Atlas of Invertebrate Viruses Adams JR & Bonami J R, eds CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 205-226

DURAND S, LIGHTNER DV & BONAMI JR (1998) Differentiation of BP-type baculovirus strains using *in situ* hybridization *Dis Aquat Org*, 32, 237-239

FAUQUET CM, MAYO MA, MANILOFF J, DESSELBERGER U & BALL LA (2005) Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Elsevier Academic Press, Oxford, UK and San Diego, California, USA, 1259 pp

HAMMER HS, STUCK KC & OVERSTREET RM (1998) Infectivity and pathogenicity of *Baculovirus penaei* (BP) in cultured larval and postlarval Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, related to the stage of viral development *J Invertebr Pathol*, 72, 38-43

JOHNSON PT & LIGHTNER DV (1988) Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans gut-infecting species *Dis Aquat Org*, 5, 123-141

LE BLANC B D & OVERSTREET R M (1990) Prevalence of *Baculovirus penaei* in

experimentally infected white shrimp (*Penaeus vannamei*) relative to age *Aquaculture*, 87, 237-242

LE BLANC BD & OVERSTREET R M (1991) Effect of dessication, pH, heat and ultraviolet irradiation on viability of *Baculovirus penaei* *J Invertebr Pathol*, 57, 277-286

LE BLANC B D, OVERSTREET RM & LOTZ J M (1991) Relative susceptibility of *Penaeus aztecus* to *Baculovirus penaei* *J World Aquaculture Soc*, 22, 173-177

LIGHTNER DV (1996) A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp

LIGHTNER D V (1999)) The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies *J Applied Aquaculture*, 9, 27-52

LIGHTNER DV & REDMAN R M (1998) Shrimp diseases and current diagnostic methods *Aquaculture*, 164, 201220

LIGHTNER D V, REDMAN R M & ALMADA RUIZ E A (1989) *Baculovirus penaei* in *Penaeus stylirostris* (Crustacea Decapoda) cultured in Mexico unique cytopathology and new geographic record *J Invertebr Pathol*, 53, 137-139

MACHADO CR, BUENO DES SL & MENCK CFM (1995) Cloning shrimp *Baculovirus penaei* DNA and hybridization comparison with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *Rev Brasil Genet (Brazil J Genetics)*, 18, 1-6

OVERSTREET RM (1994) BP (*Baculovirus penaei*) in penaeid shrimps USMSFP 10th Anniversary Review *GCRL Special Publication*, 1, 97-106

OVERSTREET R M, STUCK KC, KROL RA & HAWKINS WE (1988) Experimental infections with *Baculovirus penaei* in the white shrimp *Penaeus vannamei* as a bioassay *J World Aquaculture Soc*, 19, 175-187

POULOS B T, MARI J, BONAMI J R, REDMAN RM & LIGHTNER D V (1994) Use of non-radioactively labeled DNA probes for the detection of a baculovirus from *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization on fixed tissue *J Virol Methods*, 49, 187-194

STUCK KC & OVERSTREET R M (1994) Effect of *Baculovirus penaei* on growth and survival of experimentally infected postlarvae of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* *J Invertebr Pathol*, 64, 18-25

STUCK K C, STUCK L M, OVERSTREET R M & WANG S Y (1996) Relationship between BP (*Baculovirus penaei*) and energy reserves in larval and postlarval Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* *Dis Aquat Org*, 24, 191-198

STUCK KC & WANG S Y (1996) Establishment and persistence of *Baculovirus penaei* infections in cultured Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* *J Invertebr Pathol*, 68, 59-64

SUMMERS M.D. (1977). Characterization of Shrimp Baculovirus. U.S. Environmental Protection Agency Report, EPA-600/3-77-130. US E.P.A., Gulf Breeze, Florida, USA, 35 pp.

WANG S.Y., HONG C. & LOTZ J.M. (1996). Development of a PCR procedure for the detection of *Baculovirus penaei* in shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 123-131.

NB: В настоящее время не существует референтной лаборатории МЭБ по
Тетраэдрическому бакуловирозу (*Baculovirus penaei*)
(см. таблицу в конце настоящего *Руководства по водным животным* или см. актуальный
список на веб-сайте МЭБ:

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

РАЗДЕЛ 2.3.

БОЛЕЗНИ РЫБ

ГЛАВА 2.3.0.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

ПРОБООТБОР⁴²

1. Оценка статуса здоровья эпизоотологической единицы

1.1. Материал образцов, используемый для тестирования

Материал образцов и количество образцов, которые должны быть отобраны, зависят от болезни или патогенного организма, размера животных и цели тестирования (т.е. диагностики клинической формы болезни, обнаружения рыб, являющихся субклиническими носителями патогена, или отбора проб для целевого надзора, чтобы продемонстрировать свободу от указанной болезни). См. *Руководство МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Corsin с соавт., 2009) или *Кодекс МЭБ по здоровью водных животных*, глава 1.4 «Надзор за здоровьем водных животных» для получения информации о разработке и оценке систем наблюдения за водными животными и отдельные главы по болезням в данном *Руководстве по водным животным*, чтобы получить информацию о требованиях к образцам.

1.2. Спецификации в зависимости от популяций рыбы

Общие рекомендации см. в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (Corsin с соавт., 2009) или в главе 1.4 *Водного кодекса МЭБ*. Конкретные сведения о требованиях к образцу для конкретной болезни из списка МЭБ смотрите в главе по конкретной болезни в данном *Руководстве по водным животным*. При отсутствии доказательств обратного, для разработки системы надзора для демонстрации статуса свободы от болезни страны, зоны или района, необходим минимальный уровень отбора образцов, соответствующий предполагаемой 2%-ной превалентности с использованием предполагаемого 100% чувствительного теста, и для поддержания этого статуса отбор образцов должен проводиться на уровне, соответствующем предполагаемой превалентности равной 5 или 10%.

1.3. Спецификации в зависимости от клинического статуса

⁴² NB: Версия утверждена Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012г.

В случае клинической инфекции, помимо целого малька или целых внутренних органов, органы, от которых отбираются образцы - это головная почка, селезенка, сердце или головной мозг для большинства вирусологических исследований (жабра и кишка при взятии проб на герпесвирус карпа кои), кожа или мышцы при взятии проб для исследований на эпизоотический язвенный синдром, кожа и плавники для обследования на *Gyrodactylus salaris*. Образцы, отобранные от десяти клинически больных рыб должны быть достаточными для тестирования на патогенные организмы для каждой эпизоотологической единицы. Для выявления субклинических носителей вируса или для целевого надзора, где требуется большое количество проб, образцы могут быть объединены в пулы, как указано в каждой отдельной главе по болезням в *Руководстве по водным животным*.

1.4. Спецификации в зависимости от размера рыбы

1.4.1. Для вирусных болезней из списка кроме герпесвирусной болезни карпа кои, вирусной энцефалопатии и ретинопатии

Малёк лосося с желточным мешком: отбор образцов от всей рыбы, но удалить желточный мешок при его наличии.

Рыба от 4 до 6 см: отобрать все внутренности, включая почку. Кусочек головного мозга можно отобрать, отсоединив голову на уровне заднего края жаберной кости и нажав на нее в боковом направлении.

Рыба более 6 см: отобрать почку, селезенку и сердце или головной мозг и/или ткани в соответствии с конкретным патогенным микроорганизмом, в отношении которого проводится тестирование (подробнее смотрите главу по конкретным болезням в данном *Руководстве по водным животным*).

Взрослая рыба: отобрать яичниковую жидкость, молоки и/или ткани, подходящие для тестирования на конкретный патогенный организм (подробнее см. Главу по конкретным болезням в данном *Руководстве по водным животным*).

1.4.2. Инфекция патогенным организмом *Aphanomyces invadans* (эпизоотический язвенный синдром [ЭЯС])

Рыба любого размера: почка, печень, мышечная ткань (см. Главу 2.3.2. «Инфицирование *Aphanomyces invadans*» [эпизоотический язвенный синдром] для более подробной информации).

1.4.3. Инфекция патогенным организмом *Gyrodactylus salaris*

Любой размер рыбы: кожа и плавники (смотри Главу 2.3.3 «Инфицирование патогенным организмом *Gyrodactylus salaris*» для получения более конкретной информации).

1.4.4. Герпесвироз карпа кои (KHV)

Рыба от 4 см до взрослых особей: отобрать ткани жабр, почки, селезенки,

головного мозга и внутренностей, в зависимости от используемого теста (смотри Главу 2.3.7 «Герпесвирусная болезнь карпа кои «для получения более подробной информации).

1.4.5. Вирусная энцефалопатия и ретинопатия (VER)

Рыба 2–4 см: взять целую голову.

Рыба размером 4 см до взрослых особей: отобрать головной мозг и, возможно, глаза и спинной мозг (подробности см. в Главе 2.3.12 «Вирусная энцефалопатия и ретинопатия»).

2. Общие процедуры работы с пробами

2.1. Макроскопическое исследование

При перечисленных болезнях макроскопическое исследование в основном используется для выявления клинических признаков эпизоотического язвенного синдрома или *Gyrodactylus salaris*, но за этим следует микроскопическое исследование гистологических предметных стекол для первой болезни или влажных соскобов кожи / плавников для последней болезни.

2.2. Вирусологическое исследование

2.2.1. Транспортировка и обработка образцов антибиотиками

Пулы органов или овариальных жидкостей помещают в стерильные флаконы и хранят при температуре 4°C или на льду до тех пор, пока в лаборатории не будет произведено вирусвыделение. Вирусвыделение оптимально должно проводиться в течение 24 часов после отбора проб рыбы, но все еще может проводиться в период до 48 часов, если температура поддерживается на уровне 0–4°C, или в течение более длительных периодов времени для проб на исследование клинических болезней, хранящихся в замороженном виде при - 80°C. Однако следует избегать замораживания образцов для испытаний на субклинических носителей.

Образцы органов также можно транспортировать в лабораторию, помещая их во флаконы, содержащие среду для культивирования клеток или сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS) с добавлением антибиотиков для подавления роста бактериальных контаминантов (один объем органа, по меньшей мере, в пяти объемах транспортной жидкости). Подходящими концентрациями антибиотиков являются: гентамицин (1000 мкг мл⁻¹) или пенициллин (800 международных единиц [МЕ] мл⁻¹) и стрептомицин (800 мкг мл⁻¹). Противогрибковые соединения, такие как Mycostatin® или Fungizone®, также могут быть включены в транспортную среду в конечной концентрации 400 МЕ/мл⁻¹. Для стабилизации вируса можно добавить сыворотку или белок (5–10%), если время транспортировки превысит 12 часов.

2.2.2. Вирусвыделение

Эту процедуру следует проводить при температуре ниже 15 °C (предпочтительно от 0 до 10 °C).

1. Декантировать среду с добавлением антибиотиков из образца органа.
2. Гомогенизировать пулы органов в транспортной среде в конечном разведении 1/10 с использованием ступки и пестика или электрического гомогенизатора до получения пасты.
3. Центрифугировать гомогенат в центрифуге с охлаждением при 2–5°C при 2000–4000 g в течение 15 минут, собрать супернатант и обработать антибиотиками либо в течение четырех часов при 15°C или в течение ночи при 4°C, например, гентамицин 1 мг мл⁻¹. Если транспортировка образца была произведена в транспортной среде (то есть с воздействием антибиотиков), обработку супернатанта антибиотиками можно не производить. Обработка антибиотиками делает ненужной фильтрацию через мембранные фильтры.
4. Аналогичным образом, образцы овариальной жидкости можно обрабатывать антибиотиками для контроля микробной контаминации, но их не следует разбавлять более чем в пять раз в среде HBSS и антибиотиках.
5. Образцы овариальной жидкости следует центрифугировать так же, как и гомогенаты органов, а их супернатанты использовать непосредственно на последующих этапах.

2.2.3. Обработка с целью нейтрализации энзоотических вирусов

Рыбы часто являются субклиническими носителями эндемичных вирусов, таких как бирнавирусы (например, вирус инфекционного панкреатического некроза [IPNV]), которые вызывают цитопатический эффект в чувствительных клеточных культурах и, таким образом, усложняют выделение и идентификацию целевых патогенных организмов. В таких ситуациях инфекционность энзоотических вирусов должна быть нейтрализована перед тестированием на вирусы, перечисленные в *Кодексе о водных животных*. Однако, когда важно определить, присутствует ли один из энзоотических вирусов, образцы следует тестировать с использованием нейтрализующих антител (NAbs) или без них.

Для нейтрализации водных бирнавирусов смешать равные объемы (200 мкл) раствора одного или нескольких NAb против серотипов местного бирнавируса с тестируемым супернатантом. Дать смеси вступить в реакцию в течение 1 часа при 15°C или в течение ночи при 4°C до инокуляции в монослой восприимчивых клеток. Титр используемого раствора NAb должен составлять не менее 2000 в 50% тесте на уменьшение бляшек по сравнению с вирусными серотипами, присутствующими в данном географическом регионе.

Если образцы отобраны из страны, региона, популяции рыб или производственной единицы, которые считаются свободными от энзоотических вирусных инфекций, такую обработку гомогената органа производить не следует.

Этот подход также можно использовать для нейтрализации других энзоотических вирусов на территории, где проводятся исследования.

2.3. Исследования на паразитов

См. главу 2.3.3 для более подробной информации

2.4. Исследования на грибы

См. главу 2.3.2 для более подробной информации

МАТЕРИАЛЫ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ В РЫБЕ

3. Вирусы у рыб

3.1. Клеточные линии рыб

Следующие клеточные линии рыбы используются для исследований на вирусные патогенные организмы рыбы, указанные в *Руководстве по водным животным*:

Папилезная эпителиома карповых

(EPC)

Мальки синежаберного солнечника

(BF-2)

Толстоголовый гольян

(FHM)

Гонады радужной форели (RTG-2)

Эмбрион чавычи (CHSE-214)

Голова, почки лосося (SHK-1)

Почка атлантического

лосося(ASK)

Плавник пристипомы (GF)

Плавник карпа Кои (KF-1)

Мозг сазана

(CCB)

Голова ямчатоглазой змеи (SSN-

1)

3.2. Культуральная среда

Традиционная минимальная необходимая среда Игла (MEM) с солями Эрла, дополненная 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС), антимикробными агентами и 2 мМ L-глутамином, является наиболее широко используемой средой для культивирования клеток рыб.

Среда Стокера, однако, являющаяся модифицированной формой вышеуказанной среды, содержащей двойную концентрацию определенных аминокислот и витаминов, особенно рекомендуется для усиления роста клеток, используя те же добавки, что и выше + 10% триптозофосфат.

Эти среды забуферены либо бикарбонатом натрия, 0,16 М трис-гидроксиметиламинометан (Трис) HCl, либо, предпочтительно, 0,02 М N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновой кислотой (HEPES). Использование только бикарбоната натрия ограничено теми клеточными культурами, которые были приготовлены в плотно закрытых сосудах для культивирования клеток.

В качестве альтернативы для некоторых клеточных линий, например, SHK-1 и SSN-1, рекомендуется среда Лейбовица (L15), дополненная ФБР (5% или 10%), L-глутамином (4 мМ) и гентамицином (50 мкг / мл).

Для роста клеток содержание ФБР в среде обычно составляет 10%, тогда как для выделения вируса или продукции вируса оно может быть уменьшено до 2%. Аналогично, pH культуральной среды для роста клеток составляет 7,3-7,4 и доводится до 7,6 для продуцирования вируса или количественного анализа вируса.

В состав наиболее часто используемой смеси противомикробных препаратов входят пенициллин (100 МЕ мкг/мл⁻¹) и диgidрострептомицин (100 мкг/мл⁻¹). Добавить микостатин (50 МЕ мкг/мл⁻¹), если возможна контаминация грибами. Другие концентрации или другие антимикробные агенты могут использоваться как удобно оператору в зависимости от чувствительности к противомикробным препаратам встречающихся штаммов бактерий и грибов.

3.1. Положительные контроли вируса и приготовление антигена

3.1.1. Номенклатура вируса

Вирус эпизоотического шематопозитического некроза (EHNV)

Инфекционный некроз гемопоэтической ткани (IHNV)

Вирус инфекционной анемии лососевых (ISAV)

Герпесвирус карпа кои (KHV)

Oncorhynchus masou вирус (OMV)

Иридовирус красноперого пагеля (RSIV)

Альфавирус лососевых (SAV)

Вирус вирусной геморрагической септицемии (VHSV)

Вирус вирусной энцефалопатии и ретинопатии (вирус) (VERV) известный как вирус вирусного нервного некроза (VNNV)

3.3.2. Продуцирование вируса

Для производства исходных культур этих вирусов *in vitro*, монослойные культуры восприимчивых клеток (см. соответствующие разделы в данном *Руководстве по водным животным*) в подходящих сосудах для культивирования тканей (например, в пластиковых плашках) должны быть инокулированы при довольно низком уровне множественности заражения (M.O.I.) т. е. от 10^{-2} до 10^{-3} бляшкообразующих единиц (PFU) на клетку.

Предпочтительные температуры для размножения вируса:

15°C для IHNV, ISAV, OMV и VERV (генотип BFNNV) и VHSV

20°C для KHV, SVCV и VERV (генотипы BFNNV, SJNNV и TPNNV)

22°C для EHNV

25°C для RSIV и VERV (генотипы RGNNV и SJNNV)

30 ° C для VERV (генотип RGNNV)

3.3.3. Консервация и хранение исходных культур вируса

1. Центрифугировать инфицированные клеточные культуры при $2-5^{\circ}\text{C}$ и 2000–4000 g в течение 15 минут, затем разбавить вирусосодержащие супернатанты, чтобы получить вирусные титры в среднем равные 10^6 БОЕ мл^{-1} .
2. Разлить полученные вирусные суспензии в стерильные флаконы объемом 0,3–0,5 мл каждый.
3. Заморозить и хранить каждую серию стандартных исходных вирусов при -80°C или жидком азоте и регулярно проверять титр каждого исходного вируса, если он не использовался в течение этого периода времени.

Лиофилизация: длительное хранение (десятилетия) посевов стандартных штаммов вируса достигается лиофилизацией. Для этой цели вирусные суспензии в среде для культивирования клеток с добавлением 10% эмбриональной сыворотки телят смешивают (по объему) с равным объемом криоконсервативной среды (такой как 20% гидролизат лактальбумина в дистиллированной воде) перед обработкой. Уплотнить или закрыть пробкой под вакуумом и хранить при 4°C в темноте.

4. Методы

4.1. Серология

4.1.1. Производство кроличьей антисыворотки и поликлональных антител к вирусам у рыб

Существуют различные способы, которыми могут быть получены антитела против вирусов рыб у кроликов. Однако на титр и специфичность влияет используемая инокуляционная программа. Следующие протоколы иммунизации могут применяться для получения антисыворотки для использования в процедурах выделения и / или идентификации вируса, описанных ниже.

4.1.1.1. Антисыворотка к вирусу инфекционного панкреонекроза

Внутривенная инъекция 50–100 мкг очищенного вируса в день 0, затем идентичная бустерная доза в день 21 и кровозъятие через 5–7 дней. Кролики могут быть повторно использованы, если не будут полностью обескровлены.

4.1.1.2. Антисыворотка к другим вирусам

В протоколах иммунизации чередуются внутримышечная или внутрикожная инъекции с другими внутривенными бустерными инъекциями:

1. День 0: первичная инъекция, 500–1000 мкг очищенного вируса смешивают (об./об.) с адъювантом (неполным или другими⁴³ адъювантами Фрейнда, которые считаются более приемлемыми), получая общий объем 1,2 мл. Этот антиген вводят кролику в виде многоточечных внутрикожных инъекций (по 2 точки с каждой стороны) после того, как животное было побрито.
2. День 21: отобрать около 2 мл крови и проверить на реактивность (нейтрализация, флуоресценция); ввести бустерную дозу внутривенно тем же количеством очищенного вируса, что и при первичной инъекции, но без адъюванта.

Перед внутривенной бустерной инъекцией кролик должен быть обработан прометазином (12 мг внутримышечно) для предотвращения возможной анафилактической реакции.

3. День 28: отобрать кровь, проверить реактивность сыворотки, пустить кровь или ввести бустерную дозу в соответствии с результатами.

Что касается рабдовирусов, эта процедура иммунизации хорошо подходит для производства антисывороток, которые будут использоваться в иммунофлуоресценции и в иммуноферментном анализе. Однако более эффективным методом продуцирования нейтрализующей антисыворотки является регулярная внутривенная инъекция без адъюванта (0,2 мл) каждые 3–4 дня (два раза в неделю). Могут быть необходимы 15 инъекций. Через 1 неделю после последней инъекции следует собрать и протестировать образцы сыворотки.

4.1.2. После свертывания крови отобрать и центрифугировать сыворотку при 20°C и нагревать ее в течение 30 минут при 56°C. Отфильтровать полученную инактивированную теплом сыворотку через мембранный фильтр (размер пор - 450 нм) и временно хранить ее при 4°C в течение времени, необходимого для скрининга ее реакционной способности и специфичности и для проверки того, что на эти свойства не влияют условия консервации (например, замораживание или лиофилизация). Стерильные кроличьи сыворотки можно хранить в течение не менее 2 месяцев при 4°C без каких-либо изменений их свойств. Дозировать (обычно в небольших объемах) и заморозить при -20°C или лиофилизировать.

⁴³ Использование полных адъювантов Фрейнда может быть ограничено из соображений благополучия животных. Альтернативные синтетические адъюванты включают димиколят трегалозы и монофосфатный липид А.

Иммуноглобулины (Ig) могут быть извлечены из антисыворотки с использованием обычных методов, подходящих для очистки Ig. Селективное прикрепление к белку А является надежным и эффективным методом. Концентрация растворов Ig доводится до значений, необходимых для дальнейшего приготовления или хранения конъюгата.

Консервация Ig: смешать раствор Ig концентрации 2 мг/л⁻¹ со стерильным чистым глицерином (об./об.) и хранить при -20°C. Растворы Ig с более высокой концентрацией также могут быть приготовлены в глицерине.

4.1.3. Мышиные моноклональные антитела

Моноклональные антитела (MAbs) к большинству вирусов рыб были получены в последние годы. Некоторые из них, по отдельности или в виде двух или трех ассоциированных MAbs, дали начало биологическим реагентам, подходящим для идентификации вирусных групп (IPN, VHS, IHN). Другие MAbs, взятые по отдельности или в качестве компонентов Ab панелей, позволяют выполнять точное типирование VHSV и IHNV. Эти MAbs можно получить в Референтных лабораториях, перечисленных в конце данного *Руководства по водным животным*

Теоретически, мышиные моноклональные IgG можно обрабатывать и хранить как поликлональные IgG. Однако реакционная способность некоторых MAbs может быть нарушена такими процессами, как ферментативное мечение или радиомечение или лиофилизация. Таким образом, необходимо протестировать различные MAbs для условий, при которых они будут использоваться.

4.2. Прямая микроскопия

Образцы для прямого микроскопического исследования мазков или отпечатков тканей должны быть исследованы как можно скорее после отбора. Живые образцы следует использовать всегда, когда это возможно, или свежие, охлажденные при 4°C или 10% буферизованные образцы, зафиксированные в формалине, используемые, когда живые образцы нецелесообразны. Если имеется соответствующая полевая лаборатория, ее следует использовать для обработки и исследования образцов вблизи места сбора.

4.3. Методы гистологического исследования

4.3.1. Фиксация и погружение ткани

Для гистологии следует отбирать только живые или умирающие образцы рыбы с клиническими поражениями. Удаленные ткани должны быть немедленно зафиксированы в 10% забуференном формалине. Использовать не менее десяти объемов фиксатора для каждого объема образца ткани и оставить на 24 часа. После удаления из фиксатора образцы ткани затем дегидратируют в возрастающих концентрациях этанола, очищают в смешивающемся с воском агенте, таком как ксилол, и затем вводят в парафин с использованием стандартных протоколов.

4.3.2. Приготовление срезов тканей и окрашивание

Отрезать срезы толщиной примерно 5 мкм от блока. Поместить каждый срез на предметное стекло, удалить воск в смешивающемся с воском агенте, таком как ксилол или Clearene®, и регидратировать.

Для большинства исследований болезней срезы могут быть окрашены гематоксилином и эозином (H & E), используя следующую процедуру:

4.3.2.1. Погружение предметных стекол

1. Поместить предметные стекла в ксилол или Clearene®, чтобы удалить воск минимум на 2 минуты.
2. Повторить этап 1, используя свежий ксилол или Clearene®.
3. Поместить в 100% спирт, чтобы удалить растворитель минимум на 2 минуты.
4. Повторить шаг 3 в свежем 100% спирте.

4.3.2.2. Окрашивание

1. Промыть проточной водопроводной водой (RTW) в течение 2–5 минут. Предметные стекла должны быть чистыми, не мутными.
2. Поместить в раствор гематоксилина на 3 минуты.

3. Подержать в RTW в течение 5–10 минут до изменения цвета на синий (или в насыщенном карбонате лития); но не допускать темно синего цвета.
4. Окунуть в кислоту/спирт максимум на 10 секунд.
5. Промыть в RTW (или карбонате лития) до синего цвета.
6. Проверить под микроскопом на наличие чистой цитоплазмы и голубых ядер.
7. Водный эозин в течение 3 минут.
8. Хорошо промыть в RTW для дифференциации эозина.

4.3.2.3. Дегидрирование, очистка и заключение

1. Хорошо промыть в 70% спирте, но не слишком долго, так как он удаляет эозин.
2. Повторить этап 14, используя свежий спирт.
3. Поместить в 100% спирт, чтобы удалить растворитель минимум на 2 минуты.
4. Поместить в 50/50 спирт/Clearene® на 1–2 минуты.
5. Поместить в Clearene®.
6. Повторить погружение используя свежий Clearene®, предметные стекла должны быть чистыми.
7. Поместить в DPX (дистирен, пластификатор и ксилол) и оставить для высыхания.

Для наблюдения за гранулемами и грибными гифами, возникающими при эпизоотическом язвенном синдроме, вместо Н & Е можно использовать обычный краситель для грибов, такой как Grocott-Gomori.

4.3.3. Подготовка предметных стекол для иммуногистохимического исследования

Важно отметить, что длительная фиксация может маскировать интересующие антигены. Поэтому рекомендуется осуществлять фиксацию до минимума, при этом достигая оптимального уровня консервирования (24–48 часов). Ее можно уменьшить и далее используя небольшие кусочки ткани. Тем не менее, рекомендуется включать этап извлечения антигена (включен в протокол ниже), где это возможно. Ниже описан стандартный протокол иммуногистохимии, обычно используемый в гистологических лабораториях, но из-за различий, которые могут существовать между антителами и коммерчески доступными наборами для обнаружения, вполне вероятно, что людям потребуется оптимизировать методику для своих собственных целей. Это будет включать такие факторы, как определение оптимального титра антител. Именно самое высокое разведение приводит к наиболее интенсивному специфическому окрашиванию при достижении наименее неспецифического фонового окрашивания. Кроме того, специалистам может потребоваться изменить продолжительность инкубации реагентов.

1. Выполнить этапы 1–5 раздела 2.3.2.
2. Промыть предметные стекла дважды в ФБР (2% Твин 20) в течение 2 минут.
3. Извлечь антиген, поместив предметные стекла в пластиковую емкость Коплина, содержащую натрий-цитратный буфер, и поместить на подставку для приготовления на пару, расположенную внутри скороварки.
4. Поставить скороварку на сильный огонь, пока не будет достигнуто максимальное давление, на что будет указывать «качание» регулятора давления.
5. Уменьшить температуру и оставить на плите примерно на 10 минут, сохраняя давление.
6. Снять с конфорки и дать скороварке остыть и продуть в течение примерно 20–30 минут в вытяжном шкафу перед открытием.

7. Вынуть сосуд Коплина из скороварки и заменить натриевый цитратный буфер теплой водопроводной водой, затем холодной водопроводной водой и дистиллированной водой. Данная процедура применяется для постепенного охлаждения предметных стекол.
8. При необходимости выполнить блокирование активности эндогенного биотина/авидина (а) инкубировать предметные стекла в течение 15–20 минут в 0,005% авидине в ФБР (б) промыть в ФБР с последующей (с) инкубацией в 0,005% биотине в ФБР в течение 15–20 минут. В качестве альтернативы, использовать коммерчески доступную систему блокировки в соответствии с рекомендациями производителя. Это обычно применяется для тканей, содержащих высокие уровни биотина, таких как печень, почки и селезенка.
9. Быстро промыть предметные стекла в водопроводной воде.
10. Промыть предметные стекла в ФБР (0,2% Твин 20) в течение 2 минут.
11. Снять реактив и насухо промокнуть вокруг среза ткани, чтобы срез оставался влажным.
12. Инкубировать с первичными антителами при 25°C в течение 30 минут легким круговым вращением, если это доступно.
13. Промыть предметные стекла в ФБР (0,2% Твин 20) из промывочных флаконов.
14. Снять реактив и насухо промокнуть вокруг среза ткани, чтобы срез оставался влажным.
15. Инкубировать с биотинилированным вторичным антителом при 25°C в течение 10 минут легким круговым вращением, если это доступно.
16. Промыть предметные стекла в ФБР (0,2% Твин 20) из промывочного флакона.
17. Гасить активность эндогенной пероксидазы путем помещения предметных стекол в ФБР, содержащим 0,3% перекись водорода с 0,1% азида натрия в течение 10–15 минут при комнатной температуре.

18. Промыть предметные стекла в ФБР (0,2% Твин 20) из промывочного флакона.
19. Инкубировать с предпочтительным коммерчески доступным меченным пероксидазой комплексом для обнаружения стрептавидина при 25°C в течение 10 минут легким круговым вращением, если это доступно.
20. Промыть предметные стекла в ФБР (0,2% Твин 20) из промывочного флакона.
21. Нанести ДАБ хромоген на предметные стекла и обнаружить продукт реакции путем мониторинга под микроскопом в течение оптимального времени. Продолжительность будет зависеть от используемого продукта ДАБ.
22. Остановить реакцию, поместив предметные стекла в водопроводную воду.
23. Выполнить усиление хромогеном (необязательно), поместив слайды в ФБР с добавлением 0,5% сульфата меди на 1–5 минут при 25°C легким круговым вращением.
24. Промыть в дистиллированной воде.
25. Выполнить контрастное окрашивание гемоксилином Харриса в течение 2–3 минут.
26. Промыть водой.
27. Дегидратировать, очистить и заключить.

Подготовка реактива

ФБР - Твин 20 (0,2%):	Физиологический раствор с фосфатным буфером	10 литров
	Твин 20	2 мл
Натриевый цитратный буфер:	Тринатрийцитрат (дигидрат)	2,94 г
	Вода дистиллированная	1 литр
	Твин 20	0,5 мл

Смешать до растворения, довести рН до 6,0 с помощью 1 N HCl перед добавлением Твин 20. Хранить этот раствор при комнатной температуре в течение 3 месяцев или при 4°C для более длительного хранения.

4.4. Электронная микроскопия

Электронная микроскопия (трансмиссия или сканирование) является ценным исследовательским инструментом для изучения болезней водных животных. Однако эти методы обычно не используются для обычной диагностики заболеваний рыб, из списка МЭБ, поэтому они не описаны в данном Руководстве по водным животным.

4.5. Использование молекулярных методов для подтверждающего тестирования и диагностики

Молекулярные методы, включая зонды нуклеиновых кислот и полимеразную цепную реакцию (ПЦР), были разработаны для идентификации многих патогенных организмов водных животных. Однако, как и в случае с некоторыми другими диагностическими методами, преимущество в чувствительности часто компенсируется проблемами в интерпретации или подверженностью техническим проблемам. При использовании ПЦР в качестве метода диагностики важное значение имеют дизайн праймеров и зонда, использование контролей, а также валидация выбранного метода ПЦР. ПЦР может в значительной степени зависеть от условий, в которых она проводится, и может подвергаться лабораторной контаминации предыдущими продуктами ПЦР, что дает ложноположительные результаты. Таким образом, хотя несколько протоколов нуклеиновых кислот и протоколов ПЦР включены в эту версию *Руководства по водным животным* как диагностические или подтверждающие методы исследования рыб, где это возможно, в качестве стандартных методов скрининга указаны хорошо известные методы (например, выделение вируса). Всякий раз, когда используются эти новые молекулярные методы, они должны выполняться с осторожностью и с особым вниманием к включению адекватных положительных и отрицательных контролей.

4.5.1. Подготовка образцов и их виды

Для этих методов должны быть подготовлены образцы для сохранения нуклеиновой кислоты патогенного организма. Аналогичным образом, образцы, предназначенные для тестирования методами на основе антител, должны быть сохранены для сохранения реактивных антигенных участков для используемых антител.

Образцы, отобранные для диагностических тестов на основе нуклеиновых кислот или антител, прежде чем проводить анализ, должны обрабатываться и

упаковываться с максимальной осторожностью, чтобы минимизировать вероятность перекрестной контаминации среди образцов или деградации мишени. Для предотвращения контаминации следует использовать новые контейнеры (пластиковые пакеты для образцов или флаконы). Водостойкая этикетка с заполненными соответствующими данными должна быть помещена в каждую упаковку или контейнер для каждого набора образцов.

Некоторые подходящие методы для сохранения и транспортировки образцов, отобранных для молекулярных или основанных на антителах испытаний:

1. *Живые образцы со льдом или охлажденные образцы:* что касается образцов, которые можно быстро доставить в лабораторию для тестирования в течение 24 часов, упаковать образцы в пакеты для образцов, обложенных достаточным количеством мокрого льда вокруг упакованных образцов в изолированной коробке и отправить в лабораторию.
2. *Замороженные цельные образцы:* отобрать живые образцы в соответствии с целью пробоотбора, быстро заморозить на месте с использованием измельченного сухого льда или заморозить в полевой лаборатории с использованием механического морозильника при температуре -20°C или ниже. Подготовить и вставить этикетку в контейнер с образцами, упаковать образцы с достаточным количеством сухого льда в изолированную коробку и отправить в лабораторию.
3. *Образцы, сохраняемые в спирте:* в регионах, где хранение и отгрузка замороженных образцов проблематичны, для хранения, хранения и транспортировки определенных типов образцов можно использовать 90–95% этанол. Упаковать для отправки в соответствии с описанными выше методами.
4. *Фиксированные ткани для гибридизации на месте и иммуногистохимии:* для этой цели подходят классические методы сохранения тканей. Буферный формалин обычно является хорошим выбором для последующего использования молекулярных зондов. Для ДНК, в частности, следует избегать чрезмерной фиксации (более 24–48 часов).

4.5.2. Сохранение РНК и ДНК в тканях

Ткань разрезают до размеров менее 0,5 см в одном измерении и погружают в 10 объемов RNAlater (например, 0,5г. образца требует около 5мл. RNAlater). Мелкие

органы, такие как почка, печень и селезенка, могут храниться целиком в RNAlater. Эти образцы могут храниться при 4°C в течение 1 месяца, при 25°C в течение 1 недели или неопределенно долго при -20°C или ниже. Архивировать ткани, обработанные RNAlater при -20°C или ниже.

4.5.3. Экстракция ДНК

Для экстракции ДНК растереть в 10 объемах буфера для экстракции (NaCl [100 mM], этилендиаминтетрауксусной кислоты [EDTA, 25 mM], pH 8 и додецилсульфат натрия [SDS, 0,5%]) с добавлением протеиназы К (100 мкг мл⁻¹). После инкубации в течение ночи при 50°C ДНК экстрагируют с использованием стандартного протокола фенол/хлороформ и осаждают этанолом. Чтобы выделить ДНК из тканей, сохраненных в RNAlater, просто удалите ткань из RNAlater и обработайте ее, как если бы она была только что отобрана. Большинство тканей можно гомогенизировать непосредственно в буфере для лизиса или экстракции.

Учитывая временные ограничения и риски для лабораторного персонала, имеющиеся в продаже наборы могут быть удовлетворительными техническими альтернативами. Использование коммерческих наборов должно быть валидировано путем сравнения со стандартным фенол/хлороформ протоколом перед их обычным использованием в диагностических лабораториях.

4.5.4. Экстракция РНК

Чтобы экстрагировать РНК из тканей, сохраненных в RNAlater, просто удалить ткань из RNAlater и обработать ее, как если бы она была только что отобрана. Большинство тканей можно гомогенизировать непосредственно в буфере для лизиса или экстракции.

Учитывая временные ограничения и риски для лабораторного персонала, имеющиеся в продаже наборы могут быть удовлетворительными техническими альтернативами. Использование коммерческих наборов должно быть валидировано путем сравнения со стандартным фенол/хлороформ протоколом перед их обычным использованием в диагностических лабораториях.

4.5.5. Подготовка предметных стекол для гибридизации на месте

Для гибридизации на месте (ISH) ткани рыб должны быть зафиксированы в забуференном формалине в течение приблизительно 24 часов, а затем помещены в парафин в соответствии со стандартными гистологическими методами, как описано в разделе 3.3. Срезы нарезают толщиной 5 мкм и помещают на предметные стекла, покрытые аминоалкилсилианом, которые затем выпекают в течение ночи в печи при 40°C. Срезы удаляют воском путем погружения в ксилол на 10 минут. Этот этап повторяют один раз, а затем растворитель удаляют погружением в две

последовательные ванны с абсолютным этанолом на 10 минут каждая. Затем срезы регидратируют погружением в этанол. Протокол может потребовать проведение этапа мембранной проницаемости, обеспечивающей доступ к целевой ДНК. Для этого срезы обрабатывают протеиназой К (100 мкг мл^{-1}) в ТЕ-буфере (Трис [50 мМ], ЭДТА [10 мМ]) при 37 °C в течение 30 минут. Для ISH тестов важно, чтобы как известные положительные, так и известные отрицательные стекла были окрашены, чтобы исключить ложноположительные результаты из-за неспецифического окрашивания/отсутствия окрашивания и ложноотрицательные результаты из-за ошибок в протоколе окрашивания.

5. Дополнительная информация, которую необходимо собрать

Географическое происхождение образцов должно определяться названием места отбора образцов, связанного либо с его географическими координатами, либо с его местоположением вдоль русла реки или водоема. Другая минимальная информация об образце должна включать имя лица, отобравшего образец, организацию, дату, время, название водоема и описание местоположения. Также необходимо вести записи, которые предоставляют информацию, позволяющую отследить перемещение образца от места отбора проб до хранилища или лаборатории и внутри этих объектов. Хранилища должны регистрировать информацию о способе хранения, месте хранения, дате и времени хранения в каждом шкафу или морозильной камере, а также информацию о температуре хранения (предпочтительнее непрерывный мониторинг). Эта информация должна отслеживаться с помощью индивидуальных кодов образца, присваиваемых для всех образцов. Лабораториям следует регистрировать дату получения, информацию о месте хранения, дату проведения анализа, примечания к анализу и дату отчета для всех закодированных образцов. Эти данные значительно облегчат отслеживание образцов при возникновении проблем и обеспечат гарантию того, что образцы были правильно обработаны.

БИБЛИОГРАФИЯ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ПРОЧТЕНИЯ

AMEND D., YASUTAKE W. & MEAD R. (1969). A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon.

Trans. Am. Fish. Soc., 98, 796–804.

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

AUBERTIN A.M. (1991). Family Iridoviridae. In: Classification and Nomenclature of Viruses, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. Arch. Virol. (Suppl. 2). Springer, New York and Vienna, USA and Austria.

BOOTLAND L.M. & LEONG J.A. (1992). Staphylococcal coagglutination, a rapid method of identifying infectious hematopoietic necrosis virus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 6–13.

BOWSER P.R. & PLUMB J.A. (1980). Fish cell lines: establishment of a line from ovaries of channel catfish. *In Vitro*, 16, 365–368.

CORSIN F., GEORGIADIS M., HAMMELL K.L. & HILL B. (2009). *Guide for Aquatic Animal Health Surveillance*. The World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France., 114 pp.

DOBOS P. (1991). Family Birnaviridae. In: *Classification and Nomenclature of Viruses*, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. *Arch. Virol.*(Suppl. 2). Springer, New York and Vienna, USA and Austria, 200–202.

EAGLE H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130, 432.

FIJAN N., PETRINEC Z., SULIMANOVIC D. & ZWILLENBERG L.O. (1971). Isolation of the causative agent from the acute form on infectious dropsy of carp. *Vet. Arch. Zagreb*, 41, 125–138.

FIJAN N., SULIMANOVIC D., BEARZOTTI M., MUZINIC D., ZWILLENBERG L.O., CHILMONCZYK S., VAUTHEROT

J.F. & DE KINKELIN P. (1983). Some properties of the Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*). *Ann. Virol. Institut Pasteur*, 134E, 207–220.

HEDRICK R.P., MCDOWELL T.S., AHNE W., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. *Dis. Aquat. Org.*, 13, 203–209.

HILL B.J., WILLIAMS R.F. & FINLAY J. (1981). Preparation of antisera against fish virus disease agents. *Dev. Biol. Stand.*, 49, 209–218.

HSU Y.L., MARK ENGELKING H. & LEONG J. (1986). Occurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1353–1361.

HYATT A.D., EATON B.T., HENGSTBERGER S. & RUSSEL G. (1991). Epizootic hematopoietic necrosis virus: detection by ELISA, immuno-histochemistry and electron microscopy. *J. Fish Dis.*, 14, 605–618.

JENSEN M.H. (1965). Research on the virus of Egtved disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 126, 422-426.

LANGDON J.S., HUMPHREY J.D., WILLIAMS L.M., HYATT A.D. & WESTBURY H.A. (1986). First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.*, 9, 263–268.

LANNAN C.N., WINTON J.R. & FRYER J.L. (1984). New cell lines. *Fish cells: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. In Vitro*, 20, 671–676.

LORENZEN E., CARSTENSEN B. & OLESEN N.J. (1999). Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Dis. Aquat. Org.*, 37, 81–88.

LORENZEN N., OLESEN N.J. & VESTERGAARD-JORGENSEN P.E. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. *Dis. Aquat. Org.*, 4, 35–42.

MOURTON C., ROMESTAND., DE KINKELIN P., JEFFROY J., LEGOUVELLO R. & PAU B. (1992). A highly sensitive

immunoassay for the direct diagnosis of viral haemorrhagic septicaemia, using anti-nucleocapsid monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol., 30, 2338–2345.

MUNDAY B.L., KWANG J. & MOODY N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. J. Fish Dis., 25, 127–142.

NAKANE P.K. & KAWAOI A. (1974). Peroxidase-labeled antibody, a new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem., 22, 1084–1091.

OLESEN N.J., LORENZEN E. & LAPATRA S. (1999). Production of neutralizing antisera against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus by intravenous infection of rabbits. J. Aquat. Anim. Health, 11, 10–16.

OLESEN N.J. & VESTERGAARD-JORGENSEN P.E. (1992). Comparative susceptibility of three fish cell lines to Egtved virus, the virus of viral haemorrhagic septicaemia. Dis. Aquat. Org., 12, 235–237.

PANZARIN V., PATARNELLO P., MORI A., RAMPAZZO E., CAPPELLOZZA E., BOVO G. & CATTOLI G. & (2010).

Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens.

Arch. Virol., 155, 1193–1203.

PAUL J. (1976). Media for culturing cells and tissues. In: Cell and Tissue Culture, Paul J., ed. Churchill Livingstone, Edinburgh and London, and New York, UK and USA, 91–123.

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

ROIZMAN B. (1991). Family Herpesviridae. In: Classification and Nomenclature of Viruses, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. Arch. Virol. (Suppl. 2). Springer, New York and Vienna, USA and Austria, 103–110.

STOKER M. & MCPHERSON I. (1961). Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus in vitro. Virology,

14, 359–370.

WALKER P. & SUBASINGHE R.P. (2000). DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. FAO Fisheries Technical Paper, n°395, 93 pp.

WOLF K. (1988). Fish Viruses and Viral Diseases. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 476 pp. WOLF K. & QUIMBY M.C. (1962). Established eurythermic line of fish cell in vitro. Science, 135, 1065–1066.

WOLF K. & QUIMBY M.C. (1973). Fish viruses: Buffers and methods for plaquing eight agents under normal atmosphere. Appl. Microbiol., 25, 659–664.

*

* *

ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ ЭПИЗООТИЧЕСКОГО ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА

1. Предмет рассмотрения

Инфекция вирусом эпизоотического гематопозитического некроза - это инфекция вирусом эпизоотического гематопозитического некроза (EHNV) рода *Ranavirus* семейства *Iridoviridae*.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический агент, штаммы возбудителя

EHNV является членом рода *Ranavirus* семейства *Iridoviridae*, типовой вид вирус лягушки 3 (FV3) (Chinchar с соавт., 2005). Другие виды: вирус Боле (BIV), вирус европейских сомов (ECV), вирус обыкновенных сомов (ESV) и ранавирус Сенти-Купер. Следует соблюдать осторожность, когда речь идет о ECV и ESV как о двух отдельных вирусах, поскольку в научной литературе (Nyatt с соавт., 2000) указано, что они являются изолятами одного и того же вируса. В этом роде существует много других условных видов. Ранавирусы были выделены от здоровых или больных лягушек, саламандр и рептилий в Америке, Европе и Австралии (Chinchar, 2002; Drury с соавт., 2002; Fijan с соавт., 1991; Nyatt с соавт., 2002; Speare & Smith, 1992; Whittington с соавт., 2010; Wolf с соавт., 1968; Zupanovic с соавт., 1998). Ранавирусы имеют крупные (150-180 Нм) икосаэдрические вирионы, двухцепочечный ДНК-геном 150-170 КБ и реплицируются как в ядре, так и в цитоплазме (Chinchar с соавт., 2005). Они обладают общими антигенами, которые можно обнаружить несколькими методами.

С момента признания болезни, вызванной EHNV в Австралии в 1986 году, аналогичные системные синдромы некротического иридовируса были зарегистрированы у выращиваемых на фермах рыб. К ним относятся сом (*Ictalurus melas*) во Франции (ECV) (Pozet с соавт., 1992), обыкновенный сом (*Silurus glanis*) в Германии (ESV) (Ahne с соавт., 1989; Ahne с соавт., 1990), тюрбо (*Scophthalmus maximus*) в Дании (Bloch & Larsen, 1993) и другие рыбы в Финляндии (Ariel с соавт., 1999).

EHNV и ECV-это различимые вирусы, которые можно дифференцировать с помощью геномного анализа (Ahne с соавт., 1998; Holopainen с соавт., 2009; Nyatt с соавт., 2000; Mao с соавт., 1996; Mao с соавт., 1997; Marsh с соавт., 2002). Это позволяет проводить эпизоотологическое разделение случаев болезни у пелагических рыб в Австралии (EHNV) и Европе (ECV), а также

дифференцировать их от случаев болезни ранавирусом у лягушек (FV3 и BIV). Однако многие изоляты ранавируса не были охарактеризованы до такого уровня.

2.1.2. Выживание вне хозяина

EHNV чрезвычайно устойчив к высыханию и в воде может сохраняться в течение нескольких месяцев (Langdon, 1989). Он может персистировать в замороженных тканях рыбы более 2 лет (Langdon, 1989), а в замороженных рыбных тушах - как минимум год (Whittington с соавт., 1996). По этим причинам предполагается, что EHNV может персистировать в рыбном хозяйстве в воде и осадке, а также на заводах и оборудовании в течение нескольких месяцев или лет.

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

EHNV чувствителен к 70% этанолу, 200 мг литр⁻¹ гипохлориту натрия или нагреванию до 60°C в течение 15 минут (Langdon, 1989). Данные по инактивации ранавируса амфибий также могут быть актуальны: 150 мг литр⁻¹ хлоргексидина и 200 мг литр⁻¹ пероксимоносульфата калия показали свою эффективность после контакта в течение 1 минуты (Bryan с соавт., 2009). Если EHNV сначала высушить - то в супернатанте клеточной культуры он будет устойчив к нагреванию (Whittington et al., 2010).

2.1.4. Жизненный цикл

Путь заражения неизвестен, но экспериментально рыбы становились восприимчивыми при подвергании их воздействию вируса в ванне. Вирус инфицирует разные типы клеток, включая гепатоциты, гемопоэтические клетки и эндотелиальные клетки во многих органах. (Reddacliff & Whittington, 1996). Вирус выделяется в воду из зараженных тканей и туш по мере их разложения.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды, удовлетворяющие критериям включения в перечень как восприимчивые к заражению EHNV в соответствии с Главой 1.5. *Ветеринарно-санитарного Кодекса водных животных* (Кодекс здоровья водных животных) относятся: черный сомик (*Ameiurus melas*), радужная рыба *Melanotaenia fluviatilis*), Гамбузия Хольбрука (*Gambusia holbrooki*), речной окунь (*Perca fluviatilis*), австралийская маккария (*Macquaria australasica*), гамбузия (*Gambusia affinis*), горная галаксия (*Galaxias olidus*), северная щука (*Esox lucius*), Судак (*Sander lucioperca*), радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*) и серебряный окунь (*Bidyanus bidyanus*).

2.2.2. Виды с неполными доказательствами восприимчивости

Виды, в отношении которых имеются неполные данные, удовлетворяющие критериям включения в перечень как восприимчивых к заражению EHNV в

соответствии с главой 1.5. *Кодекса здоровья водных животных*: не известны.

Кроме того, положительные результаты патоген-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) были получены в отношении следующих организмов (без доказательства активной инфекции): атлантический лосось (*Salmo salar*), пресноводный сом (*Tnadanus tandanus*), золотистый окунь (*Macquaria ambigua*), маккулочелла (*Maccullochella peelii*) и фиолетово-пятнистый пескарь (*Mogurnda adspersa*).

2.2.3. Стадии восприимчивости хозяина

Восприимчивыми хозяевами являются все возрастные классы радужной форели и Европейского окуня.

2.2.4. Видовая или субпопуляционная предрасположенность (вероятность обнаружения)

Клинические признаки обычно более очевидны у мальков и молоди рыб, чем у взрослых особей радужной форели и Европейского окуня.

2.2.5. Целевые органы и инфицированные ткани

Целевые органы и ткани, инфицируемые вирусом: почки, селезенка и печень. Неизвестно, можно ли обнаружить EHNВ в тканях гонад, овариальной жидкости или в молоках, а также пригодны ли эти ткани для наблюдения за маточным поголовьем.

2.2.6. Персистентная инфекция

2.2.6.1. Радужная форель

Высокий уровень летальности и низкая распространенность инфекции EHNВ при естественных инфекциях у радужной форели означает, что уровень популяемости носителей, вероятно, будет очень низким (<2%) (Whittington *с соавт.*, 1994). EHNВ был обнаружен у взрослых рыб, но поскольку гистопатологические поражения, соответствующие инфекции EHNВ, также присутствовали, то наблюдалась активная инфекция, а не состояние носительства (Whittington *с соавт.*, 1999). Анти-EHNВ сывороточные антитела не были обнаружены у мальков возраста 0 + во время или после вспышки, но были обнаружены у небольшого процента выросших рыб, поэтому неясно, являлись ли они выжившими после вспышки (Whittington *с соавт.*, 1994; Whittington *с соавт.*, 1999). Имеются данные по европейским запасам радужной форели для экспериментальных заражений, где были выявлены потенциальные носители (Ariel & Bang Jensen, 2009).

2.2.6.2. Обыкновенный окунь

Этот вид чрезвычайно восприимчив к инфекции EHNV (Whittington & Reddacliff, 1995). EHNV был выделен у 2 из 40 внешне здоровых взрослых европейских окуней во время эпизоотии среди молодежи в Виктории, Австралия (Langdon & Humphrey, 1987), но поскольку инкубационный период длится до 28 дней (Whittington & Reddacliff, 1995), эти рыбы, возможно, находились в доклинической фазе. Несколько изолятов ранавируса были получены от европейского окуня в Виктории во времена, когда не было очевидной эпизоотии, и некоторые, на первый взгляд здоровые европейские окуни в Виктории, имели сывороточные антитела к EHNV или родственному вирусу (Whittington & Nyatt, неопубликованные данные).

2.2.7. Векторы

Птицы являются потенциальными векторами EHNV. Они переносят его в кишечнике, на перьях, ногах и клюве.

2.3. Клиническая картина болезни

2.3.1. Механизмы передачи

2.3.1.1. Радужная форель

EHNV распространился между фермами радужной форели путем переноса зараженных мальков и, вероятно, с транспортировочной водой (Langdon *с соавт.*, 1988; Whittington *с соавт.*, 1994; Whittington *с соавт.*, 1999). Низкая распространенность инфекции у радужной форели означает, что активная инфекция может легко остаться незамеченной в популяции и распространиться через торговлю рыбой. Нет никаких данных о возможной вертикальной передаче EHNV на или внутри икринок, а протоколы дезинфекции икринок не прошли оценку. EHNV еще не был выделен из тканей яичников или из маточного стада. Ежегодное повторное появление болезни у выращиваемой на фермах радужной форели может быть связано с повторным заражением последовательных партий рыбы от дикого обыкновенного окуня, который находится в том же районе лова.

2.3.1.2. Обыкновенный окунь

Появление инфекции EHNV у обыкновенного окуня в расположенных далеко друг от друга речных системах и водоемах, а также его прогрессирование вверх по течению указывает на то, что EHNV распространяется и другими способами, помимо воды; механизмы включают перемещение живой рыбы или приманок рыболовами-любителями. Миграция обыкновенного окуня в Австралии является неопределенной (см. Также раздел 2.2.7 векторы).

2.3.2. Превалентность

2.3.2.1. Радужная форель

Клиническую болезнь, как правило, трудно обнаружить при очень низком

уровне смертности, и инфекция EHNВ может присутствовать на ферме, не вызывая при этом подозрений. Во время вспышек EHNВ был обнаружен путем выделения вируса у 60-80% умирающих или мертвых рыб, и только у 0-4% контактирующих, клинически здоровых рыб. 99% доверительные пределы для превалентности субклинической инфекции составляют 0-8% (Whittington *с соавт.*, 1994; Whittington *с соавт.*, 1999). Вирус невозможно было обнаружить в выживших когортах после вспышки болезни. Антитела к анти-EHNВ были обнаружены у взрослых рыб при низкой превалентности (0,7%, 95% доверительный интервал 0,02% - 3,7%).

2.3.2.2. Обыкновенный окунь

Данную болезнь распознают по эпизоотической смертности рыб любого возраста, поражающей очень большую часть популяции с резким сокращением численности (Langdon *с соавт.*, 1986; Langdon & Humphrey, 1987; Whittington *с соавт.*, 1996). Как правило, в эндемичных районах наблюдается поражение мальков и молоди, однако в свежееинфицированных районах поражение наблюдается и у взрослых особей. Когда болезнь впервые обнаруживают в каком-либо районе, происходит резкое сокращение численности популяции (Langdon *с соавт.*, 1986; Langdon & Humphrey, 1987; Whittington *с соавт.*, 1996).

Исследования, о которых говорится выше, были проведены еще до появления ПЦР в реальном времени, которая может иметь большую диагностическую чувствительность и выявлять более высокую превалентность в субклинически инфицированных популяциях.

2.3.3. Географическое распределение

2.3.3.1. Радужная форель

Заражение EHNВ известно только на рыбных фермах, расположенных в бассейнах рек Маррамбиджи и Шолхейвен в Новом Южном Уэльсе, Австралия (Whittington *с соавт.*, 2010).

2.3.3.2. Обыкновенный окунь

Инфекция EHNВ является эндемичной в Юго-Восточной Австралии, но имеет прерывистое распространение (Whittington *с соавт.*, 2010). Эта инфекция встречается во многих мелких и крупных водоемах в Виктории и с 1986 года постепенно распространяется вверх по течению в бассейне реки Маррамбиджи через Новый Южный Уэльс и Территорию столицы Австралии. Аналогичное распространение наблюдалось и в реке Муррей в Южной Австралии (Whittington *с соавт.*, 1996).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

2.3.4.1. Радужная форель

По-видимому, в естественных условиях EHNВ слабо заразен, но дает высокий уровень смертности. Инфекция EHNВ может присутствовать на ферме, не

вызывая подозрений, потому что уровень смертности не поднимается выше обычного фонового уровня. Чаще всего инфекция EHNV регистрировалась у мальков с длиной тела по Смитту <125 мм, суточная смертность составляла менее 0,2% , а общая смертность - до 4%. Тем не менее, восприимчивой является радужная форель всех возрастов, хотя инфекция еще не была замечена в маточном поголовье (Whittington *et al.*, 1994; Whittington *с соавт.*, 1999). Болезнь оказывает слабое прямое влияние на экономику по причине низкого уровня смертности. Могут наблюдаться различия в восприимчивости между европейскими и австралийскими поголовьями радужной форели (Ariel & Bang Jensen, 2009).

2.3.4.2. Обыкновенный окунь

Существует очень высокий уровень инфицирования и смертности в естественных вспышках, что со временем приводит к сокращению популяций диких рыб (Langdon *с соавт.*, 1986; Langdon & Humphrey, 1987; Whittington *с соавт.*, 1996). Экспериментальная инокуляция в ванне всего лишь 0,08 TCID₅₀ 50 мл⁻¹ оказалась смертельной, а дозы, слишком низкие, чтобы быть обнаруженными при выделении вируса в клетках BF-2, были смертельными при внутрибрюшинной инокуляции (Whittington & Reddacliff, 1995). Между европейскими и австралийскими поголовьями обыкновенного окуня могут иметься различия в восприимчивости (Ariel & Bang Jensen, 2009).

2.3.5. Факторы окружающей среды

2.3.5.1. Радужная форель

Вспышки, по-видимому, связаны с плохими условиями в хозяйствах, особенно с высокой плотностью посадки, недостаточным потоком воды и загрязнением резервуаров с кормом. Поврежденная кожа может являться путем проникновения EHNV. Вспышки болезни наблюдались на фермах, где температура воды варьировала от 11 до 20°C (Whittington *с соавт.*, 1994; Whittington *с соавт.*, 1999). Инкубационный период после внутрибрюшинной инокуляции составлял 3-10 дней при температуре 19-21°C по сравнению с 14-32 днями при температуре 8-10°C (Whittington & Reddacliff, 1995).

2.3.5.2. Обыкновенный окунь

Естественная эпизоотия EHNV, поражающая молодь и взрослых особей обыкновенного окуня, происходит в основном летом (Langdon *с соавт.*, 1986; Langdon & Humphrey, 1987; Whittington *с соавт.*, 1994). Предполагают, что заболевание молоди связано с ежегодным появлением большого количества молодых рыб, не имеющих иммунитета, и последующим влиянием на них вируса, когда стаи находятся на мелководье; взрослые особи редко вовлечены в подобные вспышки. Вполне возможно, что температура окружающей среды является триггером для вспышек, поскольку молодые рыбы питаются планктонной фауной на теплом мелководье , в то время как взрослые особи питаются бентическими беспозвоночными и более крупной добычей в более глубоких и более холодных водах (Whittington & Reddacliff, 1995). В условиях

эксперимента инкубационный период составлял от 10 до 28 дней при температуре 12-18°C и 10-11 дней при температуре 19-21°C; взрослые окуни были невосприимчивы к инфекции при температуре ниже 12°C (Whittington & Reddacliff, 1995). Европейское поголовье обыкновенного окуня также показало зависимость восприимчивости от температуры (Ariel & Bang Jensen, 2009).

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Отсутствует

2.4.2. Химиотерапия

Отсутствует

2.4.3. Иммуностимуляция

Исследования не проводились.

2.4.4. Разведение резистентных к штаммам популяций

Официальной программы разведения резистентных к штаммам популяций восприимчивых видов не существует. Тем не менее, экспериментальные исследования с подверганием воздействию вирусу в ванне показали, что обыкновенный окунь из водоемов в Новом Южном Уэльсе, Австралия, у которого ранее была инфекция EHNВ, показал более низкую смертность по сравнению с обыкновенным окунем из соседних и отдаленных водоемов в Австралии, где EHNВ никогда не был зарегистрирован (Becker *с соавт.*, 2016).

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

Исследования не проводились.

2.4.6. Блокирующие агенты

Исследования не проводились.

2.4.7. Дезинфекция яиц и личинок

Исследования не проводились.

2.4.8. Общая практика ведения хозяйства

Борьба с болезнями радужной форели на уровне фермерских хозяйств основана на снижении воздействия инфекции за счет поддержания низких темпов посадки и надлежащего качества воды. Расследования на одной из ферм по разведению

радужной форели показали, что пруды с высокой плотностью посадки и слабым потоком воды и, следовательно, более низким качеством воды могут привести к более выраженному клиническому проявлению болезни по сравнению с прудами на той же ферме с более низкой плотностью посадки и более высокой скоростью потока воды (Whittington *с соавт.*, 1994). Механизм защиты может заключаться в поддержании здорового кожного покрова (Whittington *с соавт.*, 1994).

3. Отбор проб

3.1. Отбор индивидуальных образцов

Для культивирования клеток и проведения иммуноферментного анализа (ИФА) был валидирован простой метод подготовки тканей рыб (Whittington & Steiner, 1993).

Крупную рыбу помещают в ванну с 70% этанолом на 30 секунд; мальков помещают в ванну с 70% этанолом на 5 секунд, а затем промывают в стерильной воде. Рыбу препарируют с соблюдением принципов асептики в боксе биологической безопасности II класса.

3.1.1. Крупная рыба (длина туловища по Смитту >60 мм)

Извлекают 0,1 г печени, почек, селезенки ($\pm$ другие органы в отдельных случаях) и помещают в стерильные пробирки по 1,5 мл. Существуют пробирки с пестиками, пригодные для измельчения тканей (см. ниже), но можно использовать стандартные пробирки объемом 1,5 мл. В некоторых случаях печень, почки и селезенку можно объединить в одну пробирку (см. Раздел 3.3).

3.1.2. Средняя рыба (длина туловища по Смитту 30-60 мм)

Необходимо соскоблить все внутренности в пробирку.

3.1.3. Мелкая рыба (длина туловища по Смитту <30 мм)

Голову и хвост удаляют, остальную часть рыбы помещают в пробирку.

3.2. Сохранение образцов для представления

Для культивирования клеток и проведения ИФА пробирки с тканями замораживают при температуре от -20°C до -80°C до появления необходимости в их использовании. Для светового микроскопического исследования ткани фиксируют в 10% нейтральном буферном формалине.

3.3. Объединение проб в пулы

Влияние объединения образцов тканей от нескольких рыб на чувствительность диагностических тестов не было оценено.

3.4. Лучшие органы или ткани

Печень, передняя почка, селезенка.

3.5. Неподходящие образцы / ткани

Неподходящие ткани включают гонады, гонадные жидкости, молоки и икринки, так как нет никаких доказательств инфекции репродуктивных путей, и нет никакой информации об участии маточного стада в инфекционном цикле.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Нет никаких специфических клинических признаков. Рыб находят мертвыми. Возможно, имеются клинические свидетельства плохой практики ведения хозяйства, такие как повышенная плотность посадки и неоптимальное качество воды, проявляющееся в виде поражений кожи, плавников и жабр (Reddacliff & Whittington, 1996).

4.1.2. Изменение поведения

У умирающей рыбы может наблюдаться потеря равновесия, оттопыренные жаберные крышки, и она может быть темного цвета (Reddacliff & Whittington, 1996).

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

На коже, плавниках и жабрах могут отсутствовать макроскопические или неспецифические поражения. У небольшой части рыб может наблюдаться увеличение почек, печени или селезенки. В печени могут быть очаговые бело-желтые поражения, соответствующие областям некроза (Reddacliff & Whittington, 1996).

4.2.2. Клиническая химия

Не применимо.

4.2.3. Микроскопические патологические изменения

Острый очаговый, многоочаговый или локальный обширный коагуляционный или колликвационный некроз печени, гематопозитические почки и селезенка обычно видны в окрашенных гематоксилином и эозином (H&E) срезах фиксированного формалином материала. Можно увидеть небольшое количество базофильных интрацитоплазматических телец-включений, особенно в областях,

непосредственно окружающих некротические участки в печени и почках. Некротические поражения могут также наблюдаться в сердце, поджелудочной железе, желудочно-кишечном тракте, жабрах и псевдобранхии (Reddacliff & Whittington, 1996).

4.2.4. Срезы нефиксированной ткани

Не применимо.

4.2.5. Мазки

Исследования не проводились.

4.2.6. Электронная микроскопия / цитопатология

Пораженные ткани (например, почки, печень и селезенка) содержат некротические клетки. Клетки содержат очевидные цитоплазматические включения, представляющие собой разреженные участки цитоплазмы, в которых происходит сборка вирусов. В цитоплазме видны агрегаты (паракристаллические массивы) крупных ($175 \text{ Нм} \pm 6 \text{ Нм}$) безоболочечных икосаэдрических вирусов; также присутствуют одиночные вирусы. Полные вирусы (содержащие электронно-плотные ядра) отпочковываются от/выходят из инфицированных клеток через плазматическую мембрану. Ядра инфицированных клеток часто располагаются периферически и имеют искаженную форму.

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Вид микроскопии

4.3.1.1.1.1. Световая микроскопия

Следующие рутинные методы могут быть использованы для фиксации тканей: фиксация в 10% буферном нейтральном формалине, заливка парафином, подготовка срезов 10 мкм и их окрашивание гематоксилином и эозином для демонстрации некроза тканей и базофильных интрацитоплазматических телец-включений. Эти тельца-включения могут указывать на инфекцию EHNV, но не подтверждают ее наличие. Фиксированные формалином залитые парафином срезы также могут быть окрашены с помощью иммунопероксидазного метода (см. ниже) для идентификации антигена EHNV, ассоциированного с некротическими поражениями.

4.3.1.1.1.2. Электронная микроскопия

Для подготовки тканей и культур клеток можно использовать рутинные методы ультратонких срезов (*Eaton et al., 1991*), чтобы продемонстрировать некроз тканей, наличие вирусов и вирусных телец-включений. Для обнаружения антигена можно использовать ткани и клетки, зафиксированные с помощью альтернативного метода фиксации и заливки (Nyatt, 1991).

4.3.1.1.1.3. Электронная микроскопия с негативным контрастированием

Для обнаружения вирусов можно использовать супернатанты из гомогенизированных в гомогенизаторе Даунса тканей (10% [масса/объем]) и клеточных культур. Ранавирусы имеют определенный внешний вид. Они различаются по диаметру (150-180 Нм) и имеют ограничивающую клеточную оболочку (плазматическую мембрану), которая окружает капсид со спиральной симметрией. В основе капсида лежит мембрана *de novo*, которая сама окружает ядро, содержащее двухцепочечную ДНК (ds) и минорные белки. Эти препараты также можно использовать для подтверждения антигенности ранавируса (*Eaton с соавт., 1991*).

4.3.1.1.2. Тип образца

4.3.1.1.2.1. Срезы нефиксированной ткани

Не применимо.

4.3.1.1.2.2. Мазки

Не применимо.

4.3.1.1.2.3. Фиксированные срезы

См. раздел 4.3.1.1 Микроскопические методы.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток / искусственные среды

4.3.1.2.1.1. Подготовка тканей рыб для выделения вируса и ИФА

Был валидирован простой метод подготовки тканей рыб для культивирования клеток и ИФА (Whittington & Steiner, 1993) (см. Раздел 3. Отбор индивидуальных образцов).

Заморозить пробирки, содержащие ткани, при -80°C до тех пор, пока не возникнет необходимость в их использовании.

- i) Добавить 0,5 мл гомогенизирующей среды (минимальная эссенциальная среда Игла, с солями Эрла с глутамином) [MEM] с 200 международными единицами [IU] мл⁻¹ пенициллина, 200 мкг мл⁻¹ стрептомицина и 4 мкг мл⁻¹ амфотерицина В) в каждую пробирку. Измельчить ткань до мелкой

мульчи с помощью стерильного пестика.

- ii) Добавить еще 0,5 мл гомогенизирующей среды в каждую пробирку и перемешать пестиком.
- iii) Добавить в каждую пробирку по три стерильных стеклянных шарика (диаметром 3 мм) и закрыть пробирку крышкой.
- iv) Тщательно перемешать суспензию на вортексе в течение 20-30 секунд и оставить при температуре 4°C на 2 часа.
- v) Перемешать суспензию еще раз, как указано выше, и центрифугировать в течение 10 минут при 2500 *g* в настольной микроцентрифуге.
- vi) Перенести супернатант, который теперь называется осветленным гомогенатом ткани, в свежую стерильную пробирку. Гомогенаты можно замораживать при температуре -80°C до тех пор, пока они не понадобятся для выделения вируса и проведения ИФА.

4.3.1.2.1.2. Культура клеток / искусственные среды

ЕННУ хорошо растет во многих клеточных линиях рыб, включая BF-2 (малек синезаберника ATCC CCL 91), FHM (черный толстоголовый голянь; ATCC CCL 42), EPC (*epithelioma papulosum cyprini* [Cinkova *с соавт.*, 2010]) и CHSE-214 (клеточная линия эмбриона чавыча; ATCC CRL 1681) при температурах от 15 до 22°C (Crane *et al.*, 2005). Температуры инкубации 20°C или 24°C приводят к более высоким титрам, чем 15°C; для максимального увеличения титра рекомендуется использовать клетки BF-2 EPC или CHSE-214 и температуру 22°C. Это может быть важно для обнаружения низких количеств вирусов в тканях рыб (Ariel *с соавт.*, 2009). Референтные лаборатории МЭБ предпочитают использовать клетки BF-2 при температуре инкубации 22°C. Процедура для клеток BF-2 приведена ниже. Процедура для клеток CHSE-214 при иммунопероксидазном окрашивании приведена ниже (Раздел 4.3.1.2.2). Идентичность вирусов в клеточной культуре определяется с помощью иммунного окрашивания, ИФА, иммуноэлектронной микроскопии, полимеразной цепной реакции (ПЦР) или других методов.

Образцы: гомогенаты тканей.

Техническая процедура культивирования клеток: клетки культивируют (в колбах, пробирках или многолуночных планшетах) с питательной средой (MEM + 10% фетальная телячья сыворотка [ФТС] со 100 МЕ мл⁻¹ пенициллина, 100 мкг мл⁻¹ стрептомицина и 2 мкг мл⁻¹ амфотерицина В). Клетки инкубируют почти до полного слияния при температуре 22°C, что может занять до 4 дней в зависимости от скорости роста. Среду меняют на поддерживающую среду (MEM с 2% ФТС и 100 МЕ мл⁻¹ пенициллина, 100 мкг мл⁻¹ стрептомицина и 2 мкг мл⁻¹ амфотерицина В) в день инокуляции. Из одиночных или объединенных гомогенатов готовят разведение 1/10 с использованием гомогенизирующей среды. Каждую культуру инокулируют 100 мкл образца на мл культуральной среды. Это представляет собой окончательное разведение 1/100 гомогената ткани (0,1 мг мл⁻¹). Далее делают разведение 1/10, представляющее собой окончательное разведение

1/1000, и инокулируют две культуры. Стадию адсорбции не проводят. В качестве альтернативы две-три культуры можно инокулировать непосредственно 10 мкл неразбавленного гомогената на мл культуральной среды. Обратите внимание, что высокая степень токсичности клеток или загрязнения часто сопровождается использованием большого количества неразбавленного инокулята. Культуры инкубируют при температуре 22°C в инкубаторе в течение 6 дней. Культуры считывают на 3-й и 6-й день. Культуры пропускают как минимум один раз, чтобы обнаружить образцы с низкими уровнями вируса. На 6-й день первичные культуры (P1) замораживают на ночь при температуре -20°C, размораживают, осторожно перемешивают, а затем супернатант культуры инокулируют на свежие клетки, как и раньше (P2), т. е. 100 мкл супернатанта P1 на мл культуральной среды. Оставшиеся супернатанты P1 переносят в стерильные пробирки по 5 мл и помещают при температуре 4°C для тестирования методом ИФА или ПЦР или другим способом, чтобы подтвердить, что причиной цитопатического эффекта (ЦПЭ) является EHNВ. P2 инкубируют, как указано выше, и при необходимости процедуру проводят в третий раз.

4.3.1.2.1.3. Интерпретация результатов

ЦПЭ хорошо развит и состоит из очагового лизиса, окруженного округлыми зернистыми клетками. Это изменение быстро распространяется на весь монослой, который отделяется и распадается.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

Следует отметить, что поликлональные антитела, используемые во всех родственных методах (иммунопероксидаза, ИФА с захватом антигена и иммуноэлектронная микроскопия), перекрестно реагируют со всеми известными ранавирусами, за исключением ранавирусов Santee Cooper (Ahne с соавт., 1998; Cinkova с соавт., 2010; Hedrick с соавт., 1992; Nyatt с соавт., 2000).

4.3.1.2.2.1. Обнаружение EHNВ с помощью иммуноцитохимии инфицированных клеточных культур

4.3.1.2.2.1.1. Принцип проведения теста

Репликация EHNВ происходит внутри культивируемых клеток. Добавление мягкого детергента пермеабилзирует клетки, позволяя аффинно очищенному кроличьему антителу связываться с внутриклеточными вирусными белками. EHNВ обнаруживают с помощью биотинилированного анти-видового антитела и конъюгата стрептавидин-пероксидазы. Добавление субстрата приводит к "кирпично-красному" окрашиванию участков, маркированных антителами.

4.3.1.2.2.1.2. Рабочие характеристики

При выполнении, как описано в этом протоколе, окрашивание является заметным и специфичным. Однако этот тест не был валидирован с точки

зрения чувствительности или воспроизводимости.

4.3.1.2.2.1.3. Образцы

Гомогенаты тканей.

4.3.1.2.2.1.4. Подготовка клеток

Процедура, описанная ниже, предназначена для клеток CHSE-214. Можно также использовать и другие рекомендуемые клеточные линии.

- i) CHSE-214, 24-луночные планшеты засевают за день до использования 250 000 клеток/лунку (или 4 млн. клеток в 40 мл питательной среды на планшет) в 1,5 мл питательной среды (Эрла MEM с неосновными аминокислотами [EMEM], 10% ФТС, 10 ммоль N-2-гидроксиэтил-пиперазин-N-2-этансульфоновой кислоты [HEPES], 2 ммоль глутамина, 100 МЕ пенициллина и 100 мкг стрептомицина) и инкубируют в 5% CO₂ при температуре 22°C в течение ночи.

Примечание: культуры должны быть почти сливающимися и иметь здоровые делящиеся клетки перед использованием.

- ii) Среду удаляют, в каждую лунку вносят по 150 мкл 10% - ной суспензии измельченной ткани (например, печени, почек или селезенки), инкубируют в течение 1 часа (22°C), затем добавляют 1,5 мл свежей поддерживающей среды (как и для питательной среды, за исключением 2% ФТС) и возвращают в инкубатор (22°C).
- iii) За культурами ведут наблюдение на предмет появления цитопатического эффекта. Если к 10-му дню цитопатический эффект не возникает, культуры переносят на свежие клетки CHSE, собирая клетки и среду и добавляя 150 мкл к клеткам свежего планшета; обратите внимание, что клетки не замораживают и не размораживают. Нет никакой необходимости сливать имеющуюся среду, необходимо просто вернуть новый планшет в инкубатор (22°C). Снова ежедневно наблюдают за появлением цитопатического эффекта.
- iv) Клетки фиксируют (добавляют 50 мкл в 96-луночный планшет с 200 мкл/лунка культуральной среды или 400 мкл (для 24-луночных планшетов с 1,6 мл/лунка культуральной среды) 20% - ного раствора формалина в каждую лунку), не сливая культуральную среду при первом появлении цитопатического эффекта. После инкубации (22°C) в течение 1 часа при комнатной температуре (RT) смесь среда/формалин сливают и лунки дважды промывают PBS-A (фосфатный буферный физиологический раствор, свободный от Ca⁺⁺ и Mg⁺⁺) для удаления формалина. Если планшеты необходимо хранить при температуре 4°C, то добавляют больше PBS-A.

4.3.1.2.2.1.5. Протокол

- i) Развести первичное антитело против EHNВ и нормальную сыворотку до рабочего, как описано ниже (протокол фиксации для иммуноцитохимии) для соответствующего агента в 1% растворе обезжиренного молока (SM) (PBS-A [SM]) до объема, необходимого

для теста.

- ii) Удалить PBS-A из лунки (с фиксированными культурами клеток) и дважды промыть лунки 0,05% (v/v) PBS/Tween 20 (PBST). Добавить 50 мкл растворов первичных антител в каждую лунку в 96-луночного планшета или 200 мкл в 24-луночный планшет. Инкубировать на планшетном шейкере при 100-200 об / мин при комнатной температуре (22-24°C) в течение 15-30 минут или без встряхивания при 37°C в течение 1 часа.
- iii) Развести биотинилированную анти-видовую сыворотку (вторичное антитело) в 0,1% растворе SM, как описано в протоколе фиксации (ниже) для соответствующего агента, до объема, необходимого для проведения теста.
- iv) Удалить раствор первичного антитела и промыть лунки три раза PBST. Добавить вторичные антитела в каждую лунку. Инкубировать на планшетном шейкере при 100-200 об / мин при комнатной температуре (22-24°C) в течение 15-30 минут или без встряхивания при 37°C в течение 1 часа.
- v) Развести конъюгат стрептавидин-пероксидаза в 0,1% растворе SM для соответствующего агента до объема, необходимого для проведения теста.
- vi) Удалить вторичные антитела из лунки и трижды промойте лунки с помощью PBST. Добавить конъюгат в каждую лунку. Инкубировать на планшетном шейкере при 100-200 об / мин при комнатной температуре (22-24°C) в течение 15-30 минут или без встряхивания при 37°C в течение 1 часа.
- vii) Приготовить исходный субстрат из раствора 3-амино-9-этилкарбазола (АЭК): растворить одну таблетку АЕС (20 мг) в 2,5 мл диметилформамида.
- viii) Удалить конъюгат из лунок. Промыть (три раза) с помощью PBST.
- ix) Развести разбавленный исходный раствор АЭК в 47,5 мл ацетатного буфера (4,1 мл безводного ацетата натрия в 1 л деионизированной воды; рН довести до 5,0 с помощью ледяной уксусной кислоты). Непосредственно перед использованием добавить 25 мкл 30% - ной перекиси водорода в раствор АЭК, а затем добавить в каждую лунку. Инкубировать при комнатной температуре в течение 20 минут.
- x) Удалить раствор субстрата и дважды промыть лунки деионизированной водой, чтобы остановить реакцию.
- xi) Чтобы визуализировать все клетки необходимо произвести контрастирующее окрашивание гематоксилином Майера (50 мкл / лунка или 200 мкл / лунка) в течение 1 минуты и промыть деионизированной водой.
- xii) Добавить 50 мкл водопроводной воды Скотта, ополоснуть деионизированной водой и высушить на воздухе.

4.3.1.2.2.1.6. Интерпретация результатов

Положительная реакция: зернообразное, очаговое кирпично-красного цвета окрашивание клеток указывает на наличие вируса, идентифицированного диагностическим антителом.

Отрицательная реакция: отсутствие видимого красного окрашивания – все клетки должны быть окрашены в бледно-голубой цвет из-за контрастирующего окрашивания.

Фоновое окрашивание: незернистое, неочаговое, более генерализованное, бледное, розоватое окрашивание может происходить по всей культуре. Это фоновое окрашивание может быть вызвано целым рядом причин, например, неспецифической реакцией антител с невирусными компонентами, неэффективной промывкой и истечением срока годности других реагентов.

4.3.1.2.2.1.7. Реагенты для иммуоцитохимических тестов 4.3.1.2.2.1.7.1.

20% раствор формальдегида (PBS-A)

Формалин (36-38% формальдегид)	54 мл
Дистиллированная вода	36 мл
10 × PBS-A	10 мл

4.3.1.2.2.1.7.2. 10 × PBS-A

Для приготовления 1 литра 10 × PBS-а использовать:

NaCl	80.0 г
Na ₂ HPO ₄	11.5 г
KCl	2,0 г
KH ₂ PO ₄	2,0 г
Дистиллированная вода	1,0 л

Примечание: некоторые соли поставляются с дополнительными группами воды. При использовании этих реагентов необходимо отрегулировать массы, чтобы обеспечить соответствующую массу соли, например, для Na₂HPO₄ · 2H₂O необходимо добавить 15 г вместо 11,5 г (156 МВт / 120 МВт × 11,5 г = 14,95 г), чтобы устранить влияние молекул воды.

4.3.1.2.2.2. Обнаружение EHNВ с помощью ИФА с захватом антигена

ИФА с захватом антигена была валидирована для обнаружения EHNВ в клеточных культурах и непосредственно в гомогенатах тканей рыб. Аналитическая чувствительность составляет от 10³ до 10⁴ ЦПД₅₀ мл⁻¹. Специфичность приближается к 100% , а чувствительность для прямого обнаружения в тканях рыб составляет 60% по отношению к выделению

вируса в клетках BF-2 (Hyatt с соавт., 1991; Whittington & Steiner, 1993). Реакция нейтрализации не может быть использована для идентификации EHNВ, поскольку нейтрализующие антитела не вырабатываются после иммунизации млекопитающих или рыб. Мышиные моноклональные антитела, продуцируемые против EHNВ, направлены против основных эпитопов капсидного белка (МСР). Кроличьи анти-EHNВ антитела были разработаны для использования в ИФА с захватом антигена, иммунопероксидазном окрашивании и иммуноэлектронной микроскопии (Hengstberger с соавт., 1993; Hyatt с соавт., 1991; Reddacliff & Whittington, 1996). Реактивы и протоколы доступны в справочной лаборатории.

4.3.1.2.2.2.1. Образцы

Образцы гомогената тканей, приготовленные по протоколу (см. ниже), а также клеточные культуры.

4.3.1.2.2.2.2. Принцип проведения теста

Аффинно очищенное кроличье антитело, нанесенное на пластину, захватывает частицы EHNВ из образца. С помощью второго антитела и конъюгата, меченного пероксидазой, обнаруживают EHNВ, используя хромоген АВТS (2,2' - Азино-Ди - [3-этилбензтиазолин] - 6-сульфоукислота). Фермент инактивируется через 20 минут, и полученную оптическую плотность (OD) сравнивают со стандартами.

4.3.1.2.2.2.3. Рабочие характеристики

Протокол основан на опубликованных процедурах (Hyatt с соавт., 1991; Steiner с соавт., 1991; Whittington, 1992; Whittington & Steiner, 1993). При проведении испытаний, как это описано в настоящем протоколе, рабочие характеристики испытания будут как те, что приведены в Таблице 4.1. Точность анализа составляет <10% коэффициента вариации, измеряемой как изменение оптической плотности контролей между планшетами и с течением времени, когда соблюдается рекомендуемая процедура нормализации.

Таблица 4.1. Рабочие характеристики ИФА для обнаружения EHNВ по сравнению с выделением вируса в клетках BF-2

Образец	Положительно-отрицательный порог ¹	Чувствительность %	Специфичность %
Ткани рыбы ²	ОП 0,5	60	>99
Супернатанты культуры тканей с цитопатическим эффектом (клетки BF2)	ОП 0.3	>99	>99

1. Данные пороговые значения определены референтной лабораторией МЭБ по EHNВ и будут варьироваться в зависимости от партии контрольного антигена. Приведенные выше значения относятся к партии 86/8774-4-5-01.
2. Только европейский окунь и радужная форель. Более высокая фоновая ОП возникает при исследовании золотистого окуня. По другим видам данных нет.

4.3.1.2.2.2.4. Тестовые компоненты и подготовка реагентов

- i) Необходимы микротитровальные планшеты с плоским дном.
- ii) Аффинные очищенные кроличьи анти-EHNВ иммуноглобулины и овечьи анти-EHNВ антисывороточные реагенты поставляют в лиофилизированном виде. Восстановить с помощью 1 мл очищенной воды и дать флакону постоять при комнатной температуре в течение 2 минут. Осторожно перемешать содержимое пробирки. Данные реагенты сохраняют стабильность как минимум в течение 4 лет, если их хранить при температуре -20°C. Для рутинного использования в ИФА рекомендуется, чтобы рабочие запасы обоих антител были приготовлены в виде 1/10 разведения в Трис-буферном солевом растворе с глицерином и мертиолятом TSGM (формула в конце этого раздела). Такие запасы сохраняют стабильность как минимум в течение 5 лет при температуре -20°C и не затвердевают при этой температуре.
- iii) Конъюгат антиовечьих иммуноглобулинов, меченный пероксидазой (коммерческий реагент, KPL #14-23-06; 0,5 мг) поставляется в виде лиофилизированного порошка. Данный реагент показал замечательное постоянство в плане активности в разных партиях в течение 15 лет. Продукт необходимо восстановить в стерильной 50% - ной глицериновой воде, разлить на аликвоты по 150 мкл и хранить при температуре -20°C в неразбавленном виде. Рабочий раствор получают путем добавления 900 мкл TSGM к 100 мкл неразбавленного запаса. Рабочий раствор также хранят при температуре -20°C, и он сохраняет стабильность не менее 1 года. Титрование новые партии данного конъюгата проводят против более старой партии, следуя стандартным протоколам.
- iv) Термически инактивированный контрольный антиген EHNВ поставляется в виде лиофилизированного порошка. Восстановить в 1 мл стерильной воды и хранить в небольших аликвотах при температуре -20°C. Приготовить разведения с использованием PBSTG (PBS + Tween + желатин) в тот день, когда проводится тест. Контрольные разведения

антигенов EHNВ (А, В, D и F) охватывают диапазон сигнальной реакции анализа и позволяют провести процедуру нормализации.

4.3.1.2.2.5. Оборудование

Рекомендуется использовать автоматическую мойку планшетов, хотя их можно мыть и вручную. Анализ чувствителен к условиям промывки планшетов. Если оптическая плотность контролей неожиданно низка, а конъюгат и другие реагенты находятся в пределах срока годности, оборудование для мойки планшетов следует отрегулировать таким образом, чтобы давление промывки при заполнении и аспирации лунок было сведено к минимуму.

Рекомендуется использовать автоматический считыватель для планшетов, хотя результаты можно считывать и на глаз.

Для приготовления разведений всех реагентов и для переноса реагентов в лунки микротитровального планшета используют прецизионные откалиброванные пипетки (например, Gilson).

4.3.1.2.2.6. Протокол

- i) Сенсибилизировать 96-луночный планшет для ИФА (100 мкл/лунка) аффинно очищенным кроличьим-анти-ЕНВ, разбавленным 1/12800 в боратном буфере для сенсибилизации. Инкубировать в течение ночи при температуре 4°C.
- ii) Промыть планшет пять раз с помощью промывочного буфера (очищенная вода Milli-Q (MQ) плюс 0,05% Tween 20). Обратите внимание, что на этом и всех других этапах можно также использовать дистиллированную и деионизированную воду.
- iii) Приготовить блокирующий раствор: нагреть растворы в микроволновой печи или на водяной бане, чтобы растворить желатин, затем охладить до комнатной температуры.
- iv) Блокировать оставшиеся сайты связывания с помощью блокирующего раствора (100 мкл / лунка) (1% [масса/объем] желатина в разбавителе PBSTG [ФБР, 0,05% [об/об] Tween 20, 0,1% [масса/объем] желатина]). Инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут.
- v) Помыть планшет пять раз, как указано выше.
- vi) Работу проводить в боксе биологической безопасности класса II. Развести контрольный антиген (см. ниже) в PBSTG и добавить в нижний правый угол планшета. Добавить образцы гомогената ткани или образцы супернатанта культуры и контрольные антигены (100 мкл / лунку) Добавить все образцы и контроли в дублирующие лунки. Инкубировать в течение 90 минут при комнатной температуре.

Контрольные антигены - это разведения убитого нагреванием супернатанта клеточной культуры EHNВ 86/8774. Ожидается, что контроли дадут следующие показатели оптической плотности, хотя в разных лабораториях будут наблюдаться некоторые вариации, и поэтому следует допускать вариации $\pm 10\%$:

Контроль	Разведение в PBS ¹	Оптическая плотность (405 нм) ¹
A	1/5	>2.0
B	1/40	1,90
D	1/200	0,68
F	1/3000	0,16

1. Эти разведения и значения оптической плотности определяются референтной лабораторией МЭБ по инфекции EHNV и будут варьироваться в зависимости от партии контрольного антигена. Приведенные выше значения относятся к партии 86/8774-4-5-01. Положительно-отрицательный порог для образцов осветленного гомогената тканей европейского окуня и радужной форели в этом ИФА аппроксимировано значением оптической плотности контроля D на каждом планшете.

- vii) Промыть пластину вручную, чтобы избежать контаминации устройством для промывки планшетов. Работу проводить в кабинете класса II. Аспирировать жидкость из лунок с помощью многоканальной пипетки. Дважды ополоснуть планшет.
- viii) Промыть планшет пять раз на устройстве для мытья планшетов, как описано выше.
- ix) Добавить второе антитело овцы-анти-EHNV, разведенное 1/32 000 в PBSTG (100 мкл/лунка). Инкубировать в течение 90 минут при комнатной температуре.
- x) Промыть планшет пять раз на устройстве для мытья планшетов.
- xi) Добавить конъюгат, разведенный 1/1500 в PBSTG (100 мкл/лунка). Инкубировать в течение 90 минут при комнатной температуре.
- xii) Промыть планшет пять раз на устройстве для мытья планшетов.
- xiii) Добавить субстрат ABTS (22 мл ABTS + 10 мкл H₂O₂) (100 мкл/лунка) и поместите планшет на планшетный шейкер. Время этого этапа начинается с момента добавления субстрата в первые лунки планшета 1. Инкубировать в течение 20 минут.
- xiv) Немедленно добавить стоп-раствор ABTS (50 мкл / лунка), слегка встряхнуть планшет и считать оптическую плотность при длине волны 405 нм. Рассчитать среднее значение полученной при ИФА оптической плотности дублирующих лунок. Рассчитать коэффициент вариации дубликатов: образцы с коэффициентом вариации >15% должны быть повторно протестированы, если среднее значение оптической плотности лежит вблизи положительно-отрицательного порога.

4.3.1.2.2.2.7. Нормализация данных и контроль качества пределов обнаружения

Если требуется нормализовать данные от планшета к планшету и с течением времени, или принять контроля качества предела обнаружения, можно выполнить следующую процедуру. Прогнать контрольные антигены в ИФА не менее пяти раз в течение 3 недель (всего 20 отдельных планшетов ИФА). Вычислить среднее значение оптической плотности для каждого контрольного антигена. Затем для каждого последующего используемого планшета рассчитать поправочный коэффициент планшета (PCF) следующим образом:

ФКП = (средний контроль ОП/фактическая ОП + средний контроль ОП В/фактическая ОП + средний контроль ОП D/фактическая ОП + средний контроль ОП F/фактическая ОП)/4. Умножить фактическое среднее значение ОП каждого образца на PCF для этого планшета и указать эти значения.

Допускается вариабельность PCF в пределах от 0,8 до 1,2, что приближается к коэффициенту вариации 10%. Значения за пределами этого диапазона говорят о том, что в отношении данного планшета необходимо провести повторное тестирование. Графики PCF с течением времени являются готовым средством контроля стабильности реагентов, процедурных вариаций и ошибок оператора. Данный метод контроля качества был валидирован для ИФА с захватом антигена.

4.3.1.2.2.2.8. Буферы и другие реагенты

4.3.1.2.2.2.8.1. Боратный буфер

Борная кислота	6.18 г
Тетраборат динатрия ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	9.54 г
NaCl	4.38 г
MQ воды до 1 литра.	
Автоклавирировать.	

4.3.1.2.2.2.8.2. 10 x фосфатно-буферный физиологический раствор

NaCl	80.00 г
KCl	2.00 г
Na_2HPO_4	11.50 г
KH_2PO_4	2.00 г

MQ воды до 900 мл.
Отрегулировать pH до 7,2 с помощью HCl или NaOH. Довести до 1 литра.
Автоклавирировать.

Для получения рабочей силы развести 1/10 и перепроверить pH. Для хранения порошка в банках, необходимо сделать в два раза больше вышеуказанного количества порошка. Хранить. Для приготовления добавить 1,8 литра MQW, pH, довести до 2 литров.

4.3.1.2.2.8.3. АБТС

Цитрат-фосфатный буфер:

Лимонная кислота 21.00 г

Na₂HPO₄ 14.00 г

MQ воды до 800 мл. Отрегулировать pH до 4,2. Довести до 1 литра. АБТС буфер:

АБТС 0.55 г

Цитрат-фосфатный буфер на 1 литр. Поделить на аликвоты (22 мл) и заморозить.

Непосредственно перед использованием добавить 10 мкл H₂O₂ на 22-мл аликвоту.

4.3.1.2.2.8.4. АБТС стоп-раствор (0.01% NaN₃ в 0,1 м лимонной кислоте)

Лимонная кислота 10.5 г

MQ воды до 500 мл.

Добавить 50 мг азида натрия или 1 мл 5% раствора.

4.3.1.2.2.8.5. Конъюгат KPL #14-23-06⁴⁴

4.3.1.2.2.8.6. Криопротектор TSGM

10 × Трис / физиологический раствор, pH 7,4 50 мл

Глицерин 250 мл

⁴⁴ Поставщик реагентов: Bio-Mediq DPC Australia, а/я 106, Донкастер, Виктория 3108, Австралия; тел.: (+61-3) 9840 2767; факс: (+61-3) 9840 2767. Посетите: <http://www.kpl.com> для ссылок на дистрибьюторов всемирной сети. Ссылка на конкретные коммерческие продукты в качестве примеров не означает их одобрения МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, упомянутым в данном руководстве по водным животным.

Стерильная очищенная вода до 500 мл. Автоклавировать.

Добавить 10% Мертиолат (1 мл). Хранить в темной бутылке при температуре 4°C.

4.3.1.2.2.8.7. 10 x Трис / физиологический раствор (250 мм Трис, 1,5 м NaCl)

Трис	15.14 г
NaCl	43.83 г
Стерильная очищенная вода	500 мл

довести pH до 7,4.

4.3.1.2.2.3. Иммуноэлектронная микроскопия

4.3.1.2.2.3.1. Мечение золотом срезов, содержащих ткани или клеточные культуры

4.3.1.2.2.3.2. 4.3.1.2.2.3.1.1. Принцип проведения теста

Для исследования методом электронной микроскопии можно использовать культуры клеток, ткани и / или гомогенаты тканей. Обычная электронная микроскопия (исследование ультратонких срезов) позволит получить данные о структуре и морфогенезе вируса. Отрицательная контрастная электронная микроскопия позволит получить изображения, которые можно использовать для изучения структуры частиц вируса. Использование ранавирус-специфических антител и конъюгированного золота с данными препаратами позволяет рассмотреть одновременно как ультраструктуру, так и антигенность (Хаят, 1991). Такие объединенные данные позволяют классифицировать вид как принадлежащий к роду Ранавирус.

4.3.1.2.2.3.1.2. Протокол

- i) Ткани или культуры клеток фиксируют, как описано в работе Drury с соавт., 2002. Вкратце, для фиксации клеток используют 2,5% (об/об) забуферный глутаральдегид (какодилат или фосфат) в течение 40 минут. После первичной фиксации клетки промывают в том же буфере (3 × 20 минут), после фиксации в 1% (масса/объем) забуферном тетроксиде осмия (1 час), промывают (3 × 5 минут) в воде двойной дистилляции/обратного осмоса (RO), дегидратируют через градуированный спирт (70-100%), инфильтрируют и встраивают в эпоксидную смолу (например, Spurr's или epon). Чтобы провести мечение золотом ультратонких полимерных срезов

необходимо уделять должное внимание режимам фиксации и встраивания. Например, клетки должны быть зафиксированы в 0,25% (об/об) глутаральдегиде с 2-4% параформальдегидом. Вторичная фиксация не требуется, клетки инфильтрируют и внедряют в акриловую смолу, такую как LR White.

- ii) После фиксации и встраивания делают ультратонкие срезы и переносят их на покрытые пленкой никелевые сетки.
- iii) Из соответствующих блоков вырезают секции.
- iv) Блокируют в 2% (масса/объем) сухом обезжиренном молоке в PBS-A (10 минут).
- v) Свободные альдегиды блокируют с помощью 0,1 м глицина в PBS-A (20 минут).
- vi) Промывают в PBS-A (3 × 1 мин). Это необязательный шаг, используемый только в том случае, если имеется избыток свободных альдегидов (об этом может свидетельствовать высокий фон).
- vii) Если используется протеин А-золото - то блокирование осуществляется в сыворотке обычных видов - данная сыворотка должна быть гомологична той, что связывается с золотом. Рекомендуемое разведение составляет примерно 1/40 (10 минут).
- viii) Инкубируют в первичном антителе. Если детали инкубации неизвестны, то проводят начальные реакции с разведениями от 1/100 до 1/2700 (с трехкратными разведениями). Антитела разводят в 1% (об/об) желатине холодноводных рыб в PBS-A (60 минут, RT).
- ix) Промывают в 1% (об/об) желатине холодноводных рыб в PBS-A (6 × 3 минуты).
- x) Инкубируют в меченном золотом вторичном антителе или протеине А-золота или протеине G-золота. Рекомендуемое разведение 1/40 в PBS-A, содержащем 1% (масса/объем) бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0,1% (об/об) Tween 20 и 0,1% (v/v) Triton X, 60 минут, при комнатной температуре.
- xi) Промывают в PBS-A (6 × 3 минуты, при комнатной температуре).
- xii) Постфиксация в 2,5% (об/об) глутаральдегиде в PBS-A (5 минут, при комнатной температуре).
- xiii) Промывают в воде (RO) (3 × 3 минуты, при комнатной температуре).
- xiv) Высушивают на фильтровальной бумаге (тип не важен).
- xv) Окрашивают с помощью уранилацетата и ацетата свинца.

4.3.1.2.2.3.1.3. Интерпретация результатов

Вирусы в цитоплазме инфицированных клеток будут особым образом мечены золотом. Вирусы будут располагаться изолированно, в пределах тел сборки (тел включения) и в паракристаллических массивах.

4.3.1.2.2.3.3. Мечение золотом вирусных частиц (вирусов, адсорбированных на сетках)

4.3.1.2.2.3.4.

4.3.1.2.2.3.2.1. *Протокол*

- i) 10% (масса/объем) печени, почек или селезенки гомогенизируют в гомогенизаторе Даунса и освещают (5 минут, 2500 g).
- ii) Супернатант адсорбируется (из гомогената или клеточных культур) на субстрате (сетке).
- iii) Используют покрытые углеродом золотые сетки (200 ячеек) .
- iv) Образец фиксируют с помощью 0,1% (об/об) глутарового альдегида и 1% (об/об) Nonidet P40 (NP40) в PBS (2 минуты).
- v) Промывают в PBS (3 × 3 мин).
- vi) Блокируют с помощью 5% (об/об) желатина холодноводных рыб (Sigma) в PBS (10 минут) с последующим инкубационным буфером (PBS/0,1% желатин холодноводных рыб).
- vii) Инкубируют с антителом (аффинно очищенным кролика анти-EHNV, серия № M708; поставляется референтной лабораторией МЭБ; рекомендуемое разведение 1/500) в течение 1 часа, при комнатной температуре.
- viii) Сетки промывают (6 × 3 минуты) в инкубационном буфере.
- ix) Инкубируют с 10 нм протеина А-золота (для разведения см. Рекомендации поставщиков) в течение 1 часа, при комнатной температуре.
- x) Промывают (6 × 3 минуты).
- xi) Фиксируют с помощью 2,5% глутарового альдегида (5 минут).
- xii) Промывают дистиллированной водой (3 × 3 минуты) и окрашивают 2% - ной фосфотунгстовой кислотой (pH 6,8) в течение 1 минуты.

4.3.1.2.2.3.2.2. *Интерпретация результатов*

Включение NP40 позволит антителам и протеину А-золота проникнуть через внешнюю мембрану и вступить в реакцию с нижележащим капсидом. Мечение должно быть специфичным для данного вируса. В качестве отрицательного контроля необходимо включить не содержащую EHNV аффинно очищенную кроличью сыворотку (1/500).

4.3.1.2.2.4. *Иммуногистохимия (иммунопероксидазное окрашивание)*

4.3.1.2.2.4.1. *Образцы*

Фиксированные в формалине залитые парафином срезы ткани.

4.3.1.2.2.4.2. *Техническая процедура*

Следующий протокол предназначен для качественной демонстрации антигенов EHNV в фиксированных в формалине залитых парафином срезах ткани (Reddacliff & Whittington, 1996). Он предполагает, что антигены

могут стать перекрестно сшитыми, и поэтому включает в себя стадию переваривания протеазы, которая можно пропустить, если исследуются незафиксированные образцы. Для окрашивания используют коммерческий набор (DAKO® LSAB K0679) со стрептавидином, маркированным пероксидазой, и смесь биотинилированных анти-кроличьих/анти-мышинных/анти-козьих иммуноглобулинов в качестве связующих антител. Также можно использовать и другие коммерческие реагенты. Для удобства они также поставляются компанией DAKO⁴⁵. Первичное аффинно очищенное кроличье анти-EHNV антитело (Номер серии M708) поставляется в лиофилизированной форме референтной лабораторией МЭБ.

- i) Приготовить срезы толщиной 5 мкм и установить на предметные стекла SuperFrost® Plus G/Edge (Menzel-Glaser, HD Scientific Cat. номер HD 041300 72P3). Вокруг срезов делают разметку алмазным карандашом, чтобы ограничить распределение реагентов.

- ii) Срезы депарафинизируют:

Предварительно нагреть предметные стекла в инкубаторе при температуре 60°C в течение 30 минут.

Поместить предметные стекла в ксилоловую ванну и инкубировать в течение 5 минут. Повторить один раз. Обратите внимание, что замена ксилола может быть произведена без вредных последствий.

Отвести лишнюю жидкость и поместить предметные стекла в абсолютный этанол на 3 минуты. Повторить один раз. Отвести лишнюю жидкость и поместить предметные стекла в 95% - ный этанол на 3 минуты. Повторить один раз.

Отвести лишнюю жидкость и поместить предметные стекла в дистиллированную или деионизированную воду на 30 секунд.

- iii) Экспонировать антигены с помощью протеазной обработки. Предметное стекло залить протеиназой К (5-7 мкг мл⁻¹) и инкубировать в течение 20 минут (готовый к применению раствор, DakoCytomation Cat. номер S3020). Промыть предметное стекло, трижды погрузив его в воду. Поместить в ванну PBST на 5 минут (PBS pH 7,2, 0,05% [об/об] Tween 20). Слить излишки промывочного раствора и тщательно протереть участок вокруг среза.
- iv) Провести иммунное окрашивание с использованием Universal DAKO LSAB®+ Kit, Peroxidase (DakoCytomation Cat No. K0679). Убедившись, что срез ткани полностью покрыт, добавить на предметное стекло следующие реагенты. Избегать высыхания.
- v) 3% перекись водорода: покрыть предметное стекло и инкубировать в

⁴⁵ Dako Cytomation California Inc., 6392 via Real, Карпинтерия, Калифорния 93013, США, тел.: (+1-805) 566 6655, факс: (+1-805) 566 6688; Dako Cytomation Pty Ltd, Unit 4, 13 Lord Street, Botany, NSW 2019, Австралия, факс: (+61-2) 9316 4773; посетите <http://www.dakocytomation.com> для связи с другими странами.

течение 5 минут. Аккуратно промыть PBST и поместить в ванну со свежей водой.

- vi) Первичное антитело (аффинно очищенное кроличье анти-EHNV 1/1500 лот № M708) и отрицательный контроль (неиммунная сыворотка кролика в разведении 1/1500) на втором предметном стекле. Покрыть предметное стекло и инкубировать в течение 15 минут. Ополоснуть предметные стекла.
- vii) Ссылка: покрыть предметное стекло и инкубировать в течение 15 минут. Ополоснуть предметные стекла.
- viii) Стрептавидин пероксидаза: покрыть предметное стекло и инкубировать в течение 15 минут. Ополоснуть предметные стекла.
- ix) Раствор субстрата/хромогена: покрыть предметное стекло и инкубировать в течение 5 минут. Аккуратно ополоснуть предметные стекла дистиллированной водой.
- x) Провести контрастирующее окрашивание, поместив предметные стекла в ванну с гематоксилином Майера фирмы DAKO® в течение 1 минуты (модификация Лилли, кат. номер S3309). Аккуратно ополоснуть дистиллированной водой. Погрузить 10 раз в водяную баню. Поместить в дистиллированную или деионизированную воду на 2 минуты.
- xi) Поместить образцы и покрыть с помощью заливочной среды на водной основе (Dako® Faramount Waterfront Mounting Medium кат. номер S3025).

4.3.1.2.2.4.3. Интерпретация результатов

Антиген EHNV появляется в виде коричневого пятна в областях, окружающих дегенеративные и некротические участки в в области паренхимы. На этом же срезе не должно быть окрашивания отрицательной контрольной кроличьей сывороткой.

4.3.1.2.2.4.4. Наличие теста и реагентов

Реактивы (антитела) и протоколы испытаний доступны в справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

Несмотря на то что описано несколько традиционных методов ПЦР или количественной ПЦР в реальном времени, ни один из данных методов не был подтвержден в соответствии с руководящими принципами МЭБ по первичному обнаружению EHNV или других ранавирусов в тканях рыб. Однако идентификация ранавируса на уровне рода и вида возможна с использованием нескольких опубликованных стратегий ПЦР. В первом методе, описанном здесь, проводят два ПЦР-анализа с использованием праймеров MCR и рестрикционный анализ для обнаружения и быстрой дифференциации EHNV от европейского (ECV), североамериканского (FV3)

и других австралийских ранавирусов (BIV) (Marsh с соавт., 2002). Это может быть выполнено менее чем за 24 часа при относительно низких затратах. Во втором методе, описанном здесь, проводят один ПЦР-анализ использованием праймеров МСР для получения продукта (580 пар оснований), который затем секвенируют для идентификации типа ранавируса. Кроме того, можно провести ПЦР гена ДНК-полимеразы и Н1-подобных генов триплет белков нейрофиламентов (Holopainen et al., 2011) (этот метод не описан в данной главе).

Образцы: вирус из клеточной культуры или прямой анализ гомогената ткани.

4.3.1.2.3.1. ПЦР и рестрикционный эндонуклеазный анализ (РЭА): техническая процедура

Аmplified продукт ПЦР-анализа МСР-1, переваренный с помощью *Pfl*MI, позволяет дифференцировать австралийские иридовирусы (EHNV и BIV) от неавстралийских иридовирусов (FV3, Америки; и ECV, Европа). Амплифицированный продукт ПЦР-анализа МСР-2, переваренный с помощью *Hinc* II, *Acc* I and *Fnu*4H I (индивидуально), позволяет дифференцировать EHNV и BIV (Австралия) друг от друга и от FV3 (Аmerica) и ECV (Европа).

4.3.1.2.3.1.1. Подготовка реагентов

EHNV-очищенная ДНК и BIV-очищенная ДНК ПЦР-контрольные реагенты поставляются референтной лабораторией в лиофилизированном виде. Восстановить с помощью 0,5 мл Трис-ЭДТА (ТЭ) буфера (10 мм Трис/НСI, 1 мм ЭДТА, pH 8,0) и дать флакону постоять при комнатной температуре в течение 2 минут. Осторожно перемешать содержимое пробирки. Для рутинного использования, например проведения ПЦР, рекомендуется готовить рабочие растворы в виде 1/10 разведения в ТЭ буфере (pH 8,0). Аликвоты по 250 мкл хранят при температуре -20°C. Одной аликвоты достаточно для проведения не менее 50 реакций (от 1 до 5 мкл добавляют в коктейль), минимальный срок хранения - 6 месяцев с момента разбавления.

Праймеры M151 и M152 (МСР-1, 321 пар оснований), M153 и M154 (МСР-2, 625 пар оснований) поставляют в рабочей концентрации (100 нг мкл⁻¹) и хранят при температуре -20°C. Праймеры также можно заказать у коммерческих поставщиков. Последовательность праймеров приведена в таблице 4.2.

Таблица 4.2. Последовательности праймеров МСР-1 и МСР-2

ПЦР	Праймер	Последовательность	Размер продукта	Расположение гена
МСР-1	M151	AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA	321 пар оснований	266–586
	M152	CGG-GGC-GGG-GTT-		

	2	GAT-GAG-AT		
MCP-2	M15 3	ATG-ACC-GTC-GCC- CTC-ATC-AC	625 пар основани й	842–1466
	M15 4	CCA-TCG-AGC-CGT- TCA-TGA-TG		

4.3.1.2.3.1.2. ПЦР-коктейль

Реакции амплификации в конечном объеме 50 мкл (включая 5 мкл образца ДНК) содержат 2,5 мкл (250 нг) каждого рабочего праймера, 200 мкм каждого из нуклеотидов dATP, dTTP, dGTP и dCTP, 5 мкл 10 × ПЦР-буфера (66,6 мм Tris/HCl, 16,6 мм (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 1.65 mg ml⁻¹ BSA, 10 мм бета-меркаптоэтанола) и 2 ед Таq-полимеразы. Инструкции по приготовлению 10 × ПЦР буфера приведены в Таблице 4.3.

Таблица 4.3. Приготовление 10 × ПЦР буфера

Ингредиенты	Количество	Конечная концентрация в 50 мкл смеси для ПЦР
Трис	4,050 г	66,6 мм
Сульфат аммония	1.100 г	16.6 мм
BSA (Альбумин бычий сывороточный, фракция V без жирных кислот)	0.825 г	1,65 мг мл ⁻¹
Хлорид магния	1.25 мл	2.5 мм

Таблица 4.3. Приготовление 10 × ПЦР буфера

Ингредиенты	Количество	Конечная концентрация в 50 мкл смеси для ПЦР
ТЭ буфер (стерильный)	50 мл	—

ПРИМЕЧАНИЕ: Можно также использовать альтернативные коммерческие буферы.

Включены два отрицательных контроля, один из которых содержит только ПЦР-коктейль, а второй-5 мкл ТЭ-буфера.

Реакции MCP-1 и MCP-2 имеют следующий профиль: 1 цикл денатурации при 94°C в течение 3 минут, затем 35 циклов денатурации при 94°C в течение 30 секунд, отжиг при 50°C в течение 30 секунд и удлинение при 72°C в течение 1 минуты; окончательное удлинение 72°C в течение 5 минут и охлаждение до 4°C.

Примечание: температура отжига может быть увеличена до 60 или 62°C

для уменьшения неспецифической амплификации, когда анализ используется для тестирования тканей рыб.

Результаты ПЦР оценивают методом электрофореза в 2% агарозных гелях, окрашенных бромидом этидия. Контрольная ДНК ПЦР EHNВ (1/10 рабочего запаса) должна давать результат, близкий по интенсивности к полоске 10^{-3} в обоих случаях.

4.3.1.2.3.2. Альтернативная ПЦР и секвенирование для идентификации вируса

В этом анализе два праймера, обратный праймер (5' - AAA-GAC-CCG-TTT-TGC-AGC-AAA-C-3') и прямой праймер (5'-CGC-AGT-CAA-GGC-CTT-GAT-GT-3'), используются для амплификации целевой последовательности МСР (580 пар оснований [п.о.]) ДНК EHNВ методом ПЦР. Эта процедура ПЦР может быть использована для специфического обнаружения ранавирусов у Европейского окуня, радужной форели, сома, зубатки, гуппи (*Poecilia reticulata*), губана-доктора обыкновенного (*Labroides dimidatus*) и ряда ранавирусов амфибий (Nyatt с соавт., 2000). Нуклеиновую кислоту (1 мкл) добавляют в Taq - полимеразный буфер, содержащий 0,1 мкм каждого праймера, 2,5 ЕД Taq полимеразы (Promega) и 2,5 мм MgCl₂. Смесь инкубируют в автоматическом термоциклере, запрограммированном на 35 циклов при 95°C в течение 60 секунд, при 55°C в течение 60 секунд и при 72°C в течение 60 секунд, и, наконец, выдерживают при 72°C в течение 15 минут. Амплифицированную ДНК (580 п.о.) анализируют методом электрофореза в агарозном геле, иссекают и секвенируют с использованием ряда стандартных технологий). Каждый вид вируса идентифицируют по его уникальной последовательности ДНК, доступной в GenBank. Образцы могут быть представлены в справочную лабораторию МЭБ для специфической идентификации.

4.3.1.2.4. Очистка агента

Процедура очистки EHNВ была описана (Nyatt с соавт., 1991; Steiner с соавт., 1991), протокол доступен в справочной лаборатории.

4.3.2. Серологические методы

Нейтрализующие антитела не были обнаружены у рыб или млекопитающих, подвергшихся воздействию EHNВ. Непрямой ИФА для выявления антител, индуцированных после воздействия EHNВ, был описан для радужной форели и Европейского окуня (Whittington с соавт., 1994; Whittington с соавт., 1999; Whittington & Reddacliff, 1995). Чувствительность и специфичность этих анализов по отношению к стандартному тесту неизвестны, и интерпретация результатов в настоящее время затруднена. Протоколы и специальные антииммуноглобулиновые реагенты, необходимые для проведения этих тестов, можно получить в референтной лаборатории.

5. Оценка испытаний по целевому назначению

Методы, доступные в настоящее время для надзора, выявления и диагностики инфекции EHNV, перечислены в таблице 5.1. Обозначения, используемые в таблице: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод имеет применение в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение; d = метод в настоящее время не рекомендуется для этой цели; и нп = неприменимо. Данная оценка является несколько субъективной, поскольку пригодность включает в себя такие параметры, как надежность, чувствительность, специфичность и полезность. Хотя не все испытания, перечисленные в категории а или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию (см. главу 1.1.2 данного руководства *по водным животным*), их рутинный характер и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предположи- тельный диагноз	Подтвержда- ющий диагноз
	Икри нка/м олок и	Мальки	Молодь	Вз ро с- л ы е ос об и		
Макроскопические признаки	нп	d	d	d	d	d
Гистопатология	нп	d	d	d	b	d
Иммуногистохимия	нп	c	c	c	c	c
Просвечивающая электронная микроскопия	нп	d	d	d	c	b
Иммунная электронная микроскопия	нп	d	d	d	c	b
Клеточная культура	нп	a	a	a	a	b
ИФА с захватом антигенов	нп	a	a	a	a	a
ИФА с захватом антител	нп	d	d	c	c	d
Анализ последовательности ПЦР-продукта	нп	d	d	d	c	a

ЭМ = электронная микроскопия; ИФА = иммуноферментный анализ; ПЦР = полимеразная цепная реакция; нп = неприменимо.

6. Тест(ы), рекомендованный для целевого надзора, чтобы объявить о благополучии по эпизоотическому гемопозитическому некрозу

Тест, рекомендуемый для целевого надзора - это культура клеток и ИФА с захватом антигена. Серология (ИФА с захватом антител) также может играть полезную роль в исследованиях для выявления инфицированных популяций форели.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение подозрения на болезнь

Наличие EHNВ должно быть заподозрено, если соблюдается хотя бы один из следующих критериев:

- i) Гистопатология, согласующаяся с EHNВ, с клиническими признаками заболевания или без них;
- ii) ЦПЭ, типичный для EHNВ в клеточных культурах;
- iii) Положительный результат традиционной ПЦР ;
- iv) Положительный результат ИФА с захватом антигена.

7.2. Определение подтвержденного случая

Наличие EHNВ считается подтвержденным, если в дополнение к критериям, изложенным в Разделе 7.1, удовлетворяются один или несколько из следующих критериев:

- i) Выделение EHNВ проводят в клеточной культуре с последующей идентификацией вируса либо с помощью теста на основе антител (иммунопероксидазное окрашивание, ИФА, иммуногистохимия), либо с помощью традиционной ПЦР с последующим секвенированием ампликона;
- ii) EHNВ выявляют в гистологических срезах методом иммуноферментного анализа с использованием специфических анти-EHNВ антител;
- iii) Обнаружение EHNВ в тканевых препаратах методом традиционной ПЦР с последующим секвенированием ампликона.

8. Список литературы

AHNE W., BEARZOTTI M., BREMONT M. & ESSBAUER S. (1998). Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with epizootic haematopoietic necrosis virus and frog virus 3. *J. Vet. Med. [B]*, **45**, 373–383.

AHNE W., OGAWA M. & SCHLOTFELDT H.J. (1990). Fish viruses: transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish *Silurus glanis*. *J. Vet. Med. [B]*, **37**, 187–190.

AHNE W., SCHLOTFELDT H.J. & THOMSEN I. (1989). Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). *J. Vet. Med. [B]*, **36**, 333–336.

ARIEL E. & BANG JENSEN B. (2009). Challenge studies of European stocks of redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with epizootic haematopoietic necrosis virus. *J. Fish Dis.*, **32**, 1017–1025.

ARIEL E., NICOLAISEN N., CHRISTOPHERSEN M.-B., HOLOPAINEN R., TAPIOVAARA H. & BANG JENSEN B. (2009). Propagation and isolation of ranaviruses in cell culture. *Aquaculture*, **294**, 159–164.

ARIEL E., TAPIOVAARA H. & OLSESEN N.J. (1999). Comparison of Pike-perch (*Stizostedion lucioperca*), Cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) iridovirus isolates with reference to other piscine and amphibian iridovirus isolates. VIIIth International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Rhodes, Greece, 20–24 September. European Association of Fish Pathologists.

BANG JENSEN B., ERSBOLL A.K. & ARIEL E. (2009). Susceptibility of pike *Esox lucius* to a panel of ranavirus isolates. *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 169–179.

BECKER J.A., TWEEDIE A., GILLIGAN D., ASMUS M. & WHITTINGTON R.J. (2016). Susceptibility of Australian Redfin Perch *Perca fluviatilis* Experimentally Challenged with Epizootic Hematopoietic Necrosis Virus (EHNV). *J. Aquat. Anim. Health*, **28**, 122–130.

BLOCH B. & LARSEN J.L. (1993). An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 235–240.

BRYAN L.K., BALDWIN C.A., GRAY M.J. & MILLER D.L. (2009). Efficacy of select disinfectants at inactivating Ranavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **84**, 89–94.

CANNON R.M. & ROE R.T. (1982). *Livestock Disease Surveys: A Field Manual for Veterinarians*. Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia.

CHINCHAR V.G., ESSBAUER S., HE J.G., HYATT A.D., MIYAZAKI T., SELIGY V. & WILLIAMS T. (2005). Family Iridoviridae. In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, 145–162.

CHINCHAR V.G. (2002). Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers – brief review. *Arch. Virol.*, **147**, 447–470.

CINKOVA K., RESCHOVA S., KULICH P. & VESELY T. (2010). Evaluation of a polyclonal antibody for the detection and identification of ranaviruses from freshwater fish and amphibians. *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 191–198.

CRANE M.S.J., YOUNG J. & WILLIAMS L. (2005). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): growth in fish cell lines at different temperatures. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **25**, 228–231.

DRURY S.E.N., GOUGH R.E. & CALVERT I. (2002). Detection and isolation of an iridovirus from chameleons (*Chamaeleo quadricornis* and *Chamaeleo hoehnelli*) in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, **150**, 451–452.

EATON B.T., HYATT A.D. & HENGSTBERGER S.G. (1991). Epizootic haematopoietic necrosis virus: purification and classification. *J. Fish Dis.*, **14**, 157–169.

FIJAN N., MATASIN Z., PETRINEC Z., VALPOTIC I. & ZWILLENBERG L.O. (1991). Isolation of an iridovirus-like agent from the green frog (*Rana esculenta* L.). *Veterinarski Arhiv*, **61**, 151–158.

GOBBO F., CAPPELLOZA E., PASTORE M.R. & BOVO G. (2010). Susceptibility of black bullhead *Ameiurus melas* to a panel of ranavirus isolates. *Dis. Aquat. Org.*, **90**, 167–174.

HEDRICK R.P., MCDOWELL T.S., AHNE W., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. *Dis. Aquat. Org.*, **13**, 203–209.

HENGSTBERGER S.G., HYATT A.D., SPEARE R. & COUPAR B.E.H. (1993). Comparison of epizootic haematopoietic necrosis and Bohle iridoviruses, recently isolated Australian iridoviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 93–107.

HOLOPAINEN R., HONKANEN J., JENSEN B.B., ARIEL E. & TAPIOVAARA H. (2011). Quantitation of ranaviruses in cell culture and tissue samples. *J. Virol. Methods*, **171**, 225–233.

HOLOPAINEN R., OHLEMEYER S., SCHÜTZE H., BERGMANN S.M. & TAPIOVAARA H. (2009). Ranavirus phylogeny and differentiation based on major capsid protein, DNA polymerase and neurofilament triplet H1-like protein genes. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 81–91.

HYATT A.D. (1991). Immunogold labelling techniques. *In: Electron Microscopy in Biology: a Practical Approach*. Harris R., ed. IRL Press, Oxford, UK, 59–81.

HYATT A.D., EATON B.T., HENGSTBERGER S.G. & RUSSEL G. (1991). Epizootic hematopoietic necrosis virus: detection by ELISA, immuno-histochemistry and electron microscopy. *J. Fish Dis.*, **14**, 605–617.

HYATT A.D., GOULD A.R., ZUPANOVIC Z., CUNNINGHAM A.A., HENGSTBERGER S.G., WHITTINGTON R.J., KATTENBELT J. & COUPAR B.E.H. (2000). Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch. Virol.*, **145**, 301–331.

HYATT A.D., WILLIAMSON M., COUPAR B.E.H., MIDDLETON D., HENGSTBERGER S.G., GOULD A.R., SELLECK P., WISE T.G., KATTENBELT J., CUNNINGHAM A.A. & LEE J. (2002). First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). *J. Wildl. Dis.*, **38**, 239–252.

LANGDON J.S. (1989). Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *J. Fish Dis.*, **12**, 295–310.

LANGDON J.S. & HUMPHREY J.D. (1987). Epizootic Hematopoietic Necrosis a New Viral Disease in Redfin Perch *Perca fluviatilis* L. in Australia. *J. Fish Dis.*, **10**, 289–298.

LANGDON J.S., HUMPHREY J.D. & WILLIAMS L.M. (1988). Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. *J. Fish Dis.*, **11**, 93–96.

LANGDON J.S., HUMPHREY J.D., WILLIAMS L.M., HYATT A.D. & WESTBURY H.A. (1986). First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.*, **9**, 263–268.

MAO J., THAM T.N., GENTRY G.A., AUBERTIN A. & CHINCHAR V.G. (1996). Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology*, **216**, 431–436.

MAO J.H., HEDRICK R.P. & CHINCHAR V.G. (1997). Molecular characterisation, sequence analysis and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology*, **229**, 212–220.

MARSH I.B., WHITTINGTON R.J., O'ROURKE B., HYATT A.D. & CHISHOLM O. (2002). Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Molec. Cell. Probes*, **16**, 137–151.

POZET F., MORAND M., MOUSSA A., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish (*Ictalurus melas*). *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 35–42.

REDDACLIFF L.A. & WHITTINGTON R.J. (1996). Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L.). *J. Comp. Pathol.*, **115**, 103–115.

SIMON R.C. & SCHILL W.B. (1984). Tables of sample size requirements for detection of fish infected by pathogens: three confidence levels for different infection prevalence and various population sizes. *J. Fish Dis.*, **7**, 515–520.

SPEARE R. & SMITH J.R. (1992). An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 51–57.

STEINER K.A., WHITTINGTON R.J., PETERSEN R.K., HORNITZKY C. & GARNETT H. (1991). Purification of epizootic haematopoietic necrosis virus and its detection using ELISA. *J. Virol. Methods*, **33**, 199–210.

WHITTINGTON R.J. (1992). Evaluation of a simple method for improving the precision of an ELISA detecting antibody in serum. *J. Immunol. Methods*, **148**, 57–64.

WHITTINGTON R.J., BECKER J.A. & DENNIS M.M. (2010). Iridovirus infections in finfish – critical review with emphasis on ranaviruses. *J. Fish Dis.*, **33**, 95–122.

WHITTINGTON R.J., KEARNS C., HYATT A.D., HENGSTBERGER S.G. & RUTZOU T. (1996). Spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch (*Perca fluviatilis*) in southern Australia. *Aust. Vet. J.*, **73**, 112–114.

WHITTINGTON R.J., PHILBEY A., REDDACLIFF G.L. & MACGOWN A.R. (1994). Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): findings based on virus isolation, antigen capture

ELISA and serology. *J. Fish Dis.*, 17, 205–218.

WHITTINGTON R.J. & REDDACLIFF G.L. (1995). Influence of environmental temperature on experimental infection of redbfin perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Aust. Vet. J.*, 72, 421–424.

WHITTINGTON R.J., REDDACLIFF L.A., MARSH I.B., KEARNS C., ZUPANOVIC Z. & CALLINAN R.B. (1999). Further observations on the epidemiology and spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in southeastern Australia and a recommended sampling strategy for surveillance. *Dis. Aquat. Org.*, 35, 125–130.

WHITTINGTON R.J. & STEINER K.A. (1993). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): improved ELISA for detection in fish tissues and cell cultures and an efficient method for release of antigen from tissues. *J. Virol. Methods*, 43, 205–220.

WOLF K., BULLOCK G.L., DUNBAR C.E. & QUIMBY M.C. (1968). Tadpole edema virus: a viscerotropic pathogen for anuran amphibians. *J. Infect. Dis.*, 118, 253–262.

ZUPANOVIC Z., MUSSO C., LOPEZ G., LOURIERO C.L., HYATT A.D., HENGSTBERGER S.G. & ROBINSON A.J. (1998). Isolation and characterisation of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Dis. Aquat. Org.*, 33, 1–9.

*

* *

NB: В настоящее время не существует референтной лаборатории МЭБ по эпизоотическому гемопоэтическому некрозу (EHNV)

(см. таблицу в конце настоящего *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 дополнительной информации об инфекции EHNV, пожалуйста, свяжитесь с референтными лабораториями МЭБ. Референтные лаборатории МЭБ поставляют очищенную ДНК EHNV, термоинактивированный антиген EHNV и поликлональные антитела против EHNV вместе с техническими методами. За реагенты взимается плата, покрывающая расходы на эксплуатацию лаборатории.

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТ В 1995 ГОДУ КАК ЭПИЗОТИЧЕСКИЙ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЙ НЕКРОЗ; САМЫЕ ПОСЛЕДНИЕ ОБНОВЛЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2018 ГОДУ.

ИНФЕКЦИЯ

APHANOMYCES INVADANS

(ЭПИЗООТИЧЕСКИЙ ЯЗВЕННЫЙ СИНДРОМ)

1. Предмет рассмотрения⁴⁶

В контексте данной главы инфекция *Aphanomyces invadans* означает все инфекции, вызываемые грибом класса оомицетов *A. invadans* (син. *A. piscicida*).

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Инфекция *A. invadans* – это сезонное эпидемическое заболевание большой значимости у диких и разводимых на ферме пресноводных и эстуарных рыб. Имеет сложную инфекционную этиологию и клинически характеризуется наличием инвазивной инфекции *A. invadans* и некротизирующими язвенными поражениями, как правило, вызывающими гранулематозную реакцию. Инфекция *A. invadans* наиболее широко известна как эпизоотический язвенный синдром (ЭЯС, EUS). Она также известна как болезнь красных пятен, грибковый гранулематоз и язвенный микоз. В 2005 году ученые предложили именовать данную болезнь эпизоотическим гранулематозным афаномикозом (Baldock с соавт., 2005); тем не менее, термин ЭЯС (EUS) по-прежнему используется большинством ученых. Вызывает болезнь гриб класса оомицетов *A. invadans*. Инфекция *Aphanomyces invadans* получила широкое распространение со времени первой вспышки, произошедшей в 1971 году в Японии, и на сегодняшний день зарегистрирован только один генотип. С отдельными вспышками также были связаны паразиты и рабдовирус, а вторичные грамотрицательные бактерии неизбежно инфицируют поражения, вызванные *A. invadans*.

Род *Aphanomyces* входит в состав группы организмов, широко известных как водяная плесень. Несмотря на то, что ее долго считали относящейся к грибам из-за характерного роста в виде нитевидных структур, данная группа, Oomycetida, не относится к Eumycota, но вместе с диатомами и бурыми водорослями классифицируется как группа под названием Stramenopiles или Chromista.

2.1.2. Выживание вне хозяина

Каким образом *A. invadans* выживает вне хозяина, все еще неясно. Если подвижная зооспора не сможет найти подходящие субстраты, она инцистируется. Метода, подходящего для того, чтобы выделить или изолировать инцистированную зооспору

⁴⁶ NB: Версия, принятая Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2013 года.

из пораженных рыбоводных прудов, нет. В течение какого времени инцистированная спора может выживать в воде или на нерыбном субстрате, все еще неясно. При проведении эксперимента *in-vitro* инцистированная зооспора продолжала существовать в течение по меньшей мере 19 дней (Lilley et al., 2001).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Aphanomyces invadans лучше всего растет при температуре 20–30°C; он не растет в условиях *in vitro* при температуре 37°C. При солёности воды выше 2 частей на тысячу (ppt) распространение возбудителя может остановиться. Подготовка рыбоводных прудов путем просушивания солнцем и известкования являются эффективными методами дезинфекции против *A. invadans*. Как и в случае с другими оомицетами или разновидностями водяной плесени, дезинфицирующие химические средства общего назначения эффективно уничтожают любых *A. invadans*, которые могут контаминировать фермы, рыбоводные пруды или рыболовные снасти.

2.1.4. Жизненный цикл

Aphanomyces invadans (Saprolegniales, Oomycetes) имеет несептированную грибоподобную структуру мицелия. У данного оомицета есть две типичные формы зооспор. Первичная зооспора состоит из круглых клеток, которые развиваются внутри спорангия. Первичная зооспора выходит на кончик спорангиума, где она формирует кластер спор. Она быстро трансформируется во вторичную зооспору, которая имеет почкообразную форму, с клетками, имеющими два латеральных жгутика, и может свободно плавать в воде. Вторичная зооспора остается подвижной в течение периода времени, продолжительность которого зависит от условий окружающей среды и наличия рыбы-хозяина или субстрата. Как правило, зооспора инцистируется и прорастает, производя новые гифы, хотя в дальнейшем из цист могут выходить третичные поколения зооспор (полипланетизм) (Lilley с соавт., 1998).

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды-хозяева

Aphanomyces invadans является причиной болезни и смертности у разводимых на ферме и диких рыб по всему миру. Примерно 94 вида рыб, как подтверждено данными гистологической диагностики, естественным образом поражаются *A. invadans*, как показано в Таблице 2.1. По поводу подозрительных случаев естественной инфекции *A. invadans* у видов помимо перечисленных следует немедленно обращаться в соответствующую Референтную лабораторию МЭБ вне зависимости от того, ассоциируются ли клинические признаки с полученными результатами или нет. Некоторые рыбы, как, например, сазан (каarp обыкновенный) (*Cyprinus carpio*), нильская тилapia (*Oreochromis niloticus*) и ханос (молочная рыба) (*Chanos chanos*), были сочтены естественными резистентными к инфекции *A. invadans* (Lilley с соавт., 1998).

Таблица 2.1. Виды рыб, восприимчивые к инфекции *Aphanomyces invadans*

Научное наименование	Общепринятое наименование	Научное наименование	Общепринятое наименование
<i>Acanthopagrus australis</i>	желтоперый лещ	<i>Macquaria ambigua</i>	золотой окунь
<i>Acanthopagrus berda</i>	черный морской карась	<i>Macquaria novemaculeata</i>	австралийский басс
<i>Alosa sapidissima</i>	американская шэд	<i>Marcusenius macrolepidotus</i>	рыба-бульдог
<i>Ambassis agassiz</i>	австралийская чанда (окунь Агассица)	<i>Melanotaenia splendida</i>	радужница горбатая
<i>Ameiurus melas</i>	черный сомик	<i>Micralestes acutidens</i>	острозубый микралест
<i>Ameiurus nebulosus</i>	американский карликовый сомик	<i>Micropterus salmoides</i>	большеротый окунь
<i>Amniataba percoides</i>	ленточная амниатаба	<i>Mugil cephalus</i>	черная кефаль или лобан
<i>Anabas testudineus</i>	рыба-ползун	<i>Mugil curema</i>	белая кефаль
<i>Archosargus probatocephalus</i>	рыба-каторжник («овечья голова»)	<i>Mugilidae</i> (<i>Mugil</i> spp.; <i>Liza</i> spp.)	кефалевые
<i>Arius</i> sp.	морской сом	<i>Myxus petardi</i>	кефаль
<i>Aseraggodes macleayanus</i>	морской язык (солея)	<i>Nematalosa erebi</i>	австралийская нематалоза
<i>Bairdiella chrysoura</i>	горбыли или крокеры (бэрдиелла)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	радужная форель
<i>Barbus paludinosus</i>	барбус палудиносус	<i>Oreochromis andersoni</i>	ореохром Андерсона
<i>Barbus poechei</i>	барбус Печи	<i>Oreochromis macrochir</i>	большегрудый ореохром
<i>Barbus thamalakanensis</i>	Thamalakane barb	<i>Osphronemus goramy</i>	гигантский гурами
<i>Barbus unitaeniatus</i>	барбус меднополосый	<i>Oxyeleotris lineolatus</i>	спящий элеотр
<i>Bidyanus bidyanus</i>	серебряный окунь	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	мраморный элеотр
<i>Brevoortia tyrannus</i>	атлантическая менхэден	<i>Petrocephalus catostoma</i>	розовый петроцефал
<i>Brycinus lateralis</i>	черноспинный брицин	<i>Platycephalus fuscus</i>	бурый плоскоголов
<i>Carassius auratus auratus</i>	золотая рыбка	<i>Plecoglossus altivelis</i>	аю
<i>Catla catla</i>	катля	<i>Pogonias cromis</i>	бородатый тёмный горбыль (барабанщик)
<i>Channa marulius</i>	белопятнистый змееголов (змееголов-марулий)	<i>Psettodes</i> sp.	псеттод
<i>Channa striatus</i>	полосатый змееголов	<i>Puntius gonionotus</i>	серебряный барбус
<i>Cirrhinus mrigala</i>	мригаль	<i>Puntius sophore</i>	барбус софоре
<i>Clarias gariepinus</i>	южноафриканский кларий	Rohtee sp.	keti-Bangladeshi

Таблица 2.1. Виды рыб, восприимчивые к инфекции *Aphanomyces invadans*

Научное наименование	Общепринятое наименование	Научное наименование	Общепринятое наименование
<i>Clarias ngamensis</i>	кларий Мелланда	<i>Sargochromis carlottae</i>	rainbow bream
<i>Clarias batrachus</i>	лягушковый клариевый сом (промысловый клариас)	<i>Sargochromis codringtonii</i>	паратилипия Кодрингтона (зеленый (сарго)хромис)
<i>Colisa lalia</i>	лялиус (карликовый гурами)	<i>Sargochromis giardi</i>	саргохром Гиарда (розовый (сарго)хромис)
<i>Esomus</i> sp.	эзомус	<i>Scatophagus argus</i>	аргус пятнистый
<i>Fluta alba</i>	рисовый угорь	<i>Schilbe intermedius</i>	silver catfish
<i>Glossamia aprion</i>	мраморная глоссамия	<i>Schilbe mystus</i>	южноафриканский шильбовый сом
<i>Glossogobius giuris</i>	bar-eyed goby	<i>Scleropages jardini</i>	розовочешуйный склеропаг (жемчужная арована Джардини)
<i>Glossogobius</i> sp.	глоссогобиус	<i>Scortum barcoo</i>	терапон барку (нефритовый окунь)
<i>Helostoma temminckii</i>	целующийся гурами	<i>Selenotoca multifasciata</i>	пятнистополосатый аргус
<i>Hepsetus odoe</i>	Африканская хараценовая щука (хепсетус)	<i>Serranochromis angusticeps</i>	узкоголовый хромис
<i>Hydrocynus vittatus</i>	обычная тигровая рыба	<i>Serranochromis robustus</i>	нембве
<i>Ictalurus punctatus</i>	канальный сом	<i>Sillago ciliata</i>	песчаная силлага
<i>Kurtus gulliveri</i>	гулливеров куртус	<i>Siluridae (pod)</i>	сомы
<i>Labeo cylindricus</i>	африканский вальковатый лабео	<i>Strongylura krefftii</i>	клыкастый сарган («Длинный Том»)
<i>Labeo lunatus</i>	лунный лабео	<i>Therapon</i> sp.	терапон
<i>Labeo rohita</i>	роху	<i>Tilapia rendalli</i>	тиляпия Рендалла
<i>Lates calcarifer</i>	баррамунди или морской окунь	<i>Tilapia sparrmanii</i>	чернополосая тилипия
<i>Leiopotherapon unicolor</i>	крапчатый окунь	<i>Toxotes chatareus</i>	оливковый брызгун
<i>Lepomis macrochirus</i>	синежаберный солнечник	<i>Toxotes lorentzi</i>	брызгун Лоренца
<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	красный луциан	<i>Trichogaster pectoralis</i>	змеевидный гурами
<i>Macchullochella peelii</i>	треска Мюррея	<i>Trichogaster trichopterus</i>	гурами пятнистый
<i>Maccullochella ikei</i>	восточная пресноводная треска	<i>Tridentiger obscurus obscurus</i>	темный трехзубый бычок

2.2.2. Восприимчивые стадии развития хозяина

Восприимчивые стадии развития рыб – это, как правило, молодь и подростная молодь.

Сообщения об обнаружении инфекции *A. invadans* у мальков или личинок рыб отсутствуют.

При экспериментальном введении *A. invadans* сеголеткам индийского крупного карпа (катля, роху и мригаль) обнаружена резистентность к *A. invadans* (Pradhan с соавт., 2007), даже несмотря на то, что они являются естественно восприимчивыми видами. Экспериментальные заражения показали, что золотые рыбки являются восприимчивыми (Hatai с соавт., 1977; Hatai с соавт., 1994), а карп обыкновенный (Wada с соавт., 1996), нильская тилapia (Khan с соавт., 1998) и европейский угорь, *Anguilla anguilla*, (Oidtmann с соавт., 2008) являются резистентными.

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Aphanomyces invadans можно легко выявить при помощи гистологических методов с использованием образцов в виде больных рыб, отобранных из пораженных районов. Тем не менее, *A. invadans* можно выделить только от рыб с легкими или умеренно выраженными клиническими признаками инфекции *A. invadans*, демонстрирующих красные пятна или небольшие язвы. Рыбы с ярко выраженными клиническими признаками или крупными язвами не подходят для выделения.

2.2.4. Целевые органы и инфицируемые ткани

Подвижная зооспора играет важную роль в распространении болезни. После того, как подвижная спора прикрепится к коже рыбы, спора, при наличии подходящих условий, прорастет, и ее гифы захватят кожу рыбы, мышечные ткани и достигнут внутренних органов. Скелетные мышцы рыбы являются целевым органом и демонстрируют основные клинические признаки инфекции *A. invadans* с грибковыми гранулемами.

2.2.5. Персистентная инфекция пожизненными носителями

Информация, указывающая на то, что рыбы могут быть пожизненными носителями *A. invadans*, отсутствует. Как правило, большинство инфицированных рыб погибает во время вспышки. Хотя некоторые рыбы с легкой или умеренной формами инфекции могли выздороветь, маловероятно, чтобы они были пожизненными носителями *A. invadans*.

2.2.6. Переносчики

Данные отсутствуют.

2.2.7. Известные или подозреваемые дикие водные животные-носители

Данные отсутствуют.

2.3. Картина болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Инфекция *A. invadans* передается по горизонтали. Зооспоры *A. invadans* могут передаваться горизонтально от одной рыбы к другой через воду. Считается, что только вторичные зооспоры или зооспоры на стадии свободного плавания способны

прикрепляться к поврежденной коже рыбы и прорастать гифами. Если вторичные зооспоры не могут найти восприимчивый вид или сталкиваются с неблагоприятными условиями, они могут инцистироваться в условиях пруда. Цисты могут подождать наступления условий, благоприятных для их трансформации в третичные поколения зооспор, которые также находятся в стадии свободного плавания. Инцистирование, характерная особенность *A. invadans*, может играть важную роль в цикле вспышек в эндемичных районах.

2.3.2. Превалентность

Превалентность инфекции *A. invadans* в дикой природе и на аквакультурных фермах может быть высокой в эндемичных районах, когда наблюдаются высокие уровни смертности, однако может значительно варьировать. Имеются весьма ограниченные данные относительно превалентности болезни или инфекции при других обстоятельствах. Бесконтрольный водообмен на рыбных фермах в эндемичных районах приведет к вспышкам инфекции *A. invadans* на большинстве ферм, где разводят восприимчивые виды рыб.

2.3.3. Географическое распространение

Инфекция *A. invadans* была впервые зарегистрирована у разводимых на ферме пресноводных аю (*Plecoglossus altivelis*) в префектуре Оита (остров Кюсю, Япония) в 1971 году (Egusa & Masuda, 1971). Позже она была зарегистрирована у эстуарных рыб, в частности, у черной кефали (*Mugil cephalus*) в восточной части Австралии в 1972 году (Fraser с соавт., 1992; McKenzie & Hall, 1976). Инфекция *A. invadans* распространилась через Папуа – Новая Гвинея на территорию Юго-Восточной и Южной Азии, а также Западной Азии, где достигла Пакистана (Lilley с соавт., 1998; Tonguthai, 1985). Вспышки язвенной болезни у атлантической менхэден (*Brevoortia tyrannus*) в Соединенных Штатах Америки (США) были связаны с тем же самым этиологическим возбудителем, что и болезнь, наблюдавшаяся в Азии (Blazer с соавт., 1999; Lilley с соавт., 1997a; Vandersea с соавт., 2006). Первые подтвержденные вспышки инфекции *A. invadans* на африканском континенте произошли в 2007 году в Ботсване, Намибии и Замбии и были связаны с системой рек Замбези-Чобе (ФАО, 2009). В 2010 и 2011 годах инфекция *A. invadans* появилась у диких пресноводных рыб в Западно-Капской провинции (Южная Африка) и у диких американских карликовых сомов в озере Онтарио в провинции Онтарио (Канада). Сообщения об инфекции *A. invadans* поступали из более чем 20 стран, расположенных на четырех континентах: Северная Америка, южная часть Африки, Азия и Австралия.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Когда инфекция *A. invadans* заражает рыбоводный пруд, как, например, пруд для разведения змееголова, может наблюдаться высокий уровень заболеваемости (>50%) и смертности (>50%) в годы с длительным холодным периодом с температурой воды от 18 до 22°C. Однако уровни смертности и заболеваемости могут сильно варьировать в зависимости от вида рыб. Некоторые инфицированные рыбы могут выздороветь по окончании холодного периода.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Инфекция *A. invadans* происходит в большинстве случаев при температуре воды 18–22°C и после периодов проливных дождей (Bondad-Reantaso с соавт., 1992). Такие условия способствуют споруляции *A. invadans* (Lumanlan-Mayo с соавт., 1997), а температура 17–19°C, как было показано, замедляет развитие воспалительной реакции рыб на инфекцию оомицетом (Catap & Munday, 1998; Chinabut с соавт., 1995). В некоторых странах вспышки происходят сначала среди диких рыб, а затем распространяются на рыбоводные пруды. При обычных условиях инфицирование *A. invadans* методом ванн у здоровых восприимчивых видов рыб не вызывает клинических признаков болезни. Оомицету *A. invadans* требуется наличие предрасполагающих факторов, которые приводят к повреждению кожи, как, например, паразиты, бактериальная или вирусная инфекция, или кислая вода, чтобы вызвать клинические признаки заболевания ЭЯС (Lilley с соавт., 1998).

Сообщения об инфекции *A. invadans* поступали из более чем 20 стран, расположенных на четырех континентах. Перемещение живых декоративных рыб из стран, неблагополучных по *A. invadans*, могло привести к распространению болезни, как это было в случае вспышки на территории Шри-Ланки (Balasuriya, 1994). Наводнение также повлекло за собой распространение ЭЯС на территории Бангладеш и Пакистана (Lilley с соавт., 1998). При возникновении вспышки в реках/каналах болезнь может распространяться вниз по течению, а также вверх по течению в случаях, когда имеются восприимчивые виды рыб. Обеспечение того, чтобы вода из инфицированных рек не контактировала с рыбоводными прудами, могло бы предотвратить распространение болезни.

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Вакцины, обладающей протективным действием, нет. Однако, иммунизация змееголовов сырым экстрактом *A. invadans* вызывала гуморальный иммунный ответ, как было установлено при помощи SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) и анализа методом Вестерн-блота (Thompson с соавт., 1997).

2.4.2. Химиотерапия

Эффективного метода лечения рыбы, инфицированной *A. invadans*, в условиях дикой природы и в аквакультурных прудах не существует. Чтобы свести к минимуму потери рыбы в инфицированных рыбоводных прудах, следует прекратить водообмен и применить известь или гидратированную известь и/или соль (Lilley с соавт., 1998). Попытки использовать «зеленую воду», золу, известь и семена или ветки нима (*Azadirachta indica*) для профилактических обработок инфицированных *A. invadans* рыб в рыбоводных прудах давали неустойчивые результаты (Национальный научно-исследовательский институт по охране здоровья водных животных [AAHRI], Таиланд, внутренний отчет, 2001 год).

2.4.3. Иммуностимуляция

Предварительные эксперименты показали, что внутрибрюшинное введение иммуностимулятора, Salar-бес (содержащего 300 г кг⁻¹ витамина С, 150 г кг⁻¹

витамина В и следовые количества витаминов В1, В2, В6 и В12), змееголовам может усилить ингибирование как прорастания, так и роста зооспор в сыворотке *in vitro*. Змееголовы, питавшиеся обычным кормом в гранулах и кормом, обогащенным Salar-bes, все же демонстрировали клинические признаки инфекции *A. invadans* после контрольного заражения *A. invadans*. Однако, у змееголовов, получавших иммуностимулятор, Salar-bes, отмечена относительная выживаемость (в процентном выражении) на 59,2% выше, чем у контрольной группы, получавшей обычный корм (Miles с соавт., 2001).

2.4.4. Выведение резистентных особей

Данные отсутствуют.

2.4.5. Пополнение поголовья резистентными видами

Некоторые важные аквакультурные виды, в том числе нильская тилapia, молочная рыба и китайский карп, как было продемонстрировано, являются резистентными к инфекции *A. invadans*, и их можно разводить в эндемичных районах. Рекомендуется вводить в поголовье резистентные индигенные виды рыб.

2.4.6. Блокирующие агенты

Данные отсутствуют.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Текущая дезинфекция икринок и личинок рыб против различных видов водяной плесени эффективна и в отношении *A. invadans*. Необходимо отметить, что сообщения о наличии *A. invadans* у икринок и личинок рыб отсутствуют.

2.4.8. Общие практики ведения хозяйства

Контроль *A. invadans* в природных водах, по всей вероятности, невозможен. При возникновении вспышек в небольших, закрытых водоемах или рыбоводных прудах известкование воды с использованием сельскохозяйственной извести и улучшение качества воды, наряду с удалением инфицированных рыб, часто является эффективным в плане сокращения количества случаев смертности и борьбы с болезнью. Исключение возможности просачивания воды из пораженных *A. invadans* мест в рыбоводные пруды – это обычная практика, позволяющая без труда предотвратить распространение на территорию ферм. Хлорид натрия или соль и сельскохозяйственная известь являются безопасными и эффективными химическими средствами для проведения обработок или предотвращения распространения *A. invadans*.

3. Отбор образцов

3.1. Выбор отдельных образцов

Сачок, накидная сеть или невод являются самым лучшим выбором для вылавливания больных рыб в природных водах или рыбоводных прудах. В целях расследования вспышек, в качестве образцов следует отбирать больных рыб с язвенными поражениями или красными пятнами на теле.

3.2. Сохранение образцов в целях предоставления на исследование

Образцы в виде рыб следует транспортировать в лабораторию живыми или в охлаждаемых льдом контейнерах для последующей диагностики. Рыб, отобранных в удаленных районах, следует анестезировать и можно фиксировать в обычном 10% формалине или 10% забуференном фосфатом формалине на по меньшей мере 1–2 дня. Фиксированные образцы затем переносят в двуслойные пластиковые пакеты с увлажненной формалином тонкой оберточной бумагой. Пакеты, содержащие влажные образцы, запечатывают и отправляют в лабораторию.

3.3. Объединение образцов в пул

Десять больных особей рыб отбирают в качестве образцов с места, пораженного инфекцией *A. invadans*. Диагностику осуществляют посредством гистологического метода и выделения оомицета с использованием отдельных рыб или группы из нескольких рыб.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Рекомендуется использовать рыб с менее выраженными клиническими признаками, а мышечная ткань, расположенная рядом с язвой или под ней, является наиболее подходящей для выделения оомицетов. Для гистопатологического исследования наилучшим образом подходит мышечная ткань по краю язвы.

3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

Для выделения оомицетов не подходят тяжело больные или мертвые рыбы.

4. Диагностические методы

Диагностику инфекции *A. invadans* у рыб с клиническими поражениями можно осуществить посредством гистопатологии, выделения оомицетов или амплификации методом полимеразной цепной реакции.

4.1. Методы полевой диагностики

Вспышки инфекции *A. invadans* были связаны с массовой смертностью различных видов пресноводных рыб в условиях дикой природы (включая рисовые поля, устья рек, озера и реки) и на фермах в периоды низких температур и после периодов проливных дождей.

4.1.1. Клинические признаки

Обычно у рыб появляются красные пятна или язвенные поражения, от небольших до крупных, на теле.

4.1.2. Изменения в поведении

Ранние признаки болезни включают потерю аппетита, также рыбы приобретают более темную окраску. Инфицированные рыбы могут плавать близко к поверхности воды и становятся гиперактивными, а их движения приобретают рывкообразный характер.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

На поверхности тела, на голове, жаберной крышке или хвостовом стебле наблюдаются красные пятна. На более поздних стадиях наблюдаются крупные неглубокие язвы красного или серого цвета, часто с некрозом коричневого оттенка. На боку или спине появляются крупные поверхностные поражения. Большинство видов, за исключением полосатых змееголовов и кефали, на этой стадии погибают. У высоковосприимчивых видов, таких как змееголов, поражения носят более обширный характер и могут привести к полной эрозии задней части тела или к некрозу как мягких, так и твердых тканей черепа, в результате чего у живого животного обнажается мозг.

4.2.2. Клиническая химия

Информация отсутствует.

4.2.3. Микроскопическая патология

Причиной поражений на ранней стадии является эритематозный дерматит без явного участия оомицета. Рост гиф *Aphanomyces invadans* наблюдается в скелетных мышцах по мере того, как поражение прогрессирует от активной фазы легкого хронического дерматита до тяжелого некротизирующего гранулематозного дерматита локального распространения с тяжелой формой зернистой дистрофии мышцы. Оомицет вызывает сильную воспалительную реакцию, и вокруг прорастающих гиф образуются гранулемы. Соскобы поражений с тела рыбы или язв, как правило, демонстрируют вторичную грибную, бактериальную и/или паразитическую инфекцию.

4.2.4. Влажные препараты

Не подходят для диагностики инфекции *A. invadans*.

4.2.5. Мазки

Не подходят для диагностики инфекции *A. invadans*.

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

Не подходят для диагностики инфекции *A. invadans*.

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1 Микроскопические методы

Приготовление давленного препарата можно осуществить следующим образом:

- i) Удалите поверхность язвы при помощи острого лезвия скальпеля.
- ii) Отрежьте мышечную ткань по краю язвы.
- iii) Поместите кусочки ткани на разделочную доску, затем сделайте тонкие срезы при помощи острого лезвия скальпеля.

- iv) Поместите тонкие срезы ткани между двумя предметными стеклами и слегка сдавите их пальцами.
- v) Удалите одно из предметных стекол и накройте ткань покровным стеклом. Рассмотрите под световым микроскопом для обнаружения несептированной структуры гиф *A. invadans* (12–25 мкм в диаметре).

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Не подходят для диагностики инфекции *A. invadans*.

4.3.1.1.2. Мазки

Не подходят для диагностики инфекции *A. invadans*.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

4.3.1.1.3.1. Процедура отбора образцов

- i) Отберите образцы в виде только живых или умирающих особей рыб с клиническими поражениями.
- ii) Отберите образцы кожи/мышцы (<1 см³), включая переднюю кромку поражения и окружающую ткань.
- iii) Сразу же зафиксируйте ткани в 10% формалине. Количество формалина должно в 10 раз превышать объем фиксируемой ткани.

4.3.1.1.3.2. Процедура гистологического исследования

Последующая обработка фиксированной ткани включает обезвоживание путем проведения через спирты возрастающей крепости, очистку в агенте, допускающем смешивание с воском, и импрегнацию воском. Из блоков, содержащих образцы ткани рыб, готовят срезы толщиной около 5 мкм и монтируют на предметное стекло. Перед окрашиванием срезы необходимо полностью освободить от воска и произвести окраску гематоксилином и эозином (H&E) (Chinabut & Roberts, 1999). Гематоксилин и эозин и общие красители для выявления грибов (например, окраска по Грокотту) позволяют выявить типичные гранулемы и инвазивные гифы.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Выделение *Aphanomyces invadans* из внутренних тканей

Ниже приведены два метода выделения *A. invadans* или *A. piscicida*, адаптированные на основе материалов Lilley с соавт., 1998 и Willoughby & Roberts, 1994.

4.3.1.2.1.1. Метод 1

Лучше всего для опытов по выделению оомицетов подходят умеренно выраженные, имеющие бледный оттенок, выпуклые кожные поражения. Удалите чешуйки по периметру поражения и прижгите расположенную под ним кожу раскаленным докрасна шпателем для того, чтобы

простерилизовать поверхность. С помощью стерильного лезвия скальпеля и стерильного остроконечного пинцета рассеките *stratum compactum* под прижатой областью и, выполнив горизонтальный разрез и отогнув внешние ткани, обнажите расположенную снизу мышцу. Следите за тем, чтобы инструменты не контактировали с контаминированной внешней поверхностью и, таким образом, не заражали подлежащую мышцу. Используя методы асептики, осторожно отрежьте фрагменты пораженной мышцы, приблизительно 2 мм³, и поместите в чашку Петри, содержащую глюкозо-пептонный (GP) агар (смотрите Таблицу 4.1.) с пенициллином G (100 единиц мл⁻¹) и стрептомицином (100 мкг мл⁻¹). Запечатывайте чашки, инкубируйте при комнатной температуре или при 25°C и ежедневно проверяйте. Периодически переносите появляющиеся верхушки гиф в свежие чашки с глюкозо-пептонным агаром с антибиотиками, пока не будут получены культуры, свободные от контаминации.

4.3.1.2.1.2. Метод 2

Образцы поражений, расположенных на боку или хвосте рыбы длиной <20 см, можно отобрать, разрезав рыбу на две части при помощи стерильного скальпеля и выполнив поперечный разрез по краю поражения. Фламбируйте скальпель, пока он не раскалится докрасна, и используйте его для того, чтобы простерилизовать обнаженную поверхность мышцы. При помощи скальпеля с небольшим лезвием вырежьте округлый фрагмент мышцы (2–4 мм³) из-под поражения и поместите в чашку Петри с глюкозо-пептонной средой (смотрите Таблицу 4.1.) с содержанием 100 единиц мл⁻¹ пенициллина G и 100 мкг мл⁻¹ стрептомицина. Инструменты не должны контактировать с контаминированной внешней поверхностью рыбы. Инкубируйте инокулированные среды при температуре приблизительно 25°C и исследуйте под микроскопом (желательно, инвертированным микроскопом) в пределах 12 часов. Периодически переносите появляющиеся верхушки гиф в чашки с глюкозо-пептонной средой с содержанием 12 г л⁻¹ технического агара, 100 единиц мл⁻¹ пенициллина G и 100 мкг мл⁻¹ стрептомицина до тех пор, пока не будут получены аксеничные культуры. Изолят оомицета также можно поддерживать при температуре 25°C на глюкозо-дрожжевом (GY) агаре (смотрите Таблицу 4.1.) и переносить в пробирку со свежим глюкозо-дрожжевым агаром каждые 1–2 недели (Hatai & Egusa, 1979).

4.3.1.2.2. Идентификация *Aphanomyces invadans*

Aphanomyces invadans не продуцирует половых структур, и, таким образом, осуществлять диагностику только по морфологическим критериям не следует. Однако оомицет можно идентифицировать вплоть до уровня рода, индуцируя спорогенез и демонстрируя типичные бесполовые характеристики *Aphanomyces*, как описано у Lilley с соавт., 1998. Для *A. invadans* характерен медленный рост в культуре и отсутствие роста при 37°C на глюкозо-пептонном агаре с дрожжевым экстрактом (GPY) (Таблица 4.1.). Подробные профили соотношения роста и температуры представлены у Lilley & Roberts, 1997. Две процедуры, которые можно использовать для подтверждения присутствия *A.*

invadans – это биопроба и амплификация рДНК *A. invadans* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

4.3.1.2.3. Индуцирование споруляции в культурах *Aphanomyces invadans*

Индуцирование бесполой репродуктивных структур необходимо для идентификации культур оомицетов как относящихся к роду *Aphanomyces*. Чтобы индуцировать споруляцию, поместите агаровую «пробку» (диаметром 3–4 мм) активно растущего мицелия в чашку Петри, содержащую глюкозо-пептонный с дрожжевым экстрактом (GPY) бульон и инкубируйте в течение 4 дней при температуре приблизительно 20°C. Вымойте питательный агар из получившейся в результате массы путем последовательного переноса с использованием пяти чашек Петри, содержащих автоклавированную прудовую воду (Таблица 4.1.), и оставьте на ночь при температуре 20°C в автоклавированной прудовой воде. По прошествии примерно 12 часов под микроскопом должно быть видно формирование ахлиодных кластеров первичных цист и высвобождение подвижных вторичных зооспор.

4.3.1.2.4. Биопроба

Можно произвести экспериментальное заражение рыб путем внутримышечного введения 0,1 мл суспензии 100+ подвижных зооспор рыбам, восприимчивым к инфекции *A. invadans* (предпочтительно *Channa striata* или другим восприимчивым видам), при температуре 20°C, и демонстрируя гистологический рост несептированных гиф, 12–25 мкм в диаметре, в мышце рыбы при отборе образцов по прошествии 7 дней и типичных грибовых гранул в мышце рыбы при отборе образцов по прошествии 10–14 дней.

4.3.1.2.5. Методы выявления антигенов с помощью антител

Поликлональные антитела к *A. invadans* или сапрофиту *Aphanomyces* продемонстрировали перекрестную реактивность друг к другу при использовании электрофореза белков в геле и анализа методом Вестерн-блота и иммуногистохимии. (Lilley с соавт., 1997b). Однако при помощи иммунофлуоресценции было установлено, что образовавшееся позже специфическое моноклональное антитело к *A. invadans* обладает высокой специфичностью и высокой чувствительностью к *A. invadans*. Это моноклональное антитело обеспечивало возможность выявления гиф *A. invadans* на ранней стадии инфекции (Miles с соавт., 2003).

4.3.1.2.6. Молекулярные методы

4.3.1.2.6.1. Амплификация ДНК *A. invadans* методом полимеразной цепной реакции

4.3.1.2.6.1.1. Получение препарата ДНК из изолята *A. invadans*

ДНК экстрагируют из активно растущей колонии культуры *A. invadans* в глюкозно-дрожжевом (GY) бульоне примерно на четвертый день или когда молодой мицелий достигает 0,5–1,0 см в диаметре. Мицелий переносят в

стерильные чашки Петри диаметром 100 мм, дважды промывают ФБР и затем помещают на тонкую оберточную бумагу для удаления жидкости. Верхушки гиф (~50–250 мг) отрезают стерильным лезвием скальпеля и переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл для экстракции ДНК. Успешно применялись коммерческие наборы для экстракции ДНК (Phadee с соавт., 2004b; Vandersea с соавт., 2006).

4.3.1.2.6.1.2. Получение препаратов ДНК из ткани, инфицированной *A. invadans*

Для экстракции ДНК подходят небольшие фрагменты инфицированной *A. invadans* ткани, 25–50 мг (Phadee с соавт., 2004a).

4.3.1.2.6.1.3. Диагностика методом ПЦР

Три опубликованных метода являются специфичными для *A. Invadans*. Рекомендуется использовать ультрачистую воду для всех химических разведений в ПЦР-реакции.

4.3.1.2.6.1.3.1. Метод 1

Сайт связывания видоспецифичного прямого праймера располагается около 3'-конца гена SSU (гена малой субъединицы), а сайт связывания видоспецифичного обратного праймера располагается в ITS1 регионе для *Ainvad-2F* (5'-TCA-TTG-TGA-GTG-AAA-CGG-TG-3') и *Ainvad-ITSR1* (5'-GGC-TAA-GGT-TTC-AGT-ATG-TAG-3'). Смесь для ПЦР содержала 25 пМ каждого праймера, 2,5 мМ каждого дезоксинуклеозид трифосфата, 0,5 единицы ДНК-полимеразы *Platinum Taq* и 20 нг геномной ДНК (полученной либо из изолята *Aphanomysces*, либо из инфицированной ткани) для общего объема 50 мкл. Амплификацию ДНК осуществляют в термоциклере при следующих условиях проведения циклов: 2 минуты при 95°C; 35 циклов, каждый состоящий из 30 секунд при 95°C, 45 секунд при 56°C, 2,5 минут при 72°C; и финальная элонгация продолжительностью 5 минут при 72°C. Анализ продукта ПЦР осуществляют методом электрофореза в агарозном геле, а длина целевого продукта составляет 234 п.о. (Vandersea с соавт., 2006).

4.3.1.2.6.1.3.2. Метод 2

Сайты связывания видоспецифичных праймеров располагаются в ITS1 и ITS2 регионах. Прямой праймер – ITS11 (5'-GCC-GAA-GTT-TCG-CAA-GAA-AC-3'), а обратный – ITS23 (5'-CGT-ATA-GAC-ACA-AGC-ACA-CCA-3'). Смесь для ПЦР содержит 0,5 мкМ каждого праймера, 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозид трифосфата, 1,5 мМ MgCl₂, 0,6 единицы ДНК-полимеразы *Taq* и 20 нг геномной ДНК (полученной из изолята *Aphanomysces*) для общего объема 25 мкл. Амплификацию ДНК осуществляют при следующих условиях проведения циклов: 5 минут при 94°C; 25 циклов, каждый состоящий из 30 секунд при 94°C, 30 секунд при 65°C, 1 минуты при 72°C; и финальная элонгация

продолжительностью 5 минут при 72°C. Анализ продукта ПЦР осуществляют методом электрофореза в агарозном геле, а длина целевого продукта составляет 550 п.о. Амплификация методом ПЦР с использованием ДНК-матрицы, полученной из инфицированной ткани, сходна с приведенным выше протоколом за исключением того, что используется 5 нг ДНК-матрицы для проведения 35 циклов (Phadee с соавт., 2004b).

4.3.1.2.6.1.3.3. Метод 3

Сайты связывания видоспецифичных праймеров располагаются в ITS1 и ITS2 регионах. Прямой праймер – BO73 (5'-CTT-GTG-CTG-AGC-TCA-CAC-TC-3'), а обратный – BO639 (5'-ACA-CCA-GAT-TAC-ACT-ATC-TC-3'). Смесь для ПЦР содержит 0,6 мкМ каждого праймера, 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозид трифосфата, 1,5 мМ MgCl₂, 0,625 единиц ДНК-полимеразы Taq и приблизительно 5 нг геномной ДНК (или 2,5 мкл ДНК-матрицы, экстрагированной из 25 мг инфицированной ткани и суспензированной в 100 мкл буфера) в 50 мкл объема реакционной смеси (Oidtmann с соавт., 2008). Амплификацию ДНК осуществляют при следующих условиях проведения циклов: 96°C в течение 5 минут; 35 циклов по 1 минуте при 96°C, 1 минуте при 58°C и 1 минуте при 72°C; финальная элонгация при 72°C в течение 5 минут (Oidtmann, в частной беседе). Анализ продукта ПЦР осуществляют методом электрофореза в агарозном геле, а длина целевого продукта составляет 564 п.о.

Все обнаруженные на сегодняшний день изоляты *A. invadans* относятся к единственному генотипу, и это облегчает идентификацию. В качестве альтернативного варианта можно провести секвенирование продуктов ПЦР и сравнить результаты с последовательностью, депонированной в общедоступных генетических банках данных. *Aphanomyces invadans* имеет характеристики, сходные с *A. astaci*, этиологическим возбудителем чумы ракообразных. Эти два патогенных оомицета можно дифференцировать, используя молекулярные инструменты (Diéguez-Uribeondo с соавт., 2009; Lilley с соавт., 2003; Phadee et al., 2004b; Vandersea с соавт., 2006).

4.3.1.2.6.2. Метод флуоресцентной гибридизации *in-situ* (FISH) с пептидными нуклеиновыми кислотами

Метод флуоресцентной гибридизации *in-situ* (FISH) с пептидными нуклеиновыми кислотами (ПНК) продемонстрировал высокую специфичность в отношении *A. invadans*. Метод обладает способностью напрямую обнаруживать мицелиеподобную структуру оомицета в тонких срезах тканей пораженных органов восприимчивых рыб. Меченый флуоресцеином (FLU) зонд, предназначенный для гибридизации с малой субъединицей рПНК *A. invadans* (п.о. 621-635; GenBank, инвентарный номер AF396684) – 5'-FLU-GTA-CTG-ACA-TTT-CGT-3' или Ainv-FLU3.

Пораженную ЭЯС ткань фиксируют и гибридизируют как можно скорее после отбора рыбы, чтобы свести к минимуму деградацию РНК. Ткань (~20 мг) отсекают от наружного края поражений стерильными лезвиями скальпеля и помещают в отдельные лунки 24-луночного микротитрационного планшета. Один мл этанол-солевого фиксатора (44 мл 95% этанола, 10 мл деионизированной H₂O и 6 мл 25 × SET буфера [3,75 М NaCl, 25 мМ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты), 0,5 М Трис/HCl, pH 7,8]) с содержанием 3% полиоксиэтиленсорбитан монолаурата (Tween 20) добавляют для увеличения пермеабилзации ткани. Микротитрационный планшет бережно встряхивают при комнатной температуре на орбитальном шейкере (30 об/мин) в течение 1,5 часов. Фиксированные ткани промывают (два раза в течение 15 минут каждый) 0,5 мл гибридизационного буфера (5 × SET, 0,1% [об/об] Igepal-CA630 и 25 мкг мл⁻¹ поли[A]) с содержанием 3% Tween 20. Гибридизационный буфер удаляют, и ткани ресуспендируют в 0,5 мл гибридизационного буфера, содержащего 3% Tween 20 и 100 нМ зонда Ainv-FLU3. Контрольные образцы без зонда инкубируют с 0,5 мл гибридизационного буфера/3% Tween 20. Все ткани инкубируют при 60°C в течение 1 часа в темноте. После инкубации ткани промывают дважды с использованием 1 мл предварительно подогретого (60°C) 5 × SET буфера с содержанием 3% Tween 20 для удаления остаточного зонда. Образцы тканей монтируют на предметные стекла микроскопа с поли-L-лизиновым покрытием. Одну каплю раствора, препятствующего выгоранию флуоресценции, наносят на образцы, которые затем накрывают покровным стеклом. Анализируют при помощи световой и эпифлуоресцентной микроскопии. Настройки камеры и микроскопа для анализов методом эпифлуоресценции сохраняют неизменными с тем, чтобы можно было провести сравнительные анализы относительной интенсивности флуоресценции между образцами с зондами и без зондов. Флуоресцирующие гифы оомицетов выглядят как зеленая флуоресценция на темном фоне ткани. Приведенные выше подробные протоколы опубликованы Vandersea с соавт., 2006. Применяя метод FISH, можно очень хорошо визуализировать *A. invadans* в тонких срезах тканей по сравнению с давленным препаратом нефиксированной ткани.

Таблица 4.1. Среда для выделения, роста и споруляции культур *Aphanomyces invadans*

Среда глюкозо-пептонная (GP)	Бульон глюкозо-пептонный с экстрактом дрожжей (GPY)	Агар глюкозо-пептонный с экстрактом дрожжей (GPY)	Агар глюкозо-дрожжевой (GY)	Автоклавированная прудовая вода
3 г литр ⁻¹ глюкозы 1 г литр ⁻¹ пептона 0,128 г литр ⁻¹ MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,014 г литр ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0,029 г литр ⁻¹ CaCl ₂ ·2H ₂ O	бульон GP + 0,5 г литр ⁻¹ экстракта дрожжей	бульон GPY + 12 г литр ⁻¹ технического агара	1% глюкозы, 0,25% экстракта дрожжей, 1,5% агара	Отберите образцы прудовой/озерной воды, которая, как известно, поддерживает рост оомицетов.

2,4 мг литр⁻¹ FeCl₃·6H₂O
 1,8 мг литр⁻¹ MnCl₂·4H₂O
 3,9 мг литр⁻¹ CuSO₄·5H₂O
 0,4 мг литр⁻¹ ZnSO₄·7H₂O

Отфильтруйте через
 фильтровальную
 бумагу Whatman 541.
 Соедините одну часть
 прудовой воды с
 двумя частями
 дистиллированной
 воды и
 автоклавируйте. pH до
 6–7.

4.3.1.2.7. Очистка возбудителя

Необходимо поддерживать *A. invadans* в аксеничной культуре. Поскольку для него характерен медленный рост, он легко становится контаминированным другими микроорганизмами, такими как бактерии и другие быстрорастущие оомицеты и грибы. Попытки очистить или выделить *A. invadans* из контаминированных культур, как правило, оканчиваются неудачей.

4.3.2. Серологические методы

Серологические методы для выявления и идентификации *A. invadans* с использованием больных рыб в качестве образцов не практичны. В случае необходимости, моноклональное антитело обеспечивает более высокую специфичность и чувствительность, чем поликлональное антитело, для выявления или идентификации *A. invadans* серологическими методами у больных особей или в изолятах патогена.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для использования в целях надзора, выявления и диагностики инфекции *A. invadans* перечислены в таблице 5.1. Обозначения, использованные в таблице, означают: а = данный метод является методом, рекомендованным по причинам доступности, целесообразности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = данный метод применяется в некоторых ситуациях, однако затраты, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение; и d = данный метод в настоящее время не рекомендуется для данной цели. Данные обозначения в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает в себя такие аспекты, как достоверность, чувствительность, специфичность и целесообразность. Хотя не все из тестов, перечисленных как относящиеся к категории а или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются, не давая при этом вызывающих сомнение результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

	Целевой надзор		

Метод	Мальки рыб	Молодь	Взросл ые особи	Предварит ельная диагностика а	Подтвержда ющая диагности ка
Макроскопические признаки	c	c	c	b	c
Прямая СМ; наблюдение гифов оомицетов в тканях, давленных препаратах нефиксированных тканей	d	d	d	b	b
FISH; наблюдение гифов оомицетов в тканях	d	d	d	a	a
Гистопатология	c	c	c	a	a
Выделение <i>A. invadans</i> и подтверждающая идентификация посредством биопробы или ПЦР	d	d	d	a	a
ПЦР с использованием экстрактов из тканей	d	d	d	a	a
Анализ последовательностей	d	d	d	d	a
Трансмиссионная ЭМ тканей	d	d	d	d	d

СМ = световая микроскопия; FISH = флуоресцентная
гибридизация *in situ* с пептидными нуклеиновыми кислотами;
ПЦР = полимеразная цепная реакция; ЭМ = электронная
микроскопия.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора для объявления свободы от инфекции *Aphanomyces invadans*

Тест для целевого надзора для объявления свободы от инфекции *A. invadans* – это исследование макроскопических признаков. Целевой надзор осуществляется дважды в год для того, чтобы охватить весь диапазон сезонных изменений, по меньшей мере, один раз в течение времени года, благоприятного для возникновения инфекции *A. invadans*, или когда показатели температуры воды находятся на уровне около 18–25°C. Необходимо применять меры биозащиты для поддержания статуса свободы от болезни на контролируемых аквакультурных объектах или компартментах.

При использовании теста по макроскопическим признакам для целевого надзора, необходимо исследовать большое количество рыб, не умерщвляя их. Отбор рыб в качестве образцов на фермах, в компартментах или в природных водоемах следует осуществлять бережно, используя подходящие снасти или сети. Надлежащее количество исследуемых особей рыб должно быть основано на подробной информации, приведенной в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (2009).

Когда рыбы демонстрируют макроскопические признаки, сходные с инфекцией *A. invadans*, их следует категоризировать как подозрительных рыб, и данное место/ферму/компартмент/зону следует считать подозрительными. Подозрительных особей следует подвергнуть дальнейшему тестированию, используя методы,

перечисленные в рамках предварительной диагностики, с последующей подтверждающей диагностикой, согласно указанному в Таблице 5.1.

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Положительный результат, полученный при помощи любого из диагностических методов, описанных в Разделе 4, следует считать подозрительным.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

У восприимчивых видов в пределах известного географического диапазона инфекции *A. invadans* подтвержденным случаем инфекции *A. invadans* является положительный результат, когда при гистопатологическом исследовании наблюдаются микотические гранулемы.

У других видов-хозяев или за пределами известного диапазона *A. invadans* рекомендуется подтверждение посредством гистопатологического исследования и ПЦР.

8. Список литературы

BALDOCK F.C., BLAZER V.S., CALLINAN R.B., HATAI K., KARUNASAGAR I., MOHAN C.V. & BONDAD-REANTASO M.G. (2005). Outcomes of a short expert consultation on epizootic ulcerative syndrome (EUS): Re-examination of causal factors, case definition and nomenclature. In: Diseases in Asian Aquaculture V. Walker P., Laster R. & Bondad-Reantaso M.G., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 555–585.

BALASURIYA L.K.S.W. (1994). Epizootic ulcerative syndrome in fish in Sri Lanka, country status report. In: Proceeding of the ODA Regional Seminar on Epizootic Ulcerative. Robert R.J., Campbell B. & MacRae I.H., eds. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand, 39–47.

BLAZER V.S., VOGELBEIN W.K., DENSMORE C.L., MAY E.B., LILLEY J.H. & ZWERNER D.E. (1999). Aphanomyces as a cause of ulcerative skin lesions of menhaden from Chesapeake Bay tributaries. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 340–349.

BONDAD-REANTASO M.G., LUMANLAN S.C., NATIVIDAD J.M. & PHILLIPS M.J. (1992). Environmental monitoring of the epizootic ulcerative syndrome (EUS) in fish from Munoz, Nueva Ecija in the Philippines. In: Diseases in Asian Aquaculture 1. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 475–490.

CATAP E.S. & MUNDAY B.L. (1998). Effects of variations of water temperature and dietary lipids on the expression of experimental epizootic ulcerative syndrome (EUS) in sand whiting, *Sillago ciliata*. *Fish Pathol.*, **33**, 327–335.

CHINABUT S. & ROBERTS R.J. (1999). Pathology and Histopathology of Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS). Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Royal

Thai Government, Bangkok, Thailand, 33 pp (ISBN 974-7604-55-8).

CHINABUT S., ROBERTS R.J., WILLOUGHBY G.R. & PEARSON M.D. (1995). Histopathology of snakehead, *Channa striatus* (Bloch), experimentally infected with the specific *Aphanomyces* fungus associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) at different temperatures. *J. Fish Dis.*, **18**, 41–47.

DIÉGUEZ-URIBEONDO J., GARCIA M.A., CERENIUS L., KOZUBÍKOVÁ E., BALLESTEROS I., WINDELS C., WEILAND J., KATOR H., SÖDERHÄLL K. & MARTÍN M.P. (2009). Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology*, **46**, 365–376.

EGUSA S. & MASUDA N. (1971). A new fungal disease of *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **6**, 41–46.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2009). Report of the international emergency disease investigation task force on a serious fish disease in Southern Africa, 18–26 May 2007. FAO, Rome, Italy, 70 pp.

FRASER G.C., CALLINAN R.B. & CALDER L.M. (1992). *Aphanomyces* species associated with red spot disease: an ulcerative disease of estuarine fish from eastern Australia. *J. Fish Dis.*, **15**, 173–181.

HATAI K. & EGUSA S. (1979). Studies on pathogenic fungus of mycotic granulomatosis III. Development of the medium for MG-fungus. *Fish Pathol.*, **13**, 147–152.

HATAI K., EGUSA S., TAKAHASHI S. & OOE K. (1977). Study on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis – I. Isolation and pathogenicity of the fungus from cultured-ayu infected with the disease. *Fish Pathol.*, **12**, 129–133.

HATAI K., NAKAMURA K., AN RHA S., YUASA K. & WADA S. (1994). *Aphanomyces* infection in dwarf gourami (*Colisa lalia*). *Fish Pathol.*, **29**, 95–99.

KHAN M.H., MARSHALL L., THOMPSON K.D., CAMPBELL R.E. & LILLEY J.H. (1998). Susceptibility of five fish species (Nile tilapia, rosy barb, rainbow trout, stickleback and roach) to intramuscular injection with the *Oomycete* fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **18**, 192–197.

LILLEY J.H., CALLINAN R.B., CHINABUT S., KANCHANAKHAN S., MACRAE I.H. & PHILLIPS M.J. (1998). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) technical handbook. Aquatic Animal Health Research Institute., Bangkok, Thailand, 88 pp.

LILLEY J.H., HART D., PANYAWACHIRA V., KANCHANAKHAN S., CHINABUT S.,

- SÖDERHÄLL K. & CERENIUS L. (2003). Molecular characterization of the fish-pathogenic fungus *Aphanomyces invadans*. *J. Fish Dis*, **26**, 263–275.
- LILLEY J.H., HART D., RICHARDS R.H., ROBERTS R.J., CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1997a). Pan-Asian spread of single fungal clone results in large scale fish kills. *Vet. Rec.*, **140**, 653–654.
- LILLEY J.H., PETCHINDA T. & PANYAWACHIRA V. (2001). *Aphanomyces invadans* zoospore physiology: 4. *In vitro* viability of cysts. *The AAHRI Newsletter*, **10**, 1–4.
- LILLEY J.H. & ROBERTS R.J. (1997). Pathogenicity and culture studies comparing the *Aphanomyces* involved in epizootic ulcerative syndrome (EUS) with other similar fungi *J. Fish Dis.*, **20**, 135–144.
- LILLEY J.H., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (1997b). Characterization of *Aphanomyces invadans* by electrophoretic and Western blot analysis. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 187–197.
- LUMANLAN-MAYO S.C., CALLINAN R.B., PACLIBARE J.O., CATAP E.S. & FRASER G.C. (1997). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) in rice-fish culture systems: an overview of field experiments 1993-1995. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*. Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 129–138.
- MCKENZIE R.A. & HALL W.T.K. (1976). Dermal ulceration of mullet (*Mugil cephalus*). *Aust. Vet. J.*, **52**, 230–231.
- MILES D.J.C., POLCHANA J., LILLEY J.H., KANCHANAKHAN S., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (2001). Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture*, **195**, 1– 15.
- MILES D.J.C., THOMPSON K.D., LILLEY J.H. & ADAMS A. (2003). Immunofluorescence of the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*, using a monoclonal antibody. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 77–84.
- OIDTMANN B., STEINBAUER GEIGER S. & HOFFMANN R.W. (2008). Experimental infection and detection of *Aphanomyces invadans* in European catfish, rainbow trout and European eel. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 185–207.
- PHADEE P., KURATA O. & HATAI K. (2004a). A PCR method for the detection of *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathol.*, **39**, 25–31.
- PHADEE P., KURATA O., HATAI K., HIRONO I. & AOKI T. (2004b). Detection and identification of fish-pathogenic *Aphanomyces piscicida* using polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 220–230.

PRADHAN P.K., MOHAN C.V., SHANKAR K.M., KUMAR B.M. & DEVARAJA G. (2007). Yearlings of Indian major carps resist infection against the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Current Science*, **92**, 1430–1434.

THOMPSON K.D., LILLEY J.H., CHINABUT S. & ADAMS A. (1997). The antibody response of snakehead, *Channa striata* Bloch, to *Aphanomyces invadans*. *Fish & Shellfish Immunology*, **7**, 349–353.

TONGUTHAI K. (1985). A preliminary account of ulcerative fish diseases in the Indo-Pacific region (a comprehensive study based on Thai experiences). National Inland Fisheries Institute, Bangkok, Thailand, 39 pp.

VANDERSEA M.W., LITAKER R.W., YONNISH B., SOSA E., LANDSBERG J.H., PULLINGER C., MOON-BUTZIN P., GREEN J., MORRIS J.A., KATOR H., NOGA E.J. & TESTER P.A. (2006). Molecular assays for detecting *Aphanomyces invadans* in ulcerative mycotic fish lesions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1551–1557.

WADA S., AN RHA S., KONDOH T., SUDA H., HATAI K. & ISHII H. (1996). Histopathological comparison between ayu and carp artificially infected with *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathol.*, **31**, 71–80.

WILLOUGHBY L.G. & ROBERTS R.J. (1994). Improved methodology for isolation of the *Aphanomyces* fungal pathogen of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in Asian fish. *J. Fish Dis.*, **17**, 541–543.

*

* *

NB: В настоящее время нет Референтной лаборатории МЭБ по инфекции *A. invadans* (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/>).

ИНФИЦИРОВАНИЕ *GYRODACTYLUS SALARIS*

1. Предмет рассмотрения

Инфицирование *Gyrodactylus salaris* означает заражение патогенным возбудителем *Gyrodactylus salaris* (*G. salaris*), относящимся к роду *Gyrodactylus*, семейству *Gyrodactylidae*.

2. Информация о болезни

2.1. Патогенные факторы

2.1.1. Этиологический агент, штаммы возбудителя

Несколько штаммов или клад *Gyrodactylus salaris* были идентифицированы на основе генотипирования с использованием маркера митохондриальной цитохромоксидазы 1 (CO1) (Hansen и соавт., 2003; Hansen и соавт., 2007b; Meiniälä и соавт., 2002; Meiniälä и соавт., 2004). Хотя, по-видимому, не существует какого-либо соответствия между штаммами, идентифицированными по CO1 и патогенности (Hansen и соавт., 2007a), все штаммы, выделенные от атлантического лосося, которые были изучены в лабораторных экспериментах, до сих пор являются высокопатогенными для штаммов атлантического лосося. Штаммы, непатогенные для лосося, были выделены из неадромального арктического гольца (*Salvelinus alpinus*) в Норвегии (Olstad и соавт., 2007a; Robertsen и соавт., 2007) и из радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) в Дании (Jørgensen и соавт., 2007; Lindenstrøm и соавт., 2003).

2.1.2. Выживаемость вне хозяина

Выживаемость отдельных паразитов зависит от температуры, например, в течение около 24 часов при температуре 19°C, 54 часа при температуре 13°C, 96 часов при температуре 7°C и 132 часа при температуре 3°C (Olstad и соавт., 2006). Аналогичным образом, выживаемость на погибшем хозяине зависит от температуры: максимальное время выживания *G. salaris* на мертвом атлантическом лососе составляет 72, 142 и 365 часов при 18, 12 и 3°C соответственно (Olstad и соавт., 2006).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Известно, что *Gyrodactylus salaris* выживает при температуре от 0 до 25°C. Уровень толерантности к температуре выше 25°C неизвестен. Неустойчив к замерзанию. *Gyrodactylus salaris* чувствителен к высыханию. *Gyrodactylus salaris*

погибает через несколько дней при $pH \leq 5$. Он более чувствителен к низкому уровню pH ($5,1 < pH < 6,4$) в сочетании с алюминием и цинком, чем атлантический лосось-хозяин (Poléo и соавт., 2004; Soleng и соавт., 1999) (см. также раздел 2.4.2).

2.1.4. Жизненный цикл

Gyrodactylus salaris является облигатным паразитом с прямым жизненным циклом. Паразиты рожают живое потомство, другие стадии жизненного цикла отсутствуют.

2.2. Факторы, связанные с хозяином

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды, которые соответствуют критериям для включения в список вида, восприимчивого к заражению *G. salaris*, в соответствии с главой 1.5. *Кодекса здоровья водных животных (Водный кодекс)*,⁰ включают: арктический голец (*Salvelinus alpinus*), атлантический лосось (*Salmo salar*), кумжа (*Salmo trutta*), хариус (*Thymallus thymallus*), североамериканская ручьевая форель (*Salvelinus fontinalis*) и радужная форель/микижа (*Oncorhynchus mykiss*).

2.2.2. Виды с неполным доказательством восприимчивости

Виды, по которым имеются неполные доказательства соответствия критериям для включения в список как восприимчивых к заражению *G. salaris* согласно главе 1.5. *Водного кодекса*, включают в себя: неизвестно.

Кроме того, результаты патоген-специфической положительной полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволили идентифицировать *G. salaris* на следующих организмах, но длительная активная инфекция не была продемонстрирована: [В стадии изучения].

2.2.3. Восприимчивые стадии развития хозяина

Все стадии развития хозяина восприимчивы, но смертность наблюдалась только на стадии мальков и молоди.

2.2.4. Видовая или субпопуляционная предрасположенность (вероятность обнаружения)

Не применимо.

2.2.5. Органы-мишени и инфицированные ткани

Gyrodactylus salaris обычно встречается на плавниках зараженного атлантического лосося, но распределение паразитов на хозяине может варьироваться в зависимости от интенсивности инфекции (Jensen & Johnsen, 1992; Мо, 1992). Паразиты также часто встречаются на теле и, реже, на жабрах.

На других хозяевах распределение может отличаться, но в целом паразит относительно менее распространен на плавниках и относительно более распространен на теле по сравнению с атлантическим лососем.

2.2.6. Персистентная инфекция

Не применимо.

2.2.7. Векторы

Не применимо.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Gyrodactylus salaris распространился в реки и на фермы в основном за счет перемещения живой рыбы. Рыба, мигрирующая в солоноватой воде, также может способствовать распространению паразита между реками (см. также раздел 2.3.5). Популяции, обитающие вблизи зараженных рек, подвергаются большому риску заражения, если они находятся в одной и той же солоноватой водной системе. В случае заноса *G. salaris* на ферму с атлантическим лососем существует высокая вероятность заражения всей рыбы на ферме, в зависимости от схемы организации фермы.

2.3.2. Превалентность

Превалентность у молоди восприимчивых линий атлантического лосося в реках достигает почти 100% (Appleby & Mo, 1997; Johnsen & Jensen, 1991); аналогичным образом превалентность разводимого на ферме атлантического лосося (в пресной воде) повышается почти до 100% в течение короткого времени после заноса паразита. Превалентность резистентных линий в реках и на фермах неизвестна. Превалентность среди других восприимчивых видов обычно намного ниже, и может быть менее 10% (например, у разводимой на ферме радужной форели; Buchmann & Bresciani, 1997).

2.3.3. Географическое распределение

Распределение *Gyrodactylus salaris* ограничивается территорией Европы. Возбудитель был выделен из разводимого на ферме атлантического лосося или радужной форели в нескольких (главным образом, северных) европейских странах. В дикой природе паразит был обнаружен на диких лососевых, в основном, на атлантическом лососе в реках России, Швеции и Норвегии. Инфекция *G. salaris* чаще, чем это считалось ранее, встречается у разводимой на ферме радужной форели, и, вероятно, инфекция будет присутствовать в большем количестве стран, чем это известно в настоящее время. В 2006 году было зарегистрировано заражение *G. salaris* на рыбных фермах в Италии (Paladini и соавт., 2009), а в 2007 году - на рыбных фермах в Польше (Rokicka и соавт., 2007).

и Македонии (Zietara и соавт., 2007).). В 2009 г. Референтной лабораторией МЭБ был идентифицирован *G. salaris* в рыбоводческих хозяйствах в Румынии. Было продемонстрировано, что в Великобритании и Ирландии паразит отсутствовал.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Смертность среди мальков и молоди разводимого на ферме атлантического лосося может достигать 100% при отсутствии лечения. Смертность среди мальков и молоди дикого атлантического лосося в норвежских реках может достигать 98%, в среднем около 85%. Смертность у других восприимчивых видов хозяев обычно низкая или не наблюдается.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Хотя *G. salaris* в основном обитает в пресной воде, он легко размножается при уровне солености воды до 5-6 ppt (частей на триллион). Выживание при более высоком уровне солености зависит от температуры. Например, при температуре 1,4°C *G. salaris* может выживать в течение 240 часов, 78 часов и 42 часов при солености 10 ppt, 15 ppt и 20 ppt соответственно, тогда как при 12°C он может выживать в течение 72 часов, 24 часов и 12 часов при этих же уровнях солености, соответственно (Soleng & Bakke, 1997).

2.4. Контроль и предупреждение

2.4.1. Вакцинация

Вакцины отсутствуют.

2.4.2. Химиотерапия

Gyrodactylus salaris чувствителен к изменениям химического состава воды. Он чувствителен к наиболее часто используемым химическим веществам для обработки емкостей для разводимых на ферме лососевых и их икры (например, соленая вода с высокой минерализацией, формальдегид и соединения, содержащие хлор и йод). Кроме того, *G. salaris* чувствителен к кислым растворам (pH 5,0–6,0) сульфата алюминия ($[Al_2(SO_4)_3]$) (Soleng и соавт., 1999). Поскольку сульфат алюминия менее токсичен для рыб в умеренно подкисленных водах, чем *G. salaris*, это химическое вещество использовалось при попытках ликвидации паразита в речных системах Норвегии.

2.4.3. Иммуностимуляция

Иммуностимуляция отсутствует.

2.4.4. Разведение резистентных популяций

В лабораторных экспериментах селективное разведение привело к увеличению выживаемости у потомства (Salte и соавт., 2010). Тем не менее, селективное

разведение не применялось к поголовью дикого лосося, главным образом потому, что поголовье будет оставаться зараженным и, следовательно, паразит сможет распространиться в другие реки.

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

Восполнение поголовья резистентными штаммами атлантического лосося (например, штамм Балтийская Нева) в зараженных реках несовместимо с существующей системой управления штаммами атлантического лосося.

2.4.6. Блокирующие агенты

Не применимо.

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Икра, которая переносится с зараженных ферм, должна быть продезинфицирована (с использованием йодсодержащих соединений).

2.4.8. Основы практики рыбоводства

Общие рекомендуемые практики рыбоводства в целях предотвращения распространения инфекционных возбудителей между подразделениями в пресноводных рыбохозяйствах применимы к *G. salaris*. Оборудование (например, рыболовные сети), используемые в одном подразделении, не должны использоваться в другом подразделении без надлежащей дезинфекции.

3. Отбор образцов

3.1. Отбор индивидуальных образцов

В тех случаях, когда производится отбор проб, и подозрение на инфекцию отсутствует, должна осуществляться случайная выборка с достаточным количеством рыбы, например, из реки. В хозяйствах отбирают рыбу, если у нее наблюдаются клинические признаки инфекции (как описано в разделе 4.1.1).

3.2. Консервация образцов для передачи

Рыбу подвергают умерщвлению и не допускают ее высыхания перед консервацией. Целую рыбу следует хранить в 80–100% этаноле во флаконах, достаточно больших, чтобы обеспечить дополнительное пространство для консерванта. Концентрация этанола после консервации не должна быть ниже 70%. Как правило, эта концентрация обеспечивается в случае, если соотношение рыбы к этанолу не превышает 1:9. Более низкая концентрация может вызвать распад слизистой ткани и эпидермиса, и выпадение образцов *Gyrodactylus*, даже если они подвергнуты консервации. Флаконы должны иметь достаточно широкое отверстие, чтобы избежать соскабливания с образцов *Gyrodactylus*, когда рыбу помещают во флакон или вынимают для

исследования. Флаконы следует хранить в горизонтальном положении до тех пор, пока не будет достигнута фиксация/консервация ткани для предотвращения скручивания рыбы. Это облегчает осмотр рыбы, поскольку ее можно легко повернуть с помощью щипцов под микроскопом. После того, как консервация рыбы завершена, флаконы можно хранить в вертикальном положении.

Поскольку *G. salaris* характерен для плавников атлантического лосося, также могут быть использованы плавники, отрезанные от тела и хранящиеся в этаноле, как описано выше. Это особенно удобно для крупной рыбы и в полевых условиях, когда, например, транспортировка ограничена.

3.3. Объединение образцов

Образцы могут быть объединены, однако каждую рыбу впоследствии исследуют и анализируют отдельно. Плавники рыбы, полученной из хозяйства или выловленной из реки, можно объединить, а также исследовать и анализировать отдельно, но в этом случае каждый плавник не может быть соотнесен с определенной рыбой-хозяином.

3.4. Наиболее подходящие для исследования органы или ткани

Для исследования подходит рыба в виде живых целых образцов, либо в живом виде под действием анестезии (например, с MS222), либо недавно умерщвленные, либо в консервированном виде. Кроме того, могут быть подвергнуты исследованию свежие или консервированные плавники. Во всех случаях используется один и тот же метод исследования (см. Раздел 4.3.1). Обследование живой анестезированной рыбы является очень трудоемким и не рекомендуется.

Вместо исследования всей рыбы можно проверить плавники (используя метод, описанный в разделе 4.3.1). В случае заражения молоди норвежского лосося, почти у всех рыб имеется хотя бы один *G. salaris* на одном из плавников. У некоторых рыб образцы *G. salaris* могут появляться на теле или голове, включая ноздри, жабры и полость рта. Распределение *G. salaris* на плавниках и других частях рыбы варьируется в зависимости от вида рыбы и, по-видимому, зависит от линии лососевых.

3.5. Не подходящие для исследования образцы/ткани

Мертвая рыба, хранящаяся на льду, неприемлема для исследования на *Gyrodactylus*, даже если рыба хранится отдельно в полиэтиленовых пакетах и т. д. Паразиты быстро умирают, если не покрыты водой, и поскольку эти паразиты не имеют экзоскелета, мертвые паразиты быстро распадаются. Если такую мертвую рыбу промыть в воде, в осадке могут быть обнаружены образцы *Gyrodactylus*. Однако, если образцы не найдены в осадке, нельзя сделать вывод, что рыба не была заражена. Образцы *Gyrodactylus*, фиксированные в формальдегиде, трудно идентифицировать морфологически, и они не подходят для анализа ДНК.

4. Диагностические методы

4.1. Полевые диагностические методы

4.1.1. Клинические признаки

Обычно у рыб, имеющих одного или до нескольких десятков образцов паразитов, отсутствуют клинические признаки.

На ранней стадии болезни характерно усиленное свечение (рыба травмирует кожу о субстрат). Позже, рыба может приобрести сероватый цвет из-за увеличенного производства слизи, и плавники могут быть разрушены. Больные рыбы – вялые, и обычно находятся в стоячей воде.

4.1.2. Изменения в поведении

Признак свечения распространен среди умеренно или сильно зараженных рыб, выращенных на ферме, так как они травмируют кожу о дно или стенки емкости или пруда. Рыба со значительной степенью инфицирования может иметь пониженную активность и оставаться в водах с несильным течением.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

Сильно зараженная рыба может стать серовой в результате повышенного образования слизи, а на более поздней стадии спинные и грудные плавники могут стать белесыми в результате утолщения (главным образом гипертрофии) эпидермиса.

Сильно зараженная рыба может иметь разрушенные плавники, особенно спинные, хвостовые и грудные, вследствие питания паразитов.

У рыб с инфекцией *G. salaris* обычно наблюдаются вторичные грибковые инфекции (*Saprolegnia* spp.).

4.2.2. Клиническая химия

Не применимо.

4.2.3. Микроскопические патологические изменения

Не применимо.

4.2.4. Влажные препараты

Соскобы (влажные препараты) с кожи или плавников могут быть использованы для обнаружения образцов *Gyrodactylus* на зараженной рыбе. В этих случаях при

высокой интенсивности заражения сотни или тысячи образцов *Gyrodactylus* присутствуют по всему телу и плавникам. Влажные препараты обычно не подходят для идентификации *Gyrodactylus* до уровня вида, и должны быть приготовлены другие препараты для морфологического анализа или анализа ДНК (см. ниже). Если количество образцов *Gyrodactylus* небольшое, вероятность обнаружения паразитов при использовании соскобов ограничена.

4.2.5. Мазки

Не применимо.

4.2.6. Фиксированные срезы

Не применимо.

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Не применимо.

4.3. Обнаружение возбудителя и методы идентификации

4.3.1. Методы прямого обнаружения

Обнаружение *Gyrodactylus* и идентификация *G. salaris* является двухэтапным процессом. Во-первых, образцы паразитов осматривают с помощью оптического оборудования, а во-вторых, паразиты идентифицируются, как правило, индивидуально с использованием другого оборудования и методов.

Для обнаружения *Gyrodactylus* необходимо использовать оптическое оборудование. В случае подозрения на вспышку инфекции *G. salaris*, где доступна только световая микроскопия, для обнаружения образцов *Gyrodactylus* можно использовать влажные препараты. Тем не менее, настоятельно рекомендуется не использовать этот метод в программе эпиднадзора, поскольку предполагаемая специфичность и чувствительность являются низкими (значение не известно), и, следовательно, количество изученных рыб является высоким.

Для исследования подходит рыба в виде живых целых образцов (под действием анестезии), либо недавно умерщвленная или подвергшаяся консервации. Во всех случаях используется один и тот же метод исследования (см. ниже). Исследование живой анестезированной рыбы очень трудоемко и не рекомендуется. Образцы *Gyrodactylus*, фиксированные в формальдегиде, также очень трудно идентифицировать, и они не подходят для анализа ДНК. Вместо того, чтобы исследовать целую рыбу, можно проверить плавники (методом, описанным ниже). В случае заражения молоди восприимчивых линий атлантического лосося, почти у всех рыб на одном из плавников имеется хотя бы один *G. salaris*. У некоторых рыб могут встречаться образцы *G. salaris* на теле или голове, включая ноздри, жабры и полость рта. Распределение *G. salaris* на плавниках и других частях рыбы отличается в зависимости от видов рыб, и распределение, по-видимому, также зависит от линии лососевых.

Живую анестезированную рыбу, свежесрезанные плавники или законсервированную в этаноле рыбу или плавники следует исследовать под бинокулярным препаровальным микроскопом с мощной подсветкой. Рыбу помещают в контейнер и полностью покрывают пресной водой. Консервированная рыба также может быть исследована в этаноле. Живые паразиты легче обнаруживаются по их движениям, поэтому следует избегать нарушения преломления света на коже рыбы. Живые *Gyrodactylus* бесцветны, в то время как образцы *Gyrodactylus*, сохраненные в этаноле, обычно только слегка непрозрачны. Если препаровальный микроскоп имеет верхнюю подсветку, нижняя часть столика микроскопа должна быть черной. Это увеличит контрастность, и паразитов будет легче обнаружить. Должна быть исследована вся поверхность рыбы, включая жабры и полость рта. Для этого процесса лучше всего использовать два пинцета. Плавники относительно мелких рыб (менее 10 см) также можно исследовать с помощью подсветки через дно микроскопа. Таким образом, на плавниках обычно можно легко обнаружить образцы *Gyrodactylus*.

4.3.1.1. Микроскопические методы

Идентификация видов *Gyrodactylus* основана на морфологии и морфометрии маргинальных крючков-якорей (hamuli) и перегородок в опистапторе (органе прикрепления). Хорошая подготовка образцов является необходимым условием для идентификации видов.

Расщепление мягких тканей, с сохранением только твердых частей, рекомендуется в случае, когда для надежной морфометрической диагностики необходима морфометрия с высоким разрешением. Мягкие ткани можно расщеплять в растворе (около 1 мкл) с содержанием 75 мМ Трис, 10 мМ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), 5% SDS (додецилсульфат натрия) и 100 мг мл⁻¹ протеиназы К, pH 8,0. После добавления раствора для расщепления реакцию необходимо проверить в микроскопе до завершения, а затем закончить добавлением стоп-раствора (1:1 глицерина и 10% нейтрального забуференного формалина). Процедура расщепления подробно описана Harris и соавт., 1999. Идентификация *G. salaris* осуществляется в соответствии со следующими источниками: Cunningham и соавт., 2001; Malmberg, 1957; Malmberg, 1970; McNugh и соавт., 2000; Olstad и соавт., 2007b; Shinn и соавт., 2004.

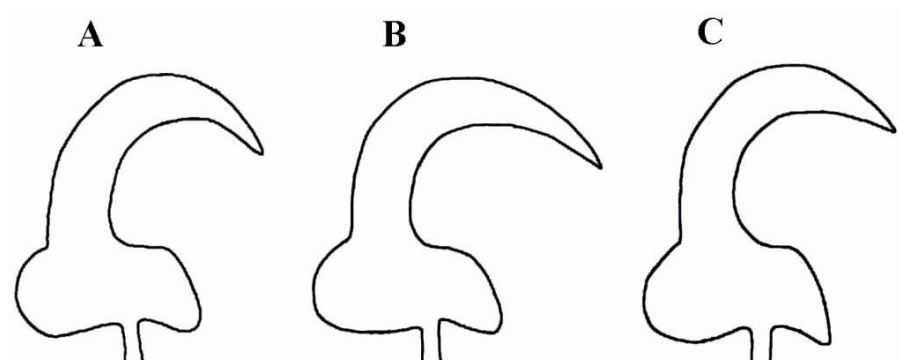
Размер опистапоральных твердых частей у *Gyrodactylus* сильно варьируется, например, в зависимости от температуры, тогда как форма более стабильна (Mo, 1991a; Mo, 1991b; Mo, 1991c). Поэтому возможности использования линейных измерений для определения морфологии может не всегда быть достаточно для установления достоверного диагноза (Olstad и соавт., 2007b).

Gyrodactylus salaris морфологически схож с *G. Teuchis*, выделенным от коричневой форели, атлантического лосося и радужной форели, а также с *G. Thymalli*, выделенным от хариуса (рис. 1). Дифференциация видов может быть осуществлена обученными морфологами с учетом формы серпа маргинального крючка. *Gyrodactylus teuchis* имеет более длинный и более изогнутый

серповидный клинок, в то время как *G. thymalli* имеет небольшой угол изгиба серпа (Cunningham и соавт., 2001; McHugh и соавт., 2000; Shinn и соавт., 2004).

Рис. 1. Маргинальные крючки (А) *Gyrodactylus salaris*, (В) *G. teuchis* и (С) *G. thymalli*.

Рисунки выполнены в соответствии с Cunningham и соавт., 2001.



4.3.1.1.1. Влажные препараты

Не применимо.

4.3.1.1.2. Мазки

Не применимо.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

Не применимо.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные среды

Не применимо.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

Не применимо.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Подготовка образцов

ДНК-матрица должна быть приготовлена из живых/свежих или консервированных этанолом образцов с использованием соответствующего протокола приготовления ДНК. Могут быть использованы наборы для извлечения ДНК в соответствии с инструкциями производителей.

4.3.1.2.3.2. Анализ внутренней транскрибируемой спейсерной области гена рибосомной РНК

4.3.1.2.3.2.1. Амплификация методом полимеразной цепной реакции (ПЦР-амплификация) внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS)

Для амплификации продукта длиной 1300 пар нуклеотидов на ITS-участке могут быть использованы такие праймеры, как 5'-TTT-CCG-TAG-GTG-AAC-CT-3' и 5'-TCC-TCC-GCT-TAG-TGA-TA -3'.

Условия циклирования для ПЦР являются следующими: начальная денатурация при температуре 95 °C в течение 5 минут; 30 циклов при температуре 94°C в течение 1 минуты, 50°C в течение 1 минуты, 72°C в течение 2 минут; окончательная экстензия при 72 °C в течение 7 минут (Cunningham, 1997). При анализе частично расщепленного материала, спейсеры ITS1 и ITS2 могут быть амплифицированы в двух отдельных реакциях, используя наборы праймеров и соблюдая условия ПЦР, описанные в Matejusková и соавт., 2001.

4.3.1.2.3.2.2. Секвенирование и анализ последовательностей ITS

Амплифицированные фрагменты ITS, подготовленные, как описано выше в разделе 4.3.1.2.3.2.1, должны быть секвенированы, и последовательности должны быть подвергнуты анализу с помощью поиска BLAST в базе данных GenBank/EMBL для установления сходства с известными последовательностями. В дополнение к праймерам для ПЦР следует использовать как минимум два внутренних праймера, таких как 5'-ATT-TGC-GTT-CTG-GAG-ACC-G и 5'-TGG-TGG-ATC-ACT-CGG-CTC-A (Zietara & Lumme, 2003). Несколько последовательностей других видов, заражающих лососевых, например, *G. derjavini*, *G. derjavinoides*, *G. truttae*, *G. teuchis* и *G. thymalli* доступны в GenBank/EMBL. *Gyrodactylus salaris* и *G. thymalli* не могут быть дифференцированы этим методом, но последовательности ITS отличают *G. salaris* и *G. thymalli* от всех других известных видов.

4.3.1.2.3.3. Анализ митохондриального гена цитохромоксидазы I

4.3.1.2.3.3.1. ПЦР-амплификация митохондриального гена цитохромоксидазы I (COI)

Для амплификации гена COI можно использовать праймеры 5'-TAA-TCG-GCG-GGT-TCG-GTA-A-3' и 5'-GAA-CCA-TGT-ATC-GTG-TAG-CA-3') (Meinilä и соавт., 2002). Условия циклирования для ПЦР являются следующими: начальная денатурация при температуре 95°C в течение 5 минут; 35 циклов при температуре 95°C в течение 1 минуты, 50°C в течение 1 минуты, 72°C в течение 2 минут; окончательная экстензия при 72°C в течение 7 минут. Дополнительные наборы праймеров для амплификации COI можно найти в следующих источниках: Meinilä и соавт., 2002; Meinilä и соавт., 2004.

4.3.1.2.3.3.2. Секвенирование и анализ последовательностей COI

Аmplицированные фрагменты CO1, полученные, как описано выше, подвергают секвенированию и сравнению с другими последовательностями, используя поиск BLAST в базе данных GenBank/EMBL. В дополнение к праймерам для ПЦР, могут быть использованы по меньшей мере два внутренних праймера, такие как 5'-ССА-ААГ-ААС-САА-ААТ-ААГ-ТГТ-ТГ-3 ') и 5'-ТГТ-СУС-ТАС -САГ-ТГС-ТАГ-ССГ-СТГ-Г-3 '(Hansen и соавт., 2003).

Если полученная последовательность не имеет 100% соответствия в GenBank / EMBL, необходимо провести филогенетический анализ, чтобы установить сходство с другими доступными последовательностями. Данный метод может быть использован для того, чтобы различить разные клады *G. salaris* и *G. Thymalli*.

ПРИМЕЧАНИЕ. С помощью последовательностей CO1 нельзя однозначно дифференцировать *G. salaris* и *G. thymalli*, но они могут быть использованы для отнесения образцов к соответствующей кладе. За некоторыми исключениями, клады *G. salaris* и *G. thymalli* в целом хорошо соответствуют предпочтениям хозяина и/или географическому распределению паразитов.

Обратите внимание, что некоторые исследователи решили представить все свои последовательности, полученные как от атлантического лосося, так и от хариуса в качестве *G. salaris*, что вызывает путаницу при сравнении последовательностей (как ITS, так и CO1) с последовательностями в GenBank/EMBL при осуществлении поиска BLAST. Таким образом, всегда следует проверять идентичность последовательностей в GenBank/EMBL.

Если последовательность нельзя отнести ни к одной из признанных клад *G. salaris* или *G. thymalli*, следует обратиться за консультацией в Референтную лабораторию МЭБ.

4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

Не применимо.

4.3.2. Серологические методы

Не применимо.

5. Классификация тестов по назначению

Не применимо.

6. Тест (ы), рекомендованные для целевого надзора с целью объявления свободы от инфекции *Gyrodactylus salaris*

Методы диагностики/обнаружения для объявления свободы аналогичны указанным в разделе 4.3.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение случаев с подозрением на инфекцию

Наблюдение за образцами *Gyrodactylus* у атлантического лосося или радужной форели (или других восприимчивых хозяев) либо при исследовании соскобов кожи под световым микроскопом, либо плавников или кожи, изученных под стереомикроскопом.

7.2. Определение подтвержденных случаев

Заражение *G. salaris* должно быть подтверждено при условии соответствия следующим критериям:

- i) Морфология соответствует *G. salaris*;
или
- ii) Молекулярная идентификация образца(ов) *Gyrodactylus* относительно *G. salaris* (или *G. thymalli*) путем секвенирования ITS с последующим секвенированием и филогенетическим анализом CO1 для отнесения последовательности к ближайшему известному родственнику является предпочтительной.

8. Список литературы

APPLEBY C. & MO T.A. (1997). Population Dynamics of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea) Infecting Atlantic Salmon, *Salmo salar*, Parr in the River Batnfjordselva, Norway. *J. Parasitol.*, **83**, 23–30.

BAKKE T.A., HARRIS P.D. & CABLE J. (2002). Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. *Int. J. Parasitol.*, **32**, 281–308.

BAKKE T.A., HARRIS P.D., HANSEN H., CABLE J. & HANSEN L.P. (2004). Susceptibility of Baltic and East Atlantic salmon *Salmo salar* stocks to *Gyrodactylus salaris* (Monogenea). *Dis. Aquat. Org.*, **58**, 171–177.

BUCHMANN K. & BRESCIANI J. (1997). Parasitic infections in pond-reared rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Denmark. *Dis. Aquat. Org.*, **28**, 125–138.

CUNNINGHAM C.O. (1997). Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea: *Gyrodactylidae*) ribosomal RNA genes. *J. Parasitol.*, **83**, 215–219.

CUNNINGHAM C.O., MO T.A., COLLINS C.M., BUCHMANN K., THIERY R., BLANC G. & LAUTRAITE A. (2001).

Redescription of *Gyrodactylus teuchis* Lautraite, Blanc, Thiery, Daniel & Vigneulle, 1999 (Monogenea: *Gyrodactylidae*), a species identified by ribosomal RNA sequence. *Syst. Parasitol.*, **48**, 141–150.

HANSEN H., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2003). Mitochondrial DNA variation of *Gyrodactylus* spp. (Monogenea, *Gyrodactylidae*) populations infecting Atlantic salmon, grayling, and rainbow trout in Norway and Sweden. *Int. J. Parasitol.*, **33**, 1471–1478.

HANSEN H., BAKKE T.A. & BACHMANN L. (2007a). DNA taxonomy and barcoding of monogenean parasites: lessons from *Gyrodactylus*. *Trends Parasitol.*, **23** (8), 363–367.

HANSEN H., BAKKE T.A. & BACHMANN L. (2007b). Mitochondrial haplotype diversity of *Gyrodactylus thymalli* (Platyhelminthes; Monogenea): extended geographic sampling in United Kingdom, Poland, and Norway reveals further lineages. *Parasitol. Res.*, **100**, 1389–1394.

HARRIS P.D., CABLE J., TINSLEY R.C. & LAZARUS C.M. (1999). Combined ribosomal DNA and morphological analysis of individual gyrodactylid monogeneans. *J. Parasitol.*, **85**, 188–191.

JENSEN A.J. & JOHNSEN B.O. (1992). Site Specificity of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea) on Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) in the River Lakselva, northern Norway. *Can. J. Zool.*, **41**, 264–267.

JOHNSEN B.O. & JENSEN A.J. (1991). The *Gyrodactylus* story in Norway. *Aquaculture*, **98**, 289–302.

JØRGENSEN T.R., LARSEN T.B., JØRGENSEN L.G., BRESCIANI J., KANIA P. & BUCHMANN K. (2007).

Characterisation of a low pathogenic strain of *Gyrodactylus salaris* from rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 235–244.

LINDENSTRØM T., COLLINS C.M., BRESCIANI J., CUNNINGHAM C.O. & BUCHMANN K. (2003). Characterization of a *Gyrodactylus salaris* variant: infection biology, morphology and molecular genetics. *Parasitology*, **127**, 165–177.

MALMBERG G. (1957). Om förekomsten av *Gyrodactylus* på svenska fiskar. *Skr. söd. Sver. Fisk För. (Årsskr., 1956)*, 19–76. (In Swedish, species descriptions and summary in English).

MALMBERG G. (1970). The excretory systems and the marginal hooks as a basis for the systematics of *Gyrodactylus* (Trematoda, Monogenea). *Ark. Zool. [Ser. 2]*, **23**, 1–235.

MATEJUSOVÁ I., GELNAR M., MCBEATH A.J.A., COLLINS C.M. & CUNNINGHAM C.O. (2001). Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five fish families (Teleostei). *Int. J. Parasitol.*, **31**, 738–745.

MCHUGH E.S., SHINN A.P. & KAY J.W. (2000). Discrimination of the notifiable pathogen *Gyrodactylus salaris* from *G. thymalli* (Monogenea) using statistical classifiers applied to morphometric data. *Parasitology*, **121**, 315–323.

MEINILÄ M., KUUSELA J., ZIETARA M. & LUMME J. (2002). Primers for amplifying approximately 820 bp of highly polymorphic mitochondrial COI gene of *Gyrodactylus salaris*. *Hereditas*, **137**, 72–74.

MEINILÄ M., KUUSELA J., ZIETARA M.S. & LUMME J. (2004). Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Int. J. Parasitol.*, **34**, 515–526.

MO T.A. (1991a). Seasonal variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on parr of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in the River Batnfjordselva, Norway. *Syst. Parasitol.*, **19**, 231–240.

MO T.A. (1991b). Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) in a fish farm, with comments on the spreading of the parasite in south-eastern Norway. *Syst. Parasitol.*, **20**, 1–9.

MO T.A. (1991c). Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on parr of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in laboratory experiments. *Syst. Parasitol.*, **20**, 11–19.

MO T.A. (1992). Seasonal variations in the prevalence and infestation intensity of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., in the River Batnfjordselva, Norway. *J. Fish Biol.*, **41**, 697–707.

OLSTAD K., CABLE J., ROBERTSEN G. & BAKKE T.A. (2006). Unpredicted transmission strategy of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: *Gyrodactylidae*): survival and infectivity of parasites on dead hosts. *Parasitology*, **133**, 33–41.

OLSTAD K., ROBERTSEN G., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2007a). Variation in host preference within *Gyrodactylus salaris* (Monogenea): an experimental approach. *Parasitology*, **134**, 589–597.

OLSTAD K., SHINN A.P., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2007b). Host-based identification is not supported by morphometrics in natural populations of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Platyhelminthes, Monogenea). *Parasitology*, **134**, 2041–2052.

PALADINI G., GUSTINELLI A., FIORAVANTI M.L., HANSEN H. & SHINN A.P. (2009). The first report of *Gyrodactylus salaris* Malmberg 1957 (Platyhelminthes, Monogenea) on Italian cultured stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Vet. Parasitol.*, **165** (3–4), 290–297.

POLÉO A.B.S., SCHJOLDEN J., HANSEN H., BAKKE T.A., MO T.A., ROSSELAND B.O. & LYDERSEN E. (2004). The effect of various metals on *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Parasitology*, **128**, 169–177.

ROBERTSEN G., HANSEN H., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2007). Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is a suitable host for *Gyrodactylus salaris* (Monogenea, *Gyrodactylidae*) in Norway. *Parasitology*, **134**, 257–267.

ROKICKA M., LUMME J. & ZIETARA M. (2007). Identification of *Gyrodactylus* ectoparasites in Polish salmonid farms by PCR-RFLP of the nuclear ITS segment of ribosomal DNA (Monogenea, *Gyrodactylidae*). *Acta Parasitologica*, **52**, 185–195.

SALTE R., BENTSEN H.B., MOEN T., TRIPATHY S., BAKKE T.A., ØDEGÅRD J., OMHOLT S. & HANSEN L.P. (2010). Prospects for a genetic management strategy to control *Gyrodactylus salaris* infection in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) stocks. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **67**, 121–129.

SHINN A.P., HANSEN H., OLSTAD K., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2004). The use of morphometric characters to discriminate specimens of laboratory-reared and wild populations of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Monogenea). *Folia Parasitol.*, **51**, 239–252.

SOLENG A. & BAKKE T.A. (1997). Salinity tolerance of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea): laboratory studies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **55**, 1837–1845.

SOLENG A., POLÉO A.B.S., ALSTAD N.E.W. & BAKKE T.A. (1999). Aqueous aluminium

eliminates *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon. *Parasitology*, **119**, 19–25.

ZIETARA M.S. & LUMME J. (2003). The crossroads of molecular, typological and biological species concepts: two new species of *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 (Monogenea: Gyrodactylidae). *Syst. Parasitol.*, **55**, 39–52.

ZIETARA M.S., ROKICKA M., STOJANOVSKI S., SKORKOWSKI E.F. & LUMME J. (2007). Alien mitochondrial DNA in variant clones of *Gyrodactylus salaris* indicates a complex hybrid history in salmonid farms. 7th International Symposium on Fish Parasites, Viterbo, Italy. *Parassitologia*, **49**, 119.

*

* *

NB: Референтная лаборатория МЭБ занимается вопросами, связанными с инфекцией *Gyrodactylus salaris*

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

Пожалуйста, обратитесь в Референтную лабораторию МЭБ для получения дополнительной информации по инфекции *G. salaris*.

NB: ВПЕРВЫЕ ОДОБРЕНА В 1997 Г. КАК GYRODACTYLOSIS У АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (GYRODACTYLUS F); ПОСЛЕДНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В 2018 Г.

ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ

1. Предмет рассмотрения

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

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

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

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

географического ареала (Enzmann с соавт., 2010; Kim с соавт., 2007; Nishizawa с соавт., 2006).

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

2.1.2. Выживание вне хозяина

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

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

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

2.1.4. Жизненный цикл

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

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

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

2.2.2. Виды, данные о восприимчивости которых являются неполными

Виды, данные о восприимчивости которых в соответствии с положениями Главы 1.5 *Водного Кодекса* являются неполными, включают: тихоокеанскую сельдь (*Clupea*

pallasii), шайнер (*Cymatogaster aggregate*), длиннорылую колюшку (*Aulorhynchus flavidus*), налима (*Lota lota*) и белого осетра (*Acipenser transmontanus*).

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

2.2.3. Восприимчивые стадии развития хозяина

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

2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность обнаружения)

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

2.2.5. Целевые органы и инфицируемые ткани

Считается, что проникновение вируса происходит через жабры и у основания плавников, поскольку почки, селезенка и другие внутренние органы являются местами, где во время клинической инфекции вирус присутствует в очень больших количествах (Bootland & Leong, 1999; Wolf, 1988).

2.2.6. Персистентное инфицирование пожизненными носителями

Исторически, географический ареал IHNV инфекции был ограничен западной частью Северной Америки, но с импортом инфицированной рыбы и икринок болезнь распространилась в Европу и Азию. При заносе IHNV в разводимую на ферме популяцию, болезнь может укорениться у восприимчивых видов дикой рыбы в водоеме. Продолжительность инфицирования IHN вирусом отдельных особей рыбы варьирует в зависимости от температуры; однако в отличие от вируса

инфекционного панкреатического некроза (IPNV) или вируса канального сома (CCV), состояние истинного пожизненного носительства IHNV встречается редко.

2.2.7. Переносчики

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

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

2.2.8. Известные и подозреваемые дикие водные животные-носители

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

2.3. Паттерн болезни

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

2.3.1. Механизмы передачи

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

2.3.2. Превалентность

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

2.3.3. Географическое распространение

IHNV инфекция была выявлена в Северной Америке, Азии и Европе, но не выявлена в Южном полушарии. Следующие страны сообщили в МЭБ о наличии подтвержденных или подозреваемых случаев IHNV инфекции: Австрия, Бельгия, Канада, Китай (Китайская Народная Республика), Хорватия, Чешская Республика,

Франция, Германия, Иран, Италия, Япония, Республика Корея, Нидерланды, Польша, Россия, Словения, Испания, Швейцария и Соединенные Штаты Америки. Инфекции и клиническая форма болезни были зарегистрированы у рыбы, разводимой как в пресной, так и в морской воде.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

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

2.3.5. Факторы окружающей среды

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

2.4. Контроль и профилактика

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

2.4.1. Вакцинация

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

2.4.2. Фармакотерапия

Хотя производилось изучение применения фармакотерапевтических подходов к контролю IHNV инфекции, ученые не установили их коммерческой

целесообразности при использовании против данной болезни в аквакультуре (Winton, 1991).

2.4.3. Иммуностимуляция

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

2.4.4. Выведение резистентной популяции

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

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

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

2.4.6. Блокирующие агенты

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

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

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

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

2.4.8. Общие практики ведения хозяйства

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

3. Отбор образцов

3.1. Выбор отдельных образцов

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

На фермах с лососевыми, при наличии радужной форели, для отбора образцов выбирается только рыба этого вида. Если радужной форели нет, образцы следует отбирать от рыбы всех других присутствующих видов, которые восприимчивы к IHNV инфекции, как указано в списке в Разделе 2.2.1. Отбор образцов от восприимчивых видов следует производить пропорционально или в соответствии с риск-ориентированными критериями для целевого выбора партий или популяций с историей аномальной смертности или случаями потенциального воздействия (например, через необработанные поверхностные воды, вылов дикой рыбы или ремонт стада при использовании популяций с неизвестным статусом по риску). Если для производства рыбы используется более одного водоема, то в образец должна быть включена рыба из всех водоемов. При наличии ослабленной рыбы, рыбы с ненормальным поведением, или недавно погибшей (неразложившейся) рыбы, выбирается такая рыба. При отсутствии такой рыбы выбранная рыба должна включать внешне нормальную, здоровую рыбу, отобранную таким образом, чтобы в образце была пропорционально представлена рыба из всех частей фермы, а также всех годовых классов.

3.2. Сохранение образцов в целях представления для исследования

Перед отправкой или доставкой в лабораторию, части органов, подлежащих исследованию, необходимо извлечь из рыбы с помощью стерильных иссекающих инструментов и перенести в стерильные пластиковые пробирки, содержащие транспортную среду, т.е. клеточную культуральную среду с 10% фетальной телячьей сывороткой (FCS) и антибиотиками. Рекомендуется добавлять 200 международных единиц (МЕ) пенициллина, 200 мкг стрептомицина и 200 мкг канамицина на один мл, хотя можно также использовать и другие антибиотики с доказанной эффективностью.

3.3. Объединение образцов в пулы

Овариальную жидкость или кусочки органов максимум от десяти особей рыбы можно собирать в одну стерильную пробирку, содержащую не менее 4 мл транспортной среды, что представляет собой один объединенный в пул образец. В каждом образце должно быть как минимум 0,5 г ткани. Пробирки следует помещать в изотермические контейнеры (например, пенопластовые коробки с толстыми стенками), добавляя достаточное количество льда или «морозильные блоки» для обеспечения сохранения образцов в охлажденном состоянии во время их транспортировки в лабораторию. Необходимо избегать замораживания. Температура образца во время перевозки никогда не должна превышать 10°C и при получении в транспортном контейнере должен присутствовать лед или один или несколько морозильных блоков должны оставаться частично или полностью замороженными. Вирусологическое исследование необходимо начать как можно быстрее и не позднее чем через 48 часов после отбора образцов. В исключительных случаях вирусологическое исследование должно быть начато самое позднее в течение 72 часов после отбора материала при условии, что отобранный материал, подлежащий исследованию, защищен транспортной средой и при соблюдении требований к температуре во время транспортировки.

В лабораторию может быть отправлена и цельная рыба при условии наличия возможности соблюдения температурных требований во время транспортировки. Цельную рыбу можно завернуть в адсорбирующую бумагу и необходимо отправлять в пластиком пакете охлажденной, как указано выше. Можно также отправлять живую

рыбу. Все операции по упаковке и этикетировке необходимо производить в соответствии с действующими национальными и международными требованиями к транспортировке, в зависимости от ситуации.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

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

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

3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

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

4. Диагностические методы

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

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

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

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

4.1.2. Изменения в поведении

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

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

У пораженной рыбы наблюдается потемнение кожи, бледные жабры, асцит, растянутое брюшко, пучеглазие и петехиальные геморрагии внутри и снаружи. Внутри у рыбы наблюдается анемия и отсутствие пищи в кишечнике. Печень, почки и селезенка бледные. В органах брюшной полости наблюдается асцитические жидкости и петехии.

4.2.2. Клиническая химия

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

4.2.3. Микроскопическая патология

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

4.2.4. Влажные препараты

Влажные препараты имеют ограниченную диагностическую ценность.

4.2.5. Тканевые отпечатки и мазки

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

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

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

иммунологическим методом окрашивания золотом в целях очерчивания поверхности вириона.

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

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

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Влажные препараты не подходят для обнаружения и идентификации IHNV.

4.3.1.1.2. Мазки

Мазки не подходят для обнаружения и идентификации IHNV.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

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

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные среды

Следует использовать следующие линии клеток: EPC или FHM.

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

4.3.1.2.1.1. Выделение вируса

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

Гомогенат центрифугируют в охлаждаемой центрифуге при 2°C–5°C и 2000–4000 g в течение 15 минут, супернатант отбирают и обрабатывают антибиотиками либо в течение четырех часов при 15°C, либо в течение ночи при

4°C (например, на данной стадии возможно полезно использовать 1 мг мл⁻¹ гентамицина). Если образец был доставлен в транспортной среде (т.е. подвергнулся воздействию антибиотиков), обработку антибиотиками можно не проводить. Обработка антибиотиками проводится с целью контроля бактериальной контаминации в образцах и делает ненужной фильтрацию через мембранные фильтры.

При возникновении трудностей на практике (например, поломка инкубатора, проблемы с культурами клеток и т.д.), в результате которых невозможно инокулировать клетки в течение 48 часов после отбора образцов ткани, допускается замораживание супернатанта при –80°C и проведение вирусологического исследования в течение 14 дней. Если собранный супернатант хранится при –80°C в течение 48 часов после отбора образцов, его можно использовать для вирусологического исследования только один раз.

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

4.3.1.2.1.2. Инокуляция клеточных монослоев

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

Обработанную антибиотиками органныю суспензию инокулируют в культуры клеток как минимум в двух разведениях, т.е. в первичном разведении и, дополнительно, в разведении 1:10, что дает конечные разведения материала тканей в клеточной культуральной среде в 1:100 и 1:1000, соответственно, (для недопущения гомологичной интерференции). Соотношение размера инокулята и объема клеточной культуральной среды должно составлять примерно 1:10. Для каждого разведения и каждой линии клеток следует использовать, как минимум, площадь клеток в примерно 2 см², что соответствует одной лунке на

24-луночном планшете для культивирования клеток. Рекомендуется использовать планшеты для культивирования клеток, но также допустимо использовать и другие установки с такой же или бóльшей площадью роста.

4.3.1.2.1.3. Инкубация культур клеток

Инокулированные культуры клеток инкубируют при 15°C в течение 7–10 дней. При изменении цвета клеточной культуральной среды с красного на желтый, что указывает на закисление среды, следует произвести корректировку уровня pH с помощью стерильного бикарбонатного раствора или эквивалентных веществ для сохранения чувствительности клеток к инфекции вирусом.

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

4.3.1.2.1.4. Микроскопия

Инокулированные культуры клеток необходимо регулярно обследовать (не менее трех раз в неделю) на наличие ЦПД при 40–150 × увеличении. Рекомендуется использовать фазово-контрастный микроскоп. При наличии явного ЦПД, следует немедленно начать процедуры по идентификации вируса.

4.3.1.2.1.5. Субкультивирование

Если развитие ЦПД после первичной инкубации в течение 7–10 дней не наблюдается, проводят субкультивирование на свежих культурах клеток с использованием такой же площади клеток, что и в первичной культуре.

Аликвотные пробы среды (супернатант) из всех культур/лунок, содержащих первичную культуру, объединяют в пул в соответствии с линией клеток через 7–10 дней после инокуляции. Затем данные пулы инокулируют в гомологичные культуры клеток и разводят. 1:10 (в результате чего получают конечные разведения супернатанта 1:10 и 1:100, соответственно), как описано в Разделе 4.3.1.2.1.2. выше.

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

Затем инокулированные культуры инкубируют в течение 7–10 дней при 15°C, производя их обследование, как указано в Разделе 4.3.1.2.1.4. При наличии токсического ЦПД в течение первых трех дней инкубации, можно провести субкультивирование на этой стадии, но клетки затем необходимо культивировать в течение семи дней и снова подвергнуть субкультивированию с дальнейшей инкубацией в течение семи дней. Если развитие токсического ЦПД происходит через 3 дня, клетки можно пассировать один раз и инкубировать, чтобы с момента первичной инокуляции прошло 14 дней. В течение последних семи дней инкубации признаки токсичности должны отсутствовать.

При наличии бактериальной контаминации, несмотря на обработку антибиотиками, перед субкультивированием необходимо произвести центрифугирование при 2000–4000 g в течение 15–30 минут при 2–5°C, и/или фильтрацию супернатанта через фильтр с размером пор в 0,45 мкм (мембрана с низким связыванием белков). Кроме этого, процедуры субкультивирования являются такими же, как и для токсического ЦПД.

При отсутствии ЦПД тест можно объявить отрицательным.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигена

4.3.1.2.2.1. Реакция нейтрализации (идентификация в культуре клеток)

- i) Собрать культуральную среду клеточных монослоев, демонстрирующих ЦПД, и центрифугировать аликвотную пробу при 2000 g в течение 15 минут при 4°C, или фильтровать через мембрану с размером пор в 0,45 мкм (или 450 нм) для удаления клеточного дебриса.
- ii) Приготовить разведения вирус-содержащей среды от 10^2 – 10^4 .
- iii) Смешать аликвотные пробы (например, 200 мкл) каждого разведения с равными объемами раствора антител к IHNV. Раствор нейтрализующих антител (Nab) должен иметь 50% нейтрализующий бляшки титр не менее 2000. Таким же образом обработать набор аликвотных проб каждого разведения вируса клеточной культуральной средой для получения не-нейтрализованного контроля.
- iv) Параллельно, необходимо провести реакцию нейтрализации против гомологичного штамма IHNV (положительная реакция нейтрализации) для подтверждения реактивности антисыворотки.
- v) Инкубировать все смеси при 15°C в течение 1 часа.
- vi) Перенести аликвотные пробы каждой из указанных выше смесей на 24-часовые монослои с нанесенной на них клеточной культуральной средой, содержащей 10% FBS (каждое разведение инокулировать в две лунки) и инкубировать при 15°C; для этой цели подходят 24- или 12-луночные планшеты для культивирования клеток при использовании 50 мкл инокулята.
- vii) Как только в ненейтрализованных контролях проявится ЦПД, проверить культуры клеток на появление ЦПД и произвести считывание результатов для каждого подозрительного по IHNV образца. Результаты регистрируют либо после простого микроскопического обследования (предпочтительно с использованием фазово-контрастного микроскопа), либо после удаления клеточной культуральной среды и окрашивания клеточных монослоев раствором 1% кристаллического фиолетового в 20% этаноле.
- viii) Тестируемый вирус идентифицируют как IHNV, когда в культурах клеток, в которые была внесена вирусная суспензия, обработанная IHNV-специфичными антителами, развития ЦПД не произошло или оно было значительно замедленным, тогда как во всех других культурах клеток ЦПД было явным.

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

4.3.1.2.2.2. Непрямая реакция флуоресцирующих антител (IFAT)

В течение нескольких лет для обнаружения IHNV были разработаны методы на основе антител для обнаружения антигенов, такие как IFAT, ИФА и другие иммуногистохимические методы. При использовании данных методов можно довольно быстро производить обнаружение и идентификацию по сравнению с процедурой выделения вируса в культуре клеток. Однако на результаты могут оказывать влияние различные параметры, такие как чувствительность и специфичность антител и подготовка образцов, и отрицательные результаты должны рассматриваться с осторожностью. Данные методы не следует использовать при попытках обнаружения рыб-носителей.

4.3.1.2.2.2.1. Непрямая реакция флуоресцирующих антител в культурах клеток

- i) Подготовить клеточные монослои в 2 см² лунках пластиковых планшетов для культивирования клеток или на покровных стеклах до получения примерно 80% конфлюэнтности, что обычно достигается в течение 24 часов инкубации при 22°C (посеять шесть клеточных монослоев для одного изолята вируса, подлежащего идентификации, плюс два для положительного и два для отрицательного контролей). Содержание FBS в клеточной культуральной среде можно снизить до 2–4%. Если необходимо идентифицировать большое количество изолятов вируса, рекомендуется использовать черные 96-луночные планшеты для иммунофлуоресценции.
- ii) Когда клеточные монослои готовы для инфицирования (т.е. в тот же день или на следующий день после посева), инокулировать вирусные суспензии, подлежащие идентификации, производя этапы десятикратных разведений прямо в лунках или сосудах с культурой клеток.
- iii) Произвести разведение контрольной вирусной суспензии IHNV таким же образом для получения титра вируса примерно в 5000–10000 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на мл в клеточной культуральной среде.
- (iv) Инкубировать при 15°C в течение 24 часов.
- v) Удалить клеточную культуральную среду, промыть один раз 0,01 М забуференным фосфатом солевым раствором (PBS), pH 7,2, затем быстро три раза холодной смесью ацетона, 30%/этанола, 70% (в объемном отношении) (хранить при –20°C).
- vi) Оставить для фиксации на 15 минут. Объем в 0,5 мл соответствует 2 см² клеточного монослоя.
- vii) Оставить клеточные монослои для высыхания на воздухе примерно на 30 минут и произвести немедленное исследование или заморозить при –20°C.
- viii) Подготовить раствор очищенного IHNV антитела или сыворотки в 0,01 М PBS, pH 7,2, содержащем 0,05% Tween-80 (PBST), в соответствующем

разведении (которое следует определить заранее или которое указано поставщиком реагента).

- ix) Регидратировать высушенные клеточные монослои посредством четырех этапов промывания PBST раствором и полностью удалить данный буфер после последнего промывания.
- x) Обработать клеточные монослои раствором антител в течение одного часа при 37°C во влажной камере и не допускать испарения (например, посредством добавления кусочка влажной ваты во влажную камеру). Объем используемого раствора должен составлять 0,25 мл 2 см⁻² на лунку.
- xi) Промыть четыре раза с помощью PBST, как указано выше.
- xii) Обработать клеточные монослои в течение одного часа при 37°C раствором ФИТЦ- или тетраметилродамин-5-(и-6-) изоцитиоцианат (TRITC)-конъюгированных антител к иммуноглобулинам, использованным в первом слое и приготовленным в соответствии с инструкциями поставщика. Такими конъюгированными антителами чаще всего являются кроличьи или козы анти тела.
- xiii) Промыть четыре раза с помощью PBST.
- xiv) Немедленно провести исследование обработанных клеточных монослоев на пластиковых планшетах или подготовить их на покровных стеклах с помощью, например, солевого раствора глицерина, pH 8,5, для микроскопического исследования.
- xv) Исследовать под падающим ультрафиолетовым светом, используя микроскоп с × 10 окулярами и × 20–40 линзами объектива с числовой апертурой >0,65 и >1,3, соответственно. Перед любым другим исследованием следует обследовать положительные и отрицательные контроли и убедиться, что они дают ожидаемые результаты.

4.3.1.2.2.2. Непрямая реакция флуоресцирующих антител на отпечатках

- i) Провести полное обескровливание рыбы.
- ii) Сделать отпечатки почки на очищенных предметных стеклах или на дне лунок пластиковых планшетов для культивирования клеток.
- iii) Хранить кусочки почки вместе с другими органами, необходимыми для процедуры выделения вируса, если данную процедуру понадобится провести позже.
- iv) Оставить отпечатки для высыхания на воздухе на 20 минут.
- v) Зафиксировать ацетоном или этанолом/ацетоном и высушить.
- vi) Регидратировать вышеуказанные препараты и блокировать с помощью 5% обезжиренного молока или 1% бычьего сывороточного альбумина, в PBST в течение 30 минут при 37°C.
- vii) Промыть четыре раза с помощью PBST.

- viii) Обработать отпечатки раствором антител к IHNV и промыть.
- ix) Блокировать и промыть.
- x) Выявить реакцию с помощью подходящих флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ)-конъюгированных специфических антител, промыть и исследовать.
- xi) Если тест отрицательный, подготовить образцы органов, хранящиеся при 4°C для проведения процедуры выделения вируса в культуре клеток, как описано выше.

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

4.3.1.2.2.3. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

- i) Сенсибилизировать лунки микропланшетов для проведения ИФА соответствующими разведениями очищенных иммуноглобулинов (Ig) или IHNV-специфичной сыворотки, в 0,01 М PBS, pH 7,2 (200 мкл/лунка).
- ii) Инкубировать в течение ночи при 4°C.
- iii) Промыть четыре раза с помощью 0,01 М PBS, содержащего 0,05% Tween-20 (PBST).
- iv) Блокировать с помощью обезжиренного молока (5% в PBST) или другого блокирующего раствора в течение 1 часа при 37°C (200 мкл/лунка).
- v) Промыть четыре раза с помощью PBST.
- vi) Добавить 2% Triton X-100 в суспензию вируса, подлежащего идентификации.
- vii) Распределить по лункам, 100 мкл/лунка, двух- или четырех-этапные разведения вируса, подлежащего идентификации, и IHNV контрольного вируса, и гетерологичного контроля вируса (например, вирус вирусной геморрагической септицемии). Отставить образцы для реагирования с сенсибилизирующими антителами к IHNV на один час при 20°C.
- viii) Промыть четыре раза с помощью PBST.
- ix) Добавить в лунки либо биотинилированную поликлональную анти-IHNV антисыворотку или MAb к N белку, специфичные для домена, отличные от таковых сенсибилизирующих MAb и ранее конъюгированных с биотином.
- x) Инкубировать в течение одного часа при 37°C.
- xi) Промыть четыре раза с помощью PBST.
- xii) Добавить стрептавидин-конъюгированную пероксидазу хрена в те лунки, в которые были добавлены биотин-конъюгированные антитела, и инкубировать в течение одного часа при 20°C.
- xiii) Промыть четыре раза с помощью PBST. Добавить субстрат и хромаген. Остановить исследование при наличии реакции положительных контролей и произвести считывание результатов.

- xiv) Провести интерпретацию результатов в соответствии с показателями оптической плотности положительных и отрицательных контролей, и в обязательном порядке следовать руководствам для каждого теста, например плотность при 450 нм положительного контроля должна составлять как минимум $5-10 \times A_{450}$ отрицательного контроля.

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

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция

4.3.1.2.3.1.1. Подготовка вирусной РНК

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

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

- i) Приготовить мастер-микс для ряда образцов, подлежащих анализу. Работы следует производить под вытяжным колпаком и в перчатках.
- ii) Приготовление мастер-микса для проведения одной 50 мкл ПЦР с обратной транскрипцией осуществляется следующим образом: 23,75 мкл не содержащей рибонуклеазу (DEPC-обработанной) воды или воды молекулярно-биологического класса чистоты; 5 мкл $10 \times$ буфера; 5 мкл 25 мМ $MgCl_2$; 5 мкл 2 мМ dNTP; 2,5 мкл ($20 \text{ пмолей мкл}^{-1}$) расположенного выше праймера 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3'; 2,5 мкл ($20 \text{ пмолей мкл}^{-1}$) расположенного ниже праймера 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'; 0,5 мкл Taq полимеразы (5 Е мкл^{-1}); 0,5 мкл AMV обратной транскриптазы (9 Е мкл^{-1}); 0,25 мкл RNaзина (39 Е мкл^{-1}).
- iii) Центрифугировать пробирки в течение короткого периода времени (10 секунд), чтобы убедиться, что содержимое находится на дне.
- iv) Поместить пробирки в термоциклер и начать производить следующие циклы— 1 цикл: 50°C в течение 30 минут; 1 цикл: 95°C в течение 2 минут; 30 циклов: 95°C в течение 30 секунд, 50°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 60 секунд; 1 цикл: 72°C в течение 7 минут и пропитывание при 4°C .

v) Визуализировать 693п.н-ПЦР ампликон посредством электрофореза продукта в 1,5% агарозном геле с этидиум бромидом и исследовать с использованием УФ трансиллюминации.

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

4.3.1.2.3.2. Другие основанные на амплификации анализы

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

4.3.1.2.3.3. Секвенирование

Анализ последовательностей ПЦР ампликонов стал в последние годы более быстрым и менее дорогим и представляет собой хороший метод для подтверждения IHNV (Winton & Einer-Jensen, 2002). Кроме того, анализ последовательности является одним из лучших подходов для идентификации генетических штаммов и для эпизоотологического отслеживания перемещения вируса (Emmenegger с соавт., 2000; Kim с соавт., 2007; Kurath с соавт., 2003; Nishizawa с соавт., 2006).

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для надзора, обнаружения и диагностики инфекции IHN вирусом указаны в таблице 5.1. Используемые в таблице обозначения означают: a = данный метод является рекомендованным методом ввиду его наличия, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = данный метод применяется в некоторых ситуациях, но его стоимость, точность или другие факторы значительно ограничивают его применение; и d = данный метод в настоящее время не рекомендуется использовать для этой цели. Данные обозначения в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает аспекты достоверности, чувствительности, специфичности и полезности. Хотя не все тесты, обозначенные, как

категория а или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются без получения сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

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

ПЦР- полимеразная цепная реакция

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

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

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

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

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

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

Библиография

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

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

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

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

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

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

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) (2008). Scientific opinion of the panel on AHAW on a request from the European Commission on aquatic animal species susceptible to diseases listed in the Council Directive 2006/88/EC. *EFSA J.*, 808, 1–144. Available at: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/ahaw_op_ej808_susceptspecies_opinion_en.pdf?ssbinary=true EMMENEGGER E.J.,

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

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

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

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

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

- GUNIMALADEVI I., KONO T., LAPATRA S.E. & SAKAI M. (2005). A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Virol.*, 150, 899–909.
- HUANG C., CHIEN M.S., LANDOLT M. & WINTON J.R. (1994). Characterization of the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein using neutralizing monoclonal antibodies. *Dis. Aquat. Org.*, 18, 29–35.
- JAKOB E., BARKER D.S. & GARVER K.A. (2011). Vector potential of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* in the transmission of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV). *Dis. Aquat. Org.*, 97, 155–165.
- JOHANSSON T., EINER-JENSEN K., BATTS W.N., AHRENS P., BJÖRKBLOM C., KURATH G., BJÖRKLUND H. & LORENZEN N. (2009). Genetic and serological typing of European infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates. *Dis. Aquat. Org.*, 86, 213–221.
- JORGENSEN P.E.V., OLESEN N.J., LORENZEN N., WINTON J.R. & RISTOW S.S. (1991). Infectious hematopoietic necrosis (IHN) and viral hemorrhagic septicemia (VHS): detection of trout antibodies to the causative viruses by means 14 2019 © OIE - Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals - 14/11/2019 Chapter 2.3.4. - Infection with infectious haematopoietic necrosis virus of plaque neutralization, immunofluorescence, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Aquat. Anim. Health*, 3, 100–108.
- KIM W.S., OH M.J., NISHIZAWA T., PARK J.W., KURATH G. & YOSHIMIZU M. (2007). Genotyping of Korean Isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Arch. Virol.*, 152, 2119–2124.
- KOŁODZIEJEK J., SCHACHNER O., DÜRRWALD R., LATIF M. & NOWOTNY N. (2008). "Mid-G" region sequences of the glycoprotein gene of Austrian infectious hematopoietic necrosis virus isolates form two lineages within European isolates and are distinct from American and Asian lineages. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 22–30.
- KURATH G. (2008). Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 27, 175–196.
- KURATH G., GARVER K.A., TROYER R.M., EMMENEGGER E.J., EINER-JENSEN K. & ANDERSEN E.D. (2003). Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *J. Gen. Virol.*, 84, 803–814.
- LAPATRA S.E., FRYER J.L. & ROHOVEC J.S. (1993a). Virulence comparison of different electropherotypes of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 16, 115–120.
- LAPATRA S.E., ROBERTI K.A., ROHOVEC J.S. & FRYER J.L. (1989). Fluorescent antibody test for the rapid diagnosis of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, 1, 29–36.
- LAPATRA S.E., TURNER T., LAUDA K.A., JONES G.R. & WALKER S. (1993b). Characterization of the humoral response of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, 5, 165–171.
- MILLER K.M., WINTON J.R., SCHULZE A.D., PURCELL M.K. & MING T.J. (2004). Major histocompatibility complex loci are associated with susceptibility of Atlantic salmon to infectious hematopoietic necrosis virus. *Environ. Biol. Fish.*, 69, 307–316.

- MORZUNOV S.P., WINTON J.R. & NICHOL S.T. (1995). The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vir. Res.*, 38, 175–192.
- NISHIZAWA T., KINOSHITA S., KIM W.S., HIGASHI S. & YOSHIMIZU M. (2006). Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Dis. Aquat. Org.*, 71, 267–272.
- OVERTURF K., LAPATRA S.E. & POWELL M. (2001). Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids. *J. Fish Dis.*, 24, 325–333.
- PURCELL M.K., HART S.A., KURATH G. & WINTON J.R. (2006). Strand-specific, real-time RT-PCR assays for quantification of genomic and positive-sense RNAs of the fish rhabdovirus, infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Virol. Methods*, 132, 18–24.
- PURCELL M.K., LAPATRA S.E., WOODSON J.C., KURATH G. & WINTON J.R. (2010). Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol.*, 28, 98–105.
- RISTOW S.S. & ARNZEN J.M. (1989). Development of monoclonal antibodies that recognize a type 2 specific and a common epitope on the nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, 1, 119–125.
- RISTOW S.S. & ARNZEN DE AVILA J.M. (1991). Monoclonal antibodies to the glycoprotein and nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) reveal differences among isolates of the virus by fluorescence, neutralization and electrophoresis. *Dis. Aquat. Org.*, 11, 105–115.
- SHORS S.T. & WINSTON V. (2003). Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in an invertebrate (*Callibaetis* sp). *Am. J. Vet. Res.*, 50, 1307–1309.
- TROYER R.M. & KURATH G. (2003). Molecular epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus reveals complex virus traffic and evolution within southern Idaho aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, 55, 175–185.
- WINTON J.R. (1991). Recent advances in the detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1, 83–93.
- WINTON J.R. (1997). Immunization with viral antigens: Infectious hematopoietic necrosis. *Dev. Biol. Stand.*, 90, 211–220. Chapter 2.3.4. - Infection with infectious haematopoietic necrosis virus
- 2019 © OIE - Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals - 14/11/2019 15
- WINTON J.R., ARAKAWA C.K., LANNAN C.N. & FRYER J.L. (1988). Neutralizing monoclonal antibodies recognize antigenic variants among isolates of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 4, 199–204.
- WINTON J.R. & EINER-JENSEN K. (2002). Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis and viral hemorrhagic septicemia. In: *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*. Cunningham C.O., ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 49–79.
- WOLF K. (1988). Infectious hematopoietic necrosis. In: *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 83–114.

*

NB: Имеются Референтные лаборатории МЭБ по инфекционному некрозу гемопозитической ткани (см. таблицу в конце данного Руководства по водным животным или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Просим обращаться в Референтные лаборатории МЭБ для получения любой дополнительной информации по инфекционному некрозу гемопозитической ткани)

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

ИНФИЦИРОВАНИЕ HPR-ДЕЛЕТИРОВАННЫМ ИЛИ HPR0 ВАРИАНТАМИ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЛОСОСЕВЫХ

1. Предмет рассмотрения

Инфекция вирусом инфекционной анемии лососевых (ИАЛ) означает инфекцию патогенным вариантом вируса ИАЛ с делетированным высоко-полиморфным регионом (HPR), или непатогенным вариантом вируса ИАЛ с неделированным HPR (или HPR0) рода *Isavirus* семейства *Orthomyxoviridae*.

ИНР-делементированный вариант вируса ИАЛ может вызывать заболевание у атлантического лосося (*Salmo salar*) в генерализованной форме; при острой анемии вызывает смерть, кровотечения и некроз ряда внутренних органов. Течение болезни продолжительное при низкой суточной смертности (0,05–0,1%) обычно только в небольшом количестве садков. Кумулятивная смертность может стать очень высокой в течение периода длительностью в несколько месяцев, если не предпринять никаких мер по ограничению распространения болезни ([Rimstad c соавт., 2011](#)).

Выявление HPR0 варианта вируса ИАЛ никогда не было связано с проявлением клинических признаков болезни у атлантического лосося ([Christiansen c соавт., 2011](#)). Этот генотип вируса реплицирует в течение короткого промежутка времени и в основном локализуется в жабрах. Была предположена связь между непатогенным вариантом HPR0 вируса ИАЛ и патогенным HPR–делементированным вирусом ИАЛ, при ряде вспышек, потенциально возникающих в результате появления HPR-делементированного варианта вируса ИАЛ из варианта HPR0 вируса ИАЛ ([Cárdenas c соавт., 2014](#); [Christiansen c соавт., 2017](#); [Cunningham c соавт., 2002](#); [Gagné & LeBlanc, 2018](#); [Mjaaland c соавт., 2002](#)).

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Вирус ИАЛ – оболочечный вирус, 100 – 130 нм в диаметре с геномом, состоящим из 8 сегментов одноцепочечной РНК с отрицательной полярностью ([Dannevig c соавт., 1995](#)). Вирус обладает гемагглютинирующей, рецептор-разрушающей активностью и способностью к слиянию ([Falk c соавт., 1997](#); [Mjaaland c соавт., 1997](#); [Rimstad c соавт., 2011](#)).

Морфологические, физико-химические и генетические свойства вируса ИАЛ сопоставимы со свойствами всех вирусов семейства *Orthomyxoviridae*, а вирус ИАЛ был классифицирован как типовой представитель рода *Isavirus* ([Kawaoka c соавт., 2005](#)) в пределах семейства этого вируса. Были описаны нуклеотидные последовательности всех восьми сегментов генотипа, кодирующих как минимум десять белков ([Clouthier c соавт., 2002](#); [Rimstad c соавт., 2011](#)), включая 3' и 5' некодирующие последовательности ([Kulshreshtha c соавт., 2010](#)). Были определены четыре основных структурных белка,

включая 68 кДа нуклеопротеин, 22 кДа матричный белок, 42 кДа гемагглютинин-эстеразный (HE) белок, ответственный за связывание с рецептором и рецептор-разрушающую активность, а также 50 кДа поверхностный гликопротеин с предполагаемой способностью к слиянию, кодируемый геномными сегментами 3, 8, 6 и 5 соответственно. Сегменты 1, 2, и 4 кодируют вирусные полимеразы PB2, PB1 и PA. Каждый из двух наименьших геномных сегментов, сегменты 7 и 8, содержит две открытые рамки считывания (ОРС). ОРС1 сегмента 7 кодирует белок с антагонистическими свойствами к интерферону типа I, в то время как ОРС2, как предполагается, кодирует белок ядерного экспорта (NEP). Является ли генный продукт ОРС1 неструктурным или структурным компонентом вириона остается неопределенным. Меньшая ОРС1 сегмента 8 кодирует матричный белок, в то время как более крупная ОРС2 кодирует РНК-связывающий структурный белок, также обладающий антигонистическими свойствами к интерферону типа I.

Анализ последовательности различных сегментов гена открыл различия между изолятами как внутри, так и за пределами определенных географических зон. На основе различий в части последовательности сегмента 6 были определены две группы: одна обозначена как европейская клада, вторая как североамериканская клада ([Gagné & LeBlanc, 2018](#)). В гене HE, был обнаружен небольшой HPR рядом с трансмембранным доменом. Этот регион характеризуется скорее присутствием пробелов, а не заменами единичных нуклеотидов ([Cunningham с соавт., 2002](#); [Mjaaland с соавт., 2002](#)). Было выдвинуто предположение, что полноразмерный ген (HPR0) представляет собой предшественника, от которого происходят все HPR-делетированные (патогенные) варианты вируса ИАЛ. Сообщалось о наличии непатогенного HPR0 генома вируса ИАЛ у клинически здорового дикого и фермерского атлантического лосося, но его не выявляли у рыбы с клинической болезнью и патологическими признаками, сопоставимыми с инфекцией HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ ([Christiansen с соавт., 2011](#); [Cunningham с соавт., 2002](#); [Lyngstad с соавт., 2012](#); [Markussen с соавт., 2008](#); [McBeath с соавт., 2009](#); [Nylund с соавт., 2007](#)). Сообщались случаи смешанной инфекции HPR-делетированным и HPR0 вариантами вируса ИАЛ ([Cárdenas с соавт., 2014](#); [Kibenge с соавт., 2009](#)). Недавние исследования показали, что HPR0 варианты вируса ИАЛ часто встречаются у атлантического лосося, выращиваемого в море. HPR0 вариант вируса ИАЛ является сезонным и скоротечным в природе и демонстрирует тканевый тропизм с высокой превалентностью в жабрах ([Christiansen с соавт., 2011](#); [Lyngstad с соавт., 2008](#)). В настоящий момент не было представлено прямого доказательства связи присутствия HPR0 варианта вируса ИАЛ со вспышкой клинической болезни. Риск возникновения патогенного HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ из резервуара HPR0 варианта считается низким, но не ничтожным ([Cárdenas с соавт., 2014](#); [Christiansen с соавт., 2011](#); [European Food Safety Authority, 2012](#); [Lyngstad с соавт., 2012](#)).

В дополнение к вариациям, наблюдаемым в HPR гена HE, другие сегменты гена также могут иметь значение для развития клинической болезни. Предполагаемый маркер вирулентности был обнаружен в белке слияния (F). Здесь, как обнаружилось, единичная замена нуклеотида или инсерция в последовательность рядом с предполагаемым сайтом расщепления белка, является обязательным условием для вирулентности ([Kibenge с соавт., 2007](#); [Markussen с соавт., 2008](#)). Кроме инсерции/рекомбинации вирус ИАЛ также использует генную реассортацию в своей эволюции, что имеет потенциальную связь с вирулентностью ([Cárdenas с соавт., 2014](#); [Devold с соавт., 2006](#); [Gagné & LeBlanc, 2018](#); [Markussen с соавт., 2008](#); [Mjaaland с соавт., 2005](#)).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Вирус ИАЛ выявляли с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в морской воде, отобранной в качестве образцов в местах выращивания, где обнаруживали атлантического лосося, положительного на вирус ИАЛ ([Kibenge с соавт., 2004](#)). Трудно оценить точно, насколько долго вирус может оставаться инфекционным в естественной среде по причине ряда факторов, таких как присутствие частиц или веществ, которые могут связывать или инактивировать вирус. Подвержение вируса ИАЛ, выращенного в культуре клеток температуре 15°C в течение 10 дней или 4°C в течение 14 дней не влияло на инфекционность вируса ([Falk с соавт., 1997](#)).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Вирус ИАЛ чувствителен к УФ излучению и озону. Инфекционность вируса ИАЛ снижалась на 3-log в стерильной пресной и морской воде при облучении УФ в дозе приблизительно 35 Дж/м² и 50 Дж/м², соответственно, в то время как соответствующее значение для вируса ИАЛ в сливных водах с рыбоперерабатывающего предприятия составляло приблизительно 72 Дж/м². Озонированная морская вода (4 минуты с использованием 8 мг мл⁻¹, 600–750 мВ кислотно-восстановительный потенциал) может полностью инактивировать вирус ИАЛ. Инкубирование гомогената ткани от больной рыбы при pH 4 или pH 12 в течение 24 часов инактивировало вирус ИАЛ. Инкубирование в присутствии хлора (100 мг мл⁻¹) в течение 15 минут также инактивировало вирус ([Rimstad с соавт., 2011](#)). Вирус ИАЛ, выделенный из культуры клеток, может выживать в течение недель при низких температурах, но инфекционность вируса теряется в течение 30 минут при подвергании его температуре 56°C ([Falk с соавт., 1997](#)).

2.1.4. Жизненный цикл

Основной путь инфекции наиболее вероятно проходит через жабры как для варианта вируса ИАЛ HPR0 так и для HPR-делетированного варианта, но инфицирование посредством кишечника или кожи исключить нельзя. HPR-делетированный вариант вируса ИАЛ использовался в исследованиях, указанных ниже. Эндотелиальные клетки, выстилающие кровеносные сосуды, по-видимому, являются основной целью для вируса ИАЛ, как было продемонстрировано электронной микроскопией, иммуногистохимическим исследованием и гибридизацией *in-situ*. Репликация вируса также была продемонстрирована в лейкоцитах и синусоидальных макрофагах в тканях почек, с положительной окраской по вирусу ИАЛ в гистохимическом анализе (ИГХ). Так как эндотелиальные клетки являются целевыми клетками (См. Раздел 2.2.5), репликация вируса может возникнуть в любом органе ([Aamelfot с соавт., 2012](#); [Rimstad с соавт., 2011](#)).

Молекула гемагглютинин-эстеразы (HE) вируса ИАЛ, подобно гемагглютанину (HA) других ортомиксовирусов (вирусы гриппа типа А, В и С) играет важную роль в связывании вируса с остатками сиаловой кислоты на поверхности клетки. В случае с вирусом ИАЛ, вирусная частица связывается с рецепторами гликопротеина, содержащими остатки 4-О-ацетил сиаловой кислоты, которые также функционируют как субстрат для рецептор-разрушающего фермента. Дальнейшее поглощение и репликация, по видимому, следуют пути, описанному в отношении вирусов гриппа А, что демонстрируется слиянием, зависимым от низкого pH, торможением репликации актиномицином D и альфа-аманицином, ранним скоплением нуклеопротеина, а затем матричного белка в ядре и почкованием вирионов-потомков от клеточной поверхности ([Cottet с соавт., 2011](#); [Rimstad с соавт., 2011](#)).

Выделение вируса ИАЛ в среду инфицированной рыбой может происходить с естественными секретами/выделениями.

Вариант HPR0 вируса ИАЛ не был выделен в культуре клеток, что затрудняет *in-vivo* и *in-vitro* исследования характеристик и жизненного цикла этого варианта.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды, которые отвечают критериям внесения в список как восприимчивые к инфекции вирусом ИАЛ на основании положений Главы 1.5. *Ветеринарно-санитарного кодекса по водным животным (Водный кодекс)*, включают: атлантический лосось (*Salmo salar*), кумжу (*Salmo trutta*) и радужную форель (*Oncorhynchus mykiss*).

2.2.2. Виды с недостаточной доказанностью восприимчивости

Виды, в отношении которых не существует достаточно доказательства выполнения критериев внесения в список видов, восприимчивых к вирусу ИАЛ на основании положений Главы 1.5. *Водного кодекса*, включают: атлантическую сельдь (*Clupea harengus*) и симу (*Oncorhynchus masou*).

К тому же патоген-специфичные положительные результаты ПЦР были получены от следующих организмов, но активной инфекции продемонстрировано не было: кижуч (*Oncorhynchus kisutch*).

2.2.3. Восприимчивые этапы жизни хозяина

Известно, что у атлантического лосося жизненные этапы от предличинки до взрослой особи, являются восприимчивыми. В основном сообщают о вспышках болезни в морских садках, и только несколько случаев были зарегистрированы на пресноводной стадии, включая один случай у предличинок ([Rimstad с соавт., 2011](#)). Инфекция HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ была экспериментально достигнута как у молоди атлантического лосося, так и у пестрятки, содержащихся в пресной воде.

2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Как известно, HPR-делетированный вариант вируса ИАЛ может вызывать клиническую болезнь только у атлантического лосося.

2.2.5. Органы-мишени и инфицированная ткань

У рыбы, которая поражена инфекцией HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ, инфицируются эндотелиальные клетки всех органов (жабры, сердце, печень, почки, селезенка и другие) ([Aamelfot с соавт., 2012](#)). Вариант HPR0 вируса ИАЛ, по-видимому, нацелен в основном на эпителиальные клетки жабр ([Aamelfot с соавт., 2012](#)), но также был выявлен в сердце и почках ([Christiansen с соавт., 2011](#); [Lyngstad с соавт., 2011](#)).

2.2.6. Персистентная инфекция

Персистентная инфекция у пожизненных носителей не была зарегистрирована у атлантического лосося, но на уровне фермы инфекция может персистировать в популяции посредством постоянного заражения новых особей, которые не демонстрируют клинических признаков болезни. Это может включать инфекцию HPR0 вариантами вируса ИАЛ, которые, по-видимому, являются быстротечными по характеру ([Christiansen с соавт.,](#)

2011; [Lyngstad с соавт., 2011](#)). Экспериментальная инфекция радужной форели и кумжи вирусом ИАЛ указывает на то, что персистентная инфекция у этих видов возможна ([Rimstad с соавт., 2011](#)).

2.2.7. Векторы

Передача вируса ИАЛ лососевыми вшами (*Lepeophtheirus salmonis* и *Caligus rogercresseyi* [[Oelckers с соавт., 2014](#)]) была продемонстрирована в экспериментальных условиях. Несмотря на то, что естественные векторы обнаружены не были, ряд различных групп векторов могут быть потенциальными векторами в определенных условиях ([Rimstad с соавт., 2011](#)).

2.2.8. Известные или предполагаемые водные животные-переносчики

Дикие атлантический лосось и кумжа могут быть переносчиками вируса ИАЛ ([Rimstad с соавт., 2011](#)). Важность дикой морской рыбы (См. Раздел 2.2.2) в качестве переносчиков вируса подлежит разъяснению. Результаты исследования с Фарерских островов указывают на потенциальное присутствие неизвестного морского резервуара этого вируса ([Christiansen с соавт., 2011](#)).

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Исследования периодически повторяющихся эпидемий инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ в различных зонах производства лосося приходят к выводу, что вирус распространяется локально между соседними площадками. Близость к площадкам, где зарегистрированы вспышки болезни, является первоочередным риском, и этот риск для восприимчивой фермы увеличивается со снижением расстояния до зараженного объекта. Анализ последовательности вируса ИАЛ, выделенного при вспышках в Норвегии, показывает, что схожесть между вирусами, полученными на соседних пораженных площадках, является еще одним доказательством передачи вируса ИАЛ между близко расположенными производственными площадками. Риск передачи вируса ИАЛ зависит от уровня действующих мер биобезопасности. Предлагаемые пути передачи вируса ИАЛ включают морскую воду, партии живой рыбы, передачу через морских вшей и через диких лососевых ([Aldrin с соавт., 2011](#); [Gustafson с соавт., 2007](#); [Lyngstad с соавт., 2011](#); [Mardones с соавт., 2011](#); [Rimstad с соавт., 2011](#)).

Многие вспышки клинической болезни, вызванной HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ в Норвегии, по-видимому, являются изолированными во времени и пространстве от других вспышек с неизвестными источниками инфекции ([Aldrin с соавт., 2011](#)). Предполагаемая гипотеза возникновения болезни это случайный переход варианта HPR0 вируса ИАЛ в HPR-делетированный вариант вируса ИАЛ, вызывающий отдельные вспышки или локальные эпидемии посредством локальной передачи ([Lyngstad с соавт., 2011](#); [Lyngstad с соавт., 2012](#)). Риск возникновения HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ из варианта HPR0 вируса ИАЛ считается низким, но не ничтожным ([European Food Safety Authority, 2012](#)). Прямая связь между HPR0 и HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ все еще нуждается в подтверждении ([Cárdenas с соавт., 2014](#); [Gagné & LeBlanc, 2018](#)).

Так как инфекция вирусом ИАЛ также была зарегистрирована на площадках производства смолта атлантического лосося, передачу вируса ИАЛ от родителей потомству также не

стоит исключать. Даже несмотря на то, что нет доказательства реальной вертикальной передачи, яйца и эмбрионы могут представлять собой риск передачи вируса, если меры биозащиты не принимаются надлежащим образом ([Mardones c соавт., 2014](#); [Marshall c соавт., 2014](#); [Rimstad c соавт., 2011](#)).

2.3.2. Превалентность

В садках с больной рыбой превалентность HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ может широко разниться, в то время как в соседних садках (где нет больной рыбы) вирус ИАЛ может с трудом поддаваться выделению, даже с помощью наиболее чувствительных методов. Поэтому в целях диагностических исследований важно отбирать пробы из садков, содержащих больную рыбу.

Существует все больше подтверждений того, что превалентность непатогенных HPR0 вариантов вируса ИАЛ может быть высокой в зонах производства атлантического лосося. Вариант HPR0 вируса ИАЛ у атлантического лосося, по-видимому, является сезонным и скоротечным ([Christiansen c соавт., 2011](#)). Вариант HPR0 вируса ИАЛ также был выделен от диких лососевых ([Rimstad c соавт., 2011](#)).

2.3.3. Географическое распределение

Первоначально сообщения о вирусе появились в Норвегии в середине 1980-ых ([Thorud & Djupvik, 1988](#)), затем об инфекции вирусом ИАЛ у атлантического лосося сообщили из Канады (Нью-Брунсвик в 1996 г.; [Mullins c соавт., 1998](#)), Соединенного Королевства (Шотландия в 1998 г.), Фарерских островов (2000 г.), США (Мэн в 2001 г.) и Чили (2007 г.) ([Cottet c соавт., 2011](#); [Rimstad c соавт., 2011](#)). О присутствии варианта HPR0 вируса ИАЛ сообщали все страны, где возникала инфекция HPR-делетированным вирусом ИАЛ, за исключением Исландии.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Во время вспышек инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ смертность и заболеваемость могут серьезно разниться как внутри садков, так и между ними на морской ферме, а также между фермами. Заболеваемость и смертность в садке может начинаться с очень низких уровней. Обычно, суточная смертность в пораженных садках варьирует от 0,5 до 1%. Без вмешательства смертность возрастает и часто достигает пика ранним летом и зимой. Уровень кумулятивной смертности во время вспышки варьирует от незначительного до умеренного, но в тяжелых случаях кумулятивная смертность может превышать 90% в течение нескольких месяцев. Изначально вспышка клинической болезни может быть ограничена до одного или двух садков в течение длительного периода. В таких случаях, если садки с рыбами, демонстрирующими клинические признаки болезни, отправляют на немедленный убой, то можно предотвратить дальнейшее развитие клинической инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ на площадке. В случаях, когда смолт был инфицирован на живорыбных судах во время транспортировки, могут возникнуть одновременные вспышки.

Вариант HPR0 вируса ИАЛ не вызывает клинической болезни у атлантического лосося.

2.3.5. Факторы окружающей среды

В основном вспышки инфекции, вызванной HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ, имеют тенденцию быть сезонными, когда большинство вспышек происходят поздней

весной или поздней осенью, однако вспышки могут возникать в любое время года. Манипуляции с рыбой (например, сортировка или обработки, разделение или перемещение садков) могут спровоцировать вспышки болезни на инфицированных фермах, особенно, если проблему не диагностировали в течение длительного периода ([Lyngstad с соавт., 2008](#)).

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Вакцинация против инфекции вирусом ИАЛ проводится в Северной Америке с 1999 г., а на Фарерских островах с 2005 г. В Норвегии вакцинация против инфекции вирусом ИАЛ проводилась в первый раз в 2009 г. в регионе с высоким количеством вспышек инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ. Чили начала вакцинацию против инфекции вирусом ИАЛ в 2010 г.

2.4.2. Фармакотерапия

Противовирусный препарат широкого спектра Рибавирин (1-бета-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) эффективен в торможении репликации вируса ИАЛ как *in vitro*, так и *in vivo* ([Rivas-Aravena с соавт., 2011](#)).

2.4.3. Иммуностимуляция

Не применимо.

2.4.4. Разведение резистентных популяций

Различия в восприимчивости среди различных групп семейства атлантического лосося в пресной воде наблюдались в экспериментах с контрольным заражением и в полевых исследованиях, что предполагает потенциал для разведения резистентных популяций ([GjØen с соавт., 1997](#)).

2.4.5. Восстановление популяции резистентными особями

Не применимо.

2.4.6. Блокирующие агенты

Не применимо.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Дезинфекция икринок в соответствии со стандартными процедурами предлагается в качестве важной меры контроля (Глава 4.4 *Водного кодекса*).

2.4.8. Общие практики содержания

Инцидентность инфекции вирусом ИАЛ может быть значительно снижена посредством выполнения законодательных мер или практик содержания, касающихся перемещения рыбы, обязательного санитарного контроля, положений по транспортировке и бойням. Специальные меры, включая ограничения, накладываемые на пораженные фермы, фермы под подозрением или соседние фермы, вынужденный санитарный убой, сегрегация

поколений («система пусто/занято»), а также дезинфекция побочных продуктов и сточных вод с рыбных боен и рыбоперерабатывающих предприятий также могут содействовать снижению инцидентности болезни. Опыт Фарерских островов, где превалентность варианта HPR0 вируса ИАЛ высока, демонстрирует, что комбинация надлежащих практик биобезопасности и содержания значительно сокращает риск возникновения вспышек инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ.

3. Отбор проб

3.1. Отбор индивидуальных образцов

С целью выявления HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ, следует отбирать образцы от рыбы, демонстрирующей клинические признаки или макропатологию.

С целью выявления варианта HPR0 вируса ИАЛ следует отбирать образцы от случайно выбранных особей в различные моменты времени на протяжении всего производственного цикла.

3.2. Сохранение проб для последующего направления на исследования

	Гематология:	Гепарин или ЭДТА (Этилендиаминтетрауксусная кислота)
	Культура клеток:	Транспортировочная среда
	Гистология и иммуногистохимия:	Фиксация в 10% нейтральном формалине, забуференном фосфатом
	Иммунофлюоресценция (мазки):	Либо направляются в высушенном виде, либо в высушенном и фиксированном в 100% ацетоне
	Молекулярная биология (ОТ-ПЦР и секвенирование):	Надлежащая среда для сохранения РНК

3.3. Объединение проб в пулы

Объединение проб в пулы может быть применимо, однако следует учитывать влияние на чувствительность и расчетную превалентность.

3.4. Наиболее подходящие органы и ткани

3.4.1. Выявление HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ

Кровь – предпочтительный материал для отбора проб от живой рыбы. Только внутренние органы, которые не были подвергнуты воздействию окружающей среды, должны использоваться для диагностического исследования.

Вирусологическое обследование (культура клеток и ОТ-ПЦР в реальном времени или ее стандартный вариант): сердце (обязательно должно использоваться) и мезонефрос;

Гистология (следует отдавать приоритет): мезонефрос, печень, сердце, поджелудочная железа/кишечник, селезенка;

Иммунофлюоресценция (мазки): мезонефрос;

Иммуногистохимия: мезонефрос, сердце (включая клапаны и артериальную луковицу (bulbus arteriosus)).

3.4.2. Выявление варианта HPR0 вируса ИАЛ

Ткани жабр.

3.5. Неподходящие пробы/ткани

Неизвестны.

4. Диагностические методы

4.1. Полевые диагностические методы

4.1.1. Клинические признаки

Наиболее явными внешними признаками инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ являются бледный цвет жабр (за исключением случаев гемостаза в жабрах), пучеглазие, вздутое брюхо, кровь в передней камере глаза и иногда кожные кровотечения, особенно в районе брюха, а также отек чешуйного кармана.

В целом атлантический лосось, естественно инфицированный HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ, кажется вялым и может держать ближе к стенке садка.

Больная рыба в целом находится в хорошем состоянии, но корма в пищеварительном тракте у такой рыбы не обнаруживают.

4.2. Патологическая оценка

4.2.1. Макроскопическая патология

Рыба, инфицированная HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ, может демонстрировать ряд патологических изменений, начиная от отсутствия таковых до серьезных, в зависимости от таких факторов, как инфекционная доза, штамм вируса, температура, возраст и иммунный статус рыбы. Отсутствие поражений является патогномоничным симптомом для инфекции HPR-делетированным вариантом вируса, но анемия и нарушение кровообращения присутствуют в любом случае. Следующие признаки были описаны как соответствующие инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ, однако все изменения редко наблюдаются у одной рыбы.

- Желтоватая жидкость возможно с примесью крови в брюшной и перикардальной полости.
- Отек плавательного пузыря.
- Небольшие кровоизлияния в висцеральной или париетальной брюшине.
- Очаговое или диффузное потемнение печени. На поверхности может присутствовать тонкий фибриновый слой.
- Разбухшая, темно-красная селезенка с закругленными краями.
- Потемнение слизистой кишечной стенки в слепой кишке, в среднем и толстом отделе кишечника, с отсутствием крови в просвете кишечника у исследуемых особей.
- Опухшие, темно-красные почки с кровью и жидкостью, истекающей при надрезе.
- Точечные кровоизлияния скелетных мышц.

4.2.2. Клиническая химия

- Гематокрит <10 в конечных стадиях (25–30, число которое часто наблюдается в менее запущенных случаях болезни).

Гематокрит <10 должен во всех случаях подлежать расследованию на наличие инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ у атлантического лосося, выращенного в морских водах.

- Мазки крови с дегенеративными и вакуолизированными эритроцитами и наличием эритробластов с неправильной формой ядра. Определение лейкоцитарной формулы демонстрирует снижение в соотношении лейкоцитов по отношению к эритроцитам с наибольшим снижением среди лимфоцитов и тромбоцитов.

Патология печени приводит к повышенным уровням содержания почечных ферментов в крови.

4.2.3. Микроскопическая патология

Гистологические изменения у клинически больного атлантического лосося разнообразны, и могут включать следующие из них:

- Многочисленные эритроциты в центральном венозном синусе и ламеллярных капиллярах, при этом в жабрах также формируются эритроцитарные тромбы.
- Многоочаговые, переходящие в сплошные кровоизлияния и/или гепатоцитарный некроз, возникающие на некотором расстоянии от крупных сосудов в печени. Очаговые скопления эритроцитов в расширенных печеночных синусоидах.
- Скопление эритроцитов в кровеносных сосудах собственной пластинки слизистой оболочки кишечника и в конечном итоге кровоизлияние в собственную пластинку.
- Строма селезенки опухшая по причине скопления эритроцитов.
- Легкие многоочаговые до обширных диффузных интерстициальных кровоизлияний с тубулярным некрозом в геморрагических областях, скопление эритроцитов в почечных клубочках.
- Эритрофагоцитоз в селезенке и вторичные кровоизлияния в печени и почках.

4.2.4. Влажные анатомические препараты

Не применимо.

4.2.5. Мазки

См. Разделы [4.3.1.1.2](#)

4.2.6. Фиксированные срезы

См. раздел [4.3.1.1.3](#)

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Вирius обнаруживали в эндотелиальных клетках и лейкоцитах с помощью электронной микроскопии тканевых препаратов, но этот метод не применялся в диагностических целях.

4.3. Обнаружение возбудителя и методы идентификации

4.3.1. Методы прямого обнаружения

За исключением молекулярных методов (см. Раздел [4.3.1.2.3](#)), эти методы прямого обнаружения рекомендуются только в отношении рыбы с клиническими признаками инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ.

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные анатомические препараты

Не применимо.

4.3.1.1.2. Мазки

4.3.1.1.2.1. Непрямой иммунофлюоресцентный анализ

Реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) с использованием валидированных моноклональных антител к гемагглютинин-эстеразе вируса ИАЛ на почечных мазках (отпечатках) или на замороженных тканевых срезах почки, сердца и печени, давал положительные реакции как у экспериментально, так и у естественно-инфицированного атлантического лосося. Подозрительные случаи (см. Раздел 7.1) можно подтвердить с помощью положительного результата в РНИФ.

i. Препараты тканевых мазков (отпечатков)

Небольшой кусочек средней части почки быстрым движением промакивают об абсорбирующую бумагу с целью удаления лишней жидкости, несколько отпечатков в области размером с ноготь большого пальца фиксируют на микроскопических слайдах, покрытых поли-L-лизином. Отпечатки высушивают воздухом, фиксируют в охлажденном 100% ацетоне в течение 10 минут и хранят либо при 4°C в течение нескольких дней или при –80°C до момента использования.

ii. Процедура окрашивания

После блокирования с помощью 5% обезжиренного сухого молока в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР) в течение 30 минут, препараты инкубируют в течение 1 часа с использованием подходящего разведения моноклональных антител к вирусу ИАЛ после трех промываний. Для обнаружения связанных антител, препараты инкубируют с помощью флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ)-конъюгированного антимышиного Ig в течение 1 часа. ЗФР с добавлением 0.1% Твин 20 используют для промывания. Все процессы инкубирования проводят при комнатной температуре.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

4.3.1.1.3.1. Иммуногистохимия (ИГХ)

Поликлональное антитело к нуклеопротеину HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ используют на парафиновых срезах ткани, фиксированных в формалине. Это ИГХ окрашивание демонстрировало положительные реакции как у экспериментально так и естественно инфицированного атлантического лосося. Предпочтительными органами для этого исследования являются средняя часть почки и сердце (переходная часть, включающая все три камеры и клапаны). Подозрительные случаи вследствие патологических признаков проверяют на основе наличия положительных результатов в ИГХ. Гистологические срезы подготавливают в соответствии со стандартными методами.

i. *Подготовка срезов ткани*

Ткани фиксируют в нейтральном забуференном фосфатом 10% формалине в течение минимум 1 дня, дегидратируют в этаноле, очищают ксиленом и парафинируют в соответствии со стандартными протоколами. Срезы, приблизительно 5 мкм толщиной (для проведения ИГХ на слайдах, покрытых поли-L-лизинном) нагревают при 56–58°C (максимум 60°C) в течение 20 минут, удаляют воск ксиленом, регидратируют с помощью этанола и окрашивают гематоксиленом и эозином в целях патоморфологии и ИГХ, как описано ниже.

ii. *Процедура окрашивания для ИГХ*

Все процедуры инкубации осуществляют при комнатной температуре на качающейся платформе, если не указано иное.

- a. Антиген демаскируют посредством кипячения в 0,1 М цитратного буфера, pH 6,0, дважды в течение 6 минут с последующей блокировкой в 5% обезжиренном сухом молоке и 2% козьей сыворотке в 50 мМ солевого трис-буфера (TBS; Трис/HCl 50 мМ, NaCl 150 мМ, pH 7,6) в течение 20 минут.
- b. Затем срезы инкубируют в течение ночи с первичными антителами (моноспецифичное кроличье антитело к нуклеопротеину вируса ИАЛ), разведенными в TBS с добавлением 1% обезжиренного сухого молока с последующими тремя промывками в TBS с 0,1% Твин 20.
- c. Для обнаружения связанных антител, срезы инкубируют с антителами к кроличьему IgG, конъюгированными щелочной фосфатазой, в течение 60 минут. После последней промывки прочный красный (1 мг мл⁻¹) и нафтол AS-MX фосфат (0.2 мг мл⁻¹) с добавлением 1 мМ левамизола в 0,1 М TBS (pH 8,2) добавляют для развития реакции в течение 20 минут. Срезы затем промывают в водопроводной воде до контрастного окрашивания с помощью гематоксилина Гарриса и подготавливают в водной заливочной среде. Срезы ткани, положительные и отрицательные на вирус ИАЛ, инкубируют в качестве контролей при каждой постановке.

iii. *Интерпретация*

Отрицательные контрольные срезы не должны демонстрировать значительных цветовых реакций. Положительные контрольные срезы должны показывать четко видимую цитоплазматическую и внутриядерную окраску красным цветом эндотелиальных клеток в кровеносных сосудах или эндокарде сердца. Исследуемый срез считается положительным, если обнаруживается четкое, внутриядерное окрашивание эндотелиальных клеток. Внутриядерная локализация специфична для нуклеопротеина ортомикровирусов в течение стадии вирусной репликации.

Сопутствующее цитоплазматическое окрашивание часто доминирует. Цитоплазматические и другие модели окрашивания без внутриядерной локализации считаются неспецифичными или сомнительными.

Наиболее сильные положительные реакции окрашивания обычно получают в эндотелиальных клетках сердца и почки. Реакции в виде эндотелиального окрашивания внутри обширных геморрагических поражений могут быть слабыми или отсутствовать вовсе, возможно по причине лизиса инфицированных эндотелиальных клеток.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток

Клетки ASK ([Devold с соавт., 2000](#)) рекомендуются к использованию для первичного выделения HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ, но при этом также можно использовать другие восприимчивые клеточные линии, такие как SHK-1 ([Dannevig с соавт., 1995](#)). Однако, следует учитывать вариабельность штаммов и способность к репликации в различных клеточных линиях. Клетки ASK, по-видимому, поддерживают выделение и рост изолятов вируса, известных до настоящего времени. Более явное цитопатическое действие (ЦПД) может демонстрироваться в клетках ASK. Обе клеточные линии SHK-1 и ASK, скорее всего, теряют восприимчивость к HPR-делетированному варианту вируса ИАЛ при увеличении количества пассажей.

Клетки SHK-1 и ASK выращивают при 20°C в культуральной среде Лейбовица L-15, обогащенной фетальной бычьей сывороткой (5% или 10%), L-глутамином (4 мМ), гентамицином (50 мкг мл⁻¹) и 2-меркаптоэтанолом (40 мкМ) (последнее можно не использовать).

В целях выделения вируса можно использовать клетки, выращенные в 25 см² колбах для культур ткани или многолуночных планшетах для культур клеток, которые можно запечатать парапленкой или с помощью устройства для запечатывания планшетов с целью стабилизации pH среды. Клетки, выращенные в 24-луночных планшетах, могут плохо расти в монослоях, но эта особенность может варьировать между лабораториями и в зависимости от типа используемых планшетов для культуры клеток. Серийно разведенные контроли, положительные на HPR-делетированный вариант вируса ИАЛ, следует инокулировать параллельно с образцами ткани в качестве теста на восприимчивость клеток к HPR-делетированному варианту вируса ИАЛ (данную манипуляцию следует осуществлять в месте, отличном от места, где исследуют образцы).

iv. Инокуляция клеточных монослоев

Подготавливают 2% суспензию гомогената ткани с помощью бессывороточной среды L-15 или другой среды с доказанной пригодностью. Ростовую среду удаляют из активно растущих монослоев (1-3 – дневные культуры или культуры 70–80% конфлюентности), выращенные в 25 см² колбах для культур ткани или многолуночных планшетах для культур клеток (см. выше). Монослои инокулируют (25 см² колбы для культур ткани), содержащих 1,5 мл 2% гомогената ткани. Объем корректируют до полного заполнения используемой площади. Оставляют на 3-4 инкубации при 15°C с последующим удалением инокулума и добавлением свежей среды L-15, обогащенной 2–5% FCS. В качестве альтернативы можно использовать 1/1000 разведение и прямую инокуляцию без замены среды.

Когда поступают пробы рыбы с производственных площадок, на которых вирус инфекционного панкреонекроза (IPNV) считается эндемичным, следует инкубировать надосадочную жидкость гомогената ткани (в течение минимум 1 часа при 15°C) с объединенной пробой антисыворотки к энзоотическим серотипам IPNV до инкубирования с целью нейтрализации любого IPNV, который может присутствовать в пробах.

v. *Мониторинговое инкубирование*

Инокулированные культуры клеток (хранимые при 15°C) должны исследоваться с регулярной периодичностью (по меньшей мере, каждые 7 дней) на наличие ЦПД. Типичное ЦПД по причине HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ проявляет себя в виде вакуолизированных клеток, которые впоследствии округляются и отделяются от ростовой поверхности. Если возникает ЦПД сопоставимое с ЦПД, описываемым для HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ или IPNV, следует отобрать аликвоту среды для идентификации вируса, как описано ниже. В случае инфекции IPNV следует повторно инокулировать клетки надосадочной жидкостью гомогената ткани, которую инкубировали с более низким разведением антисыворотки IPNV. Если спустя 14 дней не вырабатывается ЦПД, следует провести субкультивирование для освежения культур клеток.

vi. *Процедура субкультивирования*

Аликвоты среды (надосадочная жидкость) от первичных культур собирают через 14 дней (или раньше, если возникает очевидное ЦПД) после инокуляции. Надосадочные жидкости из лунок, инокулированных различными разведениями идентичных проб, могут быть объединены в целях надзора.

Надосадочные жидкости инокулируют в свежие клеточные культуры, как описано для первичной инокуляции: удаляют ростовую среду, инокулируют монослой небольшим объемом разведенной надосадочной жидкости (1/5 и более высокие разведения) в течение 3-4 часов перед добавлением свежей среды. Альтернативным образом, добавляют надосадочные жидкости (конечные разведения 1/10 и выше) непосредственно в культуры клеток с ростовой средой.

Инокулированные культуры клеток инкубируют в течение минимум 14 дней и исследуют с регулярной периодичностью, как описано в отношении первичной инокуляции. В конце периода инкубации или ранее, если возникает очевидное ЦПД, среду собирают в целях идентификации вируса, как описано ниже. Культуры клеток без признаков ЦПД подлежат постоянному исследованию на предмет присутствия HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ с помощью иммунофлуоресценции (РНИФ), гемадсорбции или ПЦР, так как репликация вируса может возникать без проявления очевидного ЦПД.

Процедура, описанная ниже, успешно применялась для выделения HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ от рыбы с клиническими признаками или от рыбы с подозрением на инфекцию. Вариант HPR0 вируса ИАЛ до настоящего времени не выделяли в культуре клеток.

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе антител

4.3.1.2.2.1. Идентификация вируса с помощью РНИФ

Все процедуры инкубирования проводят при комнатной температуре на качающейся платформе, если не указано иное.

- vii. Подготовить монослои клеток в соответствующих планшетах для культуры ткани (напр. 96-луночные или 24-луночные планшеты) в слайд-флаконах или на покровных стеклах, в зависимости от типа используемого микроскопа (инвертированный микроскоп, оборудованный УФ светом необходим для монослоев, выращенных в планшетах для культуры ткани). Клетки SHK-1 растут довольно плохо на стеклянных покровных стеклах. Должны быть включены необходимые монослои для отрицательных и положительных контролей.
- viii. Монослои инокулируют вирусными суспензиями, подлежащими идентификации в десятикратных разведениях, два монослоя на каждое разведение. Добавляют положительный вирусный контроль в разведениях, которые, как известно, дают хорошую окрашивающую реакцию. Культуры клеток инкубируют при 15°C в течение 7 дней или, если возникает ЦПД, на более ранних сроках.
- ix. Фиксируют в 80% ацетоне в течение 20 минут после удаления среды для клеточного культивирования и ополаскиванием 80% ацетоном. Удалить фиксатор и высушить воздухом в течение 1 часа. Фиксированные культуры клеток могут храниться сухими в течение менее одной недели при 4°C или при -20°C в течение более долгого периода.
- x. Клеточные монослои инкубируют с моноклональными антителами к HPR-делетированному варианту вируса ИАЛ в соответствующем разведении ФБР в течение 1 часа и дважды ополаскивают ФБР/0,05% Твин 20. Если наблюдается неспецифичное связывание, инкубируют с ФБР, содержащим 0,5% сухого обезжиренного молока.
- xi. Инкубируют с ФИТЦ-конъюгированным козым анти-мышиним иммуноглобулином (или если в качестве первичного атителя используется антитело, выработанное кроликами, используют ФИТЦ-конъюгированное антитело к кроличьему иммуноглобулину), в соответствии с инструкциями поставщика. В целях повышения чувствительности ФИТЦ-конъюгированный козий анти-мышиний Ig может быть заменен биотин-меченым антимышиным Ig и ФИТЦ-меченым стрептавидином и ополаскиванием, проводимым до проведения дополнительного этапа. Ополаскивают один раз с помощью ФБР/0,05% Твин 20, как было описано выше. Ядра могут быть окрашены пропидиум иодидом (100 мкг мл⁻¹ в стерильной дистиллированной воде). Добавляют ФБР (без Твин 20) и исследуют под УФ светом. Во избежание потери цвета, окрашенные планшеты следует хранить в темном месте до проведения исследования. При необходимости более долгого хранения (более 2-3 недель) раствор 1,4-диазабициклооктана (DABCO 2,5% в ФБР, рН 8.2) или подобный реагент можно добавить в качестве раствора, снижающего обесцвечивание.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Праймеры, описанные ниже, для ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени будут обнаруживать европейский и североамериканский HPR-делетированный вариант и вариант HPR0 вируса ИАЛ.

ОТ-ПЦР можно применять для обнаружения вируса ИАЛ в тотальной РНК (или тотальной нуклеиновой кислоте), извлеченной из рекомендуемых органов/тканей (см. Раздел 3.4). ОТ-ПЦР в реальном времени рекомендуется для обнаружения вируса ИАЛ, так она повышает

специфичность и, возможно, также чувствительность теста. В отношении ОТ-ПЦР на обнаружение вируса ИАЛ сообщалось о нескольких наборах праймеров, но рекомендуемые наборы праймеров представлены в таблице ниже. Наборы праймеров, полученных из геномного сегмента 8 и сегмента 7, использовались несколькими лабораториями и были признаны пригодными для обнаружения вируса ИАЛ во время вспышек болезни и у клинически здоровой рыбы-переносчика вируса.

По причине широкого распространения вариантов HPR0 вируса ИАЛ, важно контролировать все результаты, положительные в ПЦР, основанной на наборах праймеров из геномных сегментов 7 или 8, с помощью секвенирования HPR сегмента 6 с целью определения того, является ли изолят HPR-делетированным вариантом или HPR0 вариантом вируса ИАЛ, или обоими. Надлежащие праймеры, сконструированные и валидированные Справочной лабораторией МЭБ, приведены в таблице ниже. Валидация набора праймеров HPR для североамериканских изолятов варианта HPR0 затруднена по причине ограниченных данных по последовательности в Genbank в отношении 3' конца сегмента 6 вируса ИАЛ.

Праймеры для сегмента 7 и 8, а также праймеры для секвенирования в отношении HPR сегмента 6, перечислены ниже и также, при необходимости, могут быть использованы для проведения стандартной ОТ-ПЦР.

ОТ-ПЦР: в реальном времени и стандартная: Последовательности праймеров	Название	Сегмент генома	Размер продукта	Источник
5'-CAG-GGT-TGT-ATC-CAT-GGT-TGA-AAT-G-3' 5'-GTC-CAG-CCC-TAA-GCT-CAA-CTC-3' 5'-6FAM-CTC-TCT-CAT-TGT-GAT-CCC-MGBNFQ-3'	прямой праймер обратный праймер Taqman®зонд	7	155 нт	Snow с соавт., 2006
5'-CTA-CAC-AGC-AGG-ATG-CAG-ATG-T-3' 5'-CAG-GAT-GCC-GGA-AGT-CGA-T-3' 5'-6FAM-CAT-CGT-CGC-TGC-AGT-TC-MGBNFQ-3'	прямой праймер обратный праймер Taqman®зонд	8	104 нт	Snow с соавт., 2006
5'-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3' 5'-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3'	прямой праймер обратный праймер	6 (HPR)	304 нт если HPR0	Реф. Лаб. МЭБ

4.3.1.2.4. Очистка антигена

Вирус ИАЛ, размноженный в культуре клеток, может быть очищен с помощью центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы (Falk с соавт., 1997) или аффинной очистки с использованием иммуномагнитных бусин, сенсibilизированных моноклональными антителами к вирусу ИАЛ.

4.3.2. Серологические методы

Не опубликованы и не валидированы.

5. Рейтинг исследований на основании цели использования

Методы, доступные на данный момент для целевого надзора HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ, и диагностика инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ перечислены в Таблице 5.1. Надзор за HPR0 вариантом вируса ИАЛ ОТ-ПЦР в реальном времени с последующей стандартной ОТ-ПЦР и секвенированием являются единственным рекомендуемым методом (не указаны в таблице). Обозначения, используемые в Таблице, указывают: а = метод является рекомендуемый метод по

причине доступности, практичности, диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод может применяться в некоторых ситуациях, но затраты, точность или другие факторы значительно ограничивают диапазон его применения; и d = метод на настоящий момент не рекомендуется для проведения в этих целях. Эти данные неким образом субъективны, так как пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и практичности. Несмотря на то, что все тесты, перечисленные как категория a или b, прошли формальные процедуры стандартизации и валидации, их рутинная природа и тот факт, что они широко использовались без получения сомнительных результатов, делает их пригодными.

Таблица 5.1. Методы, используемые для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор инфекции HPR- делетированным вариантом вируса ИАЛ				Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	М	П	С	В		
Макропатологические признаки	d	d	d	d	c	b
Гистопатология	d	d	d	d	b	b
РНИФ на отпечатках почек	d	d	d	d	b	a
Иммуногистохимия	d	d	d	d	b	a
Выделение в культуре клеток с идентификацией вируса	b	b	b	b	b	a
ОТ-ПЦР	c	c	c	c	b	c
ОТ-ПЦР в реальном времени	a	a	a	a	a	b
Секвенирование	d	d	d	d	d	a

М – молодь

П- пестрятка

С – смолт

В – взрослые особи

*Так как диагностика инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ не основывается на результатах одного метода, информация в этой Таблице должна использовать с осторожностью. См. Раздел 7 в отношении критериев диагностики инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ.

РНИФ = реакция непрямой иммунофлюоресценции; ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

6. Тесты, рекомендуемые для целевого надзора с целью объявления свободы от инфекции вирусом инфекционной анемии лососевых

В отношении инфекции вирусом ИАЛ, рекомендуемым тестом для надзора является ОТ-ПЦР.

7. Подтверждающие диагностические критерии

Разумные основания для подозрения рыбы в инфицировании вирусом ИАЛ (HPR-делетированным вариантом или вариантом HPR0) приведены ниже. Компетентный орган должен обеспечить, чтобы после подозрения рыбы в инфекции вирусом ИАЛ на ферме, как можно быстрее было проведено официальное расследование в целях подтверждения или исключения присутствия болезни, применяя инспектирование и клинические исследования, а также сбор и отбор проб и применение методов лабораторного анализа, как описано в Разделе 4.

7.1. Определение случая подозрения

Наличие инфекции HPR0 или HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ подозревают, если есть соответствие следующим критериям:

- i. Положительный результат в ОТ-ПЦР или в ОТ-ПЦР в реальном времени.

Кроме того инфекция HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ подозревают, если есть соответствие хотя бы одному критерию:

- iv. Клинические признаки или патологические изменения, сопоставимые с ИАЛ;
- v. ЦПД, типичное для вируса ИАЛ в культурах клеток;
- vi. Положительный результат в РНИФ на отпечатках тканей.

7.2. Определение подтвержденного случая (HPR-делетированный вариант вируса ИАЛ)

Наличие вируса ИАЛ считается подтвержденным, если, кроме критериев, указанных в Разделе 7.1, есть соответствие одному или более критериев, указанных ниже:

- i. Выделение вируса ИАЛ проводится на культуре клеток с последующей идентификацией на культуре клеток либо посредством исследований на основе антител (РНИФ) и/или традиционной ПЦР с последующим секвенированием ампликона;
- ii. Вирус ИАЛ выявляют в гистологических срезах с помощью иммуноанализа с использованием антител к вирусу ИАЛ;
- iii. Выявление вируса ИАЛ в препаратах ткани с помощью традиционной ПЦР с последующим секвенированием ампликона.

7.3. Определение подтвержденной инфекции HPR0 вариантом вируса ИАЛ

Критерии, указанные в пункте i), должны быть выполнены, чтобы подтвердить инфекцию HPR0 вариантом вируса ИАЛ.

- i. Выявление вируса ИАЛ посредством ОТ-ПЦР с последующей амплификацией и секвенированием региона HPR сегмента 6 с целью подтверждения наличия только варианта HPR0.

8. Литературные источники

Aamelfot M., Dale O.B., Weli S., Koppang E.O. & Falk K. (2012). Expression of 4-O-acetylated sialic acids on Atlantic salmon endothelial cells correlates with cell tropism of Infectious salmon anemia virus. *J. Virol.*, 86, 10571–10578

Aldrin M., Lyngstad T.M., Kristoffersen A.B., Storvik B., Borgan O. & Jansen P.A. (2011). Modelling the spread of infectious salmon anaemia among salmon farms based on seaway distances between farms and genetic relationships between infectious salmon anaemia virus isolates. *J.R. Soc. Interface*, 8, 1346–1356

Biacchesi S., Le Berre M., Le Guillou S., Benmansour A., Brémont M., Quillet E. & Boudinot P. (2007). Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. *J. Fish Dis.*, 30, 631–636

Cárdenas C., Carmona M., Gallardo A., Labra A. & Marshall S.H. (2014). Coexistence in field samples of two variants of the infectious salmon anemia virus: a putative shift to pathogenicity. *PLoS One*, 9, e87832. doi: 10.1371/journal.pone.0087832

Christiansen D.B., McBeath A.J.A., Aamelfot M., Matejusova I., Fourrier M., White P., Petersen P.E. & Falk K. (2017). First field evidence of the evolution from a non-virulent HPR0 to a virulent HPR-deleted infectious salmon anaemia virus. *J. Gen. Virol.*, 98, 595–606

Christiansen D.H., Østergaard P.S., Snow M., Dale O.B. & Falk K. (2011). A low-pathogenic variant of infectious salmon anemia virus (ISAV1 - HPR0) is highly prevalent and causes a non-clinical transient infection in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the Faroe Islands. *J. Gen. Virol.*, 92, 909–918

Cottet L., Rivas-Aravena A., Cortez-San Martin M., Sandino A.M. & Spencer E. (2011). Infectious salmon anemia virus – genetics and pathogenesis. *Virus Res.*, 155, 10–19

Clouthier S.C., Rector T., Brown N.E.C. & Anderson E.D. (2002). Genomic organization of infectious salmon anaemia virus. *J. Gen. Virol.*, 83, 421–428

Cunningham C.O., Gregory A., Black J., Simpsom I. & Raynard R.S. (2002). A novel variant of the infectious salmon anaemia virus (ISAV) haemagglutinin gene suggests mechanisms for virus diversity. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 22, 366–374

Dannevig B.H., Falk K. & Namork E. (1995). Isolation of the causal virus of infectious salmon anemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *J. Gen. Virol.*, 76, 1353–1359

Devold M., Karlsen M. & Nylund A. (2006). Sequence analysis of the fusion protein gene from infectious salmon anemia virus isolates: evidence of recombination and reassortment. *J. Gen. Virol.*, 87, 2031–2040

Devold M., Krossoy B., Aspehaug V. & Nylund A. (2000). Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. Dis. Aquat. Org., 40, 9–18

European Food Safety Authority (EFSA) (2012). EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on infectious salmon anaemia. EFSA Journal, 10, 2971

Falk K., Namork E., Rimstad E., Mjaaland S. & Dannevig B.H. (1997). Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L). J. Virol., 71, 9016–9023

Gagné N. & LeBlanc F. (2018). Overview of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic Canada and first report of an ISAV North American-HPR0 subtype. J. Fish Dis., 41, 421–430; DOI: 10.1111/jfd.12670

Gjøen H.M., Refstie T., Ulla O. & Gjerde B. (1997). Genetic correlations between survival of Atlantic salmon in challenge and field tests. Aquaculture, 158, 277–288

Gustafson L.L., Ellis S.K., Beattie M.J., Chang B.D., Dickey D.A., Robinson T.L., Marengi F.P., Moffett P.J. & Page F.H. (2007). Hydrographics and the timing of infectious salmon anemia outbreaks among Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) farms in the Quoddy region of Maine, USA and New Brunswick, Canada. Prev. Vet. Med., 78, 35–56

Kawaoka Y., Cox N.J., Haller O., Hongo S., Kaverin N., Klenk H.D., Lamb R.A., McCauley J., Palese P., Rimstad E. & Webster R.G. (2005). Infectious Salmon Anaemia Virus. In: Virus Taxonomy – Eight Report of the International Committee on Taxonomy Viruses, , Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., eds. Elsevier Academic Press, New York, USA, 681–693

Kibenge F.S.B., Garate o.n. Johnson G., Arriagada K., Kibenge M.J.T. & Wadowaka D. (2001). Isolation and identification of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. Dis. Aquat. Org., 45, 9–18

Kibenge F.S.B., Godoy M.G., Wang Y., Kibenge M.J.T., Gherardelli V., Mansilla S., Lisperger A., Jarpa M., Larroquete G., Avendaño F., Lara M. & Gallardo A. (2009). Infectious salmon anaemia virus (ISAV) isolated from the ISA disease outbreaks in Chile diverged from ISAV isolates from Norway around 1996 and was disseminated around 2005, based on surface glycoprotein gene sequences. Virol. J., 6, 88

Kibenge F.S.B., Kibenge M.J.T., Wang Y., Qian B., Hariharan S. & McGeachy S. (2007). Mapping of putative virulence motifs on infectious salmon anaemia virus surface glycoprotein genes. J. Gen. Virol., 88, 3100–3111

Kibenge F.S.B., Munir K., Kibenge M.J.T., Moneke T.J. & Moneke E. (2004). Infectious salmon anemia virus: causative agent, pathogenesis and immunity. Anim. Health Res. Rev., 5, 65–78

Kulshreshtha V., Kibenge M., Saloni K., Simard N., Riveroll A. & Kibenge F. (2010). Identification of the 3' and 5' terminal sequences of the 8 RNA genome segments of European and North American genotypes of infectious salmon anaemia virus (an orthomyxovirus) and evidence for quasispecies based on the non-coding sequences of transcripts. Virol. J., 7, 338

- Lyngstad T.M., Hjortaas M.J, Kristoffersen A.B, Markussen T., Karlsen E.T., Jonassen C.M. & Jansen P.A. (2011). Use of molecular epidemiology to trace transmission pathways for infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Norwegian salmon farming. *Epidemics*, 3, 1–11
- Lyngstad T.M., Jansen P.A., Sindre H., Jonassen C.M., Hjortaas M.J., Johnsen S. & Brun E. (2008). Epidemiological investigation of infectious salmon anaemia (ISA) outbreaks in Norway 2003–2005. *Prev. Vet. Med.*, 84, 213–227
- Lyngstad T.M., Kristoffersen A. B., Hjortaas M. J., Devold, M., Aspehaug, V., Larssen, R. B. & Jansen & P. A. (2012). Low virulent infectious salmon anaemia virus (ISAV-HPR0) is prevalent and geographically structured in Norwegian salmon farming. *Dis. Aquat. Org.*, 101, 197–206
- MacLean S.A., Bouchard D.A. & Ellis S.K. (2003). Survey of non-salmonid marine fishes for detection of infectious salmon anemia virus and other salmonid pathogens. *In: Technical Bulletin 1902. International Response to Infectious Salmon Anemia: Prevention, Control and Eradication*, Miller O. & Cipriano R.C., eds. , USDA, APHIS; US Dept Interior, US Geological Survey; US Dept Commerce, National Marine Fisheries Service, Washington DC, USA, 135–143
- Mardones F.O., Martinez-Lopez B., Valdes-Donoso P., Carpenter T.E. & Perez A.M. (2014). The role of fish movements and the spread of infectious salmon anemia virus (ISAV) in Chile, 2007–2009. *Prev. Vet. Med.*, 114, 37–46
- Mardones F.O., Perez A.M., Valdes-Donoso P. & Carpenter T.E. (2011). Farm-level reproduction number during an epidemic of infectious salmon anaemia virus in southern Chile in 2007–2009. *Prev. Vet. Med.*, 102, 175–184
- Markussen T., Jonassen C.M., Numanovic S., Braaen S., Hjortaas M., Nilsen H. & Mjaaland S. (2008). Evolutionary mechanisms involved in the virulence of infectious salmon anaemia virus (ISAV), a piscine orthomyxovirus. *Virology*, 374, 515–527
- Marshall S.H., Ramírez R., Labra A., Carmona M. & Muñoz C. (2014). Bona Fide Evidence for Natural Vertical Transmission of Infectious Salmon Anemia Virus in Freshwater Brood Stocks of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in Southern Chile. *J. Virol.*, 88, 6012–6018; doi: 10.1128/JVI.03670-13
- McBeath A.J., Bain N. & Snow M. (2009). Surveillance for infectious salmon anaemia virus HPR0 in marine Atlantic salmon farms across Scotland. *Dis. Aquat. Org.*, 87, 161–169
- Mjaaland S., Hungnes O., Teig A., Dannevig B.H., Thorud K. & Rimstad E. (2002). Polymorphism in the infectious salmon anemia virus hemagglutinin gene; importance and possible implications for evolution and ecology of infectious salmon anemia disease. *Virology*, 302, 379–391
- Mjaaland S., Markussen T., Sindre H., Kjøglum S., Dannevig B.H., Larsen S. & Grimholt U. (2005). Susceptibility and immune responses following experimental infection of MHC compatible Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with different infectious salmon anaemia virus isolates. *Arch. Virol.*, 150, 2195–2216
- Mjaaland S., Rimstad E., Falk K. & Dannevig B.H. (1997). Genomic characterisation of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo-like virus in a teleost. *J. Virol.*, 71, 7681–7686

Mullins J.E., Groman D.B. & Wadowska D. (1998). Infectious salmon anaemia in salt water Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in New Brunswick, Canada. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 18, 110–114

Nylund A., Plarre H., Karlsen M., Fridell F., Ottem K.F., Bratland A. & Saether P.A. (2007). Transmission of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in farmed populations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Arch. Virol., 152, 151–179

Oelckers K., Vike S., Duesund H., Gonzalez J., Wadsworth S. & Nylund A. (2014). *Caligus rogercresseyi* as a potential vector for transmission of Infectious Salmon Anaemia (ISA) virus in Chile. Aquaculture, 420–421, 126–132

Plarre H., Devold M., Snow M. & Nylund A. (2005). Prevalence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in wild salmonids in western Norway. Dis. Aquat. Org., 66, 71–79

Rimstad E., Dale O.B., Dannevig B.H. & Falk K. (2011). Infectious Salmon Anaemia. In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Woo P.T.K. & Bruno D., eds., CAB International, Oxfordshire, UK, 143–165

Rivas-Aravena A., Vallejos-Vidal E., Martin M.C., Reyes-Lopez F., Tello M., Mora P., Sandino A.M. & Spencer E. (2011). Inhibitory effect of a nucleotide analog on ISAV infection. J. Virol., 85, 8037–8045

Snow M., McKay P., McBeath A.J.A., Black J., Doig F., Kerr R., Cunningham C.O., Nylund A. & Devold M. (2006). Development, application and validation of a taqman® real-time RT-PCR assay for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), Vannier P. & Espeseth D., eds. New Diagnostic Technology: Applications in Animal Health and Biologics Controls. Dev. Biol., Basel, Karger, 126, 133–145

Thorud K.E. & Djupvik H.O. (1988). Infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 8, 109–111

*

* *

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по инфекции вирусом инфекционной анемии лососевых (см. Таблицу в конце этого Водного Руководства или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ:

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

Пожалуйста обратитесь в Референтные лаборатории МЭБ для получения дальнейшей информации по инфекции вирусом инфекционной анемии лососевых

ИНФЕКЦИЯ АЛЬФАВИРУСОМ ЛОСОСЕВЫХ

1. Область применения

Инфекция альфавирусом лососевых (SAV) подразумевает инфицирование любым генотипом патогенного возбудителя альфавируса лососевых (SAV) рода *Alphavirus* семейства *Togaviridae*.

2. Информация о болезни**2.1. Факторы возбудителя****2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя**

SAV представляет собой оболочечный, сферический, одноцепочечный РНК вирус с положительной цепью, с примерным диаметром 60-70 нм и геномом ~12 т.н. Геном кодирует 8 протеинов: четыре капсидных гликопротеина (Е1, Е2, Е3 и 6К) и четыре неструктурных белка (nsP1–4). Гликопротеин Е2 считается участком большинства нейтрализующих эпитопов, тогда как Е1 содержит более консервативные, перекрёстно-реагирующие эпитопы (McLoughlin & Graham, 2007). Считается, что SAV относится к роду *Alphavirus* семейства *Togaviridae*. Это основано на исследовании нуклеотидной последовательности изолятов SAV, а также подтверждается биологическими свойствами вируса, включая исследования на перекрестную инфекцию и нейтрализацию. В дополнение к этому, в геноме SAV присутствуют четыре консервативных элемента нуклеотидной последовательности (CSEs) и консервативный мотив (GDD), характерный для альфавирусов (McLoughlin & Graham, 2007).

SAV был разделен на шесть генотипов (SAV1–SAV6) исключительно на основании последовательности нуклеиновой кислоты для белков Е2 и nsP3 (Fringuelli с соавт., 2008). Уровень антигенной вариации среди генотипов считается низким, поскольку моноклональные антитела (MAbs), выращенные к специфичному подтипу SAV, в большинстве случаев вступают в перекрестную реакцию с другими изолятами SAV (Graham с соавт., 2014; Jewhurst с соавт., 2004).

Инфекция SAV может вызывать болезнь поджелудочной железы (PD) или сонную болезнь (SD) у атлантического лосося (*Salmo salar* L.), лиманды обыкновенной (*Limanda limanda*), радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) (McLoughlin & Graham, 2007) и арктического гольца (*Salvelinus alpinus*) (Lewisch с соавт., 2018). Эта болезнь представляет собой системное заболевание, характеризующееся на микроскопическом уровне некрозом и потерей экзокринной панкреатической ткани, а также изменениями в сердечных и скелетных мышцах.

Распределение генотипных групп по восприимчивым видам и окружающей среде представлено в Таблице 2.1.

Таблица 2.1. Генотипы альфавируса лососевых (SAV) по восприимчивым видам и окружающей среде

Генотип SAV	Пресная вода	Морская вода
SAV 1	Радужная форель	Атлантический лосось
SAV 2	Радужная форель Атлантический лосось Арктический голец	Атлантический лосось
SAV 2	Атлантический лосось	
SAV 3		Радужная форель Атлантический лосось
SAV 4		Атлантический лосось
SAV 5		Атлантический лосось Лиманда обыкновенная
SAV 6		Атлантический лосось

2.1.2. Выживаемость за пределами хозяина

Лабораторные исследования предполагают, что SAV сможет выживать в течение длительного периода времени в водной среде. В этих исследованиях выживание вируса было обратнозависимо от температуры. При наличии органического материала отмечалось отчетливое увеличение периода выживания в морской воде в сравнении с пресной водой (Graham с соавт., 2007с). SAV был обнаружен во время вытекания жира из мертвой рыбы, указывая на то, что это может являться путем передачи. Капельки жира могут скапливаться на поверхности морской воды, способствуя распространению на дальние расстояния (Stene с соавт., 2015).

Период полураспада SAV в сыворотке оказался обратнозависим от температуры, подчеркивая необходимость быстрой отправки образцов в лаборатории при температуре 4°C для выделения вируса. Для длительного сохранения SAV-положительных образцов и культивируемого вируса, рекомендовано хранение при –80°C (Graham с соавт., 2007с).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

SAV стремительно инактивируется в присутствии высоких уровней органического вещества при 60°C, pH 7.2, и pH 4 и pH 12 при 4°C, что дает основания предполагать, что компостирование, силосование и щелочной гидролиз будут эффективны при инактивации вируса в рыбных отходах (Graham с соавт., 2007а).

2.1.4. Жизненный цикл

Возможные пути передачи – через жабры или кишечник. В острые стадии болезни, может быть обнаружено большое количество SAV, и живой вирус можно выделить из сердца, почек, крови и некоторых других органов, но действительные клетки-мишени для вируса еще не были идентифицированы.

Виремия предшествует как началу гистологических изменений, так и клинических признаков (McLoughlin & Graham, 2007). Путем выделения могут являться естественные экскреции/секреции, что подтверждается обнаружением SAV путем полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в фекалиях и слизи экспериментально зараженного атлантического лосося. Эти матрицы могут, таким образом, играть роль в горизонтальной передаче SAV через воду (Graham с соавт., 2012). Вирус обнаруживался в воде через 4-13 дней после инфекции, указывая на то, что выделение вируса в среду совпадает с виремическим этапом (Andersen с соавт., 2010). Инкубационный период 7–10 дней при температуре морской воды 12–15°C был установлен на основании анализа продукции антител у рыбы, зараженной внутривенно и сообитателей в экспериментальном испытании (McLoughlin & Graham, 2007). Некоторые исследования показали, что РНК SAV может определяться в рыбе в течение продолжительного срока после инфицирования (Jansen с соавт., 2010а; McLoughlin & Graham, 2007). Отмечалась слабо выраженная инфекция, предполагающая, что выраженность вспышки может зависеть от ряда факторов окружающей среды (McLoughlin & Graham, 2007), а также сезонные повышения температуры воды могут служить причиной возникновения вспышек болезни (Stene с соавт., 2014).

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяина

Виды, которые соответствуют критериям для внесения в список в качестве восприимчивых к инфекции SAV в соответствии с Главой 1.5. *Ветеринарно-санитарного кодекса водных животных (Водный Кодекс)*, включают: арктический голец (*Salvelinus alpinus*), атлантический лосось (*Salmo salar*), лиманда обыкновенная (*Limanda limanda*) и радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*).

2.2.2. Виды, имеющие неполные данные относительно их восприимчивости

Виды, в отношении которых имеются неполные данные относительно их восприимчивости в соответствии с Главой 1.5. *Водного Кодекса*, включают: камбала-ерш (*Hippoglossoides platessoides*), морская камбала (*Pleuronectes platessa*) и радужный губан (*Labrus bergylta*).

В дополнение к этому, патоген-специфичные положительные результаты ПЦР отмечались у следующих видов, но без проявления активной инфекции: мерлуза аргентинская (*Merluccius hubbsi*), кумжа (*Salmo trutta*), треска (*Gadus morhua*), европейская речная камбала (*Platichthys flesus*), пикша (*Melanogrammus aeglefinus*), сельдь (*Clupea harengus*), паут (*Trisopterus esmarkii*), сайда (*Pollachius virens*), рогатковые (*Myoxocephalus octodecemspinosus*) и мерланг (*Merlangius merlangus*).

2.2.3. Восприимчивые этапы хозяина

Все жизненные этапы считаются восприимчивыми к инфекции SAV.

Радужная форель, искусственно выращенная в пресной воде, подвергается воздействию на всех этапах производства (Kerbarth Boscher с соавт., 2006). Опыт Норвегии показывает, что искусственно выращенная радужная форель и

атлантический лосось восприимчивы на всех этапах в морской воде, что, вероятно, свидетельствует о том, что морская вода является резервуаром SAV. Экспериментальное заражение путем инъекции демонстрирует восприимчивость молодого атлантического лосося в пресной воде (McVicar, 1990).

2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность обнаружения)

Предрасположенность у известных видов и субпопуляций отсутствует.

2.2.5. Органы-мишени и зараженная ткань

Инфекция SAV представляет собой системное заболевание с ранней вирусемической фазой. После инфицирования, SAV обнаруживался во всех органах, которые были исследованы: мозг, жабры, псевдобранхия, сердце, поджелудочная железа, почки и скелетные мышцы (Andersen с соавт., 2007; McLoughlin & Graham, 2007), а также в слизи и фекалиях (Graham с соавт., 2012).

2.2.6. Персистирующая инфекция с пожизненными носителями

SAV был выявлен у выжившей рыбы через 6 месяцев после экспериментального заражения (Andersen с соавт., 2007). На уровне фермы, зараженная популяция будет сохранять SAV до момента убоя (Jansen с соавт., 2010a; Jansen с соавт., 2010b). Однако, на индивидуальном уровне, пожизненно персистирующей инфекции задокументировано не было.

2.2.7. Переносчики инфекции

SAV был выявлен методом ОТ-ПЦР у лососевой вши (*Lepeophtheirus salmonis*), собранной во время вспышек острого заболевания у атлантического лосося, но передача восприимчивым видам рыб не изучалась (Pettersen с соавт., 2009). Для распространения SAV переносчики инфекции не нужны.

2.2.8. Предполагаемые водные животные - переносчики

В исследованиях дикой морской рыбы РНК SAV была обнаружена у камбаловых видов: лиманда обыкновенная (*Limanda limanda*), камбала-ерш (*Hippoglossoides platessoides*) и обыкновенная морская камбала (*Pleuronectes platessa*) (McCleary с соавт., 2014; Snow с соавт., 2010). Значимость диких морских или пресноводных видов рыб в качестве переносчиков должна быть установлена.

2.3. Клиническая картина болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача SAV происходит горизонтально. Это подтверждают филогенетические исследования, успешная передача среди рыб при исследовании сообитателей, доказанная передача между местами выращивания, исследования выживаемости SAV в морской воде и распространение через водные потоки (Graham с соавт., 2007c; Graham с соавт., 2011; Jansen с соавт., 2010a; Kristoffersen с соавт., 2009; Viljugrein с соавт., 2009).

Передача на большие расстояния и, следовательно, занос SAV в ранее незараженную зону, с наибольшей вероятностью, обуславливается перемещением

зараженной живой рыбы (Kristoffersen с соавт., 2009; Rodger & Mitchell, 2007). Как только произошел занос SAV на территорию, близость фермы по разведению рыбы и водные потоки, становятся факторами, участвующими в местной передаче инфекции (Aldrin с соавт., 2010; Kristoffersen с соавт., 2009; Viljugrein с соавт., 2009). Факторы риска возникновения вспышек на ферме включают предысторию заражения SAV, высокую интенсивность кормления, неблагоприятную ситуацию по заболеваемости морскими вшами, использование осенних серебрянок и предшествующая вспышка инфекционного некроза поджелудочной железы (IPN) (Bang Jensen с соавт., 2012; Kristoffersen с соавт., 2009; Rodger & Mitchell, 2007).

Имелись предположения относительно вертикального пути передачи SAV (Bratland & Nylund, 2009), но доказательства неубедительны (Kongtorp с соавт., 2010; McLoughlin & Graham, 2007). Норвежский научный комитет по пищевой безопасности (2010)⁴⁷ провел оценку риска и заключил, что риск вертикальной передачи SAV незначительный.

2.3.2. Уровень распространения заболевания

Распространенность инфекции SAV может варьировать. Во время вспышек болезни, уровень распространения инфекции обычно высокий; в местах выращивания атлантического лосося отмечались уровни распространения 70–100% (Graham с соавт., 2010). При отборе образцов от умирающей или тонкотелой рыбы, или недомерков, вероятность обнаружения SAV выше, чем при случайном отборе образцов от практически здоровой рыбы (Jansen с соавт., 2010b). Показатели распространенности также могут варьировать в зависимости от используемого метода диагностики.

Распространенность среди дикой рыбы по большей мере неизвестна. РНК SAV определялась у некоторых видов камбаловых в морских водах Шотландии (Snow с соавт., 2010). Серологическое исследование диких лососевых в речных системах с пресной водой в Северной Ирландии не выявило вируснейтрализующих антител к SAV ни в одной из 188 протестированных сывороток, тогда как большинство сывороток, полученных от лосося, искусственно выращенного в морской воде в этом же районе, имели положительный результат на инфекцию (Graham с соавт., 2003).

2.3.3. Географическое распределение

Известно, что инфекция SAV присутствует у искусственно выращенной рыбы вида лососевых в Хорватии, Франции, Германии, Ирландии, Италии, Норвегии, Польши, Испании, Швейцарии и Соединенного Королевства (Англия, Шотландия и Северная Ирландия).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Уровни смертности из-за инфекции SAV могут меняться в зависимости от генотипа, сезона, года, использования мер биобезопасности и видов рыб (Bang

⁴⁷ Норвежский научный комитет по пищевой безопасности (Vitenskapskomiteen for Mattrygghet) (2010). Risikovurdering stamfiskovervåking og vertikal smitteoverføring. 01, 1–44. Доступно на сайте: <https://vkm.no/download/18.a665c1015c865cc85bdfc47/1500464589864/Vurdering%20av%20sannsynlighet%20for%20og%20risiko%20ved%20vertikal%20overf%C3%B8ring%20av%20smitte.pdf>

Jensen с соавт., 2012; Graham с соавт., 2011; Rodger & Mitchell, 2007; Stormoen с соавт., 2013). Кумулятивная смертность на уровне фермы колеблется от незначительных показателей до показателей выше 50% в тяжелых случаях. (Bang Jensen с соавт., 2012; Graham с соавт., 2003; Rodger & Mitchell, 2007; Ruane с соавт., 2008; Stene с соавт., 2014).

Продолжительность вспышек болезни, определяемая как период с повышенной смертностью, варьирует от 1 до 32 недель (Jansen с соавт., 2010a; Jansen с соавт., 2014; Ruane с соавт., 2008).

2.3.5. Факторы окружающей среды

На клинические вспышки и смертность влияет температура и время года (McLoughlin & Graham, 2007; Rodger & Mitchell, 2007; Stene с соавт., 2014; Stormoen с соавт., 2013). Подвергание рыбы стрессу из-за перемещения, скученность или лечение могут спровоцировать вспышки болезни на зараженных фермах.

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Вакцины на основе ДНК и вирус инактивированные вакцины против SAV доступны на рынке.

2.4.2. Химиотерапия

Химиотерапия недоступна.

2.4.3. Иммуностимуляция

Иммуностимуляция недоступна.

2.4.4. Резистентное разведение

Различия в восприимчивости среди разных родственных групп атлантического лосося наблюдались в испытательных экспериментах и в полевых условиях, демонстрируя потенциал резистентного разведения. В Ирландии и Норвегии предпринимаются попытки разведения рыбы, которая будет более резистентна к инфекции SAV (McLoughlin & Graham, 2007).

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

Некоторые важные виды культур, включая тилапию нильскую, молочную рыбу и китайского карпа, проявили резистентность к EUS и способность к культивированию в эндемичных районах. Рекомендуется введение резистентных местных видов рыб.

2.4.6. Блокирующие агенты

Неприменимо.

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Процедуры дезинфекции оценивались у оплодотворенных икринок из маточного стада с положительным результатом на SAV 3 генотипа (Kongtorp с соавт., 2010). Несмотря на это необходимо дополнительное исследование.

2.4.8. Общие практики животноводства

Во избежание инфекции SAV, должны применяться общие методы надлежащей гигиенической практики: использование соответствующих участков для выращивания, разделение поколений, формирование поголовья рыбой хорошего качества, удаление мертвой рыбы, регулярная очистка емкостей и садков, контроль паразитов и других патогенов, а также бережное содержание рыбы. Как только участок был инфицирован, смертность может быть снижена за счет наложения общего ограничения на содержание рыбы, а также общего ограничения на кормление рыбы.

3. Отбор образцов

3.1. Выбор индивидуальных образцов

Все производственные объекты (пруды, емкости, сетные садки, и т.п.) должны инспектироваться на наличие мертвой, слабой рыбы или рыбы с аномальным поведением. Крайне слабую (спящую) рыбу можно обнаружить на дне емкости или в сетных садках. Если количество клинически больной рыбы мало, могут быть добавлены образцы от длинной тонкотелой рыбы («недомерки») (Jansen с соавт., 2010b).

3.2. Сохранение образцов для представления

Метод	Сохраняющее средство
Гистология и иммуногистохимия:	Фиксация в нейтральном фосфатно-буферном 10% формалине
Молекулярная биология (ОТ-ПЦР и секвенирование):	Подходящая среда для сохранения РНК
Культура клеток:	Вирусная транспортная среда
Серология:	Плазма или сыворотка крови

3.3. Объединение образцов

Объединение образцов допустимо, однако следует учитывать влияние на чувствительность и превалентность композиции.

3.4. Наиболее подходящие органы и ткани

Сердце и первичная почка – рекомендуемые органы для выявления SAV молекулярно-биологическими методами или с помощью культуры клеток. Во время течения болезни, в сердце обычно содержится больше SAV, чем в других тканях, и от него всегда следует отбирать образцы. После вспышек болезни, жабры и сердце (Graham с соавт., 2010) и пулы сердца и первичной почки (Jansen с соавт., 2010a; Jansen с соавт., 2010b)

оставались положительными в ОТ-ПЦР в течение месяцев после первичного обнаружения.

Во время первичной вирусемической фазы образцы сывороток также подходят для обнаружения SAV, либо молекулярно-биологическими методами, либо с помощью культуры клеток. Отбор проб сыворотки может, таким образом, использоваться для скрининг-тестов раннего обнаружения (Graham с соавт., 2010). Примерно начиная с трех недель после заражения SAV, сыворотка крови или плазма применяются для теста вируснейтрализации, который идентифицирует нейтрализующие антитела к SAV в рыбе, подвергнутой воздействию SAV (Graham с соавт., 2003).

Ткани для гистологических исследований должны включать жабры, сердце, пилорические придатки с тканью поджелудочной железы, печень, почки, селезенку и скелетную мышцу, содержащую как красную (аэроб), так и белую (анаэроб) мышцу. Кожу с ассоциированным образцом скелетной мышцы следует отбирать на уровне боковой линии и достаточно глубоко, чтобы включать красную и белую мышцу.

4. Методы диагностики

4.1. Полевые диагностические методы

4.1.1. Клинические признаки

Внезапная потеря аппетита может наблюдаться за 1-2 недели до выявления высокой смертности. Клинически больную рыбу можно наблюдать медленно плавающей на поверхности воды. В некоторых случаях, крайне слабую («спящую») рыбу можно обнаружить на дне емкости или в сетных садках. Также может наблюдаться возрастающее количество фекальных выбросов. Однако важно отметить, что клинические признаки не патогномоничны. Внимательное изучение каждой мертвой, умирающей и аномально себя ведущей рыбы необходимо для того, чтобы определить участие SAV и исключить другие патогенные возбудители.

Изначально, нутритивный статус обычно нормальный, но в течение месяцев после вспышки или на более поздних стадиях болезни, как правило, наблюдается длинная тощая рыба (недомерок) в плохом физическом состоянии. Появление длинной тощей рыбы может быть вызвано и другими факторами, помимо SAV.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

Желтое мукоидное содержание кишечника является обычной посмертной находкой, поскольку нередко обнаруживается у рыбы, которая не ест. Периодически можно наблюдать признаки нарушения кровообращения, такие как петехиальные кровоизлияния, небольшие асциты или покраснение поджелудочной области между пилорическими придатками. У некоторых больных рыб может наблюдаться бледное сердце или разрыв сердца. Важно отметить, что результаты обследования после смерти не патогномоничны.

4.2.2. Клиническая химия

Не задокументирована для диагностического использования.

4.2.3. Микроскопическая патология

Изменения, которые наиболее часто обнаруживаются у клинически больной рыбы это большая потеря экзокринной поджелудочной ткани, кардиомиоцитный некроз и воспаление, воспаление красной (аэроб) скелетной мышцы и дегенерация или воспаление белой (анаэроб) скелетной мышцы. Другая, менее частая, но подтверждающая находка – обнаружение клеток с множественными цитоплазматическими эозинофильными гранулами вдоль почечных синусоидных капилляров.

По мере прогрессирования болезни, развитие этих изменений происходит не одновременно во всех органах: на очень короткой, первой фазе, единственным присутствующим поражением может быть некроз экзокринной панкреатической ткани и разнообразная воспалительная реакция в перипанкреатической жировой ткани. Вскоре после этого, развивается дегенерация клеток сердечной мышцы и некроз до того, как воспалительный ответ в сердце становится более ярко выражен. Панкреатические некротические омертвевшие ткани на первый взгляд исчезнут и вскоре появится типичная картина большой потери экзокринной панкреатической ткани одновременно с увеличивающимся воспалением в сердце. Несколько позже развивается дегенерация сердечной мышцы, воспаление и фиброз. У части рыб может возникнуть острый фиброз периацинозной ткани, и в этом случае поджелудочная железа не восстанавливается (недомерки) (Christie с соавт., 2007; Kerbart Boscher с соавт., 2006; McLoughlin & Graham, 2007; Taksdal с соавт., 2007).

4.2.4. Влажный препарат

Неприменимо.

4.2.5. Мазки

Неприменимо.

4.2.6. Фиксированные срезы, иммуногистохимия

Иммуногистохимическое исследование (Taksdal с соавт., 2007) рекомендуется исключительно для образцов, отобранных от рыб с острым некрозом экзокринной панкреатической ткани.

4.2.6.1. Подготовка срезов ткани

Ткани фиксируют в забуференном фосфатом нейтральном 10% формалине как минимум на 1 день, дегидрируют в градуированном этаноле, очищают в ксилене и заливают в парафин в соответствии со стандартными протоколами. Срезы толщиной приблизительно 3 мкм (отобранные для иммуногистохимии на покрытых поли-L-лизинном стеклах) нагревают при 56–58°C (максимум 60°C) в течение 20 минут, депарафинируют в ксилене, регидрируют через градуированный этанол, и окрашивают гематоксилином и эозином для гистопатологии и иммуногистохимии, как описано выше.

4.2.6.2. Процедура окрашивания для иммуногистохимии

Все инкубации проводятся при комнатной температуре и все этапы промывания осуществляются с использованием ТРИС-буферизированного физраствора (TBS).

- i) Неспецифичные антителосвязывающие сайты сначала блокируют в 5% альбумине бычьей сыворотки (BSA) в TBS в течение 20 минут. Затем раствор сливают без промывания.
- ii) Срезы инкубируют с первичным антителом (моноклональное антитело мыши 4H1 против гликопротеина E1 SAV [Todd с соавт., 2001]), разведенным 1/3000 в 2,5% БСА в TBS и затем инкубируют в течение ночи, после чего следуют две промывочные ванны, продолжительность которых составляет не менее 5 минут.
- iii) Срезы инкубируют с вторичным антителом (биотинилированные кроличьи антитела к IgG мыши), в разведении 1/300 в течение 30 минут, с последующими промывочными ваннами, как в указанном выше в этапе ii.
- iv) Срезы инкубируют стрептавидином с щелочной фосфатазой 1/500 в течение 30 минут с последующими промывочными ваннами, как в указанном выше в этапе ii.
- v) Для обнаружения связанных антител, срезы инкубируют быстрым красным⁴⁸ (1 мг мл⁻¹) и нафтол AS-MX фосфатом (0.2 мг мл⁻¹) с 1 mM Левамисоля в 0.1 M TBS (pH 8.2) и оставляют для развития на 20 минут, с одним последующим промыванием в водопроводной воде перед контрастным окрашиванием с гематоксилином Майера и монтировкой в водной монтирующей среде.

SAV-положительные и SAV-отрицательные срезы ткани включены в качестве контролей в каждую постановку реакции (Taksdal с соавт., 2007).

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология.

Неприменимы для диагностического использования.

4.2.8. Дифференциальные диагнозы

4.2.8.1. Дифференциальные диагнозы, релевантные для микроскопической патологии (Раздел Микроскопическая патология)

Ткани, которые подверглись изменениям из-за инфекции SAV, также изменились из-за воспаления сердечной или скелетной мышц (HSMI), синдрома кардиомиопатии (CMS) и инфекционного панкреатического некроза (IPN). Однако если все основные органы обследованы на гистопатологию, паттерн зараженных органов обычно будет выглядеть иным образом, как проиллюстрировано в Таблице 4.1.

Таблица 4.1. Изменение в тканях, связанные с инфекциями SAV, HSMI, CMS and IPN

	Инфекция SAV	HSMI	CMS	IPN
Сердце*	+	+	+	–
Поджелудочная железа	+	–	–	+

⁴⁸ Ссылка на специфические коммерческие продукты, в качестве примеров, не подразумевает их одобрение МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, упоминаемым в настоящем *Водном Кодексе*.

Скелетная мышца	+	+	–	–

*Сердечные изменения при CMS поражают главным образом внутренний губчатый слой миокарда желудочка и предсердия, тогда как при инфекции SAV и HSMI, компактный слой миокарда желудочка поражен более существенно. Несмотря на то что эти три болезни вызывают эпикардит, при HSMI эпикард наиболее сильно воспален.

В очень короткую, раннюю острую стадию инфекции, когда только развился некроз экзорцинной поджелудочной, инфекцию SAV можно ошибочно принять за IPN, вызванный вирусом IPN (IPNV). В таких случаях, вирусологическое обследование уточнит агент-возбудитель заболевания.

Вирусологические и серологические обследования, наряду с гистологическим обследованием 5-10 клинически зараженных рыб, обычно могут прояснить ситуацию. HSMI и CMS были выявлены только у атлантического лосося.

4.3. Методы обнаружения и идентификации агента

4.3.1. Прямые методы обнаружения

4.3.1.1. Выделение и идентификация агента

4.3.1.1.1. Культура клеток

Выделение полевых изолятов SAV в культуре клеток может представлять собой сложную задачу (Christie с соавт., 1998; Graham с соавт., 2007с; Petterson с соавт., 2013). CHSE-214 часто используются для первичного выделения SAV, но могут использоваться восприимчивые линии клеток, такие как BF-2, FHM, SHK-1, EPC, CHN-1 или другие. Сообщалось об изменении восприимчивости линии клеток среди различных полевых изолятов SAV (Graham с соавт., 2008; Herath с соавт., 2009), и поэтому рекомендовано, чтобы несколько линий клеток тестировались на выделение первичной культуры клеток SAV в новой лаборатории или на новый штамм вируса.

Клетки CHSE-214 выращивают при 20°C в минимальной питательной среде Игла (EMEM) с аминокислотами, не относящимися к незаменимым и 0,01 М буфера HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин, N-2- этансульфоновая кислота), или среды для культивирования клеток Лейбовица L-15, с добавлением фетальной бычьей сыворотки (FBS) (5% или 10%) и L-глутамином (4 мМ)

Для выделения вируса, клетки выращивают в колбах для клеточных культур или на многоруночных планшетах для выращивания клеток. SAV-положительные контроли могут быть инокулированы параллельно с образцами ткани, в качестве теста на восприимчивость к SAV. Когда включены положительные контроли, необходимо принимать меры во избежание контаминации.

i) Инокуляция клеточных монослоев

Подготавливают 2% суспензию тканевого гомогената или 10% суспензию сыворотки, используя среду L-15 или EMEM без сыворотки или другую среду с документально подтвержденным соответствием. Удаляют среду для выращивания клеток из активно растущих монослоев (1-2-х дневные

культуры или культуры с 70-80% конфлюентностью), выращенных в колбах для тканевых культур или мультисуточных планшетах для культуры клеток (см. выше). Инокулируют монослои малым объемом 2% тканевого гомогената или 10% разведением сыворотки (для 25 см² колб: 1.5 мл.) Доводят уровень до нормы соответствующей используемой площади поверхности. Проводят инкубацию в течение 2-3 часов при 15°C, с последующим удалением инокулята и добавлением свежей среды L-15 или EMEM, обогащенной 2-5% фетальной бычьей сывороткой (для 25 см² колб: 5 мл).

Когда образцы рыб поступают из производственных участков, в которых IPNV считается эндемичным, супернатант тканевого гомогената должен подвергаться инкубации (минимум в течение 1 часа при 15°C) с пулом антисывороток к искомым серотипам IPNV перед инокуляцией.

ii) Мониторинговая инкубация

Инокулированные культуры клеток (содержащиеся при 15°C) проверяют через равные интервалы (как минимум каждые 7 дней) на возникновение цитопатического эффекта (ЦПЭ). Типичный ЦПЭ, вызванный SAV, проявляется бляшками пикнотических вакуолизирующих клеток. Однако, норвежские полевые изоляты SAV (SAV3 и морской SAV2) обычно не дают ЦПЭ в низких пассажах, и это также отмечается у других генотипов SAV (Graham с соавт., 2008; Petterson с соавт., 2013). Если по прошествии 14 дней не наблюдается цитопатического эффекта, осуществляют пересев в свежие культуры клеток.

iii) Процедура субкультивации

Через 14 дней (или ранее при появлении очевидного ЦПЭ) после инокуляции, культуры подвергаются замораживанию-оттаиванию при температуре -80°C (процедура может повторяться 1-2 раза), чтобы высвободить вирус из зараженных клеток.

После центрифугирования при 3000 g в течение 5 минут, супернатанты инокулируют в свежие культуры клеток, как описано в процедуре для первичной инокуляции: удаляют питательную среду, инокулируют монослои маленьким объемом супернатанта (1/5 и более слабыми разведениями) в течение 2-3 часов перед добавлением свежей среды.

Инокулированные культуры клеток инкубируют минимум в течение 14 дней и проверяют через регулярные интервалы, как описано в процедуре для первичной инокуляции. По окончании периода инкубации или ранее при возникновении выраженного ЦПЭ, среду собирают для идентификации вируса, как описано ниже. Культуры клеток необходимо всегда обследовать на присутствие SAV путем иммунофлюоресценции (непрямая реакция флюоресцирующих антител [IFAT]), поскольку репликация вируса может возникнуть без развития очевидного ЦПЭ.

iv) Верификация роста SAV в культуре клеток на основе антител.

Все инкубации, описанные ниже, выполняют при комнатной температуре, если не указано иное.

- a) Подготавливают монослой клеток в соответствующих планшетах для тканевых культур (например, 96-луночные планшеты), или на покровных стеклах, в зависимости от типа доступного микроскопа (инверсионный микроскоп, оснащенный УФ светом необходим для монослоев, выросших на планшетах для тканевых культур). Должны быть включены необходимые монослои для отрицательных и положительных контролей.
- b) Инокулируют монослой суспензиями вируса для идентификации в десятикратных разведениях, два монослоя на каждое разведение. Добавляют положительный вирус контроль в разведения, который дает хорошую реакцию окрашивания. Инкубируют инокулированные культуры клеток при 15°C в течение 9–11 дней.
- c) Фиксируют в 80% ацетоне в течение 20 минут после удаления среды для культивирования клеток и промывают однократно 80% ацетоном. Удаляют фиксатор и высушивают на воздухе в течение одного часа. При необходимости, фиксированные культуры клеток могут храниться в сухом виде в течение 14 дней при 4°C до окрашивания.
- d) Инкубируют клеточные монослои анти-SAV MAб в соответствующем разведении в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ФБР) на один час и промывают три раза с помощью ФБР с 0.05% Твин 20.
- e) Инкубируют с флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ)-конъюгированным антимышиным иммуноглобулином в течение одного часа (или в случае первичного поликлонального антитела кролика, используют ФИТЦ-конъюгированное антитело к иммуноглобулину кролика), в соответствии с инструкцией поставщика. Чтобы повысить чувствительность теста, ФИТЦ-конъюгированный антимышиный Ig можно заменить антимышиным Ig с биотиновой меткой и ФИТЦ-меченым стрептавидином с промыванием, как на этапе d, в промежутках между этапами. Ядро может быть окрашено йодидом пропидия (100 мкг мл⁻¹ в стерильной дистиллированной воде). Добавляют ФБР (без Твин 20) и рассматривают при УФ освещении. Во избежание обесцвечивания, окрашенные планшеты следует оставить в темном месте до исследования. Для долгих периодов хранения (более 2-3 недель) в качестве раствора, препятствующего выгоранию, может добавляться раствор 1,4-дiazобизцикло октана (ДАБЦО 2.5% в ФБР, pH 8.2) или схожий реагент.

4.3.1.1.2. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), ОТ-ПЦР в реальном времени и генотипирование посредством секвенирования

Праймеры, описанные выше для ОТ-ПЦР в реальном времени и ОТ-ПЦР с секвенированием, обнаружат все известные генотипы SAV.

ОТ-ПЦР может использоваться для обнаружения SAV из общей РНК (или общих нуклеиновых кислот), полученной из рекомендованных органов или тканей (см. Раздел 3.4). Для обнаружения SAV рекомендуется ОТ-ПЦР в реальном времени, поскольку она увеличивает специфичность и чувствительность теста.

Для генотипирования рекомендуется ОТ-ПЦР с последующим секвенированием фрагментов из гена E2.

Последовательности праймеров и зондов для ОТ-ПЦР в реальном времени из nsP1 гена, а также праймеры для генотипирования, перечислены в Таблице 4.2. При необходимости, E2-праймеры могут также использоваться для стандартного обнаружения SAV при помощи ОТ-ПЦР. Могут применяться различные наборы, созданные для выделения РНК, ОТ-ПЦР и оборудование для кПЦР. Программа ПЦР зависит от набора и оборудования для ПЦР в реальном времени, используемого в лаборатории. Условия для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени в Референтной лаборатории МЭБ следующие: 50°C в течение 10 минут, 95°C в течение 3 минут, и 40 циклов (95°C в течение 10 секунд, 60°C в течение 20 секунд). Для проведения стандартных ОТ-ПЦР (секвенирование), используется следующая программа: 50°C в течение 30 минут, 95°C в течение 15 минут, и 45 циклов (94°C в течение 60 секунд, 55°C в течение 45 секунд, 72°C в течение 60 секунд).

Таблица 4.2. Последовательности праймеров и зондов для ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени

Последовательности праймеров и зондов	Геномный сегмент	Размер продукта	Ссылка
QnsP1F: 5'-CCG-GCC-CTG-AAC-CAG-TT-3' QnsP1R: 5'-GTA-GCC-AAG-TGG-GAG-AAA-GCT-3' QnsP1probe: 5'FAM-CTG-GCC-ACC-ACT-TCG-A-MGB3' (Taqman®probe)	QnsP1	107 нт	1
E2F: 5'-CCG-TTG-CGG-CCA-CAC-TGG-ATG-3' E2R: 5'-CCT-CAT-AGG-TGA-TCG-ACG-GCA-G-3'	E2	516 нт	2

1 = Hodneland и Endresen, 2006. 2 = Fringuelli с соавт., 2008.

4.3.2. Серологические методы

4.3.2.1. Реакция нейтрализации сыворотки на основе иммунопероксидазы (Graham с соавт., 2003)

Экспериментальные исследования показали, что нейтрализующие антитела могут быть впервые обнаружены на 10-16 день после заражения (Graham с соавт., 2003), и реакции нейтрализации сыворотки (SN) могут использоваться в качестве диагностического инструмента для обнаружения антител к SAV. Реакции SN основаны на присутствии или отсутствии обнаруживаемого роста вируса в культивируемых клетках после инкубации сывороткой, которая может содержать нейтрализующие антитела. В дополнение к этому, реакция способствует обнаружению вируса в сыворотке или плазме, при наличии.

Клетки CHSE-214 выращивают, как описано в Разделе 4.3.1.1.1. *Культура клеток*. Суспензию трипсинизированных клеток, разбавленных в соотношении 1/3 в среде для выращивания клеток (10% FBS) подготавливают для реакции SN.

- i) разведения 1/20 и 1/40 каждой тестовой сыворотки подготавливают в поддерживающей среде (2% FBS), и переносят в две двоянные лунки (15 мкл на лунку) на микротитрационный планшет для тканевых культур с плоским дном. Равный объем вируса (100 TCID₅₀ [средняя инфекционная доза для культуры ткани]) добавляют на планшет и инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре.
- ii) 70 мкл поддерживающей среды и 50 мкл суспензии клеток CHSE-214 добавляют в каждую лунку, и инкубируют планшеты в течение 3 дней при температуре 15°C.
- iii) Затем клеточный монослой фиксируют и окрашивают, как описано в Разделе 4.3.1.1.1, этап iv «Верификация роста SAV в культуре клеток на основе антител» или используя следующую процедуру: Монослои клеток CHSE-214 фиксируют на 30 минут при комнатной температуре в 10% забуференном нейтральном формалине. После двух промывок с 0,01 М PBS, MAb к SAV добавляют в монослои в соответствующем разведении. Связанные MAb визуализируются с помощью меченой стрептавидин-биотиновой системы в соответствии с инструкциями производителя.
- iv) Титры SN (ND₅₀) затем вычисляют по методу Карбера (1931), где титры $\geq 1:20$ расцениваются, как положительные. Оба сывороточных контроля (без добавленного вируса) и вирус контроль (без добавленной сыворотки) должны всегда быть включены в анализ, чтобы обеспечивать обоснованные результаты.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели их применения

В качестве примера, методы, доступные в настоящий момент для целевого надзора и диагностики инфекции SAV, перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице, указывают: а = метод является рекомендуемым методом исходя из соображений доступности, функциональности и диагностической чувствительности и специфичности; b = метод представляет собой стандартный метод с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы существенно ограничивают его применение; и d = метод, в настоящее время не рекомендованный для этой цели. Это несколько субъективно, поскольку соответствие метода охватывает вопросы надежности, чувствительности, специфичности и функциональности. Несмотря на это, не все тесты, перечисленные под категориями а или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, установившаяся практика и тот факт, что они широко использовались без неточных результатов, делает их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор			Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Мальки	Молодые особи	Взрослые особи		

Макропатологические признаки	d	d	d	c	d
Гистопатология	c	c	c	b	d
Иммуногистохимия	d	d	d	b	b
Выделение в культуре клеток	d	d	d	c	c
Реакция нейтрализации сыворотки	d	c	b	a	b
ОТ-ПЦР в реальном времени	b	b	b	b	b
ОТ-ПЦР с секвенированием	d	b	b	b	a

ОТ-ПЦР = Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора для признания свободы от инфекции SAV

Тест, рекомендованный к использованию при осуществлении надзора за восприимчивыми популяциями рыб для объявления свободы от SAV это ОТ-ПЦР, как описано в Разделе 4.3.1.1.2 настоящей главы.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Подозрительный случай инфекции SAV определяется следующим образом:

- i) клинические признаки соответствуют инфекции SAV (Раздел 4.1.1), или
- ii) макро- и микроскопическая патология указывает на болезнь (Разделы 4.2.1 и 4.2.3), или
- iii) обнаружены антитела к SAV (Раздел 4.3.2.1) или выявлен SAV (Раздел 4.3.1.1.), или
- iv) в случае появления эпизоотологической информации об инфекционном контакте с подозрительным или подтвержденным случаем(ями).

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Доказательство присутствия SAV, полученное из двух независимых лабораторных тестов, таких как микроскопическая патология (Раздел 4.2.3), культура клеток (Раздел 4.3.1.1.1), ОТ-ПЦР (Раздел 4.3.1.1.2) или серология (Раздел 4.3.2).

8. Список литературы

ALDRIN M., STORVIK B., FRIGESSI A., VILJUGREIN H. & JANSEN P.A. (2010). A stochastic model for the assessment of the transmission pathways of heart and skeleton muscle inflammation, pancreas disease and infectious salmon anaemia in marine fish farms in Norway. *Prev. Vet. Med.*, **93**, 51–61.

ANDERSEN L., BRATLAND A., HODNELAND K. & NYLUND A. (2007). Tissue tropism of salmonid alphaviruses (subtypes SAV1 and SAV3) in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Arch. Virol.*, **152**, 1871–1883.

ANDERSEN L., HODNELAND H. & NYLUND A. (2010). No influence of oxygen levels on pathogenesis and virus shedding in Salmonid alphavirus (SAV)-challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Virol. J.*, **7**, 198.

BANG JENSEN B., KRISTOFFERSEN A.B., MYR C. & BRUN E. (2012). Cohort study of effect of vaccination on pancreas disease in Norwegian salmon aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, **102**, 23–31.

BRATLAND A. & NYLUND A. (2009). Studies on the possibility of vertical transmission of Norwegian salmonid Alphavirus in production of Atlantic salmon in Norway. *J. Aquat. Anim. Health*, **21**, 73–78.

CHRISTIE K.E., FYRAND K., HOLTET L. & ROWLEY H.M. (1998). Isolation of pancreas disease virus from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. *J. Fish Dis.*, **21**, 391–394.

CHRISTIE K.E., GRAHAM D.A., MCLOUGHLIN M. F., VILLOING S., TODD D. & KNAPPSKOG D. (2007).

Experimental infection of Atlantic salmon *Salmo salar* pre-smolts by i.p. injection of new Irish and Norwegian salmonid alphavirus (SAV) isolates: a comparative study. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 13–22.

FRINGUELLI E., ROWLEY H.M., WILSON J.C., HUNTER R., RODGER H. & GRAHAM D.A. (2008). Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences. *J. Fish Dis.*, **31**, 811–823.

GRAHAM D.A., BROWN A., SAVAGE P. & FROST P. (2012). Detection of salmon pancreas disease in the faeces and mucus of Atlantic salmon *Salmo salar* by real-time RT-PCR and cell culture following experimental challenge. *J. Fish Dis.*, **35**, 949–951.

GRAHAM D.A., CHERRY K., WILSON C.J. & ROWLEY H.M. (2007a). Susceptibility of salmonid alphavirus to a range of chemical disinfectants. *J. Fish Dis.*, **30**, 269–277.

GRAHAM D.A., FROST P., MCCLAUGHLIN K., ROWLEY H.M., GABESTAD I., GORDON A. & MCLOUGHLIN M.F. (2011). A comparative study of marine salmonid alphavirus subtypes 1–6 using an experimental cohabitation challenge model. *J. Fish Dis.*, **34**, 273–286.

GRAHAM D.A., FRINGUELLI E., WILSON C., ROWLEY H.M., BROWN, A., RODGER H., MCLOUGHLIN M.F., MCMANUS C., CASEY E., MCCARTHY L.J. & RUANE N.M. (2010). Prospective longitudinal studies of salmonid alphavirus infections on two Atlantic salmon farms in Ireland; evidence for viral persistence. *J. Fish Dis.*, **33**, 123–135.

GRAHAM D.A., JEWHRST V.A., ROWLEY H.M., MCLOUGHLIN M.F. & TODD D. (2003). A rapid immunoperoxidase-based neutralization assay for salmonid alphavirus used for a serological survey in Northern Ireland. *J. Fish Dis.*, **26**, 407–413.

GRAHAM D.A., ROWLEY H.M., FRINGUELLI E., BOVO G., MANFRIN A., MCLOUGHLIN M.F., ZARZA C., KHALILI

- M. & TODD D. (2007b). First laboratory confirmation of salmonid alphavirus infection in Italy and Spain. *J. Fish Dis.*, **30**, 569–572.
- GRAHAM D.A., ROWLEY H.M. & FROST P. (2014). Cross-neutralization studies with salmonid alphavirus subtype 1–6 strains: results with sera from experimental studies and natural infections. *J. Fish Dis.*, **37**, 683–691.
- GRAHAM D.A., STAPLES V., WILSON C.J., JEWHRST H., CHERRY K., GORDON A. & ROWLEY H.M. (2007c). Biophysical properties of salmonid alphaviruses: influences of temperature and pH on virus survival. *J. Fish Dis.*, **30**, 533–543.
- GRAHAM D.A., WILSON C., JEWHRST H. & ROWLEY H. (2008). Cultural characteristics of salmonid alphaviruses – influences of cell line and temperature. *J. Fish Dis.*, **31**, 859–868.
- HERATH T., COSTA J., THOMPSON K., ADAMS A. & RICHARDS R. (2009). Alternative cell line for the isolation of salmonid alphavirus-1. *Icelandic Agricultural Sci.*, **22**, 19–27.
- HODNELAND K. & ENDRESEN C. (2006). Sensitive and specific detection of salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan). *J. Virol. Methods*, **131**, 184–192.
- JANSEN M.D., BANG JENSEN B. & BRUN E. (2014). Clinical manifestations of pancreas disease outbreaks in Norwegian marine salmon farming – variations due to salmonid alphavirus (SAV) subtype. *J. Fish Dis.*, doi, 10.1111/jfd.12238.
- JANSEN M.D., TAKSDAL T., WASMUTH M.A., GJERSET B., BRUN E., OLSEN A.B., BRECK O. & SANDBERG M. (2010a). Salmonid alphavirus (SAV) and pancreas disease (PD) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in freshwater and seawater sites in Norway from 2006 to 2008. *J. Fish Dis.*, **33**, 391–402.
- JANSEN M.D., WASWUTH M.A., OLSEN A.B., GJERSET B., MODAHL I., BRECK O., HALDORSEN R.N., HJELMELAND R. & TAKSDAL T. (2010b). Pancreas disease (PD) in sea-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway; a prospective, longitudinal study of disease development and agreement between diagnostic test results. *J. Fish Dis.*, **33**, 723–736.
- JEWHRST V.A., TODD D., ROWLEY H.M., WALKER I.W., WESTON J.H. MCLOUGHLIN M.F. & GRAHAM D.A. (2004). Detection and antigenic characterization of salmonid alphavirus isolates from sera obtained from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **27**, 143–149.
- KERBART BOSCHER S., MCLOUGHLIN M., LE VEN A., CABON J., BAUD M. & CASTRIC J. (2006). Experimental transmission of sleeping disease in one-year-old rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), induced by sleeping disease virus. *J. Fish Dis.*, **29**, 263–273.
- KONGTORP R.T., STENE A., ANDREASSEN P.A., ASPEHAUG V., GRAHAM D.A., LYGSTAD T.M., OLSEN A.B., OLSEN R.S., SANDBERG M., SANTI N., WALLACE C. & BRECK O. (2010). Lack of evidence for vertical transmission of SAV 3 using gametes of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., exposed by natural and experimental routes. *J. Fish Dis.*, **33**, 879–888.
- KRISTOFFERSEN A.B., VILJUGREIN H., KONGTORP R.T., BRUN E. & JANSEN P.A. (2009). Risk factors for pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon and rainbow trout in Norway during 2003–2007. *Prev. Vet. Med.*, **90**, 127–136.

- LEWISCH E., FRANK T., SOLIMAN H., SCHACHNER O., FRIEDL A. & EL-MATBOULI M. (2018). First confirmation of salmonid alphavirus infection in Arctic char *Salvelinus alpinus* and in Austria. *Dis. Aquat. Org.*, **130**, 71–76.
- MCCLEARY S.J., GILTRAP M., HENSHILWOOD K. & RUANE N.M. (2014). Detection of salmonid alphavirus RNA in Celtic and Irish Sea flatfish. *Dis. Aquat. Org.*, **109**, 1–7.
- MCLOUGHLIN M.F. & GRAHAM D.A. (2007). Alphavirus infections in salmonids – a review. *J. Fish Dis.*, **30**, 511–531.
- MCVICAR A.H. (1990). Infection as a primary cause of pancreas disease in farmed Atlantic salmon. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **10**, 84–87.
- PETTERSON E., SANDBERG M. & SANTI N. (2009). Salmonid alphavirus associated with *Lepeoptheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, **30**, 511–531.
- PETTERSON E., STORMOEN, M., EVENSEN O., MIKALSEN A.B. & HAUGLAND O. (2013). Natural infection of Atlantic salmon (*Salmo salar*) with salmonid alphavirus 3 generates numerous viral deletion mutants. *J. Gen. Virol.*, **94**, 1945–1954.
- RODGER H. & MITCHELL S. (2007). Epidemiological observations of pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. *J. Fish Dis.*, **32**, 477–479.
- RUANE N., GRAHAM D. & RODGER H. (2008). Pancreas disease in farmed salmon – health management and investigations at Irish farm sites 2005–2008. Marine Environments and Health Series, No. 34, Marine Institute, Oranmore, Co. Galway, Ireland, Available at <http://oar.marine.ie/handle/10793/267>.
- SNOW M., BLACK I., MCINTOSH R., BARETTO E., WALLACE I.S. & BRUNO D.W. (2010). Detection of salmonid alphavirus RNA in wild marine fish: implications for the origin of salmon pancreas disease in aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, **91**, 177–188.
- STENE A., BANG JENSEN B., KNUITSEN Ø., OLSEN A. & VILJUGREIN H. (2014). Seasonal increase in sea temperature triggers pancreas disease in Norwegian salmon farms. *J. Fish Dis.*, **37**, 739–751.
- STENE A., HELLEBØ A., VILJUGREIN H., SOLEVÅG S.E., DEVOLD M. & ASPEHAUG V. (2016). Liquid fat, a potential abiotic vector for horizontal transmission of salmonid alphavirus? *J. Fish Dis.*, **39**, 531–537.
- STENE A., VILJUGREIN H., YNDESTAD H., TAVORNPANICH H. & SKJERVE E. (2014). Transmission dynamics of pancreas disease (PD) in a Norwegian fjord: aspects of water transport, contact networks and infection pressure among salmon farms. *J. Fish Dis.*, **37**, 123–134.
- STORMOEN M., KRISTOFFERSEN A.B. & JANSEN P.A. (2013). Mortality related to pancreas disease in Norwegian farmed salmonid fish, *Salmo salar* L. and *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **36**, 639–645.
- TAKSDAL T., OLSEN A.B., BJERKAAS I., HJORTAAS M.J., DANNEVIG B.H., GRAHAM D.A. & MCLOUGHLIN M.F. (2007). Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *J. Fish Dis.*, **30**, 545–558.

TODD D., JEWHRST V.A., WELSH M.D., BORGHMANS B.J., WESTON J.H., ROWLEY H.M., MACKIE D.P. & MCLOUGHLIN M.F. (2001). Production and characterisation of monoclonal antibodies to salmon pancreas disease virus. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 101–108.

VILJUGREIN H., STAALSTRØM A., MOLVÆR J., URKE H.A. & JANSEN P.A. (2009). Integration of hydrodynamics into a statistical model on the spread of pancreas disease (PD) in salmon farming. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 35–44.

*

* *

NB: Существует Референтная лаборатория МЭБ по инфекции
альфавирусом лососевых (см. Таблицу в конце или см.
актуальный список на веб-сайте МЭБ:

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

Для получения любой дополнительной информации относительно инфекции
альфавирусом лососевых, пожалуйста, обратитесь в Референтную лабораторию МЭБ.

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2014 г.; ПОСЛЕДНИЕ ОБНОВЛЕНИЯ ПРИНЯТЫ В
2019 г.

ИНФЕКЦИЯ ГЕРПЕСВИРОЗОМ КАРПА КОИ

2. Предмет рассмотрения

Инфекция герпесвирозом карпа кои означает заражение патогенным возбудителем – герпесвирусом карпа кои (KHV) рода *Cyprinivirus* и семейства *Alloherpesviridae*.

3. Описание болезни

3.1. Факторы о возбудителе

3.1.1. Этиологический агент, штаммы возбудителя

Этиологический агент – герпесвирус карпа кои (KHV), принадлежащий к семейству *Alloherpesviridae* (Haramoto с соавт., 2007; Waltzek с соавт., 2009), но до проведения таксономической классификации он также был известен как вирус интерстициального нефрита и некроза жабр карпа (CNGV) (Plouze с соавт., 2011). Waltzek с соавт. в 2005 году представили доказательства в поддержку классификации вируса в качестве герпесвируса и назвали его герпесвирусом карповых 3 типа (CyHV-3) согласно номенклатуре других герпесвирусов карповых: CyHV-1 (вирус оспы карпа, папилломавирус рыб) и CyHV-2 (вирус гемопоэтической ткани серебряного карася). Секвенирование части генома показало, что KHV близкородственен CyHV-1 и CyHV-2, и отдаленно родственен вирусу канального сома (герпесвирус иctalуровых: IcHV-1), вирусу лягушек (RaHV-1) (Waltzek с соавт., 2005). Aoki с соавт. в 2007 году описали полноразмерную последовательность генома KHV и выявили 156 уникальных белок-кодирующих генов. Они предположили, что вывод о том, что 15 генов KHV гомологичны генам IcHV-1 подтверждает принадлежность KHV к семейству *Herpesviridae*. В зрелый вирион инкорпорированы 40 вирусных белков и 18 клеточных белков (Michel с соавт., 2010). Недавно был указан видовой тип CyHV-3: новый род *Cyprinivirus* внутри семейства *Alloherpesviridae*, которое также включает CyHV-1 и CyHV-2. Первые оценки размера генома KHV варьируют от не менее 150 тпн до 277 тпн, но сейчас размер подтвержден и составляет 295 тпн. Вирусные нуклеокапсиды имеют 100–110 нм в диаметре и окружены оболочкой (Plouze с соавт., 2011).

Сравнение геномов изолятов KHV, выделенных в различных регионах мира, по результатам анализа рестрикционных фрагментов (Naenen с соавт., 2004) или анализа нуклеотидных последовательностей (Sano с соавт., 2004) показало, что они практически идентичны. Аналогичным образом полипептиды изолятов KHV из различных географических регионов были одинаковыми, хотя у одного изолята из Израиля было два дополнительных полипептида (Gilad с соавт., 2003). Aoki с соавт. в 2007 годы сравнили полноразмерные последовательности геномов трех изолятов KHV, выделенных в Японии, Израиле и Соединенных Штатах Америки (США). Было выявлено, что геномы были очень похожи друг на друга

на уровне последовательностей (>99%), причем штаммы из Израиля и США были более близкородственны друг другу, чем штамму из Японии. Эти три изолята были интерпретированы, как появившиеся в виде двух линий (J и U/I) от родителя дикого типа. Однако дальнейшие исследования, проведенные в Японии, позволяют предположить, что эти линии были занесены в эти регионы независимо друг от друга и вызвали эпизоотии KHV (Pouze с соавт., 2011). Более поздние исследования, проведенные во Франции, выявили промежуточную линию между линиями J и U/I и позволили предположить, что с 2001 года с импортированными карпами кои в Европу было занесено три линии CyHV-3 (Bigarré с соавт., 2009). Позже была выявлена еще одна промежуточная линия, которая могла появиться в Индонезии (Sunarto с соавт., 2011).

3.1.2. Выживаемость вне хозяина

Исследования, проведенные в Израиле, показали, что в воде KHV сохраняет активность в течение не менее 4 часов, но не более 21 часа при температуре воды 23–25°C (Perelberg с соавт., 2003). Исследования, проведенные в Японии, продемонстрировали значительное снижение инфекционного титра в течение 3 дней в природных водах или пробах донных отложений при температуре 15°C. Однако инфекционность сохранялась в течение >7 дней, когда KHV помещали в пробы аналогичных вод, которые стерилизовали автоклавированием или фильтрацией (Shimizu с соавт., 2006). Данное исследование также обеспечило подтверждение присутствия в воде бактериальных штаммов с противовирусным действием. Позже регистрировали выявление ДНК KHV в пробах речной воды при температуре 9–11°C за 4 месяца до вспышки вызванной KHV болезни в реке (Haramoto с соавт., 2007). Однако присутствие вируса могло быть обусловлено наличием животных-векторов, и выявление ДНК не всегда может быть указанием на присутствие инфекционного вируса.

3.1.3. Устойчивость возбудителя

Вирус инактивируется при воздействии УФ-излучения при температурах выше 50°C в течение 1 минуты. Следующие дезинфицирующие средства также эффективны для инактивации: йодофор в разведении 200 мг на литр⁻¹ в течение 20 минут, бензалконий хлорид в разведении 60 мг на литр⁻¹ в течение 20 минут, 30% этиловый спирт в течение 20 минут и гипохлорит натрия в разведении 200 мг на литр⁻¹ в течение 30 секунд; все при температуре 15°C (Kasai с соавт., 2005).

3.1.4. Жизненный цикл

В ранних публикациях исследователи предположили, что у карпов основными воротами инфекции вирусом являются жабры (Dishon с соавт., 2005; Gilad с соавт., 2004; Pikarsky с соавт., 2004). Однако более поздние экспериментальные исследования показали, что основными воротами инфекции KHV являются кожа, покрывающая плавники, и тело карпа (Costes с соавт., 2009). Таким образом, происходит системное распространение вируса от кожи и жабр на внутренние органы, и высокие уровни ДНК KHV выявляли в тканях почек, селезенки и кишечника (Dishon с соавт., 2005; Pikarsky с соавт., 2004). Описано, что

накопление и морфогенез KHV в инфицированных клетках такие же как и в случае других герпесвирусов. Ультраструктурное исследование экспериментально инфицированных карпов обеспечило подтверждение того, что незрелые капсиды и зрелые нуклеокапсиды собираются в ядре, и происходит дальнейшее созревание вириона в цитоплазме инфицированных клеток. Гиперсекреция слизи наблюдается на ранних стадиях заражения KHV, и высокие уровни ДНК KHV выявляют в слизи, отобранной от экспериментально зараженных карпов (Gilad с соавт., 2004). Это является дополнительным подтверждением того, что кожа принимает активное участие в патогенезе и является важным участком для выделения вируса. Выделение вируса с мочой и фекалиями также является значимым механизмом распространения вируса. Высокие уровни ДНК KHV выявляли в тканях кишечника и почек, а также инфекционный вирус обнаруживали в фекалиях, отобранных от инфицированных карпов (Dishon с соавт., 2005; Gilad с соавт., 2004).

3.2. Факторы о хозяевах

3.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды, отвечающие критериям для перечисления в качестве восприимчивых к инфекции KHV согласно положениям Главы 1.5. *Кодекса по водным животным (Водный кодекс)*, включают: Все разновидности и подвиды сазана (*Cyprinus carpio*) и гибриды сазана (например, *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*).

3.2.2. Виды, в отношении которых недостаточно данных о восприимчивости

Виды, в отношении которых недостаточно данных о восприимчивости согласно положениям Статьи 1.5. *Водного кодекса*, включают: серебряный карась (*Carassius auratus*), белый амур (*Ctenopharyngodon idella*) и золотой карась (*Carassius auratus*).

Кроме того, у следующих видов получены положительные результаты патоген-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР), но не регистрировалась инфекция: остроносый осетр (*Acipenser oxyrinchus*), язь (*Leuciscus idus*), плотва обыкновенная (*Rutilus rutilus*), ерш обыкновенный (*Gymnocephalus cernuus*), речной окунь (*Perca fluviatilis*), гибрид стерляди и белуги (*Acipenser ruthenus* × *Huso huso*), радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*), русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii*), гаммарус (ракообразные) (*Gammarus pulex*), белый толстолобик (*Hypophthalmichthys molitrix*), усатый голец (*Barbatula barbatula*), беззубки (*Anodonta cygnea*) и линь (*Tinca tinca*).

3.2.3. Стадии восприимчивости хозяина

Все возрастные группы рыбы, от молоди и старше, вероятно, восприимчивы к герпесвирозу карпа кои (Bretzinger с соавт., 1999; Sano с соавт., 2004), но в экспериментальных условиях рыба массой 2,5–6 г была более восприимчивой, чем рыба массой 230 г (Perelberg с соавт., 2003). Личинка карпа резистентна к инфекции KHV, но тот же карп был восприимчивым к инфекции после

созревания (Ito et al., 2007).

3.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Сазан или его разновидности, например карп кои или карп кои-призрак (карп кои × сазан) являются наиболее восприимчивыми, и им следует отдавать предпочтение при выборе на выявление вируса. За ними следуют все присутствующие на объектах гибриды сазана, такие как серебряный карась × сазан или золотой карась × сазан.

3.2.5. Органы-мишени и инфицированные ткани

Жабры, почки и селезенка – органы, в которых в ходе клинической инфекции KHV присутствует в наибольших количествах (Gilad с соавт., 2004).

3.2.6. Персистентная инфекция с пожизненными носителями

Имеются доказательства того, что рыбы, выжившие после переболевания герпесвирозом карпа кои, являются персистентно инфицированными вирусом и могут сохранять его в течение длительного времени. Продemonстрировано, что у экспериментально инфицированного сазана вирус персистирует при благоприятной температуре и впоследствии сохраняется при температурах ниже благоприятных (St-Hilaire с соавт., 2005). Позже подтверждающие данные о персистентности у карпа были представлены в ходе исследования, направленного на определение распространения вируса в популяции дикого сазана. В Японии исследователи провели ПЦР и массовое серологическое обследование на озере Бива (Uchii с соавт., 2009), где через 2 года после большой вспышки 2004 года регистрировали эпизодические вспышки. Дальнейший анализ выжившей популяции показал, что 54% взрослых карпов были сероположительными и 31% ПЦР-положительными. Сохранение высоких уровней антител к вирусу позволяет предположить, что латентный вирус может периодически реактивироваться и стимулировать иммунный ответ.

3.2.7. Векторы

Вода является основным абиотическим вектором. Однако живые векторы (например, другие виды рыб, беспозвоночные-паразиты и рыбацкие птицы и млекопитающие) и фомиты могут также участвовать в передаче.

3.2.8. Предполагаемые гидробионты-переносчики

Имеются данные, которые указывают на то, что другие виды рыб и некоторые водные беспозвоночные являются потенциальными векторами KHV. Вирусную ДНК выявляли в тканях здорового серебряного карася после совместного обитания с карпом кои, экспериментально инфицированного KHV, а также у серебряного карася, подвергнутого воздействию во время природной эпизоотии

КНВ у карпа кои (Pouze с соавт., 2011). В ходе проводимых в Германии исследований КНВ выявляли посредством гнездовой ПЦР у нескольких различных разновидностей серебряного карася (красный, львиноголовый и шубункин), а также у белого амура (*Ctenopharyngodon idella*), язя (*Leuciscus idus*) и декоративных сомиков-анцистров (*Ancistrus* sp.) (Bergmann с соавт., 2009). Выявление у серебряного карася и белого амура подтверждали в гибридизации *in situ* с использованием праймеров, отличных от тех, которые использовались в ПЦР. В ходе недавно проведенного в Польше исследования КНВ также выявляли в ПЦР у русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) и у американского атлантического осетра (*A. oxyrinchus*) с рыбоводческих ферм на севере Польши (Kempter с соавт., 2009). Все пробы от осетров отбирали на фермах, где содержится сазан, у которого ранее регистрировали вспышки болезни, вызванной КНВ. Присутствие белка КНВ и вирусного генома в тканях жабр и почек осетра подтверждали в непрямой реакции флуоресценции и посредством гибридизации *in situ*, соответственно.

Также появляется все больше данных, указывающих на то, что векторами КНВ могут быть водные беспозвоночные. Результаты проведенных в Японии исследований показывают, что ДНК КНВ выявляли в образцах планктона, в частности вида коловратки (Minamoto с соавт., 2010). Образцы планктона отбирали в 2008 году в Ибанаико, мелководной лагуне, соединенной с озером Бива, который является излюбленным местом нереста карпа. Статистический анализ показал значительную положительную корреляцию между уровнем КНВ в планктоне и численностью коловраток, и авторы предположили, что КНВ связывается с и/или концентрируется за счет присущего фильтраторам поведения видов коловраток. Согласно более ранней публикации о небольшом исследовании в Польше КНВ выявляли у беззубок (*Anodonta cygnea*) и пресноводных креветок (*Gammarus pulex*) (Kielpinski с соавт., 2010). Беспозвоночных собирали в прудах на юге Польши, где в последние 5 или 6 лет регистрировали вспышки болезни, вызванной КНВ, в популяциях сазанов. Необходима дополнительная работа для определения того, насколько долго инфекционный вирус персистирует в беспозвоночных в отсутствие видов животных-хозяев, а также остается ли вирус жизнеспособным.

Недавние исследования предоставили дополнительные доказательства того, что серебряный карась (*Carassius auratus*) восприимчив к инфекции КНВ. Транскрипт РНК вирусного гена тимидинкиназы выявляли в тканях жабр, мозга и кишечника серебряного карася, который подвергался воздействию КНВ во время совместного обитания с инфицированным карпом кои. Затем было продемонстрировано, что серебряный карась из этой же популяции передает КНВ интактному сазану, когда перепады температуры использовались в качестве фактора стресса (El-Matbouli и Soliman, 2011). Bergmann с соавт., 2010 также сообщили о репликации КНВ у серебряного карася после экспериментального заражения посредством иммерсии. ДНК и антиген КНВ выявляли в лейкоцитах, выделенных из проб крови серебряного карася, посредством ПЦР (на 45 день после заражения) и в реакции непрямой флуоресценции (на 60 день после заражения).

3.3. Паттерн болезни

3.3.1. Механизмы передачи

Способ передачи КНВ горизонтальный, но на настоящий момент нельзя исключать «яйцо-ассоциированную» передачу (обычно называемую «вертикальной» передачей). Горизонтальная передача может быть прямой (от рыбы к рыбе) или векторной, при которой основным абиотическим вектором является вода. Резервуары герпесвируса карпа кои – клинически инфицированная рыба и скрытые носители вируса среди культивируемой, одичавшей или дикой рыбы. Вирулентный вирус распространяется с фекалиями, мочой, слизью жабр и кожи. В экспериментальных условиях инфекционный вирус на более постоянной основе выделялся от инфицированного сазана при температуре 16°C, чем при 23°C или 28°C (Yuasa с соавт., 2008). Болезнь может быть скоротечной, особенно при оптимальных температурах (23–25°C), но менее скоротечной при температурах ниже 23°C. Болезнь может проявиться через 3 дня после введения интактной рыбы в водоем, где содержится больная рыба, но другие исследователи сообщают, что у интактной рыбы болезнь наблюдается через 8-21 день (Bretzinger с соавт., 1999; Hedrick с соавт., 2000).

3.3.2. Превалентность

Существует мало опубликованных данных о превалентности вируса в популяциях дикого или культивируемого карпа. Есть данные экспериментальных исследований персистенции вируса у сазана, инфицированного при перmissive температуре и впоследствии содержавшегося при температуре ниже перmissive (St-Hilaire с соавт., 2005; см. Раздел 2.2.6). В ходе данного исследования анализ образцов сыворотки крови показал, что процент карпа (не менее 10–25%), у которого выработались высокие титры антител и иммунологический ответ, выявлялся в течение нескольких месяцев (St-Hilaire с соавт., 2009). В ходе других исследований посредством ПЦР вирусную ДНК выявляли у карпа в отсутствие болезни при температуре 13°C, и существует вероятность, что инфицированная рыба, выживающая при низких температурах, может действовать в качестве резервуара вируса (Gilad с соавт., 2004). В диких популяциях, выживших после вспышки КНВ, есть признаки высокой превалентности сероположительных карпов. По результатам ПЦР и обследования на антитела к КНВ на озере Бива, проведенных в 2006 году, дополнительный анализ популяции выжившего карпа показал, что 54% взрослых карпов были сероположительными и 31% ПЦР-положительными (Uchii с соавт., 2009). В рамках исследования распространения КНВ в Англии и Уэльсе четыре объекта, где в 2006 году наблюдались клинические вспышки КНВ, и на которые с того времени не вводили рыбу, в 2007 году были повторно проинспектированы и протестированы на наличие антител к КНВ в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) (Taylor с соавт., 2010). На трех из объектов выявлены положительные результаты и 85–93% серопревалентность в образцах популяции выжившего карпа. На четвертом объекте результаты были отрицательными.

3.3.3. Географическое распределение

После первых сообщений о болезни, вызванной KHV в Израиле и Германии в 1998 году, и о выявлении ДНК KHV в тканевых образцах, отобранных во время массовой гибели карпа в Соединенном Королевстве в 1996 году (Bretzinger с соавт., 1999; Perelberg с соавт., 2003) географический ареал болезни расширился. До появления информации о болезни и средств ее выявления болезнь распространилась на многие страны мира, в основном в результате торговли крапом кои. Сейчас известно, что она появилась или регистрируется у рыбы, ввезенной в не менее 28 разных стран. В Европе KHV выявляют во многих странах по всему континенту (Bergmann с соавт., 2006; Naenen с соавт., 2004; Novotny с соавт., 2010). О последних вспышках герпесвируса карпа кои в МЭБ сообщали Румыния, Словения, Испания и Швеция. В Азии – Китай (Гонконг), Китайский Тайбэй, Индонезия, Япония, Корея (Республика), Малайзия, Сингапур (у рыбы, импортированной из Малайзии) и Таиланд (Naenen с соавт., 2004; Pouze с соавт., 2011; Pikulkaew с соавт., 2009; Sano с соавт., 2004). Повсеместно в ЮАР, Канаде и США (Garver с соавт., 2010; Naenen с соавт., 2004; Hedrick с соавт., 2000) регистрируют возникновение герпесвируса. Вероятно, вирус персистирует во много большем количестве стран, но пока еще не идентифицирован или не зарегистрирован.

3.3.4. Смертность и заболеваемость

Заболеваемость инфицированной популяции может достигать 100%, а смертность – 70-80%, но последняя может достигать 90 или 100% (Bergmann с соавт., 2010a; Naenen с соавт., 2004). Обычно у больного карпа наблюдают вторичные или сопутствующие бактериальные и/или паразитарные инфекции, которые могут влиять на процент смертности или проявление клинических признаков болезни (Naenen с соавт., 2004).

3.3.5. Факторы окружающей среды

На клиническую картину болезни влияют температура воды, вирулентность вируса, возраст и состояние здоровья рыбы, плотность популяции, а также факторы стресса (например, транспортировка, нерест, плохое качество воды). Болезнь зависит от температуры и возникает в диапазоне температур от 16 до 25°C (Naenen с соавт., 2004; Hedrick с соавт., 2000; Perelberg с соавт., 2003; Sano с соавт., 2004). В экспериментальных условиях болезнь вызывала высокую смертность при температуре 28°C, но не при 29 или 30°C, ни при 13°C (Gilad с соавт., 2004; Pouze с соавт., 2011). Однако посредством ПЦР вирусную ДНК выявляли у рыбы при температуре 13°C, и, вероятно, инфицированная рыба, выживающая при низких температурах, может быть резервуаром вируса (Gilad с соавт., 2004).

3.4. Контроль и профилактика

Методы контроля и профилактики герпесвируса карпа кои должны, в первую очередь, основываться на предотвращении контактов с вирусом наряду с надлежащим соблюдением требований гигиены и биозащиты. Это возможно на небольших фермах, на которые вода поставляется из родников или скважин, и на которых применяется надежная система предотвращения попадания на ферму рыбы

через сточные воды.

3.4.1. Вакцинация

В настоящий момент отсутствует широко применяемая безопасная и эффективная вакцина. Однако живой аттенуированный вирус используется для вакцинации карпа и защиты рыбы от контрольного заражения вирусом. Вакцинные препараты индуцируют выработку антител против вируса, и длительность защиты составляет не менее 8 месяцев (Pouze с соавт., 2011). Вакцина зарегистрирована для применения в чрезвычайных ситуациях в Израиле, и широко применяется на фермах по разведению карпов по всей стране. Результаты проведенных в Японии исследований показали, что пероральное введение вакцины на основе липосомов, содержащей инактивированный KHV, было эффективным для защиты карпа от инфекции KHV (Pouze с соавт., 2011).

3.4.2. Химиотерапия

Неприменимо.

3.4.3. Стимуляция иммунитета

В настоящий момент отсутствует опубликованная информация о применении иммуностимуляторов для контроля герпесвируса у карпов. Однако известно, что они являются областью научного интереса.

3.4.4. Разведение резистентных популяций

Дифференциальная резистентность к герпесвирусу карпа кои продемонстрирована у разных пород карпа. У потомства кроссов двух пород домашнего карпа и одной породы дикого карпа воспроизводили экспериментальную или естественную инфекцию. Самый низкий процент выживаемости составил около 8%, но процент выживаемости у самой резистентной породы составил 61–64% (Shapira с соавт., 2005). В ходе более недавнего исследования 96 семей, полученных при скрещивании по двухаллельной системе четырех европейских/азиатских пород сазана, экспериментально заражали KHV. Процент выживаемости пяти самых резистентных кроссов в итоговом исследовании с контрольным заражением вирусом составил от 42,9 до 53,4% (Dixon с соавт., 2009).

3.4.5. Замена на резистентные виды

Естественные вспышки герпесвируса карпа кои не регистрируют у разводимых традиционным способом травоядных видов карпа, включая белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*), белого амура (*Ctenopharyngodon idella*) и пестрого толстолобика (*Aristichthys nobilis*). Травоядные виды карпа обычно разводят в условиях поликультуры с сазаном, но у этих видов не наблюдают признаков болезни или смертности, как в нормальных условиях поликультуры, так и в ходе экспериментального совместного содержания с инфицированной рыбой, или

прямого контакта с вирусом (Pouze с соавт., 2011). Гибриды сазана также представляют собой потенциальный метод контроля для предотвращения серьезных убытков вследствие герпесвируса карпа кои. Исследования популяции гибрида самец серебряного карася × самка сазана показало, что они резистентны к герпесвирусу карпа кои (Hedrick с соавт., 2006). Эти гибриды показывают быстрый рост и морфологически очень похожи на родителей по материнской линии. Однако у выживших гибридов в ходе ПЦР выявляли ДНК KHV, что позволяет предположить, что они являются потенциальными носителями вируса (Hedrick с соавт., 2006). Напротив, польские исследователи зарегистрировали смертность 35–42% гибридов серебряного карася × карпа кои и 91–100% гибридов обыкновенного карася × карпа кои, зараженных KHV посредством погружения (Bergmann с соавт., 2010b; см. Раздел 2.2.1). Вероятно, существует высокий уровень генетических вариаций среди гибридов из разных кроссов, и следовательно, вариации резистентности к KHV. Это в большой степени будет зависеть от породы используемого сазана или карпа кои. Разные породы сазана показали разный уровень резистентности к герпесвирусу карпа кои (Dixon с соавт., 2009; Shapira с соавт., 2005).

3.4.6. Блокирующие агенты

Неприменимо.

3.4.7. Дезинфекция яиц и личинок

Дезинфекцию яиц можно проводить посредством обработки йодоформом. Доказано, что KHV инактивируется йодоформом в концентрации 200 мг/ литр⁻¹ в течение 30 секунд при температуре 15°C (Kasai с соавт., 2005).

3.4.8. Общие стратегии содержания

Меры биозащиты должны включать в себя обеспечение поставок новой рыбы из благополучных по болезни источников, а также введение системы карантина, при котором новая рыба может содержаться с индикаторной рыбой при температурах, пермиссивных для герпесвируса карпа кои. Затем рыба должна содержаться в карантине от 4 недель до 2 месяцев, прежде чем она будет перемещена на основной объект и смешана с интактной рыбой. Меры гигиены на объекте должны быть аналогичными рекомендуемым для SVC и должны включать дезинфекцию яиц, регулярную дезинфекцию прудов, химическую дезинфекцию оборудования фермы, аккуратное обращение с рыбой во избежание стресса, а также безопасное уничтожение мертвой рыбы.

4. Пробоотбор

4.1. Выбор индивидуальных образцов

Все возрастные группы карпа, по-видимому, восприимчивы к герпесвирусу карпа кои, хотя, в целом, рыба в возрасте до 1 года более восприимчива к клинической болезни и рекомендуется для пробоотбора. Пригодность выбранных образцов рыбы

в ходе подозрения на вспышку герпесвируса карпа кои будет зависеть от используемого диагностического теста. Умиравшие или только что погибшие карпы, проявляющие типичные клинические признаки болезни, подходят для исследования в большинстве тестов, описанных в Разделе 4. Тушки рыбы с признаками разложения ткани могут быть пригодны только для исследования методами на основе ПЦР. Аналогичным образом, образцы, отобранные от клинически здоровой рыбы в популяции, где подозревается болезнь, можно исследовать с достоверными результатами только в более чувствительных анализах на основе ПЦР.

4.2. Консервирование образцов для отправки

Целую рыбу следует отправлять в лабораторию живой или умерщвлять ее и упаковывать по отдельности в герметичные стерильные контейнеры. Однако предпочтительно и рекомендуется отбирать образцы органов рыбы сразу же после их отбора на производственном объекте. Целую рыбу или отобранные образцы органов следует отправлять в лабораторию в холодильных контейнерах или на льду. Следует избегать замораживания отобранной рыбы или отобранных органов. Тем не менее, при получении замороженной рыбы или органов последние пригодны для тестирования только с использованием методов на основе ПЦР. Небольшие образцы тканей можно также предоставлять законсервированными в спирте (например, 80–100% этанол) для исследования методами на основе ПЦР.

4.3. Объединение образцов в пулы

При исследовании клинически зараженной рыбы методами на основе ПЦР, и особенно при попытках выделения вируса следует избегать объединения образцов в пулы или ограничиваться пулом максимум из двух рыб. При исследовании в целях надзора методами на основе ПЦР объединение в пулы должно ограничиваться максимум пятью особями в одном пуле.

4.4. Лучшие органы или ткани

При исследовании клинически зараженной рыбы методами на основе ПЦР, и особенно при попытках выделения вируса, рекомендуется отбирать образцы тканей жабр, почек и селезенки. Вирус присутствует в наибольшем количестве в этих тканях в ходе клинической инфекции, и высокие уровни вируса также выявляют в тканях мозга и кишечника (Dishon с соавт., 2005; Gilad с соавт., 2004). При исследовании методами на основе ПЦР не проявляющей симптомов рыбы, клинически здоровой рыбы рекомендуется также включить кишечник и мозг.

4.5. Образцы/ ткани, которые непригодны

Тушки рыбы с очень выраженными признаками разложения тканей могут быть непригодны для исследования с использованием всех методов.

5. Методы диагностики

Диагноз герпесвируса карпа кои у больной рыбы может быть поставлен с использованием

ряда методов. Выделение KHV в культуре клеток в настоящее время не считается настолько чувствительной системой, как описанные методы на основе ПЦР для выявления ДНК KHV. Вирус выделяют только на ограниченном количестве линий клеток, и с этими клетками сложно работать. Поэтому, выделение вируса в культуре клеток не является надежным методом диагностики герпесвируса карпа кои (Haenen с соавт., 2004). Методы иммунодиагностики, аналогичные тем, которые используются для диагностики весенней виремии карпа (SVC) (например, методы иммунофлуоресценции [ИФ] или ИФА), могут быть пригодны для быстрой идентификации и диагностики герпесвируса, но их мало описывают, сравнивают и валидируют. Пока не будут доступны валидированные тесты, диагностика герпесвируса карпа кои должна основываться не на одном тесте, а на комбинации двух или трех тестов (Haenen с соавт., 2004).

5.1. Методы диагностики в полевых условиях

5.1.1. Клинические признаки

Во время вспышки герпесвируса карпа кои в популяции наблюдается заметный прирост смертности. Все возрастные группы карпа, по-видимому, восприимчивы к герпесвирусу карпа кои, хотя, при экспериментальном заражении рыба в возрасте до 1 года более восприимчива к болезни. При более пристальном исследовании отдельных рыб типичные клинические признаки включают в себя обесцвечивание или покраснение кожи, которая может также приобретать грубую (наждачную) текстуру, очаговую или полную потерю эпидермиса, чрезмерную или недостаточную выработку слизи на коже и жабрах, а также обесцвечивание жабр.

Прочие клинические признаки включают энофтальм (запавшие глаза), геморрагии на коже и в основании плавников, а также эрозии плавников.

5.1.2. Поведенческие изменения

Рыбы становятся сонными, отбиваются от стаи, собираются у водовпуска и хватают воздух у поверхности воды. Некоторые рыбы могут демонстрировать нарушения равновесия и дезориентацию, но также они могут проявлять признаки гиперактивности.

5.2. Клинические методы

5.2.1. Макроскопические патологические признаки

Патогномические макропатологические поражения отсутствуют. При постановке окончательного диагноза необходимо дождаться непосредственного выявления вирусной ДНК или выделения и идентификации вируса. Однако наиболее убедительная макропатология наблюдается в жабрах и может варьировать от бледных некротических участков до обширного обесцвечивания, тяжелого некроза и воспаления. Еще один часто наблюдаемый макропатологический признак – бледные, неровные участки на коже, которые ассоциированы с повышенной секрецией слизи, а также с недостаточной выработкой слизи, если участки кожи имеют текстуру, похожую на наждачную

бумагу. Также часто регистрируют такие клинические признаки как анорексия, энцефалит (запавшие глаза), а также поверхностные кровоизлияния в основании плавников. Прочие внутренние поражения варьируются частотой проявления и зачастую отсутствуют в случае внезапной гибели. Другие регистрируемые макрпатологические признаки включают адгезии в брюшной полости при наличии или отсутствии нарушения цвета внутренних органов (более светлые или более темные). Почки или печень могут быть увеличены, а также на них могут наблюдаться точечные кровоизлияния. Присутствующие макроскопические поражения могут быть также осложнены, т.к. больная рыба, и особенно сазан, также инфицирована эктопаразитами, такими как *Argulus* sp., *Chilodonella* sp., *Cryptobia* sp., *Dactylogyrus* sp., *Gyrodactylus* sp., *Ichthyobodo* sp., *Ichthyophthirius* sp., *Trichodina* sp. и жаберными сосальщиками, а также различными видами бактерий, особенно *Flavobacterium columnare* при теплых температурах воды.

5.2.2. Клиническая химия

Опубликованная информация отсутствует.

5.2.3. Микроскопические патологические признаки

Дополнительное исследование жабр посредством микроскопии малой мощности могут выявлять эрозии первичных ламелл, слияние вторичных ламелл, а также воспаление вершечек первичных и вторичных ламелл. Гистопатология болезни может быть неспецифичной или разнообразной, но воспаление и некроз жаберных тканей представляют собой постоянный признак. В жабрах также наблюдается гиперплазия и гипертрофия жаберного эпителия, а также слияния вторичных ламелл и адгезия жаберных лепестков. Наблюдается некроз жабр, начиная от небольших участков некротических клеток эпителия вторичных ламелл и до полной потери ламелл. В клетках жаберного эпителия и в лейкоцитах обычно наблюдается значительное увеличение ядра, краевое стояние хроматина, создающее вид «печатки», а также бледные эозонофильные внутриядерные включения. Воспаление, некроз и ядерные включения наблюдают (по отдельности или вместе) в эпителии других органов, особенно почек, но также и селезенки, поджелудочной железы, печени, мозга, кишечника, и в эпителии полости рта.

5.2.4. Влажные препараты

Неприменимо.

5.2.5. Мазки

КНВ идентифицируют посредством иммунофлуоресценции (ИФ) в мазках-отпечатках и в мазках печени, почек и мозга инфицированной рыбы. Самые высокие уровни ИФ-положительных сигналов наблюдали в почках, и посредством ИФ вирус можно выявить в отпечатке почки через 1 день после заражения (Pikarsky с соавт., 2004; Shapira с соавт., 2005).

5.2.6. Электронная микроскопия/ цитопатология

Выявление вирусных частиц посредством трансмиссивной электронной микроскопии (ТЭМ) тканей инфицированного карпа не является надежным методом диагностики. Кусочки ткани жабр и почки, зафиксированные глутаральдегидом, следует отбирать у тяжело инфицированного карпа ($>10^6$ вирусных частиц). Наилучшие результаты получают при отборе образцов от нескольких карпов в инфицированной популяции на разных стадиях инфицирования. Это позволяет гарантировать, что некоторые образцы ткани получены от тяжело инфицированных особей.

5.3. Выявление возбудителя и методы идентификации

В данном разделе подробно описаны не все методы, так как широкомасштабное сравнение и валидация методов выявления и идентификации KHV не проводились. По возможности представлено краткое описание опубликованных методов. Рекомендации относительно методов будут основаны на результатах дополнительного тестирования и валидации, а также на дополнительных данных получаемых из разработавших эти методы лабораторий с целью принятия решения об их «пригодности».

5.3.1. Методы прямой детекции

KHV идентифицируют посредством иммунофлуоресценции (ИФ) в мазках-отпечатках печени, почек и мозга инфицированной рыбы. Самые высокие уровни ИФ-положительных сигналов наблюдали в почках, и посредством ИФ вирус можно выявить в отпечатке почки через 1 день после заражения (Pikarsky с соавт., 2004; Shapira с соавт., 2005). Вирусный антиген также выявляют в инфицированных тканях посредством иммунопероксидазного окрашивания. Вирусный антиген выявляли на второй день после заражения в почке, а также наблюдали в жабрах и печени (Pikarsky с соавт., 2004). Однако выявление KHV посредством иммунного окрашивания следует интерпретировать с аккуратностью, т.к. положительно-окрашенные клетки могут быть результатом перекрестной реакции с серологически связанным вирусом (например, CyHV-1) или невирусным белком (Pikarsky с соавт., 2004). Метод прямой детекции KHV в отпечатках почки посредством непрямого иммунофлуоресцентного анализа (IFAT) описан ниже.

Методы иммунофлуоресценции (ИФ) и гибридизации *in situ* (ISH), проводимые на отделенных лейкоцитах рыбы, используются в научно-исследовательских приложениях для выявления или идентификации KHV. Несмотря на то, что данные методы подробно не сравнивали с другими методами, они не являются деструктивными методами (нелетальные), и некоторые лаборатории могут признать их полезными для постановки диагноза. Описание методов здесь не приводится, но подробные протоколы отделения лейкоцитов из крови, а также протоколы ИФ и ISH можно найти в опубликованных работах Bergmann с соавт., 2009 и Bergmann с соавт., 2010a.

Методы на основе ИФА для прямой детекции антигена КНУ в инфицированных тканях находятся в стадии разработки в ряде лабораторий по всему миру, но валидированные методы пока не опубликованы. В настоящее время есть один опубликованный метод ИФА, и он разработан в Израиле для выявления КНУ в фекалиях рыбы (Dishon с соавт., 2005). Разработанные методы ИФА будут иметь низкую чувствительность, что может быть пригодно для выявления высоких уровней КНУ в тканях клинически больной рыбы, но они не подходят для надзора за КНУ в популяциях здоровой рыбы.

Наиболее часто используемый метод выявления КНУ непосредственно в рыбе – КНУ-специфичные анализы на основе ПЦР.

5.3.1.1. Методы микроскопического анализа

5.3.1.1.1. Влажные препараты

Неприменимо.

5.3.1.1.2. Мазки/отпечатки

5.3.1.1.2.1. Непрямой иммунофлуоресцентный анализ на отпечатках почек

- i) Рыбу тщательно обескровить.
- ii) Приготовить отпечатки почек на чистых предметных стеклах или на дне лунок пластиковых культуральных планшетов.
- iii) Оставить отпечатки высыхать на 20 минут.
- iv) Смыть однократно 0,01 М фосфатно-буферного раствора (ФБРС), рН 7,2, затем трижды быстро ополоснуть холодным ацетоном (хранить при температуре -20°C) на одно предметное стекло, или смесью 30% ацетона/70% этанола, также при температуре -20°C , в случае пластиковых планшетов.
- v) Оставить для воздействия фиксаторов на 15 минут. Объем лунки 0,25 мл/см² достаточно для отпечатков на культуральных планшетах.
- vi) Оставить зафиксированные отпечатки высыхать на воздухе в течение не менее 30 минут и сразу же обработать или заморозить при температуре -20°C .
- vii) Регидратировать высушенные отпечатки посредством четырех этапов промывки 0,01 М раствора ФБР, рН 7,2, содержащего 0,05% Tween 20 (ФБРТ), и полностью удалить буфер после последней промывки.
- viii) Приготовить раствор очищенного анти-КНУ антитела или сыворотки в 0,01 М ФБР, рН 7,2, содержащего 0,05% Tween 20 (ФБРТ), в соответствующем разведении (которое установлено заранее или предоставлено поставщиком реактивов).
- ix) Блокировать раствором 5% обезжиренного молока или 1% альбумина бычьей сыворотки в ФБРТ в течение 30 минут при температуре 37°C .
- x) Четыре раза промыть ФБРТ.

- xi) Обрабатывать отпечатки раствором антитела (приготовлен на этапе viii) в течение 1 часа при температуре 37°C во влажной камере, избегать появления испарения. Объем 0,125 мл/см⁻² лунки достаточно для культурального планшета.
- xii) Четыре раза промыть ФБРТ.
- xiii) Обрабатывать отпечатки в течение 1 часа при температуре 37°C раствором флуоресцинизоцианат (FITC)-конъюгированного антитела, используемого первым слоем и приготовленного согласно инструкции поставщика. Чаще всего данные FITC-антитела – это кроличьи или козы антитела.
- xiv) Четыре раза промыть ФБРТ.
- xv) Добавить ФБР в объеме 0,25 мл/см⁻² лунка к обработанным отпечаткам на культуральных планшетах и сразу же исследовать, или перед микроскопией накрыть предметные стекла покровными стеклами с использованием солевого раствора и глицерина при pH 8,5.
- xvi) Исследовать при падающем УФ-излучении через микроскоп с окулярами с $\times 10$ увеличением и линзами объектива с $\times 20$ – 40 увеличением и с числовой апертурой $>0,65$ и $>1,3$, соответственно. Для получения ожидаемых результатов перед началом любого исследования необходимо обеспечить наличие положительных и отрицательных контролей.

5.3.1.1.3. Фиксированные срезы

Метод, детально описанный в Разделе 4.3.1.1.2 выше, также подходит для выявления антигена в залитых в парафин срезах ткани, зафиксированных нейтрально забуференным 10% формалином (NBF). Однако для обнаружения антигена, который может быть скрыт вследствие чрезмерной фиксации ткани, может возникнуть необходимость дополнительной обработки депарафинизированных срезов, регидратированных в ФБР. Стандартная обработка – инкубирование срезов с 0,1% трипсином в ФБР при температуре 37°C в течение 30 минут. Затем, перед выполнением этапов viii–xvi, описанных в Разделе 4.3.1.1.2 выше, срезы промывают в холодном ФБР.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для прямой детекции вирусного антигена посредством IFAT или иммуногистохимии ткани следует фиксировать в течение 24–48 часов в 10% NBF, а затем для длительного хранения фиксатор следует заместить 70% этанолом.

5.3.1.2. Выявление, выделение и идентификация возбудителя

5.3.1.2.1. Культура клеток

Диагностика герпесвируса карпа кои у клинически инфицированной рыбы можно проводить посредством выделения вируса в культуре клеток. Однако вирус можно выделить только в ограниченном количестве линий клеток, и манипуляции с этими клетками могут быть осложнены. Также, выделение в культуре клеток не настолько чувствительный метод, как описанные методы

выявления ДНК KHV на основе ПЦР, и он не считается надежным методом диагностики герпесвируса карпа кои (Naenen с соавт., 2004).

Рекомендованные к использованию линии клеток: KF-1 или CCB

5.3.1.2.1.1. Экстракция вируса

Используют процедуру, описанную в Главе 2.3.0., Раздел A.2.2.2.

5.3.1.2.1.2. Инокуляция монослоев клеток

- i) Перед инокуляцией клеток гомогенаты объединенных в пулы органов можно обработать антибиотиками, как описано в Главе 2.3.0., Разделы A.2.2.1 и A.2.2.2.
- ii) Если после инокуляции обработанных антибиотиками гомогенатов наблюдается цитотоксическое действие, не менее 1 мл 1/10 супернатанта гомогената органов отфильтровывают через одноразовый целлюлозоацетатный фильтр с диаметром отверстий 0,45 мкм (или через фильтр с мембраной с аналогичными характеристиками низкого связывания белков).
- iii) Для прямой инокуляции переносят соответствующий объем обработанного антибиотиками или отфильтрованного гомогената на 24-48-часовые монослои клеток в культуральных флаконах или на многоруночных планшетах. На клеточный слой размером менее 5 см² вносят 100 мкл отфильтрованного супернатанта. В качестве альтернативы делают дополнительное 10-кратное разведение отфильтрованного супернатанта в среде для культивирования клеток, буферизируют при pH 7,6, добавляют 2% фетальную бычью сыворотку (ФБС), и оставляют для адсорбции на 0,5–1 час при температуре 18–22°C.

Затем, не удаляя инокулят, добавляют соответствующий объем среды для культивирования клеток (0,2–0,3 мл/см² на каждый культуральный флакон) и инкубируют при температуре от 20°C до 25°C.

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании многоруночных планшетов инкубирование в атмосфере CO₂ или добавление HEPES в среду для культивирования клеток (HEPES = N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновая кислота) обеспечат поддержание соответствующего уровня pH во время инкубации.

5.3.1.2.1.3. Мониторинг инкубации

- i) Процесс инфекции положительных контролей и других инокулированных культур клеток отслеживают посредством ежедневной микроскопии при ×40–100 увеличении в течение 14 дней. Рекомендуется использовать фазово-контрастный микроскоп.
- ii) Во время инкубирования pH клеточной культуральной среды поддерживают на уровне 7,3 and 7,6. Этого можно достичь посредством добавления в инокулированную клеточную культуральную среду стерильного бикарбонатного буфера в случае плотно закрытых культуральных флаконов или забуференной HEPES среды в случае

многолуночных планшетов.

- iii) Если цитопатическое действие (ЦПД) появляется в тех культурах клеток, которые инокулированы разведениями супернатантов исследуемых гомогенатов, процедуры идентификации следует проводить незамедлительно (см. Раздел 4.3.1.2.2 ниже).
- iv) Если в инокулированных культурах не развивается ЦПД (несмотря на нормальное развитие ЦПД в вирусных контролях), инокулированные культуры следует дополнительно субкультивировать в течение 14 дней. Если в вирусных контролях не развивается ЦПД, процесс следует повторить с использованием свежих восприимчивых клеток и новых партий образцов.

5.3.1.2.1.4. Процедуры субкультивирования

- i) Аликвоты клеточной культуральной среды переносят из всех монослоев, инокулированных супернатантами гомогенатов органов, на свежие культуры клеток.
- ii) Монослой клеток инокулируют как описано выше в Разделе 4.3.1.2.1; Инокулирование монослоев клеток, этап iii.
- iii) Инкубируют и проводят мониторинг как описано выше в Разделе 4.3.1.2.1. Если ЦПД не развивается, результат теста может быть признан отрицательным.

5.3.1.2.1.5. Подтверждающая идентификация

Наиболее надежным методом для подтверждающей идентификации ЦПД является ПЦР с последующим секвенированием продукта ПЦР. Методы ПЦР, рекомендуемые для идентификации KHV, те же что и методы, рекомендованные для прямой детекции в тканях рыб (раздел 4.3.1.2.3. ниже). Для итогового подтверждения ПЦР-продукты надлежащего размера следует идентифицировать как KHV по происхождению посредством секвенирования (см. раздел 4.3.1.2.3 ниже).

5.3.1.2.1.6. Подтверждение результатов ПЦР

- i) ДНК экстрагируют из супернатанта вирусной культуры с использованием подходящего набора или реагента для экстракции ДНК. Пример экстракции ДНК с использованием метода солевой экстракции (реагент DNAzol®) описан ниже в разделе 4.3.1.2.3.1.
- ii) Экстрагированную ДНК затем амплифицируют с использованием протоколов ПЦР, описанных ниже в разделе 4.3.1.2.3.1

Амплифицированные продукты ПЦР затем можно быстро удалить из геля и секвенировать как описано в разделе 4.3.1.2.3

5.3.1.2.2. Методы выявления антигена на основе антител

Методы на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) для

прямой детекции антигена KHV в инфицированных тканях находятся в процессе разработки в ряде лабораторий, и эти методы могут также быть пригодными для подтверждающей идентификации KHV. В настоящее время имеется один опубликованный метод ИФА, и он был разработан в Израиле для выявления KHV в фекалиях рыб (Dishon с соавт., 2005).

Методы идентификации вируса, основанные на производстве культур клеток, инфицированных KHV (например, IFAT, иммунопероксидазный метод и реакция сывороточной нейтрализации), не рекомендованы. Это обусловлено тем, что вирус растет медленно и непредсказуем в культурах восприимчивых клеток.

Молекулярные методы

Из всех опубликованных методов одноэтапной ПЦР протоколы, описанные ниже, в настоящее время считаются наиболее чувствительными для выявления ДНК KHV в образцах свежей ткани, отобранных от карпа с клиническим проявлением болезни. Данные протоколы могут также позволить выявление субклинических уровней вируса. В первом используется ТК праймер, разработанный Bercovier с соавт., 2005 в Медицинском колледже Хадасса Иерусалимского университета в Израиле. Второй разработан Yuasa с соавт., 2005 в Национальном научно-исследовательском институте аквакультуры (NRIA), Ватарай, Миэ, Япония, и он усовершенствует опубликованный протокол. Если у ткани есть признаки разложения, может возникнуть необходимость использования наборов праймеров, нацеленных на более короткие области генома.

Альтернативные методы ПЦР, которым отдают предпочтение многие диагностические лаборатории взамен традиционной ПЦР, включают количественную ПЦР, например ПЦР в реальном времени. Наиболее часто используемый для выявления KHV метод количественной ПЦР – ПЦР в реальном времени с использованием зонда Taqman по методу Gilad (Gilad с соавт., 2004). ПЦР в реальном времени с зондами Taqman сейчас являются обычной диагностической процедурой, которая позволяет выявить и провести количественную оценку очень низкого количества копий целевых последовательностей нуклеиновых кислот. Посредством минимизации манипуляций с образцами за счет автоматизации пробоподготовки и процедур термоциклирования ПЦР с зондами Taqman позволяет в значительной степени избежать риска контаминации, присущего методам гнездовой ПЦР.

Протокол пробоподготовки, описанный ниже, использует метод солевой экстракции (реагент DNAzol®) для экстракции ДНК KHV. Это простой в использовании, быстрый протокол, который также относительно недорогой по сравнению с некоторыми наборами. Лаборатории, которые незнакомы с DNAzol® или аналогичными солевыми реагентами, могут посчитать этот метод менее надежным. Однако в продаже имеется ряд наборов для экстракции ДНК на основе солевых реагентов или силиконовых матрикс (от популярных производителей, включая Roche, Qiagen и Invitrogen), которые производят

высококачественную ДНК, пригодную для использования при выполнении описанных протоколов ПЦР.

5.3.1.2.2.1. Прямая детекция посредством ПЦР

5.3.1.2.2.1.1. Пробоподготовка и экстракция ДНК с использованием реагента DNAzol®

Экстракцию вируса из тканей органов следует проводить с использованием процедуры, описанной в Главе 2.3.0, Раздел А.2.2.2.

- i) 100 мкл гомогената тканей (1/10 [в/о]) добавляют в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку с 1 мл реагента DNAzol®.
- ii) Аккуратно перемешивают, пять раз перевернув пробирку, и оставляют при комнатной температуре на 5 минут, затем центрифугируют в микроцентрифуге при 10 600 *g* (*rcf* = относительное центрифужное ускорение) в течение 10 минут.
- iii) 1 мл супернатанта переносят в новую 1,5 мл микроцентрифужную пробирку с 0,5 мл этанола.
- iv) Аккуратно перемешивают, пять раз перевернув пробирку, и оставляют при комнатной температуре на 5 минут, затем центрифугируют в микроцентрифуге при 18 000 *g* (*rcf*) в течение 30 минут.
- v) Удаляют супернатант и полученный в результате центрифугирования осадок промывают 250 мкл 70% раствора этанола в воде реагентного качества.
- vi) Образцы центрифугируют в течение 5 минут при 18 000 *g* (*rcf*).
- vii) Этанол удаляют при помощи пипетки, и осадок высушивают на воздухе, оставив пробирки открытыми на лабораторном столе на 5 минут.
- viii) Осадок ресуспендируют в 50 мкл воды реагентного качества, предварительно нагретой до 60°C, и инкубируют при температуре 60°C в течение 5 минут. Образцы можно хранить при температуре –20°C, пока они не потребуются.

5.3.1.2.2.1.2. ПЦР

5.3.1.2.2.1.2.1. Общие примечания

ПЦР зачастую может давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты. Ложноположительные результаты (отрицательные образцы, демонстрирующие положительную реакцию) могут возникать либо в результате примесей в продукте от положительных образцов, либо в результате перекрестной контаминации продуктами ПЦР из предыдущих тестов. Следовательно, каждый анализ и каждая экстракция из тканей должны включать отрицательный контроль для исключения контаминации. Для минимизации риска контаминации на всех этапах пробоподготовки и проведения ПЦР следует использовать наконечники пипеток с противозагрязняющими фильтрами. Кроме того, подготовку всех ПЦР следует проводить в чистой зоне, которая отделена от зоны, где

проводятся амплификация и гель-электрофорез. Запрещается передавать оборудование (например, лабораторные халаты и расходные материалы) между зонами и, по возможности, следует ограничить перемещения между зонами. Контаминация ПЦР-продуктов может происходить через оборудование, одежду и бумагу (например, рабочие журналы). Также необходимо регулярно производить очистку и дезинфекцию УФ-облучением и хлорной известью всех рабочих поверхностей и вытяжных шкафов, используемых при экстракции и постановке ПЦР. Реагенты и расходные материалы следует также систематически дезинфицировать УФ-облучением. Для обеспечения целостности образцов последние всегда следует хранить (например, в морозильнике или в холодильнике) в помещении, отделенном от микробиологической лаборатории или зоны.

5.3.1.2.2.1.2.2. *Протокол 1 (с праймерами Bercovier ТК)*

i) Для каждого образца готовят мастер-микс, содержащий:

10 мкл реакционного буфера ($\times 5$ концентрация)

5 мкл $MgCl_2$ (25 мМ исходного раствора)

0,5 мкл dNTPs (25 мМ смеси)

0,5 мкл прямого праймера (10 пмоль $мкл^{-1}$ исходного раствора)

0,5 мкл обратного праймера (10 пмоль $мкл^{-1}$ исходного раствора)

0,25 мкл ДНК-полимеразы 500 мк (5 мк $мкл^{-1}$)

30,75 мкл воды реagentного типа

Праймеры Bercovier ТК:

Прямой = 5'-GGG-TTA-CCT-GTA-CGA-

G-3'

Обратный = 5'-CAC-CCA-GTA-GAT-TAT-

GC-3'

Размер продукта = 409 п.о.

47,5 мкл каждого образца вносят в тонкостенную 0,5 мл-микроцентрифужную пробирку. Накрывают двумя каплями минерального масла.

ii) Добавляют 2,5 мкл экстрагированной ДНК. Оставшуюся ДНК хранят при температуре $-20^{\circ}C$.

iii) Пробирки помещают в термоциклер и запускают следующую программу:

1 цикл: 5 минут при температуре 94°C;

40 циклов: 1 минута при температуре 95°C

1 минута при температуре 52°C (см. примечание ниже)

1 минута при температуре 72°C

Стадия финальной элонгации в течение 10 минут при температуре 72°C.

Примечание в отношении условий циклов: Температура отжига 55°C эффективно используется многими лабораториями для амплификации KHV с праймерами Bergovier ТК.

iv) Визуализируют ПЦР амплификон размером 409 п.о. посредством электрофореза продукта в агарозном геле, окрашенном 2% этидия бромидом, и изучают с использованием УФ-трансиллюминатора. В гель необходимо включить соответствующую лестницу молекулярного веса для определения размера продукта.

v) Продукты надлежащего размера следует подтверждать как KHV по происхождению посредством секвенирования.

5.3.1.2.2.1.2.3. *Протокол 2 (с праймерами Gray Sph/ модификации Yuasa)*

i) Для каждого образца готовят мастер-микс, содержащий:

1 мкл реакционного буфера ($\times 10$ концентрация)

1,6 мкл dNTPs (2,5 мМ смеси)

0,2 мкл прямого праймера (50 пмоль мкл^{-1} исходного раствора)

0,2 мкл обратного праймера (50 пмоль мкл^{-1} исходного раствора)

0,1 мкл ДНК-полимеразы

14,9 мкл воды реагентного типа

(ПРИМЕЧАНИЕ: итоговая концентрация MgCl_2 в мастер-миксе 2 мМ)

Праймеры Gray Sph:

Прямой = 5'-GAC-ACC-ACA-TCT-GCA-AGG-AG-3'

Обратный = 5'-GAC-ACA-TGT-TAC-AAT-GGT-CGC-3'

Размер продукта = 292 п.о.

19 мкл каждого образца вносят в 0,2 мл тонкостенную микроцентрифужную пробирку. Накрывают двумя каплями минерального масла.

- ii) Добавляют 1 мкл экстрагированной ДНК.
- iii) Пробирки помещают в термоциклер и запускают следующую программу:

1 цикл: 30 секунд при температуре 94°C;

40 циклов: 30 секунд при температуре 94°C

30 секунд при температуре t 63°C

30 секунд при температуре t 72°C

Стадия финальной элонгации в течение 7 минут при температуре 72°C.

- iv) Добавляют 3 мкл ×6 буфера для внесения к каждому продукту ПЦР и проводят электрофорез 7 мкл на агарозном геле, окрашенном 2% этидия бромидом при 100 V в течение 20 минут. Проводят визуализацию в УФ-свете. В гель необходимо включить соответствующую лестницу молекулярного веса для определения размера продукта.
- v) Продукты надлежащего размера следует подтверждать как KHV по происхождению посредством секвенирования.

5.3.1.2.2.1.2.4. Анализ нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР

Продукты ПЦР извлекают из геля и очищают с использованием коммерческого набора для очистки ДНК из геля, например, Geneclean®, Q-BIOgene, СК). Одиночные, выраженные (яркие) продукты ПЦР после очистки секвенируют непосредственно в обоих направлениях посредством праймеров, используемых при финальной амплификации. В качестве альтернативы менее выраженные (бледные) продукты ПЦР клонируют с использованием ТА-клонизирующего вектора (например, pGEM T, Promega), а обе цепи ДНК секвенируют с использованием универсальных наборов праймеров M13. Амплификацию, клонирование и секвенирование проводят в двух повторностях, чтобы исключить возможные погрешности вследствие введения Taq-полимеразы. Затем реакции секвенирования анализируют в генетическом анализаторе, и выравнивания и консенсусные последовательности получают при использовании соответствующего

программного обеспечения (например, программное обеспечение Sequencher™ 4.0, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, США). Исследовательским лабораториям, в которых отсутствуют возможности для секвенирования, рекомендуется использовать услуги коммерческих компаний, предлагающих услуги секвенирования. При предоставлении образцов исследовательским лабораториям следует использовать инструкции, предоставляемые выбранной компанией, оказывающей услуги секвенирования.

5.3.2. Серологические методы

После воздействия KHV иммунный статус рыбы является важным фактором, причем как неспецифический (интерферон), так и специфичный иммунитет (сывороточные антитела, клеточный иммунитет) играют важную роль при герпесвирусных инфекциях. Клинические проявления болезни доминируют при температурах воды от 18°C и выше, когда иммунный ответ рыбы оптимален. Инфицированный карп продуцирует антитела к вирусу, и опубликованы описания тестов на основе ИФА, которые достоверно выявляют эти антитела в сыворотках в высоких разведениях (Adkison с соавт., 2005; Pouze с соавт., 2011; St-Hilaire с соавт., 2005). Антитела выявляют в сыворотке через 3 недели после экспериментального заражения и через 1 год после естественного заражения у выжившей рыбы (Adkison с соавт., 2005; Pouze с соавт., 2011; St-Hilaire с соавт., 2005; Taylor с соавт., 2010).

Показано, что сыворотка от карпа кои, содержащая антитела к KHV, перекрестно реагирует на низком уровне с CyHV-1, что является дополнительным доказательством того, что эти вирусы близкородственны. Признаки перекрестно-реагирующих антител продемонстрированы в аналогичных ИФА и вестерн-блоттинге сыворотки от карпов кои, инфицированных CyHV-1 или KHV (Adkison с соавт., 2005). Вирусологи-диагносты также должны знать, что рыба, недавно вакцинированная против KHV, может демонстрировать положительные результаты ИФА на выявление антител.

Выявление антител может оказаться ценным методом установления предшествующего воздействия KHV у внешне здоровой рыбы, и пока не будут разработаны методы на основе ПЦР, которые смогут достоверно выявлять персистирующий вирус у подвергшейся воздействию вируса рыбы, анализы на выявление антител могут быть единственными имеющимися в распоряжении методами для проведения надзора. Однако вследствие отсутствия достаточных знаний о серологических ответах рыбы на вирусные инфекции, выявление у рыбы антител к вирусам пока не признано рутинным методом скрининга для оценки вирусного статуса в популяции рыбы. Валидация некоторых серологических методов для определенных вирусных инфекций рыб может быть проведена в ближайшем будущем, сделав применение серологии рыб более широко применяемой для санитарных скрининговых исследований.

6. Оценка тестов по цели применения

Имеющиеся в настоящее время методы целевого надзора и диагностики КНУ перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, использованные в Таблице, означают: а = метод рекомендован по причине доступности, использования и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы значительно ограничивают его применение; и d = в настоящее время метод не рекомендуется для этой цели. Это, в некоторой мере, субъективно, т.к. пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и практичности. Несмотря на то, что не все тесты, перечисленные в категории а или b, прошли официальные процедуры стандартизации и валидации, их рутинная суть и факт их широкого применения без сомнительных результатов делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предварительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	ПЛ	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические поражения	d	d	c	c	b	d
Световая микроскопия	d	d	c	c	b	d
Гистопатология	d	c	c	c	b	c
Выделение в культуре клеток	d	d	d	d	b	d
Трансмиссионная электронная микроскопия	d	d	d	d	b	c
Анализы на основе антител на выявление вируса	d	d	c	c	b	b
ДНК-зонды <i>in situ</i>	d	d	c	c	b	b
ПЦР	d	b	b	b	a	a
Сиквенс	НП	НП	НП	НП	НП	a
Анализы на выявление антител (серология)	d	d	c	b	b	d
Биопроба	НП	НП	НП	НП	НП	НП

ПЛ = постличиночная стадия; ПЦР = полимеразная цепная реакция; НП = неприменимо.

6. Тест(ы), рекомендованные для целевого надзора в целях признания благополучия по герпесвирусу карпа кои

Целевой надзор должен опираться на регулярный мониторинг объектов, где содержатся восприимчивые виды. Мониторинг объектов следует проводить, когда температура воды достигает значений, способствующих развитию болезни ($>17^{\circ}\text{C}$), и не раньше, чем через 3 недели после установления такой температуры. Образцы следует отбирать от всех

выявленных на объекте больных рыб, демонстрирующих аномальное поведение, и эти образцы следует тестировать с использованием наиболее чувствительных тестов, имеющихся в распоряжении (например, ПЦР). В настоящее время отсутствуют рекомендованные валидированные методы для исследования здоровых популяций восприимчивой рыбы для признания благополучия по КНВ. Однако многие лаборатории используют более чувствительные молекулярные методы, такие как ПЦР в реальном времени или гнездовая ПЦР, для достоверного выявления низких уровней ДНК персистирующего вируса. Эти анализы могут продемонстрировать свою пригодность для использования при выполнении программ надзора. Отсутствуют опубликованные данные о широкомасштабной валидации этих более чувствительных анализов, но наиболее широко применяется ПФР в реальном времени с зондом Taqman по методу Gilad (Gilad с соавт., 2004). Общеизвестно, что этот анализ является наиболее чувствительным из описанных методов ПЦР, используемых для выявления низких уровней КНВ. В качестве альтернативы выявление антител может быть полезным методом для установления предшествующего воздействия КНВ у внешне здоровой рыбы. Валидация иммуноферментных анализов для выявления антител к КНВ может быть проведена в ближайшем будущем, сделав применение этих анализов более широко приемлемым для санитарных скрининговых исследований.

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Определение случая подозрения

КНВ подозревается у восприимчивых видов рыб, если выполнен один из следующих критериев:

- i) Наличие типичных клинических признаков герпесвируса карпа кои в популяции восприимчивой рыбы.
- ii) Демонстрация типичной для герпесвируса карпа кои гистопатологической картины в срезах ткани.
- iii) Типичное ЦПД, наблюдаемое в восприимчивых культурах клеток без идентификации возбудителя.
- iv) Единственный положительный результат одного из диагностических тестов, перечисленных в категории а или b в Таблице 5.1.
- v) Перемещение живой рыбы с объекта, где подтверждено или подозревается присутствие КНВ в связи с наличием клинического проявления болезни, на объекты без подозрения на КНВ.
- vi) Установлены прочие эпизоотологические связи с объектами, где подтвержден КНВ.
- vii) Выявлены антитела к КНВ.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если объекты указываются как подозрительные согласно критериям v и vi, попытки тестирования на КНВ следует предпринимать, только если температура воды достигает значений, способствующих развитию болезни ($>17^{\circ}\text{C}$). Если температура воды ниже допустимых значений, тогда живой образец восприимчивой рыбы следует поместить в воду с повышенной температурой (в идеале $20\text{--}24^{\circ}\text{C}$) и исследовать через 14–21 день.

7.2. Определение подтвержденного случая

Следующие критерии должны быть выполнены для подтверждения КНВ:

- i) Смертность, клинические признаки и патологические изменения соответствуют болезни, вызванной КНВ (Раздел 4.2), и выявление КНВ одним или несколькими из следующих методов:

- a) Выявление КНВ в ПЦР методами, описанными в Разделе 4.3.1.2.3;

ИЛИ

- b) Выявление КНВ в тканевых препаратах с использованием специфичных антител против КНВ (например, IFAT на тканевых отпечатках, как описано в Разделе 4.3.1.1.2);

ИЛИ

- c) Выделение и идентификация КНВ на культуре клеток от не менее одного образца рыбы с объекта, как описано в Разделе 4.3.1.2.1
- ii) В отсутствие смертности или клинической болезни одним или несколькими из следующих методов:
 - a) Выявление КНВ в ПЦР методами, описанными в Разделе 4.3.1.2.3;
 - b) Положительные результаты двух отдельных или различных диагностических методов, перечисленных в категории а или b в Таблице 5.1.

8. Список литературы

ADKISON M.A., GILAD O. & HEDRICK R.P. (2005). An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the koi herpesvirus (KHV) in the serum of koi *Cyprinus carpio*. *Fish Pathol.*, **40**, 53–62.

AOKI T., HIRONO I., KUROKAWA K., FUKUDA H., NAHARY R., ELDAR A., DAVISON A.J., WALTZEK T.B., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2007). Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J. Virol.*, **81**, 5058–5065.

BERCOVIER H., FISHMAN Y., NAHARY R., SINAI S., ZLOTKIN A., EYNGOR M., GILAD O., ELDAR A. & HEDRICK R.P. (2005). Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol.*, **5**, 1–9.

BERGMANN S.M., KEMPTER J., SADOWSKI J. & FICHTNER D. (2006). First detection, confirmation and isolation of koi herpesvirus (KHV) in cultured common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Poland. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **26**, 97–104.

BERGMANN S.M., LUTZE P., SCHUTZE H., FISCHER U., DAUBER M., FICHTNER D. & KEMPTER J. (2010a). Goldfish (*Carassius auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV) but not for KHV disease. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **30**, 74–84.

BERGMANN S.M., SCHUTZE H., FISCHER U., FICHTNER D., RIECHARDT M., MEYER K., SCHRUDDE D. & KEMPTER J. (2009). Detection of koi herpes-virus (KHV) genome in apparently healthy fish. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **29**, 145–152.

BERGMANN S.M., SADOWSKI J., KIELPINSKI M., BARTLOMIEJCZYK M., FICHTNER D., RIEBE R., LENK M. & KEMPTER J. (2010b). Susceptibility of koi x crucian carp and koi x goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD). *J. Fish Dis.*, **33**, 267–272.

BIGARRÉ L., BAUD M., CABON J., ANTUCHOWICZ J., BERGMANN S.M., ENGELSMA M., POZET F., REICHERT M. & CASTRIC J. (2009). Differentiation between Cyprinid herpesvirus type-3 lineages using duplex PCR. *J. Virol. Methods*, **158**, 51–57.

BRETZINGER A., FISCHER-SCHERL T., OUMOUNA M., HOFFMANN R. & TRUYEN U. (1999). Mass mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **19**, 182–185.

COSTES B., STALIN RAJ V., MICHEL B., FOURNIER G., THIRION M., GILLET L., MAST J., LIEFFRIG F., BREMONT

M. & VANDERPLASSCHEN A. (2009). The major portal of entry of koi herpes virus in *Cyprinus carpio* is the skin. *J. Virol.*, **83**, 2819–2830.

DISHON A., PERELBERG A., BISHARA-SHIEBAN J., ILOUZE M., DAVIDOVICH M., WERKER S. & KOTLER M.

(2005). Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7285–7291..

DIXON P.F., JOINER C.L., WAY K., REESE R.A., JENEY G. & JENEY Z. (2009). Comparison of the resistance of selected families of common carp, *Cyprinus carpio* L., to koi herpesvirus: preliminary study. *J. Fish Dis.*, **32**, 1035– 1039.

EL-MATBOULI M. & SOLIMAN H. (2011). Transmission of cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) from goldfish to naïve common carp by cohabitation. *Res. Vet. Sci.*, **90**, 536–539.

GARVER K.A., AL-HUSSINEE L., HAWLEY L.M., SCHROEDER T., EDES S., LEPAGE V., CONTADOR E., RUSSELL S., LORD S., STEVENSON R.M.W., SOUTER B., WRIGHT E. & LUMSDEN J.S. (2010). Mass mortality associated

with koi herpesvirus in wild common carp in Canada. *J. Wildl. Dis.*, **46**, 1242–1251.

GILAD O., YUN S., ADKISON M.A., WAY K., WILLITS N.H., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2003). Molecular

comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J. Gen. Virol.*, **84**, 2661–2667.

GILAD O., YUN S., ZAGMUTT-VERGARA F.J., LEUTENEGGER C.M., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2004).

Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 179–187.

HAENEN O.L.M., WAY K., BERGMANN S.M. & ARIEL E. (2004). The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **24**, 293–307.

HARAMOTO E., KITAJIMA M., KATAYAMA H. & OHGAKI S. (2007). Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan. *J. Fish Dis.*, **30**, 59–61.

HEDRICK R.P., GILAD O., YUN S., SPANGENBERG J.V., MARTY G.D., NORDHAUSEN R.W., KEBUS M.J.,

BERCOVIER H. & ELDAR A. (2000). A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 44–57.

HEDRICK R.P., WALTZEK T.B. & MCDOWELL T.S. (2006). Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish and goldfish x common carp hybrids to cyprinid herpesvirus-2 and herpesvirus-3. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 26–34.

ILOUZE M., DAVIDOVICH M., DIAMANT A., KOTLER M. & DISHON A. (2011). The outbreak of carp disease caused by CyHV-3 as a model for new emerging viral diseases in aquaculture: a review. *Ecol. Res.*, **26**, 885–892.

ITO T., SANO M., KURITA J., YUASA K. & IIDA T. (2007). Carp larvae are not susceptible to koi herpesvirus. *Fish Pathol.*, **42**, 107–109.

KASAI H., MUTO Y. & YOSHIMIZU M. (2005). Virucidal effects of ultraviolet, heat treatment and disinfectants against koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.*, **40**, 137–138.

KEMPTER J., SADOWSKI J., SCHUTZE H., FISCHER U., DAUBER M., FICHTNER D., PANICZ R. & BERGMANN S.M. (2009). Koi herpesvirus: Do Acipenserid restitution programs pose a threat to carp farms in the disease free zones? *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **39**, 119–126.

KIELPINSKI M., KEMPTER J., PANICZ R., SADOWSKI J., SCHUTZE H., OHLEMEYER S. & BERGMANN S.M. (2010). Detection of KHV in freshwater mussels and crustaceans from ponds with KHV history in common carp (*Cyprinus carpio*). *Israeli J. Aquaculture (Bamidgeh)*, **62**, 28–37.

MINAMOTO T., HONJO M.N., YAMANAKA H., TANAKA N., ITAYAMA T. & KAWABATA Z. (2010). Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. *Res. Vet. Sci.*, **90**, 530–532.

MICHEL B., LEROY B., STALIN RAJ V., LIEFFRIG F., MAST J., WATTIEZ R., VANDERPLASSCHEN A.F. & COSTES B. (2010). The genome of cyprinid herpesvirus-3 encodes 40 proteins incorporated in mature virions. *J. Gen. Virol.*, **91**, 452–462.

NOVOTNY L., POKOROVA D., RESCHOVA S., VICENOVA M., AXMANN R., VESELY T. & MIKLER J.R. (2010). First clinically apparent koi herpesvirus infection in the Czech Republic. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **30**, 85–91.

PERELBERG A., SMIRNOV M., HUTORAN M., DIAMANT A., BEJERANO Y. & KOTLER M. (2003). Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *Israeli J. Aquaculture*, **55**, 5–12.

PIKARSKY E., RONEN A., ABRAMOWITZ J., LEVAVI-SIVAN B., HUTORAN M., SHAPIRA Y., STEINITZ M., PERELBERG A., SOFFER D. & KOTLER M. (2004). Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J. Virol.*, **78**, 9544–9551.

PIKULKAEW S., MEEYAM T. & BANLUNARA W. (2009). The outbreak of Koi herpesvirus (KHV) in Koi (*Cyprinus carpio koi*) from Chiang Mai Province, Thailand. *Thai J. Vet. Med.*, **39**,

SANO M., ITO T., KURITA J., YANAI T., WATANABE N., MIWA S. & IIDA T. (2004). First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol.*, **39**, 165–167.

SHAPIRA Y., MAGEN Y., ZAK T., KOTLER M., HULATA G. & EVAVI-SIVAN B. (2005). Differential resistance to koi herpesvirus (KHV)/carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains and crossbreds. *Aquaculture*, **245**, 1–11.

SHIMIZU T., YOSHIDA N., KASAI H. & YOSHIMIZU M. (2006). Survival of koi herpesvirus (KHV) in environmental water. *Fish Pathol.*, **41**, 153–157.

ST-HILAIRE S., BEEVERS N., JOINER C., HEDRICK R.P. & WAY K. (2009). Antibody response of two populations of common carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to koi herpesvirus. *J. Fish Dis.*, **32**, 311–320.

ST-HILAIRE S., BEEVERS N., WAY K., LE DEUFF R.M., MARTIN P. & JOINER C. (2005). Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 15–23.

SUNARTO A., MCCOLL K.A., CRANE M.S., SUMIATI T., HYATT A.D., BARNES A.C. & WALKER P.J. (2011).

Isolation and characterization of koi herpesvirus (KHV) from Indonesia: identification of a new genetic lineage. *J. Fish Dis.*, **34**, 87–101.

TAYLOR N., WAY K., DIXON P.F., PEELER E.J., JEFFREY K. & DENHAM K.L. (2010). Koi herpesvirus (KHV):

distribution and prospects for control in England and Wales. *J. Fish Dis.*, **33**, 221–230.

UCHII K., MATSUI K., IIDA T. & KAWABATA Z. (2009). Distribution of the introduced cyprinid herpesvirus-3 in a wild population of common carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.*, **32**, 857–864.

WALTZEK T.B., KELLEY G.O., STONE D.M., WAY K., HANSON L., FUKUDA H., HIRONO I., AOKI T., DAVISON A.J.

& HEDRICK R.P. (2005). Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae*. *J. Gen. Virol.*, **86**, 1659–1667.

WALTZEK T.B., KELLEY G.O., ALFARO M.E., KUROBE T., DAVISON A.J. & HEDRICK R.P. (2009). Phylogenetic

relationships in the family *Alloherpesviridae*. *Dis. Aquat. Org.*, **84**, 179–194.

YUASA K., ITO T. & SANO M. (2008). Effect of water temperature on mortality and virus shedding in carp experimentally infected with koi herpesvirus. *Fish Pathol.*, **43**, 83–85.

YUASA K., SANO M., KURITA J., ITO T. & IIDA T. (2005). Improvement of a PCR method with the Sph 1–5 primer set for the detection of koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.*, **40**, 37–39.

*
* *

NB: Имеются Референтные лаборатории МЭБ по герпесвирусу карпа кои (см. таблицу в конце данного Руководства по водным животным или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Просим обращаться в Референтные лаборатории МЭБ для получения любой дополнительной информации по герпесвирусу карпа кои)

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2006 г.; ПОСЛЕДНЕЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2019 г.

ИРИДОВИРУСНАЯ БОЛЕЗНЬ КРАСНОГО МОРСКОГО КАРАСЯ

1. Область применения⁴⁹

В целях данной главы, причиной иридовirusной болезни красного морского карася (RSIVD) (Inoue с соавт., 1992) считается инфицирование иридовirusом красного морского карася (RSIV).

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

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

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

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

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

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

2. Сведения о болезни

2.1. Характеристика возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

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

2.1.2. Выживание вне организма хозяина

Нет данных.

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

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

2.1.4. Жизненный цикл

Неприменимо.

2.2. Характеристики хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Нижеследующие виды восприимчивы к RSIV: красный морской карась (*Pagrus major*), дальневосточный морской карась (*Acanthopagrus schlegeli*), крупночешуйный

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

2.2.2. Восприимчивые стадии развития хозяина

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

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность обнаружения)

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

2.2.4. Поражаемые органы и ткани

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

2.2.5. Хроническая инфекция и постоянные носители

Нет данных.

2.2.6. Переносчики

Нет данных.

2.2.7. Известные или подозреваемые носители среди диких гидробионтов

Нет данных.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Пути передачи

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

2.3.2. Превалентность

Болезнь наблюдается у разводимых популяций.

2.3.3. Географическое распространение

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

2.3.4. Смертность и заболеваемость

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

2.3.5. Факторы окружающей среды

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

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

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

2.4.2. Химиотерапия

Нет данных.

2.4.3. Иммуностимуляция

Проводятся исследования.

2.4.4. Разведение с целью повышения устойчивости

Проводятся исследования.

2.4.5. Восполнение популяции с помощью устойчивых видов

Проводятся исследования.

2.4.6. Блокирующие агенты

Нет данных.

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Нет данных.

2.4.8. Общие практики разведения

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

3. Отбор проб

3.1. Выбор отдельных образцов

Отбор рыбы в предсмертном состоянии.

3.2. Хранение проб для анализа

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

3.3. Объединение проб

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

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

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

3.5. Не подходящие для использования пробы/ткани

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

4. Методы диагностики

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

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

4.1.2. Изменения в поведении

Пораженная рыба плавает неактивно, частота дыхания становится аномальной, что явно заметно и вызывается анемией.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

Бледные жабры и увеличенная селезенка.

4.2.2. Клиническая химия

Низкая гематокритная величина.

4.2.3. Микроскопическая патология

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

4.2.4. Влажные препараты

Нет.

4.2.5. Мазки

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

4.2.6. Фиксированные срезы

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

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

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

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Нет.

4.3.1.1.2. Мазки

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

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

По результатам исследования гистологических срезов от пораженной рыбы могут быть обнаружены аномально увеличенные клетки селезенки, сердца, почек, печени, кишечника или жабр. Такие увеличенные клетки могут реагировать на моноклональные антитела против RSIV в иммуногистохимическом анализе. Однако, данный метод еще полностью не валидирован.

4.3.1.2. Изоляция и идентификация возбудителя

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

4.3.1.2.1. Клеточная культура /искусственная среда

4.3.1.2.1.1. Инокуляция клеточных монослоев

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

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

4.3.1.2.1.2. Мониторинг процесса инкубации

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

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

Если осуществляется программа надзора/контроля за здоровьем рыбы, может возникнуть необходимость принять меры по приостановлению утвержденного статуса здоровья производственного объекта и/или зоны (если она была утверждена ранее), из которой был взят образец, предположительно позитивный на наличие вируса. Приостановление утвержденного статуса будет продолжаться до тех пор, пока не будет доказано, что данный вирус не является RSIV или ISKNV.

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

4.3.1.2.1.3. Процедуры посева

- i) Собрать аликвоты клеточной культуральной среды из всех монослоев, инокулированных с разбавлениями каждого супернатанта тестового гомогената.
- ii) Инокулировать монослои клеток, как описано выше (Инокуляция монослоев клеток, этапы i и ii).
- iii) Инкубировать и наблюдать, как описано выше (Инкубация монослоев клеток, этапы i и ii и Мониторинг этапов инкубации i и ii).

В случае отсутствия ЦПЭ тест может быть объявлен отрицательным.

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

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

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

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

4.3.1.2.2.1. Процедура проведения исследования

- i) Тщательно обескровить рыбу.
- ii) Сделать отпечатки селезенки на очищенных стеклянных предметных стеклах микроскопа.
- iii) Хранить образцы селезенки при температуре 4°C вместе с другими органами, необходимыми для изоляции вируса, в случае, если это понадобится позднее.
- iv) Дать отпечаткам высохнуть на воздухе в течение 20 минут.
- v) Зафиксировать отпечатки холодным ацетоном.
- vi) Обработать отпечатки раствором моноклональных антител (M10) в течение 30 минут при температуре 37°C во влажной камере.
- vii) Промыть три раза фосфатно-буферным солевым раствором (PBS).
- viii) Инкубировать отпечатки в течение 30 минут при 37°C во влажной камере с раствором специфического антитышинного антитела, конъюгированного флуоресцеиновым изотиоцианатом (FITC), подготовленного в соответствии с

инструкциями поставщика. Эти антитела ФИТЦ чаще всего являются антителами кролика или козы.

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

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

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

4.3.1.2.2.2. Уровни валидации

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

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

4.3.1.2.2.3. Интерпретация результатов

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

4.3.1.2.2.4. Доступность проведения исследования

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

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

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

4.3.1.2.3.1. Непрямая реакция флуоресцирующих антител

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

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

IFAT проводится непосредственно после выделения вируса в клеточной культуре.

4.3.1.2.3.1.1. Процедура проведения исследования

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

4.3.1.2.3.1.2. Уровни валидации

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

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

4.3.1.2.3.1.2. Интерпретация результатов

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

4.3.1.2.3.1.3. Доступность проведения исследования

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

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.4.1. Полимеразная цепная реакция

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

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

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

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

4.3.1.2.4.1.2. Амплификация полимеразной цепной реакции

RSIV и ISKNV имеют большие геномы двухцепочечной ДНК. Для амплификации последовательности генов (570 оснований) ДНК обоих вирусов - RSIV и ISKNV методом ПЦР используется набор праймеров, прямой праймер 1-F (5'-CTC-AAA-CAC-TCT-GGC-TCA-TC-3') и обратный праймер 1-R (5'-GCA-CCA-ACA-CAT-CTC-CTA-TC-3') (Kurita с соавт., 1998). (Следует обратить внимание, что предыдущие праймеры МЭБ, специфичные RSIV, 4-F [5'-CGG-GGG-CAA-TGA-CGA-CTA-CA-3'] и 4-R [5'-CCG-CCT-GTG-CCT-TTT-CTG-GA-3'; ожидаемый размер продукта - 568 п.о.] не амплифицируют ДНК ISKNV [Oseko с соавт., 2004]). Оба набора праймеров описаны Kurita с соавт., 1998.

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

4.3.1.2.4.1.3. Уровни валидации

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

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

4.3.1.2.4.1.4. Интерпретация результатов

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

4.3.1.2.4.1.5. Доступность проведения исследования

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

4.3.1.2.5. Очистка возбудителя

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

4.3.2. Серологические методы

Серологические методы с использованием сыворотки пораженной рыбы еще не разработаны.

5. Рейтинг исследований по цели использования

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

Таблица 5.1. Методы целевого мониторинга и диагностики

Метод	Целевое наблюдение				Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	Послелички	Ювенильные особи	Взрослые особи		
Общие признаки	d	d	d	d	b	d
Биопроба (изоляция вируса в клеточной культуре) и идентификация методом IFAT или ПЦР	c	c	c	c	a	a
Прямая световая микроскопия	d	d	c	d	b	d
Гистопатология	d	d	d	d	b	d
Трансмиссионная электронная микроскопия	d	d	d	d	b	d
Анализ на основе антител (IFAT) изолированного вируса или мазка-	c	c	c	c	a	a/b

отпечатка						
ПЦР	c	c	c	c	a	a
Секвенирование	d	d	d	d	a	a

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

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

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

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Определение случая с подозрением на болезнь

Подозревается наличие RSIV или ISKNV при одном из нижеперечисленных критериев:

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

7.2. Определение случая с подтвержденным наличием болезни

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

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

8. Список литературы

CHOI S.K., KWON S.R., NAM Y.K., KIM S.K. & KIM K.H. (2006). Organ distribution of red sea bream iridovirus (RSIV) DNA in asymptomatic yearling and fingerling rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and effects of water temperature on transition of RSIV into acute phase. *Aquaculture*, 256, 23–26.

- CHOU H.Y., HSU C.C. & PENG T.Y. (1998). Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. *Fish Pathol.*, 33, 201–206.
- DO J.W., CHA S.J., KIM J.S., AN E.J., PARK M.S., KIM J.W., KIM Y.C., PARK M.A. & PARK J.W. (2005). Sequence variation in the gene encoding the major capsid protein of Korean fish iridoviruses. *Arch. Virol.*, 150, 351–359.
- DO J.W., MOON C.H., KIM H.J., KO M.S., KIM S.B., SON J.H., KIM J.S., AN E.J., KIM M.K., LEE S.K., HAN M.S., CHA S.J., PARK M.S., PARK M.A., KIM Y.C., KIM J.W. & PARK J.W. (2004). Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. *Virology*, 325, 351–363.
- GIBSON-KUEH S., NGOH-LIM G.H., NETTO P., KURITA J., NAKAJIMA K. & NG M.L. (2004). A systematic iridoviral disease in mullet, *Mugil cephalus* L. and tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal: a first report and study. *J. Fish Dis.*, 27, 693–699.
- HE J.G., DENG M.S., WENG P., LI Z., ZHOU S.Y., LONG Q.X., WANG X.Z. & CHANG S.M. (2001). Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, 291, 126–139.
- INOUE K., YAMANO K., MAENO Y., NAKAJIMA K., MATSUOKA M., WADA Y. & SORIMACHI M. (1992). Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 27, 19–27.
- JEONG J.B., JUN J.L., YOO M.H., KIM M.S., KOMISAR J.L. & JEONG H.D. (2003). Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, 220, 119–133.
- JEONG J.B., KIM H.Y., KIM H.K., CHUNG J.K., KOMISAR J.L. & JEONG H.D. (2006). Molecular comparison of iridoviruses isolated from marine fish cultured in Korea and imported from China. *Aquaculture*, 255, 105–116.
- JEONG J.B., PARK K.H., KIM H.Y., HONG S.H., CHUNG J.K., KOMISAR J.L. & JEONG H.D. (2004). Multiplex PCR for the diagnosis of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, 235, 139–152.
- JUNG S., MIYAZAKI T., MIYATA M., DANAYADOL Y. & TANAKA S. (1997). Pathogenicity of iridovirus from Japan and Thailand for the red sea bream *Pagrus major* in Japan, and histopathology of experimentally infected fish. *Fisheries Sci.*, 63, 735–740.
- JUNG S.J. & OH M.J. (2000). Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. *J. Fish Dis.*, 23, 223–226.
- KASORNCHANDRA J. & KHONGPRADIT R. (1997). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic iridovirus in nursing grouper, *Epinephelus marabarcus*. In: *Diseases in Asian Aquaculture III*. Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 61–66.
- KAWAKAMI H. & NAKAJIMA K. (2002). Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1996 to 2000. *Fish Pathol.*, 37, 45–47.

- KIM Y.J., JUNG S.J., CHOI T.J., KIM H.R., RAJENDRAN K.V. & OH M.J. (2002). PCR amplification and sequence analysis of irido-like virus infecting fish in Korea. *J. Fish Dis.*, 25, 121–124.
- KURITA J., NAKAJIMA K., HIRONO I. & AOKI T. (1998). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.*, 33, 17–23.
- KURITA J., NAKAJIMA K., HIRONO I. & AOKI T. (2002). Complete genome sequencing of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fisheries Sci.*, 68 (suppl. II), 1113–1115.
- KURITA J., NGOH-LIM G.H., GIBSON-KUEH S., DE LA PENA L., CHUAH T.T., PALAMISAMY V., SANO M., OSEKO N., MAENO Y. & NAKAJIMA K. (2004). Phylogenetic analysis of red sea bream iridovirus-like viruses in Southeast Asia. In: 7th Asian Fisheries Forum 04 Abstracts, Penang, Malaysia, 381.
- KUSUDA R., NAGATO K. & KAWAI K. (1994). Characteristics of an iridovirus isolated from red sea bream, *Pagrus major*. *Suisanzoshoku*, 42, 151–156.
- MATSUOKA S., INOUE K. & NAKAJIMA K. (1996). Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1991 to 1995. *Fish Pathol.*, 31, 233–234.
- MIYATA M., MATSUNO K., JUNG S.J., DANAYADOL Y. & MIYAZAKI T. (1997). Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. *J. Fish Dis.*, 20, 127–134.
- MURALI S., WU M.F., GUO I.C., CHEN S.C., YANG H.W. & CHANG C.Y. (2002). Molecular characterization and pathogenicity of a grouper iridovirus (GIV) isolated from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, 25, 91–100.
- NAKAJIMA K. & KURITA J. (2005). Red sea bream iridoviral disease. *Uirusu.*, 55, 115–126.
- NAKAJIMA K. & MAENO Y. (1998). Pathogenicity of red sea bream iridovirus and other fish iridoviruses to red sea bream. *Fish Pathol.*, 33, 143–144.
- NAKAJIMA K., MAENO Y., FUKUDOME M., FUKUDA Y., TANAKA S., MATSUOKA S. & SORIMACHI M. (1995). Immunofluorescence test for the rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using monoclonal antibody. *Fish Pathol.*, 30, 115–119.
- NAKAJIMA K., MAENO Y., HONDA A., YOKOYAMA K., TOORIYAMA T. & MANABE S. (1999). Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. *Dis. Aquat. Org.*, 36, 73–75.
- NAKAJIMA K., MAENO Y., KURITA J. & INUI Y. (1997). Vaccination against red sea bream iridoviral disease in red sea bream. *Fish Pathol.*, 32, 205–209.
- NAKAJIMA K., MAENO Y., YOKOYAMA K., KAJI C. & MANABE S. (1998). Antigen analysis of red sea bream iridovirus and comparison with other fish iridoviruses. *Fish Pathol.*, 33, 73–78.
- NAKAJIMA K. & SORIMACHI M. (1994). Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 29, 29–33.
- NAKAJIMA K. & SORIMACHI M. (1995). Production of monoclonal antibodies against red sea bream iridovirus. *Fish Pathol.*, 30, 47–52.

OSEKO N., CHUAH T.T., PALAMISAMY V., MAENO Y. & KURITA J. (2004). Iridovirus isolated from diseased sea bass *Lateolabrax niloticus* and red drum *Sciaenops ocellatus* causing mass mortality in Malaysia. In: 7th Asian Fisheries Forum 04 Abstracts, Penang, Malaysia, 127.

OSHIMA S., HATA J., HIRASAWA N., OHTAKA T., HIRONO I., AOKI T. & YAMASHITA S. (1998). Rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using the polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, 32, 87–90.

OSHIMA S., HATA J., SEGAWA C., HIRASAWA N. & YAMASHITA S. (1996). A method for direct DNA amplification of uncharacterized DNA viruses and for development of a viral polymerase chain reaction assay: Application to the red sea bream iridovirus. *Anal. Biochem.*, 242, 15–19.

QIN Q.W., CHANG S.F., NGOH-LIM G.H., GIBSON-KUEH S., SHI C. & LAM T.J. (2003). Characterization of a novel

ranavirus isolated from grouper *Epinephelus tauvina*. *Dis. Aquat. Org.*, 53, 1–9.

QIN Q.W., LAM T.J., SHEN H., CHANG S.F., NGOH G.H. & CHEN C.L. (2001). Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*. *J. Virol. Methods*, 98, 17–24.

SHI C.Y., JIA K.T., YANG B. & HUANG J. (2010). Complete genome sequence analysis of a Megalocytivirus (family Iridoviridae) associated with turbot mortality in China. *Virol. J.*, 7, 159.

SHI C.Y., WANG Y.G., YANG S.L., HUANG J. & WANG Q.Y. (2004). The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China. *Aquaculture*, 236, 11–25.

SONG W.J., QIN Q.W., QIU J., HUANG C.H., WANG F. & HEW C.L. (2004). Functional genomic analysis of Singapore grouper iridovirus: Complete sequence determination and proteomic analysis. *J. Virol.*, 78, 12576–12590.

SUDTHONGKONG C., MIYATA M. & MIYAZAKI T. (2002a). Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. *Dis. Aquat. Org.*, 48, 163–173.

SUDTHONGKONG C., MIYATA M. & MIYAZAKI T. (2002b). Viral DNA sequences of genes encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South China Sea and Southeast Asian countries. *Arch. Virol.*, 147, 2089–2109.

*

* *

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

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

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

ВЕСЕННЯЯ ВИРЕМИЯ КАРПОВ

1. Предмет рассмотрения⁵⁰

Весенняя виремия карпов (ВБК/SVC) - это рабдовирусная инфекция, способная вызвать острую геморрагическую и контагиозную виремию у некоторых видов карпа и некоторых других видов карповых и иctalуровых. В контексте данной главы ВБК считается инфекцией вирусом весенней виремии карпов (вирусом ВБК). 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 ВБК является вирус весенней виремии карпов (вирус ВБК), 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 ВБК 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 ВБК или рабдовирус щуки (PFRV) с помощью серологических методов исследования. Анализ показал, что изоляты можно разделить на четыре отдельные геногруппы и что все изоляты вируса ВБК 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

⁵⁰ NB: Версия адаптирована Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012.

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 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⁻¹ 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 жабу. 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) (*Ctenopharyngodon 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* [= *Gibelion catla*]), являются хозяевами вируса ВВК (Haghighi Khiabani 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 Khiabani 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 Khiabani 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, гулли (*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 которыми 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) переносят 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. Дикie 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 ВБК 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 ВБК 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 ВБК 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 ВБК 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 ВБК. 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 ВБК *in vitro*, но он не тестировался в условиях выращивания карпа.

2.4.3. Иммуностимуляция

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

2.4.4. Племенное разведение с целью повышения резистентности

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

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 ≤ 4 см), целые внутренние органы, включая почку и мозг (> 4 см длины тушки ≤ 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 жаберы, 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 α -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.

4.3.1.3. 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 удалённой 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 см² 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 pH 7,6 и обогащенную 2% фетальной телячьей сывороткой (FCS) (1 мл/лунка для 24-луночных планшетов для культивирования клеток). Инкубировать при 20 °C.

4.3.1.2.1.4. Мониторинг инкубации

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

Поддерживать pH 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-этансульфоокислота) или 2 М трис (Трис [гидроксиметил]) аминметан /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 посреством 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 см²) 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⁻¹ 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), pH 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 см² 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 pH 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, pH 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 ° C.
- vii) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- viii) Добавить в лунки 200 мкл MAb, конъюгированные с пероксидазой хрена

(HRPO), или поликлональные антитела к вирусу ВВК; или поликлональные IgG к вирусу ВВК. Белок МАb к N белку, специфичному для домена, отличного от домена, сенсibilизированного Mab, и ранее конъюгированного с биотином, также может использоваться. Инкубировать в течение 1 часа при 37 °C.

- 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 °C.
- xi) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- xii) Добавить 200 мкл подходящего субстрата и хромогена, такого как дигидрохлорид 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 в течение 20 минут.
- v) Зафиксировать в холодном ацетоне (хранится при температуре около -20°C) для предметных стекол или в 80% ацетоне в воде или в 30% ацетоне в этаноле, также при температуре около -20°C, 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°C.
- 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°C.
- 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 постараться избежать испарения.

- х) 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 другим блокирующим раствором 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 Р-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 MAb, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO) или поликлональные антитела к вирусу ВВК; или поликлональные IgG к вирусу ВВК. Также может быть использован белок

MAb-N, специфичный для домена, отличного от домена сенсibilизированного MAb 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 ВБК состоит из одной цепи РНК размером приблизительно 11 т.п.н. с отрицательной полярностью. Амплификацию фрагмента кДНК вируса ВБК длиной 714 п.н. проводят с использованием праймеров, полученных из последовательностей области, кодирующей ген гликопротеина: 5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR * -R * TC-3 '(SVCV F1) и 5'-AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH * -ACN * -CAY * -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 ReagentT (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 КCl, 10 мМ DTT, 3 мМ MgCl₂), содержащего 1 мМ dNTP, 100 пмоль праймера вируса ВБК 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 MgCl₂, 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 MgCl₂, 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 Piru (инвентарный номер Genbank D26175). Затем были разработаны праймеры для отжига областей, кодирующих консервативные аминокислоты, с использованием опубликованной последовательности для вируса ВБК (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 ВБК, и это было изучено, главным образом, после образования антител. Гуморальный иммунный ответ зависит от температуры воды. После заражения вирусом ВБК 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: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = 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 «а» 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 макроскопическим 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 линия). 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® 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 viremia 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 рефрентные 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.

ВЕСЕННЯЯ ВИРЕМИЯ КАРПОВ

1. Предмет рассмотрения⁵¹

Весенняя виремия карпов (ВБК/SVC) - это рабдовирусная инфекция, способная вызвать острую геморрагическую и контагиозную виремию у некоторых видов карпа и некоторых других видов карповых и иctalуровых. В контексте данной главы ВБК считается инфекцией вирусом весенней виремии карпов (вирусом ВБК). 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 ВБК является вирус весенней виремии карпов (вирус ВБК), 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 ВБК 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 ВБК или рабдовирус щуки (PFRV) с помощью серологических методов исследования. Анализ показал, что изоляты можно разделить на четыре отдельные геногруппы и что все изоляты вируса ВБК 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

⁵¹ NB: Версия адаптирована Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012.

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 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⁻¹ 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 жабу. 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) (*Ctenopharyngodon 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* [= *Gibelion catla*]), являются хозяевами вируса ВВК (Haghighi Khiabani 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 Khiabani 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 Khiabani 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, гулли (*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 которыми 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. Дикie 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 ВБК 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 ВБК 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 ВБК 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 ВБК 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 ВБК. Безопасная и эффективная вакцина в настоящее время недоступна. Тем не менее, ряд экспериментальных инаktivированных 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 ВБК *in vitro*, но он не тестировался в условиях выращивания карпа.

2.4.3. Иммуностимуляция

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

2.4.4. Племенное разведение с целью повышения резистентности

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

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 ≤ 4 см), целые внутренние органы, включая почку и мозг (> 4 см длины тушки ≤ 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 жаберы, 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 α -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.

4.3.1.3. 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 удалённой 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 см² монослой 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 pH 7,6 и обогащенную 2% фетальной телячьей сывороткой (FCS) (1 мл/лунка для 24-луночных планшетов для культивирования клеток). Инкубировать при 20 °C.

4.3.1.2.1.4. Мониторинг инкубации

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

Поддерживать pH 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-этансульфоокислота) или 2 М трис (Трис [гидроксиметил]) аминметан /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

- x) 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.
- xi) Развести вирус-содержащую среду от 10^{-2} до 10^{-4} .
- xii) 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.
- xiii) Параллельно, должны быть проведены другие реакции нейтрализации против:
- Гомологичного вирусного штамма (положительная реакция нейтрализации),
 - Гетерологичного вирусного штамма (отрицательная реакция нейтрализации).
- xiv) Инкубировать все смеси при температуре 20°C в течение одного часа.
- xv) 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.
- xvi) 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.
- xvii) 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.
- xviii) 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 посреством 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)

- xvi) Подготовить монослои клеток в лунках (2 см²) 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
- xvii) 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.
- xviii) Развести контрольную вирусную суспензию вируса ВВК аналогичным образом, чтобы получить титр вируса примерно 5000-10000 БОЕ мл⁻¹ в среде для культивирования клеток.
- xix) Инкубировать при температуре 20°C в течение 24 часов.
- xx) Удалить среду для культивирования клеток, промыть один раз 0,01 М фосфатно-буферным раствором (ФБР), pH 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 см² клеточного монослоя.
- xxi) Дать клеточным монослоям высохнуть на воздухе в течение не менее 30 минут и немедленно обработать их или заморозить при -20°C.
- xxii) 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.
- xxiii) 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.
- xxiv) 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).

xxv) Инкубировать клеточные монослои с раствором антитела в течение 1 часа при 37°C во влажной камере и не допускать испарения.

xxvi) Промыть четыре раза в ФБРТ.

xxvii) 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.

xxviii) Промыть четыре раза в ФБРТ.

xxix) Немедленно просмотреть обработанные клеточные монослои на пластиковых подложках или установить слайды или покровные стекла, используя физиологический раствор глицерина с pH 8,5 или имеющийся в продаже держатель.

xxx) 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)

xiii) Покрыть лунки микропланшетов, разработанных для ИФА, соответствующими разведениями очищенных иммуноглобулинов (Ig), специфичных для вируса ВВК, в 0,02 М карбонатном буфере, pH 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 нуклеокапсиды (N). Инкубировать в течение ночи при температуре 4°C.

xiv) Промыть четыре раза в ФБРТ.

xv) Блокировать обезжиренным молоком (5% в карбонатном буфере) или другим блокирующим раствором в течение 1 часа при 37°C (300 мкл/лунка).

xvi) Промыть четыре раза в ФБРТ.

xvii) Добавить 2% неионогенное моющее средство (Triton X-100 или Nonidet P-40) к суспензии вируса, которую необходимо идентифицировать.

xviii) 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 ° C.

xix) Промыть четыре раза в ФБРТ.

xx) Добавить в лунки 200 мкл MAb, конъюгированные с пероксидазой хрена

(HRPO), или поликлональные антитела к вирусу ВВК; или поликлональные IgG к вирусу ВВК. Белок МАb к N белку, специфичному для домена, отличного от домена, сенсibilизированного Mab, и ранее конъюгированного с биотином, также может использоваться. Инкубировать в течение 1 часа при 37 °С.

xxi) Промыть четыре раза в ФБРТ.

xxii) 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.

xxiii) Промыть четыре раза в ФБРТ.

xxiv) Добавить 200 мкл подходящего субстрата и хромогена, такого как дигидрохлорид 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

xv) Тщательно обескровить рыбу.

xvi) Сделать отпечатки почек на очищенных предметных стеклах или на дне лунок пластикового планшета для культивирования клеток.

xvii) 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.

xviii) Оставьте отпечаток для просушивания на воздухе в течение 20 минут.

xix) Зафиксировать в холодном ацетоне (хранится при температуре около -20°C) для предметных стекол или в 80% ацетоне в воде или в 30% ацетоне в этаноле, также при температуре около -20°C, 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°C.

xx) 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°C.

xxi) Промыть четыре раза в ФБРТ, по 5 минут для каждой промывки. Предметные стекла или пластиковые планшеты для культивирования можно осторожно потряхивать во время промывки.

xxii) Приготовить раствор очищенного антитела или сыворотки к вирусу ВВК в ФБРТ при соответствующем разведении (что было установлено ранее или как указано поставщиком реагентов).

xxiii) Инкубировать отпечатки раствором антител в течение 1 часа при температуре 37°C во влажной камере и постараться избежать испарения.

- xxiv) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- xxv) 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.
- xxvi) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- xxvii) 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.
- xxviii) 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.

- xi) 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).
- xii) Инкубировать в течение ночи при температуре 4°C.
- xiii) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- xiv) Блокировать обезжиренным молоком (5% в карбонатном буфере) или другим блокирующим раствором в течение одного часа при температуре 37°C (300 мкл/лунка).
- xv) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- xvi) Хранить 1/4 аликвоту каждого гомогената при 4°C, если тест отрицательный и требуется выделение вируса в клеточной культуре.
- xvii) Обработать оставшуюся часть гомогената 2% тритоном X-100 или нонидетом P-40 и 2 mM фенилметилсульфонидфторида; аккуратно перемешать.
- xviii) 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.
- xix) Промыть четыре раза в ФБРТ.
- xx) Добавить в лунки 200 мкл MAb, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRPO) или поликлональные антитела к вирусу ВВК; или поликлональные IgG к вирусу ВВК. Также может быть использован белок

MAb-N, специфичный для домена, отличного от домена сенсibilизированного MAb и предварительно конъюгированного с биотином. Инкубировать в течение 1 часа при 37 ° С.

xxvi) Промыть четыре раза в ФБРТ.

xxvii) 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.

xxviii) Промыть четыре раза в ФБРТ.

xxix) Добавить 200 мкл подходящего субстрата и хромогена, такого как диgidрохлорид тетраметилбензидина. Остановить реакцию, когда положительные контроли вступят в реакцию и считать результаты.

xxx) 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 ВБК состоит из одной цепи РНК размером приблизительно 11 т.п.н. с отрицательной полярностью. Амплификацию фрагмента кДНК вируса ВБК длиной 714 п.н. проводят с использованием праймеров, полученных из последовательностей области, кодирующей ген гликопротеина: 5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR * -R * TC-3 '(SVCV F1) и 5'-AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH * -ACN * -CAY * -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 ReagentT (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 КCl, 10 мМ DTT, 3 мМ MgCl₂), содержащего 1 мМ dNTP, 100 пмоль праймера вируса ВБК 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 MgCl₂, 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 MgCl₂, 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 Piru (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: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = 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 «а» 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 макроскопическим 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 линия). 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® 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 viremia 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.

ВИРУСНАЯ ГЕМОМРАГИЧЕСКАЯ СЕПТИЦЕМИЯ

1. Предмет рассмотрения¹

В данной главе вирусная геморрагическая септицемия (VHS) является болезнью, вызываемой инфекцией вирусом вирусной геморрагической септицемии (VHSV, синоним: Egtved вирус).

VHS – болезнь разводимой на ферме радужной форели, разводимого на ферме тюрбо, разводимого на ферме азиатского паралихта, а также широкого круга пресноводных и морских видов (Европейское управление по безопасности пищевых продуктов, 2008; Meyers & Winton, 1995; Skall с соавт., 2005), вызываемая VHSV, вирусом принадлежащим к роду *Novirhabdovirus*, в семействе *Rhabdoviridae* (Walker с соавт., 2000). Все изоляты VHS вируса можно идентифицировать с помощью иммунохимических тестов с использованием моноклонального антитела IP5B11 (Lorenzen с соавт., 1988).

Больная рыба на ранних стадиях инфекции может демонстрировать неспецифические клинические признаки, включая быструю гибель (которая может достигать до 100% у мальков), вялость, потемнение кожи, пучеглазие, анемию (бледные жабры), геморрагии у основания плавников, жабр, глаз и кожи и растянутое брюшко из-за опухоли в брюшной полости. При хронической инфекции у пораженной рыбы внешние признаки обычно не наблюдаются. Может также встречаться нервная форма VHS, которая характеризуется ярко выраженным аномальным поведением при плавании, таким как постоянные всплески и/или движение по спирали. Критерии подтверждающей диагностики кратко изложены в разделе 7 данной главы.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Возбудитель, штаммы возбудителя

Возбудителем VHS является рабдовирус (VHSV), относящийся к роду *Novirhabdovirus*, в семействе *Rhabdoviridae*, которое также включает вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) и рабдовирус Хирам азиатского паралихта (*Paralichthys olivaceus*). Вирионы имеют пулевидную форму (приблизительно 70 нм в диаметре и 180 нм в длину), геном с одноцепочечной РНК негативного смысла приблизительно в 11 000 нуклеотидов и обладают оболочкой, которая содержит мембранный гликопротеин, являющийся нейтрализующим поверхностным антигеном. Геном кодирует шесть белков: нуклеопротеин, N; фосфопротеин, Р (ранее обозначаемый, как М1); матриксный белок, М (ранее обозначаемый, как М2); гликопротеин, G; невирионный протеин, NV и полимеразу, L (Walker с соавт., 2000).

Радужная форель, у которой VHSV может вызывать вспышки тяжелой болезни, является традиционным хозяином данного вируса, но многие другие виды

¹ NB: Версия, принятая Всемирной Ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 г.

пресноводной и морской рыбы также восприимчивы к болезни. Естественные вспышки происходили у разводимого на ферме тюрбо (Ross с соавт., 1994; Schlottfeldt с соавт., 1991) и как у разводимого на ферме, так и у дикого азиатского паралихта (Isshiki с соавт., 2001; Takano с соавт., 2000). Вдоль тихоокеанского побережья Северной Америки наблюдалась гибель от естественной инфекции у свободно обитающих видов морской рыбы (Meyers с соавт., 1999; Traxler с соавт., 1999). Кроме того, было выявлено, что изоляты, выделенные у тихоокеанской сельди, были патогенными для тихоокеанской сельди в экспериментальных условиях (Kosan с соавт., 1997). Обзор представлен у Skall с соавт., 2005. Вспышки VHS также наблюдались у диких пресноводных видов рыбы в Великих озерах (Elsayed с соавт., 2006; Grooscock с соавт., 2007; Lumsden с соавт., 2007).

Большой круг хозяев и значительные различия в патогенности у различных видов-хозяев могут представлять проблему при осуществлении программ контроля VHS, основной задачей которых является защита важной отрасли по производству радужной форели. Основная проблема состоит в том, должно ли обнаружение морского VHS вируса у свободно обитающей рыбы в утвержденной VHSV-свободной зоне приводить к аннулированию данного статуса свободы. Однако по результатам наблюдений в большей части Европы наличие VHS у свободно обитающей рыбы в морской окружающей среде лишь в нескольких случаях оказывало негативное воздействие на утвержденный статус свободы от VHS. Тем не менее, последняя вспышка у радужной форели в Норвегии была вызвана VHS вирусом генотипа III, морской генотип, который до этого момента считался непатогенным для радужной форели (Dale et al., 2009), что указывает на определенную значимость морских штаммов для отрасли по производству радужной форели.

Моноклональные антитела (MAb) IP5B11 (Lorenzen с соавт., 1988) вступают в реакцию со всеми изолятами VHS вируса всех известных генотипов и серотипов.

Большинство поликлональных антител против VHS вируса типа I (DK-F1) вступают в перекрестную реакцию со всеми изолятами VHS вируса в непрямой реакции флюоресцирующих антител (IFAT) и твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA). Однако по результатам реакции нейтрализации VHS вирус можно разделить на три подгруппы на основании паттерна нейтрализации при исследовании против панели из четырех нейтрализующих MAbs и одного поликлонального антитела (Olesen с соавт., 1993). Таким образом, VHS вирус имеет несколько общих антигенных детерминант, хотя серогруппирование не коррелирует с генотипами, идентифицированными с помощью анализа последовательностей нуклеиновых кислот. Были получены MAbs, вступающие в специфическую реакцию с различными группами VHS вируса, например, изолятами американской/японской геногруппы IVa и геногруппы Ib (Ito с соавт., 2010; Ito с соавт., рукопись находится в процессе подготовки).

Наиболее эффективным дифференцирующим способом типирования VHS вируса является секвенирование нуклеиновых кислот. Сравнение последовательностей многих VHSV изолятов, проведенное несколькими лабораториями, показало, что генетические отличия, по-видимому, больше связаны с географическим расположением, чем с годом выделения или хозяйским видом (Skall с соавт., 2005). Были сгруппированы четыре основных

генотипа на основании секвенирования полноразмерных и/или усеченных генов из N-гена (Einer-Jensen et al., 2005; Snow с соавт., 1999; Snow с соавт., 2004), G-гена (Einer-Jensen с соавт., 2004; Einer-Jensen с соавт., 2005) и NV-гена (Einer-Jensen с соавт., 2005), соответственно:

Генотип I: Несколько сублиний (Ia-Ie), включающих европейские пресноводные изоляты VHS вируса, изоляты из района Черного моря и группу морских изолятов из Балтийского моря, проливов Каттегат, Скагеррак, Северного моря и Ла-Манша. Изоляты генотипа Ib в последнее время выделяли севернее всего в районах на уровне 70° северной широты недалеко от мыса Нордкап в Норвегии (www.fishpathogens.eu, отчет №. 2902).

Генотип II: Группа изолятов из Балтийского моря

Генотип III: Изоляты Северной Атлантики (от банки Флемиш-Кап (López-Vázquez с соавт., 2006) до побережья Норвегии (Dale с соавт., 2009)), из Северного моря, проливов Каттегат, Скагеррак).

Генотип IV: североамериканские и японские/корейские изоляты (две сублинии IVa и IVb [Elsayed с соавт., 2006]).

Генотип I разделен на несколько сублиний, при этом морские изоляты, выделенные у дикой рыбы, отнесены к сублинии Ib. Наиболее явно выраженную классификацию сублиний генотипа I получают при анализе полноразмерного G-гена (Einer-Jensen с соавт., 2005).

Поскольку генотип I включает VHS вирус, выделенный у дикой морской рыбы, а также изоляты, вызывающие гибель радужной форели, из континентальной части Европы, предполагалось наличие родства между пресноводными и морскими типами (Skall et al., 2005).

Все японские и другие азиатские изоляты, кроме одного, входят в североамериканский генотип IVa. Оставшийся изолят отнесен к традиционному европейскому генотипу Ib (Nishizawa с соавт., 2002). Считается, что данный изолят занесен из-за пределов Японии.

В Северной Америке, выявлены как минимум две сублинии: генотип IVa - на тихоокеанском побережье и генотип IV - на атлантическом побережье и в районе Великих озер.

2.1.2. Выживание вне хозяина

Выживание VHS вируса вне хозяина зависит от физико-химических условий водной среды (Ahne, 1982) и от температуры: при температуре 4°C вирус выживает в течение более длительных периодов, чем при температуре 20°C (Parry & Dixon, 1997). Зарегистрировано, что вирус сохраняется в пресной воде в течение 28–35 дней при 4°C (Parry & Dixon, 1997) и выявлено, что он сохраняется свою инфекционность в течение одного года при 4°C в фильтрованной пресной воде (Hawley & Garver, 2008). Вирус может присутствовать в течение более длительного периода времени при добавлении в воду органических материалов,

таких как овариальные жидкости или продукты крови, такие как бычья сыворотка. В сырой пресной воде при 15°C период 99,9% инактивации составляет 13 дней, а в морской воде инаktivация вируса происходит в течение 4 дней (Hawley & Garver, 2008). В ходе других исследований с использованием морской воды при 15°C, инфекционность вируса была снижена на 50% через 10 часов, но все же могла восстанавливаться через 40 часов (Kosap с соавт., 2001).

Замораживание инфицированной VHS вирусом рыбы при коммерческих температурах замораживания, а затем оттаивание не убивает полностью вирус, но снижает титры инфекционности вируса на 90% или более (Arkush с соавт., 2006). Данные авторы отмечали, что оставшийся инфекционный вирус сохранялся в ткани рыбы и не уходил в воду, образующуюся при оттаивании данной мороженой рыбы.

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

VHS вирус чувствителен к ряду общепотребительных дезинфектантов. Обзорные исследования представлены у Bovo с соавт., 2005b; Wolf, 1988.

2.2. Факторы хозяина

Резервуарами VHS вируса является клинически инфицированная рыба, а также латентные носители среди культивируемой, одичавшей и дикой рыбы. На восприимчивость к VHS болезни оказывают влияние несколько факторов. У радужной форели наблюдается генетическая вариабельность по восприимчивости (Henryon с соавт., 2002a; Henryon с соавт., 2002b), по-видимому, имеет некоторую важность и возраст рыбы – чем моложе рыба, тем выше её восприимчивость. В целом, более взрослая рыба, у которой наблюдается высокая смертность от VHS, ранее никогда до этого не сталкивалась с болезнью.

2.2.1. Восприимчивые виды

В течение последних двух десятилетий VHS вирус выделяли у всё большего количества видов морской и пресноводной рыбы (см. таблицы 2.1 и 2.2.). (В таблице 2.1. представлен список видов, в отношении которых имеются убедительные научные данные об их восприимчивости, а в таблице 2.2. перечислены виды, в отношении которых имеются некоторые данные об их восприимчивости.) Вполне вероятно, что VHS вирус является эндемичным в популяциях рыб в больших регионах умеренного пояса Северного полушария. На данный момент, VHS вирус был выделен у приблизительно 80 различных видов рыбы по всему Северному полушарию, включая Северную Америку, Азию и Европу. Было выявлено, что ряд видов восприимчив к VHS вирусу в экспериментальных условиях. Количество возможных видов-хозяев возрастает с увеличением усилий по мониторингу. Однако наиболее восприимчивым аквакультурным видом рыбы к генотипу Ia является радужная форель, хотя также сообщалось, что VHS вызывает гибель у разводимого на ферме тюрбо и азиатского паралихта. У дикой рыбы, случаи значительной гибели наблюдались в последнее время в районе Великих озер США и Канады с вовлечением как минимум 28 видов пресноводной рыбы. Все изоляты VHS вируса, выделенные во время данных вспышек принадлежат к генотипу IVb (Министерство сельского хозяйства США (USDA),

2008; Thompson с соавт., 2011).

Таблица 2.1. Виды рыбы, в отношении которых имеются убедительные научные данные об их восприимчивости (Европейское управление по безопасности пищевых продуктов [EFSA], 2008)

Восприимчивые виды согласно правилам Европейского управления по безопасности пищевых продуктов (EFSA)			
Отряд	Семейство	Общее название	Латинское название
Лососеобразные (Salmoniformes) (лосось)	Salmonidae (лососевые)	Радужная форель / стальноголовый лосось (Rainbow trout / Steelhead trout)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
		Чавыча (Chinook salmon)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
		Кижуч (Coho salmon)	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
		Атлантический лосось (Atlantic salmon)	<i>Salmo salar</i>
		Кумжа (Brown trout)	<i>Salmo trutta</i>
		Европейский хариус (Grayling)	<i>Thymallus thymallus</i>
		Обыкновенный сиг (Whitefish) ^a	<i>Coregonus lavaretus</i>
		Сиги (Whitefish)	<i>Coregonus</i> spp.
		_a	<i>O. mykiss</i> × <i>O. kisutch</i>
		_a	<i>O. mykiss</i> × <i>S. fontinalis</i> triploid
		_a	<i>O. mykiss</i> × <i>S. alpinus</i> triploid
Щукообразные (Esociformes)	Щуковые (Esocidae)	Щука-маскинонг (Muskellunge)	<i>Esox masquinongy</i>
		Обыкновенная щука (Northern pike)	<i>Esox lucius</i>
Сельдеобразные (Clupeiformes)	Сельдевые (Clupeidae)	Атлантическая сельдь (Atlantic herring)	<i>Clupea harengus</i>
		Тихоокеанская сельдь (Pacific herring)	<i>Clupea pallasii</i>
		Перуанская сардина (South American pilchard)	<i>Sardinops sagax</i>
		Европейские шпроты (European sprat)	<i>Sprattus sprattus</i>
	Тресковые	Атлантическая треска (Atlantic cod)	<i>Gadus morhua</i>
		Обыкновенный кападан (Poor cod)	<i>Trisopterus minutus</i>
		Мерланг	<i>Merlangius merlangus</i>

Трескообразные (Gadiformes) (треска)	(Gadidae)	(Whiting)	
		Северная путассу (Blue whiting)	<i>Micromesistius poutassou</i>
		Тресочка Эсмарка (Norway pout)	<i>Trisopterus esmarkii</i>
		Минтай (Alaska Pollock)	<i>Theragra chalcogramma</i>
	Налимовые (Lotidae) (хек и обыкновенный налим)	Четырехусый морской налим (Fourbeard rockling)	<i>Enchelyopus cimbrius</i>
		Обыкновенный налим (Burbot)	<i>Lota lota</i>
	Мерлузовые (Merlucciidae)	Тихоокеанская северная мерлуза ((North) Pacific hake)	<i>Merluccius productus</i>
Камбалообразные (Pleuronectiformes) (камбала)	Камбаловые (Pleuronectidae)	Обыкновенная лиманда (Dab)	<i>Limanda limanda</i>
		Речная камбала (Flounder)	<i>Platichthys flesus</i>
		Морская камбала (European plaice)	<i>Pleuronectes platessa</i>
		Черный палтус (Greenland halibut)	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>
		Атлантический белокорый палтус (Atlantic halibut) ^a	<i>Hippoglossus hippoglossus</i> ^b
	Скофталмовые (Scophthalmidae)	Тюрбо (Turbot)	<i>Scophthalmus maximus</i>
	Паралихтиевые (Paralichthyidae)	Японский паралихт (Japanese flounder)	<i>Paralichthys olivaceus</i>
Корюшкообразные (Osmeriformes)	Аргентиновые (Argentinidae)	Европейская аргентина (Lesser argentine)	<i>Argentina sphyraena</i>
	Корюшковые (Osmeridae) (корюшка)	Калифорнийская малоротая корюшка (Surf smelt)	<i>Hypomesus pretiosus</i>
Окунеобразные Perciformes (окуне- подобные)	Песчанковые (Ammodytidae)	Дальневосточная многопозвонковая песчанка (Pacific sand lance)	<i>Ammodytes hexapterus</i>
		Песчанка (Sand eel)	<i>Ammodytes</i> spp.
		Тихоокеанская песчанка (Pacific sand eel)	<i>Ammodytes personatus</i>
	Бычковые	Малый бычок-бубырь (Sand goby)	<i>Pomatoschistus minutus</i>

	<i>(Gobiidae)</i>	Бычок-кругляк (Round goby)	<i>Neogobius melanostomus</i>
	<i>Эмбиотициевые (Embiotocidae)</i>	Обыкновенный шайнер (Shiner perch)	<i>Cymatogaster aggregata</i>
	<i>Горбылевые (Sciaenidae)</i>	Речной горбыль (Freshwater drum)	<i>Aplodinotus grunniens</i>
	<i>Скумбриевые (Scombridae)</i>	Японская скумбрия (Chub mackerel, Pacific mackerel)	<i>Scomber japonicus</i>
	<i>Окуневые Percidae (окунь)</i>	Желтый окунь (Yellow perch)	<i>Perca flavescens</i> ^c
	<i>Мороновые Moronidae (temperate bass)</i>	Обыкновенный лаврак (European seabass) ^a	<i>Dicentrarchus labrax</i>
Колюшкообразные (Gasterosteiformes)	<i>Колюшковые (Gasterosteidae)</i>	Трехиглая колюшка (Three-spined stickleback)	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Карпообразные (Cypriniformes) (капп)	Карповые <i>Cyprinidae</i> (гольян или карп)	Толстоголовый голянь (Fathead minnow) ^a	<i>Pimephales promelas</i> ^d
Миногообразные (Petromyzontiformes) (миноги)	Миноговые <i>Petromyzontidae</i> (минога)	Речная минога (European river lamprey)	<i>Lampetra fluviatilis</i> ^e

- a. Опыт по инфицированию, погружение
- b. Skall с соавт., 2005;
- c. Kane-Sutton с соавт., 2010;
- d. Al-Hussinee с соавт., 2010;
- e. Gadd с соавт., 2010.

Таблица 2.2. Виды рыбы, в отношении которых имеются некоторые данные об их восприимчивости (EFSA, 2008)

Недостаточные данные для заявления о наличии восприимчивости			
Отряд	Семейство	Общее название	Латинское название
Лососеобразные Salmoniformes (salmon)	<i>Salmonidae</i> (лососевые)	Кета (Chum salmon) ^a	<i>Oncorhynchus keta</i>
		Нерка (Sockeye salmon) ^a	<i>Oncorhynchus nerka</i>
		Озерный голец-кристивомер (Lake trout) ^{b c}	<i>Salvelinus namaycush</i> ^d
		Американская паляя (Brook trout) ^{bc}	<i>Salvelinus fontinalis</i> ^d
		Сельдевидный сиг (Lake whitefish)	<i>Coregonus clupeaformis</i>
		Золотая форель (Golden trout) ^c	<i>Oncorhynchus aguabonita</i>
		Арктический голец (Arctic char) ^b	<i>Salvelinus alpinus</i>
		Сплейк (Splake) ^c	<i>Salvelinus namaycush</i> × <i>Salvelinus fontinalis</i> ^d
		_b	<i>O. mykiss</i> × <i>S. namaycush</i>
		_b	<i>O. mykiss</i> × <i>O. kisutch</i> <i>triploid</i>
Сельдеобразные (Clupeiformes)	<i>Сельдевые</i> (<i>Clupeidae</i>)	Северная доросома (American gizzard shad)	<i>Dorosoma cepedianum</i>
Трескообразные (Gadiformes) (треска)	<i>Тресковые</i> <i>Gadidae</i>	Тихоокеанская треска (Pacific cod)	<i>Gadus macrocephalus</i>
		Пикша (Haddock)	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>
		Тихоокеанская тресочка (Pacific tomcod)	<i>Microgadus proximus</i>
	<i>Налимовые</i> <i>Lotidae</i> (хек и налим)	Обыкновенный налим (Burbot)	<i>Lota lota</i>

Сомообразные Siluriformes (сом)	<i>Икталуровые</i> <i>Ictaluridae</i> (североамериканский пресноводный сом)	Американский сомик (Brown bullhead)	<i>Ictalurus nebulosus</i>
		Канальный сомик (Channel catfish)	<i>Ictalurus punctatus</i>
Корюшкообразные Osmeriformes	<i>Корюшковые</i> <i>Osmeridae</i> (корюшка)	Тихоокеанская корюшка (Eulachon)	<i>Thaleichthys pacificus</i>
Окунеобразные Perciformes (окунеподобные)	<i>Центрарховые</i> <i>Centrarchidae</i> (солнечник)	Большеротый окунь (Largemouth bass)	<i>Micropterus salmoides</i>
		Большеротый окунь (Largemouth bass) ^c	<i>Micropterus salmoides</i> ^d
		Малоротый окунь (Smallmouth bass)	<i>Micropterus dolomieu</i>
		Синежаберный солнечник (Bluegill)	<i>Lepomis macrochirus</i>
		Обыкновенный солнечник (Pumpkinseed)	<i>Lepomis gibbosus</i>
		Черный краппи (Black crappie)	<i>Pomoxis nigromaculatus</i>
		Американский каменный окунь (Rock bass)	<i>Ambloplites rupestris</i>
	<i>Окуневые</i> <i>Percidae</i> (окунь)	Светлоперый судак (Walleye)	<i>Sander vitreus</i>
		Речной окунь (European perch)	<i>Perca fluviatilis</i>
	<i>Мороновые</i> <i>Moronidae</i> (temperate bass)	Белый окунь (White bass)	<i>Morone chrysops</i>
		Полосатый лаврак (Striped bass)	<i>Morone saxatilis</i>
		Белый американский лаврак (White perch)	<i>Morone americana</i>
		Дальневосточный морской карась (Black porgy) ^c	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>
		Красный морской карась (Red seabream) ^c	<i>Pagrus major</i>
	<i>Спаровые</i>	Дорада	<i>Sparus aurata</i>

	<i>Sparidae</i>	(Gilthead seabream)	
Окунеобразные Perciformes (окунеподобные)	<i>Серрановые</i> (<i>Serranidae</i>)	Группер-акаара (Hong Kong grouper) ^c	<i>Epinephelus akaara</i>
	<i>Ставридовые</i> (<i>Carangidae</i>)	Японская лакедра (Japanese amberjack) ^c	<i>Seriola quinqueradiata</i>
	<i>Горбылевые</i> (<i>Sciaenidae</i>)	Желтый горбыль (Yellow croacker) ^a	<i>Larimichthys polyactis</i> ^e
	<i>Снарровые</i> (<i>Sparidae</i>)	Желтый зубан (Yellowback seabream) ^a	<i>Dentex tumifrons</i> ^e
	<i>Волосохвостые</i> (<i>Trichiuridae</i>)	Рыба-сабля (Largehead hairtail) ^a	<i>Trichiurus lepturus</i> ^e
	<i>Строматеевые</i> (<i>Stromateidae</i>)	Серебристый памп (Silver pomfret, butter fish)	<i>Pampus argenteus</i> ^e
Скорпенообразные Scorpaeniformes (скорпеновые и плоскоголовые)	<i>Анопловы</i> <i>Anoplopomatidae</i> (аноплома)	Аноплома (Sablefish)	<i>Anoplopoma fimbria</i>
	<i>Sebastidae</i> (скорпены, каменные окуни и шипощеки) (Rockfish, rockcod and thornyheads)	Черный морской окунь, мебару (японский) (Black rockfish, Mebaru (Japanese))	<i>Sebastes inermis</i>
		Темный окунь (Schlegel's black rockfish) ^c	<i>Sebastes schlegelii</i>
	<i>Липаровые</i> (<i>Liparidae</i>)	Мозаичный липарис (Cubed snailfish) ^a	<i>Liparis tessellatus</i> ^e
	<i>Scorpaenidae</i>	Морской ёрш (Izu scorpionfish, sting fish) ^a	<i>Scorpaena izensis</i> ^e
Угреобразные (Anguilliformes)	<i>Угревые</i> <i>Anguillidae</i>	Обыкновенный угорь (European eel)	<i>Anguilla anguilla</i>
		Американский речной угорь (American eel) ^a	<i>Anguilla rostrata</i> ^f
Карпозубообразные Cyprinodontiformes	<i>Фундуловые</i> (<i>Fundulidae</i>)	Обыкновенный фундулюс (Mummichog)	<i>Fundulus heteroclitus</i>
Колюшкообразные Gasterosteiformes	<i>Аулоринховые</i> (<i>Aulorhynchidae</i>)	Длиннорылые колюшки	<i>Aulorhynchus flavidus</i>

		Tube-snout	
Карпообразные Cypriniformes (карп)	Чукучановые (<i>Catostomidae</i>)	Серебристая моксостома (Silver redhorse)	<i>Moxostoma anisurum</i>
		Северная моксостома (Shorthead redhorse)	<i>Moxostoma macrolepidotum</i>
	Карповые Cyprinidae (гольян или карп)	–	<i>Barbus graellsii</i>
		Толстоголовый гольян (Bluntnose minnow)	<i>Pimephales notatus</i>
		Изумрудный шайнер (Emerald shiner)	<i>Notropis atherinoides</i>
		Гудзонский нотропис (Spottail shiner)	<i>Notropis hudsonius</i>
		Иберийский подуст (Iberian nase)	<i>Chondrostoma polylepis</i>
		Дианио-перо (Zebra danio) ^c	<i>Danio rerio</i>
		Серебряный карась (Goldfish) ^b	<i>Carassius auratus</i>
Перкопсообразные (Percopsiformes) (лососеокунь, пиратоокуновые и слепоглазковые)	Перкопсовые <i>Percopsidae</i> (лососеокунь)	Лососеокунь (Trout-perch)	<i>Percopsis omiscomaycus</i>
Камбалообразные Pleuronectiformes (камбала)	Солеевые (<i>Soleidae</i>)	Сенегальская соля (Senegalese sole)	<i>Solea senegalensis</i>
		Сенегальская соля (Senegalese sole) ^{bc}	<i>Solea senegalensis</i> ^g
	Камбаловые <i>Pleuronectidae</i>	Японская камбала (Marbled flounder) ^c	<i>Pleuronectes yokohamae</i>
		Английская камбала (English sole)	<i>Parophrys vetula</i>
		Дальневосточная длинная камбала (Blackfin flounder, Korean flounder) ^a	<i>Glyptocephalus stelleri</i> ^e
Кефалообразные (Mugiliformes)	Кефаловые (<i>Mugilidae</i>)	Черная кефаль (плоскоголовая черная кефаль (flathead grey mullet),	<i>Mugil cephalus</i> ^d

		лобан (striped mullet))	
		Плоскоголовая черная кефаль (flathead grey mullet), лобан (striped mullet)) ^a	<i>Mugil cephalus</i> ^e
Ошибнообразные (Ophidiiformes)	<i>Ошибневые (Ophidiidae)</i>	Натальская ласка-рыба (Armoured cusk, Armoured weaselfish) ^a	<i>Hoplobrotula armata</i> ^e
Кархаринообразны ^e (Carcharhiniformes)	Кошачьи акулы <i>Scyliorhinidae</i>	Японская кошачья акула (Cloudy catshark) ^a	<i>Scyliorhinus torozame</i> ^e
Нерыбные объекты		Пиявка (Leech)	<i>Myzobdella lugubris</i> ^h
Нерыбные объекты		Ракообразные (Crustacean)	<i>Diporeia</i> spp. ⁱ

- a. Только полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР);
- b. Опыт по инфицированию, погружение;
- c. Опыт по инфицированию, внутрибрюшинная инъекция;
- d. Kim & Faisal, 2010;
- e. Lee с соавт., 2007;
- f. Al-Hussinee с соавт., 2011;
- g. López-Vázquez с соавт., 2011;
- h. Faisal & Schulz, 2009;
- i. Faisal & Winters, 2011.

2.2.2. Восприимчивые стадии хозяина

Инфицирование VHS вирусом может вызвать болезнь и гибель у восприимчивой рыбы на всех стадиях её жизни. В эндемичных регионах инфекция может привести к развитию протективного иммунитета; поэтому, болезнь более распространена в популяциях молодой, ранее неинфицированной рыбы. Нет сведений о том, что VHS вирус инфицирует икринки рыбы.

2.2.3. Предрасположенность видов и субпопуляций (вероятность обнаружения)

В ходе массовых обследований дикой морской рыбы VHS вирус был выделен у рыбы большинства годовых классов. Однако было протестировано лишь небольшое количество молоди, поскольку её обычно не вылавливают в ходе данных массовых обследований. Наивысшая превалентность вируса была выявлена у мелководной рыбы, такой как сельдь, килька, тресочка Эсмарка и т.д.. (Skall с соавт., 2005).

2.2.4. Целевые органы и инфицируемые ткани

При септических стадиях болезни вирус в больших количествах присутствует во всех тканях, включая кожу и мышцы. Целевыми органами являются почки, сердце и селезенка, поскольку это места, в которых вирус присутствует в самых больших количествах. При хронических стадиях титры вируса могут быть высокими в головном мозгу (Smail & Snow, 2011; Wolf, 1988).

2.2.5. Персистентное инфицирование пожизненными носителями

Некоторые особи, оставшиеся в живых после эпизоотий, будут становиться долговременными носителями вируса.

2.2.6. Переносчики

Учитывая большое количество восприимчивых видов можно предположить, что вирус способен размножаться в достаточно большом круге хозяев, что исключает необходимость переносчиков. Однако у инфицированных особей многих видов рыбы клинические признаки никогда не наблюдались.

VHS вирус был выделен у пиявок, *Myzobdella lugubris*, и у *Diporeia* spp. в Великих озерах, Северная Америка. В настоящее время неизвестно, могут ли пиявки и креветко-подобные *Diporeia* передавать VHS вирус от одной рыбы другой (Faisal & Schulz, 2009; Faisal & Winters, 2011).

VHS вирус может переноситься рыбадыными птицами, действующими как внешние механические переносчики (Olesen & Vestergård Jørgensen, 1982; Peters & Neukirch, 1986).

2.2.7. Известные и подозреваемые дикие водные животные-носители

См. таблицы 2.1. и 2.2., в которых перечислены виды, у которых был выделен VHS вирус. В настоящее время, недостаточно научных данных, обосновывающих включение всех видов из Великих озер в список видов, восприимчивых к VHS вирусу (Европейское управление по безопасности пищевых продуктов, 2008).

2.3. Картина болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Знания о механизме передачи вируса были получены в основном в ходе исследований изолятов VHS вируса, выделенных у радужной форели в Европе; было выявлено, что их передача происходила горизонтально при контакте с другой инфицированной рыбой или контаминированной водой, т.д. Инфицированная рыба выделяла вирус в среду с мочой (Wolf, 1988) и репродуктивными жидкостями. Передача без труда происходит при температуре в диапазоне от 1 до 15°C, но может происходить и при температуре до 20°C. Инкубационный период зависит от температуры и дозы, и при более высоких температурах составляет 5–12 дней.

Во время вспышки и сразу после нее вирус без труда поддается выделению в культуре клеток (Wolf, 1988). Ткани почек, сердца и селезенки дают урожай вируса в самых высоких титрах.

У рыб-носителей (клинически здоровых) выявление VHS вируса более проблематично (Skall с соавт., 2005). VHS вирус растет в ряде линий клеток рыбы, но наиболее восприимчивой к инфекции пресноводными европейскими штаммами вируса является BF-2 клеточная линия (Skall с соавт., 2005). Клетки по восприимчивости располагаются в следующем порядке: BF-2, FHM, RTG-2, и EPC (Lorenzen с соавт., 1999), но другие линии клеток рыбы, такие как CHSE-214 и SSN-1, также восприимчивы. Восприимчивость клеточной линии к инфекции будет зависеть от ряда параметров, включая происхождение клеточной линии и различия в штаммах вируса, таким образом, по-видимому, EPC клеточная линия может быть более восприимчива к изолятам VHS вируса генотипа IV, чем к изолятам генотипа I, II или III (Skall с соавт., 2005).

Хорошо установлено наличие статуса носительства VHS вируса у видов пресноводной рыбы (Enzmann & Konrad, 1985; Jørgensen, 1982). Вирусологический статус таких носителей будет зависеть от ряда параметров, включающих продолжительность периода времени, прошедшего после первоначального подвергания воздействию, и географической близости выпускных сооружений рыбоводческих ферм. С момента выявления штаммов VHS вируса у морских видов, был проведен ряд исследований, включающий обширный пробоотбор от широкого диапазона видов рыбы из прибрежных вод в континентальной Европе (Skall с соавт., 2005), Соединенном Королевстве (Skall с соавт., 2005), Северной Америке (Hedrick с соавт., 2003) и Азии (Kim & Park, 2004; Takano с соавт., 2000). В ходе данных исследований производился анализ образцов на наличие вируса посредством инокуляции в линии клеток рыбы. В ходе некоторых исследований образцы от рыбы объединяли в пулы и, поэтому, было трудно определить точную превалентность. Тем не менее, исходя из результатов процедуры выделения вируса в культуре клеток, и независимо от исследованных видов рыбы, первалентность VHS вируса у видов морской рыбы, у которой в ходе данных исследований были отобраны образцы, составляла от 0,0 до 16,7% (95% доверительный уровень, 8,7–27,5%) (Skall с соавт., 2005).

Болезнь в основном наблюдалась при температуре от 4°C до 14°C. При температуре воды от 15°C до 18°C, болезнь в основном была кратковременной с умеренной совокупной смертностью.

При низких температурах воды (1–5°C) течение болезни обычно было длительным с низкой ежедневной смертностью, но высокой совокупной смертностью. Вспышки VHS происходят в течение всех сезонов года, но наиболее часто - весной, когда наблюдается повышение или колебание температур воды. Более подробные обзорные анализы данного состояния были произведены Wolf, 1988 и Smail & Snow, 2011.

Передача происходит в основном горизонтально через воду, при экскреции вируса с мочой (Smail & Snow, 2011). Исследования с использованием биоиллюминесцентной визуализации живой форели, инфицированной рекомбинантным вирулентным IHN вирусом, вирусом, который очень сходен с

VHS вирусом, несущим репортерный ген, превосходно проиллюстрировали, что урожай вируса на коже рыбы очень высокий (Bremont, 2005). Данный аспект также следует исследовать и в отношении рыбы, инфицированной VHS, прямая экскреция вируса с кожи может быть источником распространения вируса (Smail & Snow, 2011).

Свидетельства и данные о действительной вертикальной передаче VHS вируса отсутствуют (Bovo с соавт., 2005a).

2.3.2. Превалентность

До конца 1980-х годов, считалось, что VHS распространена только у разводимой на ферме радужной форели в континентальной Европе, с редкими случаями выявления у ограниченного количества других видов пресноводной рыбы (например, кумжа, щука [Meier & Jørgensen, 1980; Schlotfeldt & Ahne, 1988]), при этом Скандинавия (кроме Дании), Великобритания и Ирландия считались свободными от VHS. С обнаружением и выделением VHS вируса у тихоокеанского лосося вдали от тихоокеанского побережья Северной Америки в конце 1980-х годов, проведенные последующие исследования показали, VHS вирус присутствует у многочисленных видов разводимой на ферме и дикой рыбы вдоль тихоокеанского и атлантического побережий Северной Америки (Skall с соавт., 2005), в районе Великих озер Северной Америки (Thompson с соавт., 2011), в морях вокруг Соединенного Королевства (Skall с соавт., 2005), в Балтийском море, в проливах Скагерак и Каттегат (Skall с соавт., 2005), в водах вокруг Японии (Skall с соавт., 2005), а в районе Черного моря - отличающийся генотип Ie (Nishizawa с соавт., 2006).

2.3.3. Географическое распространение

В течение двух последних десятилетий VHS вирус был выделен у дикой рыбы во всех зонах умеренного климата в Северном полушарии, как в пресных водах, так и в морских водах (Skall с соавт., 2005). Однако вспышки VHS у разводимой на ферме радужной форели наблюдались только в Европе, где она по-прежнему считается одной из самых серьезных вирусных болезней в аквакультуре. В Америке, VHS главным образом вызывает смертность у дикой рыбы (Meyers & Winton, 1995; Skall с соавт., 2005; Министерство сельского хозяйства США (USDA), 2008). В Азии, были сообщения о вспышках клинической болезни у разводимого на ферме азиатского паралихта, а также производились выделения вируса у видов дикой рыбы (Lee с соавт., 2007; Skall с соавт., 2005).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Уровень смертности варьирует в зависимости от многих условий окружающей среды и физиологических условий, большинство из которых в полной мере не определены. Болезнь, в целом, является прохладноводной или холодноводной болезнью с наивысшей смертностью при температуре около 9–12°C. Маленькие мальки радужной форели (0.3–3 g) - наиболее восприимчивы к вирусу генотипа Ia, и уровень смертности у них достигает почти 100%, но болезнь может поражать радужную форель всех размеров и смертность может варьировать от 5 до 90%. Опыты по инфицированию посредством погружения приводили к 100% смертности у тихоокеанской сельди при инфицировании её вирусом генотипа IVa (Skall с

соавт., 2005).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Вспышки VHS были зарегистрированы как в пресноводных водоемах, так и в водоемах с морской водой при солености воды до 36 частей на тысячу (ppt) и диапазонах температур от 2 до 20°C. Большинство вспышек наблюдалось весной, когда наблюдаются колебания температуры.

Лабораторные исследования показали, диапазон температур для VHS вируса генотипа IVb такой же, как и для генотипа I, при этом оптимальной является температура 9–12°C, а верхним пределом – температура 18–20°C (Goodwin & Merry, 2011).

2.4. Контроль и профилактика

При отсутствии антивирусных обработок, методы контроля VHS в настоящее время представляют собой схемы официального надзора за здоровьем в сочетании с мерами контроля. Примеры практик, которые были успешными в плане снижения количества инфицированных ферм в эндемичном районе и недопущения повторного инфицирования, таких как процедура полного санитарного убоя или процедура выдержки, были описаны в обзорных статьях ранее (Olesen, 1998; Olesen & Korsholm, 1997). Успешное искоренение вспышек острой болезни было недавно проведено в Соединенном Королевстве в 2006 г. (Stone с соавт., 2008) и в Норвегии в 2007 г. (Dale с соавт., 2009), поскольку с того времени вспышек больше не было, и в Дании, в которой спустя 45 лет надзора и контроля VHS была искоренена на более чем 400 эндемично инфицированных фермах, последняя вспышка была зарегистрирована в феврале 2009 г. (рукопись находится в процессе подготовки).

2.4.1. Вакцинация

Хотя научные исследования по разработке вакцины против VHS продолжаются в течение более трех десятилетий, коммерческой вакцины пока нет. Кандидатные вакцины включают инактивированные вакцины, аттенуированные живые вакцины, рекомбинантную вакцину в прокариотической и эукариотической экспрессирующих системах и вакцины на основе ДНК. Однако последние были признаны очень перспективными, индуцирующими хорошую защиту от VHS. Обзоры представлены у Lorenzen & Lapatra, 2005.

2.4.2. Химиотерапия

В настоящее время терапевтические методы отсутствуют.

2.4.3. Иммуностимуляция

Производился анализ нескольких иммуностимулирующих средств, таких как полученные из дрожжей бета-глюканы, полученные из IL-1 β пептиды и пробиотики, на наличие у них способности усиливать защиту от VHS (Peddie с соавт., 2003). Несколько авторов сообщали о положительных эффектах, но иммуностимуляторы, направленные конкретно на усиление резистентности к

VHS, отсутствуют.

2.4.4. Выведение резистентной популяции

У радужной форели была обнаружена аддитивная генетическая вариация в отношении резистентности к VHS (Dorson с соавт., 1995; Henryon с соавт., 2002a; Henryon с соавт., 2002b). В исследовании, проведенном Henryon с соавт., 2005, наследуемость резистентности к VHS составляла 0,11 в течение временного периода до гибели по логарифмической временной шкале. Таким образом, было продемонстрировано наличие хорошего потенциала для выведения резистентной популяции. Однако в настоящее время коммерческие резистентные линии радужной форели пока отсутствуют.

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

На некоторых фермах в Дании, на которых периодически наблюдались случаи высокой смертности, вызванной VHS, предпринимались попытки восполнения поголовья более резистентными видами, такими как кумжа (*Salmo trutta*) и судак (*Sander lucioperca*) (Н. Korsholm, персональное сообщение).

2.4.6. Дезинфекция икринок и личинок

Дезинфекция икринок на стадии «глазка» и только что оплодотворенных икринок является эффективной и рентабельной защитной мерой для прекращения распространения болезни (более подробно процедуры описаны у Vovo с соавт., 2005b).

2.4.7. Общие практики ведения хозяйства

На течение и степень тяжести болезни могут оказывать влияние низкое качество воды, высокая плотность рыбы, высокая скорость кормления, другие болезни, такие как пролиферативная почечная болезнь (PKD), ихтиофтириоз, бактериальная почечная болезнь (BKD), т.д. В целом, повышение температуры, ограничения в кормлении, снижение плотности рыбы и ограниченные манипуляции могут снизить уровень смертности. На эндемично инфицированных фермах обычно зарыбление производится с использованием не подвергавшихся никакому воздействию мальков с желточным мешком при максимально возможной высокой температуре воды.

3. Отбор образцов

3.1. Выбор отдельных образцов

Клинические обследования следует производить в период, когда температура ниже 14°C, или всякий раз, когда температура воды достигает своего самого низкого годового значения. Все производственные подразделения (пруды, резервуары, садки и т.д.) должны быть проинспектированы на наличие погибшей, слабой рыбы или рыбы с аномальным поведением. Особое внимание следует уделять местам, где производится водосброс, где обычно собирается ослабленная рыба, ввиду присутствия там течения воды.

Выбор рыбы, подлежащей отбору в качестве образца, необходимо производить следующим образом:

- Для генотипа I: на фермах с лососевыми, при наличии радужной форели отбор образцов следует производить только от рыбы данного вида. Если радужной форели нет, образцы следует отбирать от рыбы всех других присутствующих восприимчивых к VHS вирусу видов рыбы, перечисленных в таблицах 2.1 и 2.2. Однако данные виды рыбы должны быть пропорционально представлены в образце. Для других генотипов: следует отбирать образцы от видов рыбы, в отношении которых известно об их восприимчивости к указанному генотипу. Отбор образцов от восприимчивых видов рыбы следует производить пропорционально и в соответствии с риск-ориентированными критериями для целевого выбора партий или популяций с историей аномальной смертности или случаями потенциального воздействия (например, через необработанные поверхностные воды, вылов дикой рыбы или ремонт стада с использованием популяций с неизвестным статусом по риску).
- Если для производства рыбы используется более чем один водоем, в образец должна быть включена рыба из всех используемых водоемов.
- При наличии ослабленной рыбы, рыбы с аномальным поведением или недавно погибшей рыбы (неразложившейся) следует выбирать такую рыбу. При отсутствии такой рыбы выбранная рыба должна включать внешне нормальную, здоровую рыбу, отобранную таким образом, чтобы в образце была пропорционально представлена рыба из всех частей фермы, а также всех годовых классов.

3.2. Сохранение образцов для представления для исследования

Перед отправкой или доставкой в лабораторию, части органов, подлежащих исследованию, необходимо извлечь из рыбы с помощью стерильных иссекающих инструментов и перенести в стерильные пластиковые пробирки, содержащие транспортную среду, т.е. клеточную культуральную среду с 10% фетальной телячьей сывороткой (FCS) и антибиотиками. Рекомендуется добавлять комбинацию из 200 международных единиц (МЕ) пенициллина, 200 мкг стрептомицина и 200 мкг канамицина на один мл, хотя также можно использовать и другие антибиотики с доказанной эффективностью.

3.3. Объединение образцов в пулы

Овариальную жидкость или кусочки органов максимум от десяти особей рыбы можно собирать в одну стерильную пробирку, содержащую как минимум 4 мл транспортной среды, что представляет собой один объединенный в пул образец. Вес ткани в каждом образце должен составлять минимум 0,5 г. Пробирки следует поместить в изотермические контейнеры (например, пенопластовые коробки с толстыми стенками), добавляя достаточное количество льда или «морозильные блоки» для обеспечения сохранения образцов в охлажденном состоянии во время их транспортировки в лабораторию. Необходимо избегать замораживания. Температура образца во время перевозки всегда должна оставаться ниже 10°C, и при приемке в лаборатории в

транспортном контейнере должен все еще присутствовать лед или один или несколько морозильных блоков должны оставаться частично или полностью замороженными. Вирусологическое исследование необходимо начать как можно быстрее или не позднее чем через 48 часов после отбора образцов. В исключительных случаях, вирусологическое исследование должно быть начато не позднее чем в течение 78 часов после отбора материала при условии, что подлежащий исследованию материал защищен транспортной средой и при соблюдении требований к температуре во время транспортировки.

В лабораторию может быть отправлена и цельная рыба при условии наличия возможности соблюдения требований к температуре во время транспортировки. Цельную рыбу можно завернуть в адсорбирующую бумагу и необходимо отправить в пластиковом пакете охлажденной, как указано выше. Можно также отправлять живую рыбу. Все операции по упаковке и этикетировке следует производить в соответствии с действующими национальными и международными регламентами по транспортировке, в зависимости от ситуации.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

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

Для маленьких мальков, цельные особи рыбы длиной менее 4 см можно измельчить стерильными ножницами или скальпелем после удаления части тушки за анальным отверстием. Если образец состоит из цельной рыбы длиной от 4 до 6 см, следует производить отбор внутренних органов, включая почки.

3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

VHS вирус очень чувствителен к ферментативному расщеплению, поэтому, следует избегать отбора образцов тканей с высокой ферментативной активностью, таких как кишечник и печень.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Расширенное клиническое обследование на наличие VHS следует проводить при наличии следующих признаков: быстрое начало смертности, вялость, потемнение кожи, пучеглазие, анемия (бледные жабры), геморрагии у основания плавников, жабр, глаз и кожи, аномальное плавание, такое как плескание и плавание по спирали, вздутое брюшко из-за опухоли в брюшной полости.

4.1.2. Изменения в поведении

Неврологическая форма болезни характеризуется ярко выраженным аномальным плавательным поведением, таким как постоянное плескание и

плавание по спирали, ввиду тропизма вируса к головному мозгу. В отличие от рыбы с бактериальной септициемией VHS-инфицированная рыба не будет пытаться ускользнуть при ловле её сетью.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Макроскопические поражения включают генерализованную петехиальную геморрагию в коже, мышечной ткани (особенно в дорсальных мышцах) и внутренних органах. Важно исследовать дорсальную мускулатуру на наличие петехиального кровотечения, которое является очень частым признаком VHS инфекции. Почки в острой фазе - темно красные, но у умирающей рыбы может наблюдаться сильный некроз почек. Селезенка - умеренно увеличенная. Печень - часто бледная и пятнистая. Желудочно-кишечный тракт, особенно задняя часть кишечника, – бледный и не содержит пищи.

4.2.2. Клиническая химия

В острой фазе VHS уровень эритроцитов в крови – очень низкий, кровь по внешнему виду светло красная и прозрачная.

4.2.3. Микроскопическая патология

При исследовании методом иммуногистохимии выявляют VHSV-положительные эндотелиальные клетки, главным образом в сердечнососудистой системе (Evensen et al., 1994). В почках, печени и селезенке наблюдается обширный очаговый некроз и дегенерация – цитоплазматические вакуоли, пикноз, кариолизис и инвазия лимфоцитов. Поскольку скелетные мышцы, по-видимому, не являются местом инфицирования, эритроциты могут скапливаться в пучках и волокнах скелетных мышц, не вызывая повреждения самих мышц.

4.2.4. Электронная микроскопия/цитопатология

VHS вирус является типичным рабдовирусом пулевидной формы, 60–75 нм в диаметре и 180–240 нм в длину. Ультраструктуральные аспекты развития вирусной инфекции в клеточной культуре были описаны ранее (Baroni с соавт., 1982).

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

В основе стандартного метода надзора (для выявления рыб-носителей) с целью обнаружения VHS лежат прямые методы, т.е. выделение VHS вируса в клеточной культуре с последующей идентификацией с помощью методов на основе антител (IFAT, ИФА) или методов на основе нуклеиновых кислот (например, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией [ОТ-ПЦР]). Поскольку прямая иммунологическая демонстрация VHSV антигена в тканях инфицированной рыбы (посредством анализа связывания с антителом) имеет низкую чувствительность, данный метод можно использовать только при подозрении на наличие VHS инфекции (на основании клинических признаков, эпизоотологических данных и гистопатологии). Было установлено, что недавно

опубликованная валидированная ОТ-ПЦР в реальном времени для прямой идентификации генома VHSV в тканях рыбы имеет уровни специфичности и чувствительности очень сходные с таковыми методов культивирования в клетках с последующей идентификацией (Garver с соавт., 2011; Jonstrup с соавт., 2013). Данный метод потенциально можно использовать в программах прямого надзора для получения утвержденного статуса свободы от VHS, если в будущем страны-члены МЭБ одобряют его использование для данной цели.

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

Почки и печень являются главными целевыми тканями, исследование гистологических срезов тканей больной рыбы показывает наличие дегенерации и некроза кроветворных тканей почек (и селезенки) с очаговой дегенерацией и некрозом печени. На срезах скелетных мышц можно увидеть многочисленные очаги эритроцитов, в то время как мышечные волокна остаются неповрежденными.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Клеточные культуральные/искусственные среды

Выделение VHS вируса в культурах ряда стабильных линий клеток рыбы убедительно подтверждено документальными доказательствами (Lorenzen с соавт., 1999; Olesen & Vestergård Jørgensen, 1992). Хотя инокуляция линий клеток рыбы для выделения вируса считается «золотым» стандартом для программ надзора (с целью обнаружения рыб-носителей) с точки зрения чувствительности, точная чувствительность данной процедуры неизвестна. Какой материал от инфицированной рыбы пригоден для вирусологического исследования, зависит от размера рыбы. Так, подходящими образцами являются цельные мальки (длина тела <4 см), внутренние органы, включая почки (4 см < длина тела < 6 см) или, для рыбы большего размера – почки, селезенка, сердце и головной мозг, для рыб-производителей – овариальная жидкость в момент метания икры.

Рекомендуется использовать линию клеток рыбы BF-2. Альтернативно, можно использовать EPC или FHM клетки (Lorenzen с соавт., 1999; Olesen & Vestergård Jørgensen, 1992; Министерство внутренних дел США, 2007). В целом, EPC клетки менее чувствительны к вирусу генотипов I, II и III, чем BF-2 клетки (Lorenzen с соавт., 1999; Olesen & Vestergård Jørgensen, 1992). Однако EPC клеточная линия очень чувствительна к нескольким изолятам генотипа IV (Министерство внутренних дел США, 2007).

После обнаружения вируса на основании развития вирусного цитопатогенного действия (ЦПД) в клеточной культуре производится идентификация вируса с помощью тестов на основе антител или тестов на основе нуклеиновых кислот. В любых тестах на основе антител следует использовать антитела, валидированные по своей чувствительности и специфичности (Ariel & Olesen, 2001). Рекомендуется использовать MAб

IP5B11 (Lorenzen с соавт., 1988) в качестве эталонного реагента, поскольку все выделенные на данный момент VHS вирусы вступают в реакцию с данным моноклональным антителом (MAb).

4.3.1.2.1.1. *Выделение вируса*

В лаборатории, ткань в пробирке необходимо полностью гомогенизировать (либо с помощью лопастной мешалки (Stomacher), блендера, валидированного гомогенизатора, либо, что более эффективно, с помощью ступки и пестика с добавлением стерильного песка) и затем суспендировать в оригинальной транспортной среде. Если образец представляет собой цельную рыбу длиной менее 4 см, её следует измельчить стерильными ножницами или скальпелем после удаления участка тела за анальным отверстием. Если образец представляет собой цельную рыбу длиной от 4 см до 6 см, следует отбирать внутренние органы, включая почки. Если образец представляет собой цельную рыбу длиной более 6 см, следует произвести отбор образцов тканей, как описано в Разделе 3.4. Образцы ткани следует измельчить стерильными ножницами или скальпелем и гомогенизировать, как описано выше, а затем суспендировать в транспортной среде. В лаборатории следует откорректировать итоговое соотношение тканевого материала и транспортной среды таким образом, чтобы оно составляло 1:10.

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

Если собранный супернатант хранится при –80°C в течение 48 часов с момента отбора образцов, его можно повторно использовать для вирусологического исследования только один раз.

При возникновении трудностей на практике (например, поломка инкубатора, проблемы с клеточными культурами и т.д.), в результате которых невозможно инокулировать клетки в течение 48 часов после отбора образцов ткани, допускается замораживание супернатанта при –80°C и проведение вирусологического исследования в течение 14 дней.

Перед инокуляцией клеток супернатант смешивают с равными частями соответствующим образом разведенного пула антисывороток к местным серотипам вируса инфекционного панкреатического некроза (IPNV), и инкубируют данный раствор в течение как минимум 1 часа при 15°C или максимум 18 часов при 4°C. Титр антисыворотки в реакции 50% нейтрализации бляшек должен быть не менее 1/2000.

Обработка всех инокулятов антисывороткой к IPN вирусу (вирусу, который в некоторых частях Европы присутствует в 50% образцов от рыбы) производится с целью предотвращения развития ЦПД, вызванного IPN вирусом, в инокулированных клеточных культурах. Это сокращает продолжительность вирусологического исследования, а также количество случаев, в которых наличие ЦПД будет считаться потенциально указывающим на присутствие VHS вируса. Когда образцы поступают с производственных площадок, которые считаются свободными от IPN, обработку инокулятов с помощью антисыворотки против IPN вируса можно не проводить.

4.3.1.2.1.2. *Инокулирование клеточных монослоев*

BF-2 клетки выращивают при 20–24°C в подходящей среде, например минимальная поддерживающая среда Игла (или её модификации) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и антибиотиков в стандартных концентрациях. При культивировании клеток в закрытых флаконах рекомендуется буферировать среду бикарбонатом. Среда, используемая для культивирования клеток в открытых сосудах, может быть буферирована с помощью Tris/HCl (23 мМ) и Na-бикарбоната (6 мМ), или с помощью HEPES-буферированной среды (HEPES = N-2-гидроксиэтил-пиперазин-N-2-этансерная кислота). Необходимо поддерживать pH на уровне $7,6 \pm 0,2$. Клеточные культуры, подлежащие инокулированию тканевым материалом, в момент инокуляции должны быть молодыми (4-48 часов) и активно растущими (не конфлюэнтными).

Обработанные антибиотиками органические суспензии инокулируют в клеточные культуры как минимум в двух разведениях, т.е. в первичном разведении и в разведении 1/10, что дает конечные разведения тканевого материала в клеточной культуральной среде в 1/100 и 1/1000, соответственно (в целях недопущения гомологичной интерференции). Соотношение размера инокулята и объема клеточной культуральной среды должно составлять примерно 1:10. Для каждого разведения и каждой клеточной линии следует использовать, как минимум, площадь клеток в 2 см², что соответствует одной лунке на 24-луночной планшете для культивирования клеток. Рекомендуется использовать планшеты для культивирования клеток, но также допускается использование других установок с такой же или большей площадью роста.

4.3.1.2.1.3. *Инкубация культур клеток*

Инокулированные культуры клеток инкубируют при 15°C в течение 7–10 дней. При изменении цвета клеточной культуральной среды с красного на желтый, что указывает на закисление среды, следует произвести корректировку уровня pH с помощью стерильного бикарбонатного раствора или эквивалентных веществ для сохранения чувствительности клеток к инфицированию вирусом.

Как минимум каждые 6 месяцев или при возникновении подозрения в

сниженной чувствительности клеток производится титрование замороженных запасов VHS вируса в целях подтверждения чувствительности клеточных культур к инфекции вирусом.

4.3.1.2.1.4. Микроскопия

Инокулированные культуры клеток необходимо регулярно обследовать (не менее трех раз в неделю) на наличие ЦПД при 40–150 × увеличении. При наличии явного ЦПД, следует немедленно начать процедуры по идентификации вируса. Рекомендуется использовать фазово-контрастный микроскоп.

4.3.1.2.1.5. Субкультивирование

Если развитие ЦПД после первичной инкубации в течение 7–10 дней не наблюдается, проводят субкультивирование на свежих культурах клеток с использованием такой же площади клеток, что и в первичной культуре.

Аликвоты среды (супернатант) из всех культур/лунок, содержащих первичную культуру, объединяют в пул в соответствии с линией клеток через 7–10 дней после инокуляции. Затем данные пулы инокулируют в гомологичные культуры клеток и разводят 1:10 (в результате чего получают конечные разведения супернатанта 1:10 и 1:100, соответственно), как описано выше (Инокулирование клеточных монослоев).

Альтернативно, аликвоты 10% среды, содержащей первичную культуру, инокулируют прямо в лунку со свежей культурой клеток (субкультивирование из лунки-в лунку). Для образцов, отобранных от лососевых, перед инокуляцией можно провести предварительную инкубацию разведений с антисывороткой к IPNV в соответствующем разведении, как описано выше (Раздел 4.3.1.2.1.1. Выделение вируса).

Затем инокулированные культуры инкубируют в течение 7–10 дней при 15°C, производя их обследование, как указано выше (Раздел 4.3.1.2.1. Микроскопия). При наличии токсического ЦПД в течение первых трех дней инкубации, можно провести субкультивирование на этой стадии, но клетки затем необходимо культивировать в течение семи дней и снова подвергнуть субкультивированию с дальнейшей инкубацией в течение семи дней. Если развитие токсического ЦПД происходит через 3 дня, клетки можно пассировать один раз и инкубировать в течение такого периода времени, чтобы с момента первичной инокуляции прошло 14 дней. В течение последних семи дней инкубации признаки токсичности должны отсутствовать.

При наличии бактериальной контаминации, несмотря на обработку антибиотиками, перед субкультивированием необходимо произвести центрифугирование при 2000–4000 *g* в течение 15–30 минут при 2–5°C, и/или фильтрацию супернатанта через фильтр с размером пор в 0,45 мкм

(мембрана с низким связыванием белков). Кроме этого, процедуры субкультивирования являются такими же, как и при токсическом ЦПД.

При отсутствии ЦПД тест можно объявить отрицательным.

4.3.1.2.1.6. Идентификация вируса

4.3.1.2.1.6.1. Реакция нейтрализации

- i) Собрать культуральную среду клеточных монослоев, демонстрирующих ЦПД, и центрифугировать её при 2000 *g* в течение 15 минут при 4°C, или фильтровать через мембрану с размером пор в 0,45 мкм (или 450 нм) для удаления клеточного дебриса.
- ii) Приготовить разведения вирус-содержащей среды от 10⁻² до 10⁻⁴.
- iii) Смешать аликвоты (например, 200 мкл) каждого разведения с равными объемами раствора антител к VHSV и таким же образом обработать аликвоты каждого разведения вируса клеточной культуральной средой. Раствор нейтрализующих антител [Nab] должен иметь 50% нейтрализующий бляшки титр не менее 2000.
- iv) Параллельно, необходимо провести еще одну реакцию нейтрализации против гомологичного штамма вируса (положительная реакция нейтрализации).
- v) При необходимости сходную реакцию нейтрализации можно провести с использованием антител к IPNV.
- vi) Инкубировать все смеси при 15°C в течение 1 часа.
- vii) Перенести аликвоты каждой из указанных выше смесей на 24-48-часовые монослои с нанесенной на них клеточной культуральной средой, содержащей 10% фетальную телячью сыворотку (FCS) (каждое разведение инокулировать в две лунки) и инкубировать при 15°C; для этой цели подходят 24- или 12-луночные планшеты для культивирования клеток при использовании 50 мкл инокулята.
- viii) Обследовать культуры клеток на появление ЦПД, как только ЦПД проявится в ненейтрализованных контролях (клеточные монослои, защищенные в положительных контролях нейтрализации). Результаты регистрируют либо после простого микроскопического обследования (предпочтительно с использованием фазово-контрастного микроскопа), либо после удаления клеточной культуральной среды и окрашивания клеточных монослоев раствором 1% кристаллического фиолетового в 20% этаноле.
- ix) Тестируемый вирус идентифицируют как VHSV, когда в культурах клеток, в которые была внесена вирусная суспензия, обработанная VHSV-специфичными антителами, развития ЦПД не произошло или оно было значительно замедленным, тогда как во всех других культурах клеток ЦПД было явным.
- x) При отсутствии нейтрализации нейтрализующими антителами (Nab) к VHS вирусу, следует обязательно провести IFAT,

иммунопероксидазный тест, ИФА или ОТ-ПЦР с использованием подозрительного образца. Наблюдалось несколько случаев антигенного дрейфа поверхностного антигена, что время от времени приводило к неудаче при проведении реакции нейтрализации с использованием NAb к VHS вирусу.

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

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

В течение нескольких лет для обнаружения VHS вируса были разработаны методы на основе антител для обнаружения антигенов, такие как IFAT, ИФА и различные иммуногистохимические процедуры. В целом, считается, что основными целевыми органами являются почки, сердце и селезенка. При использовании данных методов можно довольно быстро производить обнаружение и идентификацию по сравнению с процедурой выделения вируса в культуре клеток. Однако на результаты тестов могут оказывать влияние различные параметры, такие как чувствительность и специфичность антител и подготовка образцов, и отрицательные результаты должны рассматриваться с осторожностью. Данные методы не следует использовать при попытках обнаружения рыб-носителей.

4.3.1.2.2.1. Непрямая реакция флуоресцирующих антител на отпечатках

- i) Провести полное обескровливание рыбы.
- ii) Сделать отпечатки почки на очищенных предметных стеклах или на дне лунок пластиковых планшетов для культивирования клеток.
- iii) Хранить кусочки почки вместе с другими органами, необходимыми для процедуры выделения вируса, если данную процедуру понадобится провести позже.
- iv) Оставить отпечатки для высыхания на воздухе на 20 минут.
- v) Зафиксировать ацетоном или этанолом/ацетоном и высушить, как указано в разделе 4.3.1.2.2.3, этапы v–vii.
- vi) Регидратировать вышеуказанные препараты (см. Раздел 4.3.1.2.2.3, этап ix) и блокировать с помощью 5% обезжиренного молока или 1% бычьего сывороточного альбумина, в 0,01 М забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР), pH 7,2, содержащем 0,05% Tween-80 (PBST), в течение 30 минут при 37°C.
- vii) Промыть четыре раза с помощью PBST.
- viii) Обработать отпечатки раствором антител к VHSV и промыть, как указано в Разделе 4.3.1.2.2.3
- ix) Блокировать и промыть, как описано ранее в этапах vi и vii.
- x) Проявить реакцию с помощью подходящих флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ)-конъюгированных специфических антител, промыть и исследовать, как указано в Разделе 4.3.1.2.2.3, этапы xii–

- xi) Если тест отрицательный, подготовить образцы органов, хранящихся при 4°C, для проведения процедуры выделения вируса в культуре клеток, как описано выше.

4.3.1.2.2.2. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) (модифицированный Olesen и Jørgensen, 1991)

4.3.1.2.2.2.1. Процедура ИФА на материалах тканей

Процедуры отбора образцов: см. Главу 2.3.0 и *Руководство МЭБ по надзору за здоровьем гидробионтов* (2009).

Подготовка образцов органов: см. Главу 2.3.0 и *Руководство МЭБ по надзору за здоровьем гидробионтов* (2009).

4.3.1.2.2.2.2. Необходимо следовать процедуре, описанной ниже (процедура ИФА на супернатанте клеточной культуры)

- i) Оставить аликвоту 1/4 разведения каждого гомогената, если в будущем требуется проведение процедуры выделения вируса в культуре клеток.
- ii) Обработать оставшуюся часть гомогената с помощью 2% Triton X-100; осторожно перемешать.
- iii) Выполнить другие этапы (v–xiii) процедуры, описанной в «Процедуре ИФА на супернатанте культуры клеток».
- iv) Если тест отрицательный, подготовить образцы органов, хранящихся при 4°C, для проведения процедуры выделения вируса в культуре клеток, как описано выше.

4.3.1.2.2.2.3. Процедура ИФА на супернатанте культуры клеток

- i) Сенсибилизировать лунки микропланшетов для проведения ИФА соответствующими разведениями очищенных от белка-A иммуноглобулинов (Ig) из кроличьей антисыворотки против VHSV, в карбонатном буфере, pH 9,6 (50 мкл лунка⁻¹).
- ii) Инкубировать в течение ночи при 4°C.
- iii) Промыть 3ФР, содержащем 0,05% Tween-20 (PBST).
- iv) Добавить 1% Triton X-100 в суспензию вируса, подлежащего идентификации.
- v) Распределить по лункам, 50 мкл лунка⁻¹, двух- или четырех-этапные разведения (в PBST, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин) вируса, подлежащего идентификации, и VHSV контрольного вируса, а также отрицательный контроль (например, вирус инфекционного некроза кроветворной ткани), и отставить для реагирования с сенсибилизирующими антителами к VHSV на один час при 37°.
- vi) Промыть с помощью PBST.
- vii) Добавить в лунки МАb к N белку VHS вируса (IP5B11), 50 мкл

лунка⁻¹.

viii) Инкубировать в течение 1 часа при 37°C.

ix) Промыть с помощью PBST.

x) Добавить в лунки (50 мкл лунка⁻¹) конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) моноклональные антимышьиные антитела.

xi) Инкубировать в течение 1 часа при 37°C.

xii) Промыть с помощью PBST.

xiii) Визуализировать реакцию с помощью орто-фенилендиамина и измерить оптическую плотность при длине волны в 492 нм.

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

4.3.1.2.2.3. Непрямая реакция флуоресцирующих антител

- i) Подготовить клеточные монослои в 2 см² лунках пластиковых планшетов для культивирования клеток или на покровных стеклах до получения примерно 80% конфлюэнтности, что обычно достигается в течение 24 часов инкубации при 22°C (посеять шесть клеточных монослоев для одного изолята вируса, подлежащего идентификации, плюс два для положительного и два для отрицательного контролей). Содержание FCS в клеточной культуральной среде можно снизить до 2–4%. Если необходимо идентифицировать большое количество изолятов вируса, настоятельно рекомендуется использовать Terasaki планшеты.
- ii) Когда клеточные монослои готовы для инфицирования, т.е. в тот же день или на следующий день после посева, внести вирусные суспензии, подлежащие идентификации, производя этапы десятикратных разведений прямо в лунках или сосудах с культурой клеток.
- iii) Произвести разведение контрольной вирусной суспензии VHSV таким же образом для получения титра вируса примерно в 5000–10000 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на мл⁻¹ в клеточной культуральной среде.
- iv) Инкубировать при 15°C в течение 24 часов.
- v) Удалить клеточную культуральную среду, промыть один раз 0,01 М забуференным фосфатом солевым раствором (ЗФР), pH 7,2, затем быстро три раза холодной смесью ацетона, 30%/этанола, 70% (в объемном отношении) (хранить при –20°C).
- vi) Оставить для фиксации на 15 минут. Объем в 0,5 мл соответствует 2 см² клеточного монослоя.
- vii) Оставить клеточные монослои для высыхания на воздухе примерно на 30 минут и произвести немедленное исследование или заморозить при –20°C.

- viii) Подготовить раствор очищенного анти-VHSV антитела или сыворотки в 0,01 М PBST, pH 7,2, в соответствующем разведении (которое следует определить заранее или которое указано поставщиком реагента).
- ix) Регидратировать высушенные клеточные монослои посредством четырех этапов промывания PBST раствором и полностью удалить данный буфер после последнего промывания.
- x) Обрабатывать клеточные монослои раствором антител в течение одного часа при 37°C во влажной камере и не допускать испарения, например, посредством добавления кусочка влажной ваты во влажную камеру. Объем используемого раствора должен составлять 0,25 мл 2 см⁻² лунка⁻¹.
- xi) Промыть четыре раза с помощью PBST, как указано выше.
- xii) Обрабатывать клеточные монослои в течение одного часа при 37°C раствором флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТЦ)- или тетраметилродамин-5-(и-6-) изоцитиоцианат (TRITC)-конъюгированных антител к иммуноглобулину, использованному в качестве первичного антитела и приготовленным в соответствии с инструкциями поставщика. Такими конъюгированными антителами чаще всего являются кроличьи или козы антитела.
- xiii) Промыть четыре раза с помощью PBST.
- xiv) Немедленно провести исследование обработанных клеточных монослоев на пластиковых планшетах или произвести их заключение под покровные стекла с помощью, например, солевого раствора глицерина, pH 8,5, для микроскопического исследования.
- xv) Исследовать под падающим ультрафиолетовым светом, используя микроскоп с × 10 окулярами и × 20–40 линзами объектива с числовой апертурой >0,65 и >1,3, соответственно. Перед любым другим исследованием следует обследовать положительные и отрицательные контроли и убедиться, что они дают ожидаемые результаты.

Альтернативно могут быть использованы другие IFAT или иммуноцитохимические (щелочная фосфатаза или пероксидаза) методы с доказанной эффективностью.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

Широко используют молекулярные тесты (ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени) ввиду их быстроты, чувствительности и специфичности. Кроме того, в условиях существования различных штаммов с различными патогенными характеристиками, с учетом обнаружения разнообразных североамериканских, азиатских, европейских и атлантических морских штаммов, с помощью секвенирования ПЦР продуктов можно получить важные эпизоотологические данные (Einer-Jensen с соавт., 2002; Skall с соавт., 2005). Тесты методом ОТ-ПЦР в реальном времени, в целом, более чувствительны, чем тесты с помощью традиционной ОТ-ПЦР. Несмотря на

то, что эти тесты для обнаружения и идентификации вируса во время острой фазы болезни оправданно использовали в течение ряда лет, степень чувствительности и специфичности анализов ОТ-ПЦР в реальном времени по сравнению с процедурой выделения вируса в культуре клеток и последующей идентификацией была однозначно установлена лишь недавно (Garver с соавт., 2011; Jonstrup с соавт., 2013). Выявлено, что эти два анализа подходят для идентификации VHS вируса всех генотипов.

В момент написания (2011), нельзя было рекомендовать использование петлевой изотермической амплификации (LAMP) для VHSV в качестве общего анализа для выявления VHSV, поскольку единственный опубликованный LAMP анализ не был валидирован относительно всех генотипов и при выравнивании последовательностей, вероятно, что опубликованный LAMP анализ не будет распознавать все генотипы (Soliman & El-Matbouli, 2006).

4.3.1.2.3.1. Подготовка вирусной РНК

Все работы с РНК следует производить на льду и в перчатках.

Отобрать аликвоты культуральной среды из клеток инфицированного монослоя, демонстрирующих ЦПД. Центрифугировать при 1000 *g* в течение 5 минут для удаления клеточного дебриса.

РНК экстрагируют с помощью метода фенол-хлороформа или РНК аффинных спин-колонок в соответствии с инструкциями производителя. РНК необходимо ресуспендировать в дистиллированной не содержащей РНазу воде (например, вода, обработанная 0,1% диэтилпиروкарбонатом).

4.3.1.2.3.2. Традиционная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

ОТ-ПЦР амплификацию можно произвести в один или два этапа. В основе обеих процедур лежит этап ПЦР амплификации с использованием праймеров: 5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3' (VN forward (прямой)) и 5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3' (VN reverse (обратный)) (Snow с соавт., 2004). VN forward и VN reverse праймеры созданы для амплификации области, соответствующей основаниям 1–505 N-гена VHS вируса (Snow с соавт., 2004).

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании данных праймеров может не происходить распознавание изолятов вируса генотипа IVb; поэтому рекомендуется производить подтверждение результатов с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени или методов на основе антител.

4.3.1.2.3.2.1. Одноэтапная ОТ-ПЦР

Анализ методом ОТ-ПЦР в 50 мкл одной пробирке можно провести с использованием, например, Qiagen одноэтапной ОТ-ПЦР системы (Qiagen, Германия), в соответствии с инструкциями изготовителя. Вкратце, реакционная смесь состоит из: 5 мкл экстрагированной вирусной РНК, 2 мкл

10 мМ dNTP, 10 мкл 5 × ОТ-ПЦР реакционного буфера (с 12,5 мМ MgCl₂) и 2 мкл ферментативной смеси. ОТ-ПЦР можно провести с помощью VN forward (прямой) и VN reverse (обратный) праймеров в итоговой концентрации в 0,6 мМ каждый. Рекомендуется провести следующие циклы: 50°C в течение 30 минут, 95°C в течение 15 минут, 35 циклов при 94°C в течение 30 секунд, 55°C в течение 30 секунд, и 68°C в течение 60 секунд. Впоследствии, реакцию проводят при 68°C в течение 7 минут.

4.3.1.2.3.2.2. Двухэтапная ОТ-ПЦР

Синтез 20 мкл кДНК можно провести с использованием, например, iScript cDNA Synthesis Kit (набор для синтеза кДНК) (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями производителей. Вкратце, реакционная смесь состоит из: 5 мкл экстрагированной вирусной РНК, 4 мкл 5× iScript реакционной смеси, 1 мкл iScript обратной транскриптазы, и 10 мкл не содержащей нуклеазу воды. Инкубировать образцы по следующей программе: 25°C в течение 5 минут, 42°C в течение 30 минут, 85°C в течение 5 минут. Использовать 5 мкл для ПЦР.

После синтеза сДНК (описанного выше) можно провести 25 мкл ПЦР, используя, например, Go Taq Flexi полимеразу (Promega), в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, реакционная смесь состоит из: 5 мкл кДНК; 11,125 мкл Milli Q воды; 5 мкл 5× Green GoTaq Flexi буфера; 2,5 мкл 25 мМ MgCl₂; 0,5 мкл VN forward (10 мМ); 0,5 мкл VN reverse (10 мМ); 0,25 мкл 25 мМ (каждого) dNTP; 0,125 мкл Go Taq Flexi ДНК полимеразы. Инкубировать образцы, используя следующую программу: 94°C в течение 5 минут, 36 циклов при 94°C в течение 30 секунд, 55°C в течение 30 секунд, и 68°C в течение 60 секунд. Впоследствии, реакцию проводят при 68°C в течение 7 минут.

Количество и специфичность одноэтапной и двухэтапной ОТ-ПЦР реакций можно оценить с помощью гель-электрофореза 1/10 реакции в 1,5% агарозном геле с этидиум бромидом и исследовать с помощью УФ просвечивания.

ПРИМЕЧАНИЕ: ПЦР может варьировать в зависимости от условий, в которых она проводится, например, возможно понадобится оптимизация протоколов термоциклинга в зависимости от используемого термоциклера. Более того, могут наблюдаться ложноположительные результаты ввиду, например, отжига ложного праймера или лабораторной контаминации. Следует также соблюдать осторожность, когда вирус выращивают в BF-2 клетках, поскольку в редких случаях может наблюдаться ложная положительная полоса размером лишь незначительно меньшим, чем истинная VHSV полоса. Поэтому, важно включать адекватные положительные и отрицательные контроли и обязательно секвенировать ампликоны, если имеются какие-либо сомнения.

4.3.1.2.3.3. ОТ-ПЦР в реальном времени

ОТ-ПЦР амплификацию можно провести, используя праймеры/зонд, адаптированные из Jonstrup с соавт., 2013: прямой праймер: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3'; обратный праймер: 5'-TCT-GCG-ATC-

TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3'; и зонд: 5'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1. Эти праймеры нацелены на нуклеотиды 532–608 в соответствии с номером доступа в GenBank Z93412. Альтернативно, можно адаптировать праймеры/зонд из Garver с соавт., 2011: прямой праймер (2F): 5'-ATG-AGG-CAG-GTG-TCG-GAG-G-3'; обратный праймер (2R): 5'-TGT-AGT-AGG-ACT-CTC-CCA-GCA-TCC-3'; и зонд (2-MGB): 5'-FAM-TAC-GCC-ATC-ATG-ATG-AGT-MGBNFQ-3', нацеленные на нуклеотиды 787–868, в соответствии с номером доступа в GenBank Z93412.

4.3.1.2.3.3.1. Одноэтапная ОТ-ПЦР в реальном времени

ОТ-ПЦР 25 мкл в одной пробирке можно провести, используя, например, Quantitect Probe RT-PCR kit (ОТ-ПЦР набор с зондом) (Qiagen, Германия), в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, реакционная смесь состоит из: 5 мкл экстрагированной вирусной РНК (приблизительно 0,05–2 мкг), 12,5 мкл 2×кОТ-ПЦР мастер-микса и 0,25 мкл ОТ/РНазной блокирующей ферментативной смеси. ОТ-ПЦР в реальном времени можно проводить, используя прямой и обратный праймеры в итоговой концентрации 0,9 мкМ каждый, и зонд в итоговой концентрации 0,25 мкМ. ПЦР программа зависит от используемого набора и оборудования для ПЦР в реальном времени. Для mx3005p (Stratagene) с использованием Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen, Германия) используют следующую программу: 50°C в течение 30 минут, 95°C в течение 15 минут, 40 циклов при 94°C в течение 15 секунд, 60°C в течение 40 секунд, 72°C в течение 20 секунд, в случае использования разной платформы и/или набора, следует произвести корректировки, если это необходимо.

Просим обратить внимание на то, что чувствительность анализов ОТ-ПЦР в реальном времени очень во многом зависит используемого набора (см. Jonstrup с соавт., 2013 для дополнительной информации).

4.3.2. Серологические методы

Надзор, базирующийся на серологических тестах, имеет ряд преимуществ по сравнению с процедурой выделения вируса, особенно в случаях, когда температура воды слишком высокая для проведения процедуры выделения вируса, и в эндемично инфицированных популяциях без клинических признаков болезни. Однако гуморальный иммунный ответ впервые может быть обнаружен через 3–4 недели после инфицирования. С другой стороны, высокие уровни антител могут сохраняться в течение длительного времени: > 6 месяцев после инфицирования (Fregeneda-Grandes & Olesen, 2007; Lapatra, 1996; Lorenzen & Lapatra, 1999). Недостатком серологических методов является медленная выработка антител у рыбы после инфицирования, особенно при низких температурах воды. В настоящее время производится итоговая оценка чувствительности, специфичности тестов и воспроизводимости серологических методов для обнаружения у рыбы антител против VHS вируса. После надлежащей оценки и валидации данные методы будут вставлены в текст данной главы.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для надзора, обнаружения и диагностики VHSV указаны в таблице 5.1. Использованные в таблице обозначения означают: a = данный метод является рекомендованным методом ввиду его наличия, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = данный метод применяется в некоторых ситуациях, но его стоимость, точность или другие факторы значительно ограничивают его применение; и d = данный метод в настоящее время не рекомендуется использовать для этой цели. Данные рекомендации в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает аспекты достоверности, чувствительности, специфичности и полезности. Хотя не все тесты, обозначенные, как категория a или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются без получения сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для надзора, обнаружения и диагностики

Метод	Целевой надзор			Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	d	d	b	d
Гистопатология	d	d	d	b	d
Трансмиссионная электронная микроскопия	d	d	d	c	d
Выделение в культуре клеток с последующим исследованием одним из идентификационных методов	a	a	a	a	a
Анализы на основе антител	d	d	d	b	a
Традиционная ОТ-ПЦР с последующим секвенированием	c	c	c	b	a
ОТ-ПЦР в реальном времени	c	c	c	a	a

ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

6. Тесты, рекомендованные для целевого надзора в целях объявления свободы от вирусной геморрагической септицемии (VHS)

Тест, рекомендованный для целевого надзора, представляет собой культивирование образцов ткани рыбы в BF-2 клетках с последующей идентификацией с помощью

иммунохимических тестов или тестов на основе нуклеиновых кислот, как описано в Разделе 4 данной главы.

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Присутствие VHSV следует подозревать при соответствии как минимум одному из нижеследующих критериев:

- i) Наличие VHS-сообразных поражений выявленных при патологоанатомическом исследовании, при наличии или отсутствии клинических признаков болезни. Выявленные при патологоанатомическом исследовании поражения и клинические признаки должны соответствовать таковым, описанным в Разделах 4.1. и 4.2 данной главы;
- ii) VHSV-типичное ЦПД в культурах клеток до подтверждения;
- iii) Если в ходе эпизоотологического расследования выявлены эпизоотологические связи с фермами, на которых подозревается или подтверждено наличие VHS: обнаружение антител к VHS вирусу у рыбы.

Подозрение на наличие VHS можно исключить, если продолжающиеся расследования не выявили никаких дополнительных доказательств присутствия патогена.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Присутствие VHS вируса считается подтвержденным, если, дополнительно к критериям, указанным в Разделе 7.1., наблюдается соответствие одному или нескольким нижеследующим критериям:

- i) Выделение VHS вируса производится в культуре клеток с последующей идентификацией вируса либо с помощью теста на основе антител (IFAT, ИФА, реакция нейтрализации, иммуногистохимия) и/или ОТ-ПЦР с последующим секвенированием ампликона, либо с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени;
- ii) VHS вирус выявлен в тканях или тканевых препаратах посредством иммунологического анализа с использованием специфических антител к VHS вирусу;
- iii) Обнаружение VHS вируса в тканевых препаратах посредством ОТ-ПЦР с последующим секвенированием ампликона или посредством ОТ-ПЦР в реальном времени.

Подтверждение первого случая VHS на фермах, находящихся в неинфицированных зонах или компартментах, не должно основываться только на критериях пунктов ii) или iii).

Материал тканей для вирусологического исследования может, в некоторых случаях, сопровождаться дополнительным материалом для бактериологического, паразитологического, гистологического или другого исследования в целях проведения дифференциальной диагностики.

8. Список литературы

- AHNE W. (1982). Vergleichende Untersuchung über die Stabilität von vier fischpathogenen Viren (VHSV, PFR, SVCV, IPNV) (Comparative studies on the stability of four fish-pathogenic viruses [VHSV, PFR, SVCV, IPNV]). *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **29**, 457–476.
- AL-HUSSINEE L., HUBER P., RUSSELL S., LEPAGE V., REID A., YOUNG K.M., NAGY E., STEVENSON R.M.W. & LUMSDEN J.S. (2010). Viral haemorrhagic septicaemia virus IVb experimental infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and fathead minnow, *Pimphales promelas* (Rafinesque). *J. Fish Dis.*, **33**, 347–360.
- AL-HUSSINEE L., LORD S., STEVENSON R.M.W., CASEY R.N., GROOCOCK G.H., BRITT K.L., KOHLER K.H., WOOSTER G.A., GETCHELL R.G., BOWSER P.R. & LUMSDEN J.S. (2011). Immunohistochemistry and pathology of multiple Great Lakes fish from mortality events associated with viral hemorrhagic septicemia virus type IVb. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 117–127.
- ARIEL E. & OLESEN N.J. (2001). Assessment of a commercial kit collection for diagnosis of the fish viruses: IHNV, IPNV, SVCV and VHSV. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **21**, 6–11.
- ARKUSH K.D., MENDONCA H.L., MCBRIDE A.M., YUN S., MCDOWELL T.S. & HEDRICK R.P. (2006). Effects of temperature on infectivity and of commercial freezing on survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.*, **69**, 145–151.
- BARONI A., GALESSO R. & BOVO G. (1982). Ultrastructural observations on the virus of viral haemorrhagic septicaemia in culture. *J. Fish Dis.*, **5**, 439–444.
- BOVO G., HÅSTEIN T., HILL B., LAPATRA S., MICHEL C., OLESEN N.J., SHCHELKUNOV I., STORSET A., WOLFFFROM T. & MIDTLYNG P.J. (2005a). QLK2-CT-2002-01546: Fish Egg Trade Work package 1 report: Hazard identification for vertical transfer of fish disease agents, 1-35. VESO, P.O. Box 8109, Dep., N-0032 Oslo, Norway.
Available at: http://www.eurl-fish.eu/-/media/Sites/EURL-FISH/english/activities/scientific%20reports/fisheggtrade%20wp_1.ashx?la=da
- BOVO G., HILL B., HUSBY A., HÅSTEIN T., MICHEL C., OLESEN N.J., STORSET A. & MIDTLYNG P.J. (2005b). Fish Egg Trade Work package 3 report: Pathogen survival outside the host, and susceptibility to disinfection, 1-53. VESO, P.O. Box 8109 Dep., N-0032 Oslo, Norway.
Available at: http://www.eurl-fish.eu/-/media/Sites/EURL-FISH/english/activities/scientific%20reports/fisheggtrade%20wp_3.ashx?la=da
- BREMONT M. (2005). Reverse genetics on fish rhabdoviruses: tools to study the pathogenesis of fish rhabdoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **292**, 119–141.
- DALE O.B., ØRPETVEIT I., LYGSTAD T.M., KAHNS S., SKALL H.F., OLESEN N.J. & DANNEVIG B.H. (2009). Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 93–103.
- DORSON M., QUILLET E., HOLLEBECQ M.G., TORHY C. & CHEVASSUS B. (1995). Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Vet. Res.*, **26**, 361–368.

EINER-JENSEN K., AHRENS P., FORSBERG R. & LORENZEN N. (2004). Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.*, **85**, 1167–1179.

EINER-JENSEN K., AHRENS P. & LORENZEN N. (2005). Parallel phylogenetic analyses using the N, G or Nv gene from a fixed group of VHSV isolates reveal the same overall genetic typing. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 39–45.

EINER-JENSEN K., BJÖRKLUND H., ORESHKOVA S., SHCHELKUNOV I., VESELY T. & LORENZEN N. (2002). Detection and typing of fish viruses. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **22**, 158–165.

ELSAYED E., FAISAL M., THOMAS M., WHELAN G., BATTS W. & WINTON J. (2006). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *J. Fish Dis.*, **29**, 611–619.

ENZMANN P.J. & KONRAD M. (1985). Inapparent infections of brown trout with VHS-virus. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **5**, 81–83.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2008). Scientific Opinion of the panel on AHAW on a request from the European Commission on aquatic animal species susceptible to diseases listed in the Council Directive 2006/88/EC. *The EFSA Journal*, **808**, 1–144.

EVENSEN Ø., MEIER W., WAHLI T., OLESEN N.J., JØRGENSEN P.E.V. & HÅSTEIN T. (1994). Comparison of immunohistochemistry and virus cultivation for detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **20**, 101–109.

FAISAL M. & SCHULZ C.A. (2009). Detection of Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from the leech *Myzobdella lugubris* Leidy, 1851. *Parasit. Vectors*, **2**, 45.

FAISAL M. & WINTERS A.D. (2011). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from *Diporeia* spp. (*Pontoporeiidae*, *Amphipoda*) in the Laurentian Great Lakes, USA. *Parasit. Vectors*, **4**, 2.

FREGENEDA-GRANDES J.M. & OLESEN N.J. (2007). Detection of rainbow trout antibodies against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) by neutralisation test is highly dependent on the virus isolate used. *Dis. Aquat. Org.*, **74**, 151–158.

GADD T., JAKAVA-VILJANEN M., EINER-JENSEN K., ARIEL E., KOSKI P. & SIHVONEN L. (2010). Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype II isolated from European river lamprey *Lampetra fluviatilis* in Finland during surveillance from 1999 to 2008. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 189–198.

GARVER K.A., HAWLEY L.M., MCCLURE C.A., SCHROEDER T., ALDOUS S., DOIG F., SNOW M., EDES S., BAYNES C. & RICHARD J. (2011). Development and validation of a reverse transcription quantitative PCR for universal detection of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 97–112.

GOODWIN A.E. & MERRY G.E. (2011). Mortality and carrier status of bluegills exposed to viral hemorrhagic septicemia virus genotype IVb at different temperatures. *J. Aquat. Anim.*

Health, **23**, 85–91.

GROOCOCK G.H., GETCHELL R.G., WOOSTER G.A., BRITT K.L., BATTS W.N., WINTON J.R., CASEY R.N., CASEY J.W. & BOWSER P.R. (2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia in round gobies in New York State (USA) waters of Lake Ontario and the St. Lawrence River. *Dis. Aquat. Org.*, **76**, 187–192.

HAWLEY L.M. & GARVER K.A. (2008). Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 171–178.

HEDRICK R.P., BATTS W.N., YUN S., TRAXLER G.S., KAUFMAN J. & WINTON J.R. (2003). Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 211–220.

HENRYON M., BERG P., OLESEN N.J., KJÆR T.E., SLIERENDRECHT W.J., JOKUMSEN A. & LUND I. (2005). Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture*, **250**, 621–636.

HENRYON M., JOKUMSEN A., BERG P., LUND I., PEDERSEN P.B., OLESEN N.J. & SLIERENDRECHT W.J. (2002a). Erratum to “Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout” (*Aquaculture*, 2002, **209**, 59–76). *Aquaculture*, **216**, 389–390.

HENRYON M., JOKUMSEN A., BERG P., LUND I., PEDERSEN P.B., OLESEN N.J. & SLIERENDRECHT W.J. (2002b). Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. *Aquaculture*, **209**, 59–76.

ISSHIKI T., NISHIZAWA T., KOBAYASHI T., NAGANO T. & MIYAZAKI T. (2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 87–99.

ITO T., OLESEN N.J., SKALL H.F., SANO M., KURITA J., NAKAJIMA K. & IIDA T. (2010). Development of a monoclonal antibody against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype IVa. *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 17–27.

JONSTRUP S.P., KAHNS S., SKALL H.F., BOUTRUP T.S. & OLESEN N.J. (2013). Development and validation of a novel Taqman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Fish Dis.*, **36** (1), 9–23.

JØRGENSEN P.E.V. (1982). Egtved virus: occurrence of inapparent infections with virulent virus in free-living rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at low temperature. *J. Fish Dis.*, **5**, 251–255.

KANE-SUTTON M., KINTER B., DENNIS P.M. & KOONCE J.F. (2010). Viral hemorrhagic septicemia virus infection in yellow perch, *Perca flavescens*, in Lake Erie. *J. Great Lake Res.*, **36**, 37–43.

KIM R. & FAISAL M. (2010). Experimental studies confirm the wide host range of the Great Lakes viral haemorrhagic septicaemia virus genotype IVb. *J. Fish Dis.*, **33**, 83–88.

- KIM S.M. & PARK S.I. (2004). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in wild marine fishes in the coastal region of Korea *J. Fish Pathol.*, **17**, 1–10.
- KOCAN R., BRADLEY M., ELDER N., MEYERS T.R., BATTS W.N. & WINTON J.R. (1997). North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus is highly pathogenic for laboratory-reared pacific herring. *J. Aquat. Anim. Health*, **9**, 279–290.
- KOCAN R.M., HERSHBERGER P.K., ELDER N.E. & WINTON J.R. (2001). Survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in filtered seawater and seawater containing ovarian fluid, crude oil and serum-enriched culture medium. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 75–78.
- LAPATRA S.E. (1996). The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **6**, 15–28.
- LEE W.L., YUN H.M., KIM S.R., JUNG S.J. & OH M.J. (2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from marine fish in the South Western Coastal Area and East China Sea. *J. Fish Pathol.*, **20**, 201–209.
- LÓPEZ-VÁZQUEZ C., CONDE M., DOPAZO C.P., BARJA J.L. & BANDÍN I. (2011). Susceptibility of juvenile sole *Solea senegalensis* to marine isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus from wild and farmed fish. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 111–116.
- LÓPEZ-VÁZQUEZ C., RAYNARD R.S., BAIN N., SNOW M., BANDÍN I. & DOPAZO C.P. (2006). Genotyping of marine viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from the Flemish Cap by nucleotide sequence analysis and restriction fragment length polymorphism patterns. *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 23–31.
- LORENZEN E., CARSTENSEN B. & OLESEN N.J. (1999). Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 81–88.
- LORENZEN N. & LAPATRA S.E. (1999). Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response. *Fish Shellfish Immunol.*, **9**, 345–360.
- LORENZEN N. & LAPATRA S.E. (2005). DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 201–213.
- LORENZEN N., OLESEN N.J. & VESTERGÅRD JØRGENSEN P.E. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. *Dis. Aquat. Org.*, **4**, 35–42.
- LUMSDEN J.S., MORRISON B., YASON C., RUSSELL S., YOUNG K., YAZDANPANA A., HUBER P., AL-HUSSINEE L., STONE D. & WAY K. (2007). Mortality event in freshwater drum *Aplodinotus grunniens* from Lake Ontario, Canada, associated with viral haemorrhagic septicemia virus, Type IV. *Dis. Aquat. Org.*, **76**, 99–111.
- MEIER W. & JØRGENSEN P.E.V. (1980). Isolation of VHS virus from pike fry (*Esox lucius*) with hemorrhagic symptoms. *In: Fish Diseases, Third COPRAQ Session*, Ahne W., ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany and New York, USA, 8–17.
- MEYERS T.R., SHORT S. & LIPSON K. (1999). Isolation of the North American strain of viral

hemorrhagic septicemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality in two new host species of Alaskan marine fish. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 81–86.

MEYERS T.R. & WINTON J.R. (1995). Viral hemorrhagic septicemia virus in North America. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **5**, 3–24.

NISHIZAWA T., IIDA H., TAKANO R., ISSHIKI T., NAKAJIMA K. & MUROGA K. (2002). Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 143–148.

NISHIZAWA T., SAVAS H., ISIDAN H., ÜSTÜNDAG C., IWAMOTO H. & YOSHIMIZU M. (2006). Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from free-living turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2373–2378.

OLESEN N.J. (1998). Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *J. Appl. Ichthyol.*, **14**, 173–177.

OLESEN N.J. & JØRGENSEN P.E.V. (1991). Rapid detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in fish by ELISA. *J. Appl. Ichthyol.*, **7**, 183–186.

OLESEN N.J. & KORSHOLM H. (1997). Control measures for viral diseases in aquaculture: eradication of VHS and IHN. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **17**, 229–233.

OLESEN N.J., LORENZEN N. & JØRGENSEN P.E.V. (1993). Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 163–170.

OLESEN N.J. & VESTERGÅRD JØRGENSEN P.E. (1982). Can and do herons serve as vectors for Egtved virus? *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **2**, 48.

OLESEN N.J. & VESTERGÅRD JØRGENSEN P.E. (1992). Comparative susceptibility of three fish cell lines to Egtved virus, the virus of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 235–237.

PARRY L. & DIXON P.F. (1997). Stability of nine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates in seawater. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **17**, 31–36.

PEDDIE S., MCLAUCHLAN P.E., ELLIS A.E. & SECOMBES C.J. (2003). Effect of intraperitoneally administered IL-1b-derived peptides on resistance to viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 195–200.

PETERS F. & NEUKIRCH M. (1986). Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron, *Ardea cinerea*. *J. Fish Dis.*, **9**, 539–544.

ROSS K., MCCARTHY U., HUNTLY P.J., WOOD B.P., STUART D., ROUGH E.I., SMAIL D.A. & BRUNO D.W. (1994). An outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus maximus*) in Scotland. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **14**, 213–214.

SCHLOTTFELDT H.J. & AHNE W. (1988). Epizootics in brown trout (*Salmo trutta fario*) caused by VHSV-F1. *J. Appl. Ichthyol.*, **4**, 147–148.

SCHLOTTFELDT H.J., AHNE W., JØRGENSEN P.E.V. & GLENDE W. (1991). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) – a natural outbreak. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **11**, 105–107.

SKALL H.F., OLESEN N.J. & MELLERGAARD S. (2005). Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming - a review. *J. Fish Dis.*, **28**, 509–529.

SMAIL D.A. & SNOW M. (2011). Viral Haemorrhagic Septicaemia. *In*: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Second Edition. Woo P.T.K. & Bruno D.W. eds. CABI, Wallingford, UK, 110–142.

SNOW M., BAIN N., BLACK J., TAUPIN V., CUNNINGHAM C.O., KING J.A., SKALL H.F. & RAYNARD R.S. (2004). Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 11–21.

SNOW M., CUNNINGHAM C.O., MELVIN W.T. & KURATH G. (1999). Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. *Virus Res.*, **63**, 35–44.

SOLIMAN H. & EL-MATBOULI M. (2006). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS) *Vet. Microbiol.*, **114**, 205–213.

STONE D.M., FERGUSON H.W., TYSON P.A., SAVAGE J., WOOD G., DODGE M.J., WOOLFORD G., DIXON P.F., FEIST S.W. & WAY K. (2008). The first report of viral haemorrhagic septicaemia in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in the United Kingdom. *J. Fish Dis.*, **31**, 775–784.

TAKANO R., NISHIZAWA T., ARIMOTO M. & MUROGA K. (2000). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **20**, 186–192.

THOMPSON T.M., BATTS W.N., FAISAL M., BOWSER P., CASEY J.W., PHILLIPS K., GARVER K.A., WINTON J. & KURATH G. (2011). Emergence of viral hemorrhagic septicemia virus in the North American Great Lakes region is associated with low viral genetic diversity. *Dis. Aquat. Org.*, **96** (1), 29–43.

TRAXLER G.S., KIESER D. & RICHARD J. (1999). Mass mortality of pilchard and herring associated with viral hemorrhagic septicemia virus in British Columbia, Canada. *Fish Health Sect. Am. Fish Soc. Newslett.*, **27**, 3–4.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2008). Species affected by the Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS). Amended Federal Order, Available at: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_dis_spec/aquaculture/downloads/vhs_fed_order_amended.pdf.

UNITED STATES DEPARTMENT OF THE INTERIOR (2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus. USGS FS 2007-3055. US Department of the Interior, US Geological Survey. Fact Sheets.

WALKER P.J., BENMANSOUR A., DIETZGEN R., FANG R.X., JACKSON A.O., KURATH G., LEONG J.C., NADIN-DAVIS S.A., TESH R.B. & TORDO N. (2000). Family *Rhabdoviridae*. *In*: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report

of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. с соавт., eds. Academic Press, San Diego, USA and London, UK, 563–583.

WOLF K. (1988). Viral hemorrhagic septicemia. *In*: Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 217–249.

*

* *

NB: Имеется Референтная лаборатория МЭБ по вирусной геморрагической септицемии (см. таблицу в конце данного *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>)

Просим обращаться в Референтные лаборатории МЭБ для получения любой дополнительной информации по вирусной геморрагической септицемии.

Болезнь, вызываемая вирусом *ONCORHYNCHUS MASOU*

1. Предмет рассмотрения⁵²

Болезнь, вызываемая вирусом *Oncorhynchus masou* (OMVD) – это онкогенное и кожно-язвенное состояние, которое сочетается с гепатитом, у лососевых рыб в Японии и, по всей вероятности, в прибрежных реках на территории восточной Азии, которые являются прибежищем тихоокеанского лосося.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Этиологическим возбудителем является вирус *Oncorhynchus masou* (OMV), входящий в семейство *Herpesviridae*; впрочем, ему также было присвоено такое название, как вирус нерки озера Товада, префектура Акита и Амори (NeVTA), вирус опухоли ямаме (YTV), вирус опухоли кижуча (CSTV, COTV), вирус *O. kisutch* (OKV), герпесвирус кижуча (CHV), почечный вирус радужного лосося (RKV) и герпесвирус радужной форели (RHV) (Yoshimizu с соавт., 1995).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Значительное снижение инфекционных титров OMV наблюдалось в пределах 3 и 7 дней в природных водах при температуре 15°C и 10°C, соответственно. Тем не менее, инфекционная активность сохранялась в течение 7–14 дней при температуре ниже 5°C (Yoshimizu с соавт., 2005), указывая на подтверждение присутствия в воде бактериальных штаммов, обладающих антивирусной активностью.

2.1.3. Стабильность возбудителя (описание эффективных методов инактивации)

Свободные от патогенов водоисточники часто имеют существенно важное значение в аквакультуре. Поступающая из рек или озер вода, которая обычно используется в инкубаториях, содержит патогены рыб. Такие открытые водные ресурсы не следует использовать без обработки в целях уничтожения патогенов рыб. Вирусы, поражающие рыб, делятся на две группы в зависимости от чувствительности к УФ. OMV относится к чувствительной группе и инактивируется посредством обработки дозой ультрафиолета 10^4 мкВт секунда см⁻² (Yoshimizu с соавт., 1986). При температуре 15°C в течение 20 минут минимальные концентрации, демонстрирующие 100% сокращение бляшек OMV под действием йодофора, раствора гипохлорита

⁵² NB: Версия, принятая Всемирной ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2013 года. Данная болезнь больше не включена в список МЭБ.

натрия, раствора бензалкония хлорида, мыльного раствора крезоло, раствора формальдегида и раствора калия перманганата, составляли 40, 50, 100, 100, 3500 и 16 мг литр⁻¹, соответственно (Hatori с соавт., 2003).

OMV является термо-, эфир- и кислото (рН 3)-лабильным и не гемагглютинирует О-клетки человека. Он полностью инактивируется ультрафиолетовым (УФ) облучением в дозе $3,0 \times 10^3$ мкВт секунда см⁻². В присутствии 50 мкг мл⁻¹ аналога пиримидина, 5-йоддезоксисуридина (IUdR), происходит ингибирование репликации. Ингибирование репликации вируса происходит под действием противогерпесвирусных средств, таких как фосфоноацетат (РА), ацикловир (АСV), (Е)-5-(2-бромовинил-2'-дезоксисуридин (BVdU) и 1-В-D-арабино-фураносилцитозин (Ara-C), что обусловлено ингибированием ДНК-полимеразы, индуцируемой OMV (Kimura с соавт., 1981a; Kimura с соавт., 1983a; Kimura et al., 1983b).

2.1.4. Жизненный цикл

Вслед за стадией септицемии инфекции OMV возникает иммунный ответ, в результате чего происходит синтез нейтрализующих антител к OMV. Нередко имеет место статус вирусоносительства, что приводит к выделению вируса через половые продукты во время нереста.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды-хозяева (общепринятые и латинские названия)

К видам рыб, которые являются восприимчивыми к OMV, относятся: лосось кокани (нерка) (*Oncorhynchus nerka*), сима (масу) (*O. masou*), кета (*O. keta*), кижуч (*O. kisutch*) и радужная форель (*O. mykiss*) (Kimura с соавт., 1983с).

2.2.2. Восприимчивые стадии развития хозяина

Возраст рыбы имеет критическое значение, и 1-месячные мальки с желточным мешком представляют собой наиболее уязвимую мишень для вирусной инфекции (Kimura с соавт., 1981b; Kimura с соавт., 1983с). Основным фактором окружающей среды, который создает благоприятные условия для инфекции OMV, является низкая температура воды – ниже 15°C (Kumagai с соавт., 1994).

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность обнаружения)

Лососевые являются единственными видами рыб, восприимчивыми к инфекции OMV, при этом последовательность видов рыб от наиболее восприимчивых до наименее восприимчивых такова: кокани, кета, сима, кижуч и радужная форель (Kimura с соавт., 1983a).

2.2.4. Целевые органы и инфицируемая ткань

С клинической точки зрения, первоначальная инфекция OMV проявляется как генерализованная и часто смертельная инфекция, сопровождающаяся отеком и геморрагиями. Клинические признаки обусловлены размножением вируса в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров, гематопозитической ткани и

гепатоцитах. Четыре месяца спустя после этого первого клинического состояния варьирующее количество остающихся в живых рыб демонстрируют эпителиому, которая возникает, главным образом, вокруг рта (верхняя и нижняя челюсть) и, в меньшей степени, на хвостовом плавнике, жаберной крышке и поверхности тела (Kimura с соавт., 1981a; Yoshimizu с соавт., 1987). Эта неоплазия может сохраняться в течение до 1 года после инфицирования. Что касается кижуча, инфицированные рыбы в возрасте 1 года, в частности, демонстрируют язвы на коже, белые пятна на печени и неопластические ткани вокруг ротовых частей или по всей поверхности тела. Среди радужной форели были инфицированы рыбы коммерческого размера, и больные рыбы не демонстрировали почти никаких внешних признаков, хотя у некоторых рыб обнаруживались язвенные поражения на коже. Что касается внутренних органов, наблюдаются кишечная геморрагия и белые пятна на печени (Furihata с соавт., 2003).

2.2.5. Персистентная инфекция пожизненными носителями

В естественных условиях, особи, выжившие после болезни, вызываемой OMV (OMVD), являются персистентно инфицированными вирусом и выделяют вирус, и вирус сохраняется у рыб вплоть до достижения зрелости (Yoshimizu с соавт., 1993).

2.2.6. Переносчики

Вода является основным абиотическим переносчиком. Тем не менее, переносчики-живые организмы, например, другие виды рыб, паразитические беспозвоночные и рыбоядные птицы и млекопитающие, также могут участвовать в передаче.

2.2.7. Известные или подозреваемые дикие водные животные-носители

У сим, выловленных в устье реки, наблюдалась неоплазия вокруг рта, а из опухолей был выделен OMV. Не так давно радужные форели, живущие в реке и которые, возможно, ушли с ферм, были инфицированы OMV и погибли (Furihata с соавт., 2003; Yoshimizu & Nomura, 2001).

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Резервуарами OMV являются клинически инфицированные рыбы и скрытые носители среди групп культивируемых, одичавших или диких рыб. Выделение инфекционного вируса происходит с фекалиями, мочой, половыми продуктами и, по всей вероятности, с кожной слизью, в то время как почка, селезенка, печень и опухоли являются местами, где вирус наиболее широко распространен при клинической инфекции. Передача вируса OMV происходит горизонтальным путем и, возможно, является «ассоциированной с поверхностью икринок». Горизонтальная передача может быть как прямой, так и происходящей посредством переносчиков, при этом вода является основным абиотическим фактором. Дезинфекция икринок сразу после оплодотворения и на стадии глазка эффективна в плане предотвращения инфекции OMV. Болезнь, вызываемая OMV, не регистрировалась у мальков с желточным мешком, появившихся из подвергнутых дезинфекции икринок, инкубация которых и появление мальков из которых происходили в свободной от вируса воде (Yoshimizu, 2009).

2.3.2. Превалентность

OMV был выделен от симы во всех местах, где проводилось расследование, за исключением одного инкубатория. Исходя из результатов нашего эпидемиологического исследования, истоки OMV, как предполагалось, были расположены вдоль япономорского побережья Хоккайдо, а предполагаемым изначальным видом-хозяином была сима. В 1960-е годы икринки симы были отобраны из рек япономорского побережья Хоккайдо и привезены на остров Хонсю, основной остров Японии. При неограниченном перемещении рыб вирус распространился на несколько мест на территории Хонсю, где наблюдались первые случаи раковой болезни у симы (Kimura, 1976). Впоследствии кижуча и радужную форель культивировали в тех же водных системах, где культивировали симу. Возможно, инфицирование кижуча OMV произошло на стадии малька в пресной воде, потому что опухолевые ткани были обнаружены вокруг рта у кижучей, которые выращивались в специально огороженных участках, при этом в инкубатории, откуда кижуч был пересажен в специально огороженный участок, в прошлом регистрировалась OMVD (Furihata с соавт., 2003; Kumagai с соавт., 1994; Yoshimizu & Nomura, 2001).

2.3.3. Географическое распространение

После первых сообщений относительно OMVD в северной Японии (Kimura с соавт., 1980) географический диапазон болезни на территории Японии расширился. Сообщения о возникновении болезни за пределами Японии отсутствуют.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Восприимчивость к OMV мальков ряда лососевых изучалась экспериментальным путем посредством погружения в воду с содержанием ТЦД50 (средняя инфекционная доза для культуры ткани) мл^{-1} OMV при температуре 10°C на 1 час. При сравнении икринок пяти различных лососевых в возрасте 1 месяца лосось кокани продемонстрировал самую высокую чувствительность при 100% смертности. Сима и кета также продемонстрировали высокую чувствительность при 87% и 83% смертности, соответственно. Кижуч и радужная форель, как было показано, менее чувствительны к заражению OMV при смертности 39% и 29%, соответственно. Таким образом, диапазон хозяев широко представлен среди видов лососевых (Kimura с соавт., 1983с). Восемь возрастных групп кеты (в возрасте 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 месяцев) были подвергнуты погружению при тех же самых условиях. Кумулятивная смертность только что появившейся из икринок кеты, находившейся под наблюдением в течение последующих 4 месяцев, составила 35%, но у мальков в возрасте от 1 до 5 месяцев она составляла более 80%. В возрасте 6 и 7 месяцев восприимчивость мальков снизилась, и лишь 7% и 2% рыб стали жертвами болезни. Среди 8-месячной молодежи случаев гибели не наблюдалось. С другой стороны, мальки симы в возрасте 1 месяца были наиболее чувствительными, и кумулятивная смертность достигла 87%. У мальков в возрасте от 3 до 5 месяцев кумулятивная смертность снизилась с 65% до 24% (Kimura с соавт., 1983с). Начиная с 1988 года герпесвирус выделяли из печени, почки и развивающейся неоплазмы у прудовых и выращивавшихся в специально огороженных участках кижучей (Kumagai с соавт.,

1994). Пораженные рыбы демонстрировали следующие признаки болезни: язвы на коже, белые пятна на печени и неопластические ткани вокруг ротовой части или по всей поверхности тела. Данная болезнь наносит экономический ущерб культуре кижуча. Все эти вирусы нейтрализовали посредством кроличьей сыворотки против OMV или NeVTA, а онкогенность была подтверждена путем экспериментального заражения. Изолированный вирус демонстрировал сильную патогенность в отношении кижуча. Массовая смертность регистрировалась среди радужной форели в возрасте 1 года в прудовых культурах начиная с 1992 года на территории Хоккайдо. Больные рыбы не демонстрировали практически никаких клинических признаков. Некоторые же рыбы демонстрировали язвенные поражения на коже. Со стороны внутренних органов наблюдались кишечная геморрагия и белые пятна на печени. В период с февраля 2000 года по январь 2001 года имели место эпидемии среди культивируемой радужной форели весом от 12 г до 1,5 кг на 18 фермах по разведению рыбы в префектуре Нагано, Япония. Были продемонстрированы высокие титры инфекционности (около 10^8 ТЦД₅₀ г⁻¹) в основных внутренних органах, а в печени наблюдались многочисленные некротические очаги. Вирус был идентифицирован как OMV при помощи серологических тестов и полимеразной цепной реакции (ПЦР). В более чем 80% случаев вспышки были связаны с завозом живой рыбы (Furihata с соавт., 2003).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Общие санитарно-профилактические меры являются стандартной практикой в инкубаториях. Следует обратить особое внимание на то, чтобы избежать перемещения оборудования из одного резервуара в другой, а после использования все следует подвергать дезинфекции. Методы для проведения санитарной обработки инкубаторного участка следует разрабатывать с осмотрительностью в том, что касается химической токсичности для рыб, влияния температуры воды и их неоднократного применения. Следует помнить о том, что работники сами могут выступать в качестве эффективных переносчиков для патогенов, и для предотвращения распространения вирусов требуется надлежащая дезинфекция рук и обуви. Хотя проведение санитарной обработки участков инкубирования и выращивания во время их использования может быть затруднительным, следует дезинфицировать выростные каналы и пруды с помощью хлора до и после использования (Yoshimizu, 2009).

2.4. Контроль и профилактика

OMV чувствителен к обработке ультрафиолетовым облучением, озоном и йодофором (Yoshimizu & Kasai, 2011). Начиная с 1983 года, настоятельно рекомендуется в качестве одной из стратегий контроля проводить исследование овариальной жидкости, полученной от зрелой рыбы, и дезинфекцию собранных икринок во всех инкубаториях на территории Хоккайдо с использованием йода в начале стадии глазка. На данный момент OMV больше уже не выявляется в большинстве инкубаториев в данном регионе. В настоящее время все икринки и объекты уже продезинфицированы йодофором сразу после оплодотворения и еще раз в начале стадии глазка. В результате этого OMV не выделяется на территории Хоккайдо и Тохоку, а также удалось избежать вспышки

OMVD у симы и кижуча, но не у радужной форели (Furihata с соавт., 2003; Yoshimizu, 2009).

2.4.1. Вакцинация

Вакцинация зрелой радужной форели OMV, инактивированным формалином, обеспечила возможность снизить положительное соотношение OMV в овариальной жидкости (Yoshimizu & Kasai, 2011). Также вакцинация с использованием инактивированного формалином OMV весьма эффективна в целях защиты от инфекции OMV на стадии малька (Yoshimizu & Kasai, 2011).

2.4.2. Химиотерапия

Терапевтическую эффективность ацикловира (ACV) оценивали при использовании OMV и мальков кеты. Рыб подвергали экспериментальному заражению OMV, а затем обработке ACV либо пероральным путем, либо путем погружения. Ежедневное погружение рыб в раствор ACV (25 мкг мл⁻¹, 30 минут в день, 15 раз) снизило смертность инфицированной рыбы. Пероральное введение ACV (25 мкг на каждую рыбу в день, 60 раз) не оказало влияния на выживаемость кеты. Напротив, группа, в которой осуществлялось пероральное введение IUdR, продемонстрировала более высокую выживаемость, чем группа, получавшая ACV. Это дало основание предположить, что у рыб, которым вводили лекарственный препарат оральным путем, не поддерживался эффективный уровень ACV. Ежедневное погружение инфицированной рыбы в раствор ACV (25 мкг мл⁻¹, 30 минут в день, 60 раз) в значительной степени подавляло развитие опухолей, вызванных OMV (Kimura с соавт., 1983a; Kimura с соавт., 1983b).

2.4.3. Иммуностимуляция

На сегодняшний день опубликованная информация об использовании иммуностимуляторов для контроля OMVD у лососевых отсутствует. Однако это, как известно, является областью, представляющей научно-исследовательский интерес.

2.4.4. Выведение резистентных особей

На сегодняшний день опубликованная информация о применении выведения резистентных особей для контроля OMVD у лососевых отсутствует.

2.4.5. Пополнение поголовья резистентными видами

Гибриды представляют собой потенциальный метод контроля для предотвращения серьезных потерь, обусловленных OMVD. В ходе исследований, проведенных в отношении популяции триплоидных гибридных лососевых (тетрамерная радужная форель × кумжа), было установлено, что они являются резистентными к OMVD (Kohara & Denda, 2010).

2.4.6. Блокирующие агенты

Не применимо.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Дезинфекция икринок может осуществляться посредством обработки йодофором. OMV, как было показано, инактивируется путем применения йодофора из расчета 50 мг литр⁻¹ в течение 15 минут при температуре 15°C или 25 мг литр⁻¹ в течение 20 минут при температуре 15°C (Yoshimizu, 2009).

2.4.8. Общие практики ведения хозяйства

Меры биозащиты должны включать в себя обеспечение того, что новые поступления рыбы осуществляются из свободных от болезни источников, а также устройство карантинной системы, где можно держать новых рыб вместе с индикаторными рыбами при пермиссивных для OMVD температурах. Тогда рыб карантинируют в течение как минимум 4 недель – 2 месяцев перед перемещением на основной участок и смешиванием с не подвергавшейся никакому воздействию рыбой. Меры гигиены на местах должны быть аналогичными мерам, рекомендованным для ИHN, и включать в себя дезинфекцию икринок, регулярную дезинфекцию прудов, химическую дезинфекцию оборудования фермы, бережное обращение с рыбой во избежание стресса и безопасное уничтожение погибшей рыбы.

3. Отбор образцов

3.1. Выбор отдельных образцов

3.1.1. Рыба с клиническими признаками

Малек с желточным мешком в целом виде (длина тела ≤ 4 см), внутренние органы, включая почку (4 см $\leq$ длина тела ≤ 6 см), или, если речь идет о рыбе более крупного размера, язвенные поражения кожи или неопластические ткани, а также почка, селезенка, печень и головной мозг.

3.1.2. Внешне здоровая рыба

Почка, селезенка и головной мозг (рыба любого размера) и/или овариальная жидкость от рыб-производителей в период нереста.

3.2. Сохранение образцов в целях предоставления на исследование

Целых рыб следует отправлять в лабораторию в живом виде или подвергнув их умерщвлению и упаковав по отдельности в герметизированные асептические контейнеры. Однако весьма предпочтительно и рекомендуется отбирать образцы органов от рыб сразу же после того, как они были выбраны на рыбоводческом объекте. Рыб в целом виде или отобранные образцы органов следует направлять в лабораторию в охлаждаемых контейнерах (от +0°C до 5°C) со льдом. Следует избегать замораживания отобранных рыб или иссеченных органов.

3.3. Объединение образцов в пул

При тестировании рыб с клиническими признаками методом культуры клеток или методами на основе ПЦР, объединения образцов в пул следует избегать или же ограничиться не более чем пятью рыбами в каждом пуле. Что касается тестирования с помощью методов культуры клеток в рамках надзора за здоровьем, следует проводить тестирование образцов при не более чем пяти рыбах в пуле.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

3.4.1. Рыба с клиническими признаками

Малек в целом виде (длина тела ≤ 4 см), внутренние органы, включая печень или почку ($4 \text{ см} \leq \text{длина тела} \leq 6 \text{ см}$), или, если речь идет о рыбе более крупного размера, язвенные поражения кожи или неопластические ткани, а также печень или почка.

3.4.2. Внешне здоровая рыба

Печень, почка, селезенка и головной мозг (рыба любого размера) и/или овариальная жидкость от рыб-производителей в период нереста.

3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

Трупы рыб с очень глубокими признаками разложения тканей могут не подойти для тестирования какими бы то ни было методами.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

С клинической точки зрения, первоначальная инфекция OMV проявляется как генерализованная и часто смертельная инфекция, сопровождающаяся отеком и геморрагиями. Клинические признаки обусловлены размножением вируса в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров, гематопозитической ткани и гепатоцитах (Kimura с соавт., 1981b). Четыре месяца спустя после этого первого клинического состояния варьирующее количество остающихся в живых рыб демонстрируют эпителиому, которая возникает, главным образом, вокруг рта (верхняя и нижняя челюсть) и, в меньшей степени, на хвостовом плавнике, жаберной крышке и поверхности тела (Kimura с соавт., 1981a). Эта неоплазия может сохраняться в течение до 1 года после инфицирования. Если говорить о кижуче, инфицированные рыбы в возрасте 1 года, в частности, демонстрируют язвы на коже, белые пятна на печени и неопластические ткани вокруг ротовых частей или по всей поверхности тела. У радужной форели больные рыбы не демонстрировали почти никаких внешних признаков, хотя у некоторых рыб обнаруживались язвенные поражения на коже. Что касается внутренних органов, наблюдаются кишечная геморрагия и белые пятна на печени (Yoshimizu & Kasai, 2011).

4.1.2. Изменения в поведении

Рыбы становятся вялыми, собираются у водостока или боковых сторон пруда. У некоторых рыб могут наблюдаться потеря равновесия и дезориентация.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Макроскопические признаки у инфицированных рыб – это отсутствие аппетита и экзофтальм (пучеглазие), а также петехии на поверхности тела, в особенности под нижней челюстью. Агональное или аномальное плавательное поведение не

наблюдалось. Что касается внутренних органов, на печени наблюдаются поражения в виде белых пятен, а в сложных случаях вся печень становится жемчужно-белой. В некоторых случаях устанавливают, что вздута селезенка. В пищеварительном тракте отсутствует пища (Kimura с соавт., 1981b).

4.2.2. Клиническая химия

Опубликованная информация отсутствует.

4.2.3. Микроскопическая патология

Почка инфицированных OMV симы в возрасте 1-го и 3-х месяцев, кижуча в возрасте 1-го месяца и кеты в возрасте 2-х месяцев является главным целевым органом для вируса, насколько можно судить по тяжести гистопатологических изменений, обнаруженных у инфицированных 1-месячных сим. Некроз эпителиальных клеток и почки наблюдался у экземпляров на ранней стадии умирания, в то время как частичный некроз печени, селезенки и поджелудочной железы наблюдался у особей на более поздних стадиях умирания из данной группы. Некроз гематопозитической ткани почки наблюдался у инфицированных 3-х месячных сим. При том, что почка считалась рано поражаемым органом-мишенью для OMV, она постепенно приобрела резистентность к инфекции OMV. По этой причине было сочтено, что целевой орган переместился с почки на печень, и заметные гистопатологические изменения наблюдались на более поздних стадиях. Очаги некроза в печени имели тенденцию становиться более тяжелыми при более продолжительном инкубационном периоде. Присутствовали гепатоциты с маргинацией хроматина. Также наблюдалась клеточная дистрофия в селезенке, поджелудочной железе, сердечной мышце и мозге (Kimura с соавт., 1983с). Гистопатологические изменения, наблюдавшиеся у кижуча и кеты, были такими же, как наблюдавшиеся у симы (Tanaka с соавт., 1984). Что касается радужной форели, были продемонстрированы высокие титры инфекционной активности в основных внутренних органах и наблюдались многочисленные некротические очаги в печени. Несомненным изменением был некроз инфицированных OMV клеток, которые наблюдались в селезенке, гематопозитических тканях почки, печени, кишечнике, сердце, жаберных лепестках, эпидермисе и латеральной мускулатуре. В частности, со стороны кишечника наблюдался тяжелый некроз и геморрагия в эпителии и подлежащих тканях, что представляет собой новое описание OMVD радужной форели (Furihata с соавт., 2003).

4.2.4. Влажные препараты

OMV был идентифицирован в мазках-отпечатках почки посредством непрямой реакции флуорисцирующих антител (IFAT).

4.2.5. Мазки

Опубликованная информация отсутствует.

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

Вирусные частицы были обнаружены путем исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ, TEM) тканей печени, полученных от клинически

инфицированных кеты, симы, кижуча и радужной форели (Kimura с соавт., 1980; Tanaka с соавт., 1984). Электронная микроскопия инфицированных клеток показывает, что интрануклеарные гексагональные капсиды имеют диаметр 115 нм. Обилие почкующихся, заключенных в оболочку вирионов, 200 × 240 нм в диаметре, также наблюдается на поверхности и внутри цитоплазматических везикул. Рассчитанное число капсомеров негативно окрашенных вирионов составляет 162. Данные характеристики подтверждают, что OMV является гересвирусом.

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

Инфекционная активность возбудителя остается неизменной в течение по меньшей мере 2 недель при температуре от 0°C до 5°C, однако при температуре –20°C 99,9% инфекционной активности теряется в пределах 17 дней. Вирусовыделение следует проводить с использованием рыб, которых транспортировали в лабораторию на льду. Для фильтрации OMV рекомендуется фильтр-нуклеопор (0,40 мкм, поликарбонат), поскольку фильтр с целлюлозо-ацетатной мембраной улавливает вирусные частицы. В целях вирусологического обследования зрелых лососевых, отбирают овариальную жидкость при помощи метода, описанного Yoshimizu с соавт., 1985, с добавлением такого же объема антибиотика и оставляют для реакции при температуре 5°C на протяжении ночи. Если речь идет об опухолевой ткани, ткань нарезают и дезинфицируют йодоформом, затем промывают сбалансированным солевым раствором (BSS) Хэнка и транспортируют вместе с раствором антибиотика в лабораторию. Необходимо подготовить опухолевую ткань для первичной культуры или сокультуры с клетками RTG-2. После проведения одного пассажа первичной культуры клеток следует провести исследование культуральной среды на наличие вируса. Обычно собирают и инокулируют клетки RTG-2, подходящая температура инкубации составляет 15°C. В лаборатории использовали кроличью сыворотку или моноклональное антитело против OMV для реакции флуоресцирующих антител (Hayashi с соавт., 1993), а также использовали ДНК-зонд для обнаружения вирусного генома (Gou с соавт., 1991). В ходе ПЦР с использованием праймера F10 и праймера R05 (Aso с соавт., 2001) амплифицировали состоящий из 439 пар-оснований сегмент ДНК из штаммов OMV, выделенных от симы, кижуча и радужной форели, а также печени, почки, мозга и нервных тканей. Посредством профиля амплифицированной ДНК в агарозном геле смогли дифференцировать OMV и *H. salmonis* (Aso с соавт., 2001).

4.3.1. Методы прямого обнаружения

OMV был идентифицирован в мазках-отпечатках почки при помощи IFAT. Наиболее широко применяемым методом обнаружения OMV непосредственно в тканях рыб является использование методов ПЦР, специфических для OMV.

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Вирусные антигены были обнаружены в инфицированных тканях посредством IFAT. Что касается кижуча, культивируемых в прудах рыб пересаживают в специально огороженные сетями участки в море. Ткани почки подвергались сильному давлению, чтобы адаптироваться к морской среде. Во время этого

периода происходит репликация OMV и появление антигена OMV в тканях почки. Метод непрямой реакции флуоресцирующих антител полезен и эффективен для выявления рыб, инфицированных OMV (Kumagai с соавт., 1994).

4.3.1.1.2. Мазки

Опубликованная информация отсутствует.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

Метод, подробно описанный в Пункте 4.3.1.1.1 выше, также подходит для обнаружения антигена OMV в срезах залитых в парафин тканей, фиксированных в 10% нейтральном забуференном формалине (NBF). Общепринятая обработка состоит в инкубировании срезов с 0,1% трипсином в ФБР (PBS) при температуре 37°C в течение 30 минут. Затем срезы промывают в холодном ФБР.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные среды

Линия клеток, которую надлежит использовать: *RTG-2* или *CHSE-214*.

4.3.1.2.1.1. Инокулирование клеточных монослоев

- i) Выполните дополнительное десятикратное разведение супернатантов гомогенатов органов (1/10) и перенесите соответствующий объем каждого из двух разведений на 24-часовые монослои клеток. Инокулируйте как минимум 2 см² осушенного клеточного монослоя, используя 100 мкл каждого разведения.
- ii) Оставьте для адсорбции на 1 час при температуре 15°C и, не удаляя инокулят, добавьте культуральную среду, забуференную при pH 7,4 и обогащенную 2% фетальной бычьей сывороткой (ФБС, FBS) (1 мл/лунку для 24-луночных культуральных планшетов), и инкубируйте при 15°C.

4.3.1.2.1.2. Мониторинг инкубирования

- i) Следите за течением инфекции на позитивных контролях и других инокулированных культурах клеток путем исследования под микроскопом при увеличении 4× или 10× в течение 14 дней. Рекомендуется использовать фазово-контрастный микроскоп.
- ii) Поддерживайте pH культуральной среды на уровне между 7,2 и 7,4 во время инкубирования. Этого можно добиться путем добавления стерильного бикарбонатного буфера (для плотно закрытых культуральных матрасов) или Трис-буферного раствора (для культуральных планшетов) к инокулированной культуральной среде или, еще лучше, путем использования забуференной HEPES среды (HEPES = N-2-гидрокисэтил-пиперазин-N-2-этансульфоновая кислота).

- iii) Если в культурах клеток, которые были инокулированы разведениями тестируемых супернатантов гомогенатов, проявляется цитопатический эффект (ЦПЭ, CPE), необходимо сразу же провести процедуры идентификации (смотрите пункт «Реакция нейтрализации» ниже).

В случае реализации программы по надзору/контролю за здоровьем рыб, возможно, необходимо принять положения для приостановки действия утвержденного статуса по здоровью производственного участка или зоны (если он был утвержден ранее), которые являются местом происхождения вирус-положительного образца. Приостановка действия утвержденного статуса будет сохраняться в силе до тех пор, пока не будет продемонстрировано, что вирус, о котором идет речь, не является OMV.

- iv) Если в инокулированных культурах ЦПЭ не развивается (несмотря на нормальное развитие ЦПЭ в вирусных контролях), инокулированные культуры следует подвергнуть субкультивированию в течение последующих 7 дней. Если вдруг ЦПЭ не будет развиваться на вирусных контролях, тогда процесс следует повторить с использованием свежих чувствительных клеток и новых партий образцов.

4.3.1.2.1.3. Процедуры субкультивирования

- i) Отберите аликвоты культуральной среды от всех монослоев, инокулированных разведениями каждого супернатанта гомогенатов органов.
- ii) При необходимости, повторите реакцию нейтрализации в отношении вируса инфекционного панкреонекроза (IPNV) и/или вируса инфекционного гемопозитического некроза (IHNV), как описано ранее (смотрите Главу 2.3.0., Пункт 2.2.3.), используя разведение вышеуказанного супернатанта (от 1/1 до 1/100).
- iii) Инокулируйте клеточные монослои, как описано выше.
- iv) Инкубируйте и осуществляйте мониторинг, как описано выше.
- v) При отсутствии ЦПЭ тест может быть признан отрицательным.

4.3.1.2.1.4. Выделение OMV из культур неопластических клеток

- i) Отберите неопластические ткани, проведите дезинфекцию йодоформом, 50 частей на миллион в течение 20 минут, и промойте три раза сбалансированным солевым раствором Хэнкса.
- ii) Оставьте ткани на ночь в 0,25% трипсине в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ФБР, PBS) при температуре 5°C. Затем $3,5 \times 10^5$ неопластических клеток/мл высеваются в матрас для культивирования тканей, содержащий 20% фетальную бычью сыворотку (ФБС, FBS).

- iii) Соберите первичную культуру неопластических клеток и культивируйте совместно с клетками RTG-2 или CHSE-214.
- iv) Инкубируйте и осуществляйте мониторинг, как описано выше.

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена, основанные на использовании антител

Реакция нейтрализации

- i) Отберите культуральную среду клеточного монослоя, демонстрирующего ЦПЭ, и центрифугируйте при 2000 g в течение 15 минут при температуре 4°C для удаления клеточного детрита.
- ii) Разведите вирус-содержащую среду от 10^2 до 10^4 мл⁻¹.
- iii) Смешайте аликвоты (например, 200 мкл) каждого разведения вируса с равными объемами раствора антител, специфических к OMV, и аналогичным образом обработайте аликвоты каждого разведения вируса культуральной средой.

(Раствор нейтрализующих антител [NAb] должен иметь титр, вызывающий 50%-е снижение количества бляшек, не менее 2000.)

- iv) Параллельно необходимо проводить другие реакции нейтрализации против:
 - Гомологичного вирусного штамма (положительная реакция нейтрализации),
 - Гетерологичного вирусного штамма (отрицательная реакция нейтрализации).
- v) При необходимости, аналогичную реакцию нейтрализации можно провести при использовании антител к IPNV, чтобы гарантировать, что ни одному IPNV-контаминанту не удалось избежать первого анти-IPNV теста.
- vi) Инкубируйте все смеси при температуре 15°C в течение 1 часа.
- vii) Перенесите аликвоты каждой из указанных выше смесей на клеточные монослои (инокулируйте две культуры клеток на разведение) и оставьте для адсорбции на 0,5~1 час(а) при температуре 15°C; 24- или 12-луночные культуральные планшеты подходят для данной цели при использовании 50 мкл инокулюма.
- viii) По завершении адсорбции добавьте культуральную среду, обогащенную 2% ФТС (фетальная телячья сыворотка, FCS) и забуференную при pH 7,4~7,6, в каждую лунку и инкубируйте при температуре 10~15°C.
- ix) Проверяйте культуры клеток на предмет начала ЦПЭ и произведите считывание результатов, как только это произойдет в не подвергнутых нейтрализации контролях (в положительных контролях нейтрализации клеточные монослои защищены). Результаты регистрируются либо после

простого исследования под микроскопом (предпочтительно, фазово-контрастным) или после сливания культуральной среды и окрашивания клеточных монослоев раствором 1% кристаллического фиолетового в 20% этаноле.

- x) Тестируемый вирус идентифицируется как OMV, когда развитие ЦПЭ предотвращается или заметно задерживается в культурах клеток, в которые вносили вирусную суспензию, обработанную OMV-специфическим антителом, в то время как в других культурах клеток ЦПЭ очевиден.
- xi) При отсутствии какой-либо нейтрализации нейтрализующим антителом (Nab) к OMV, обязательным является проведение IFAT с использованием подозрительного образца.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

ПЦР (Aso с соавт., 2001).

- i) Экстрагируйте нуклеиновую кислоту из клеток, инфицированных штаммом OO-7812 OMV и *H. salmonis*, с использованием InstGene Matrix (Biorad⁵³).
- ii) Пеллетируйте инфицированные вирусом ткани или инфицированные культивируемые клетки центрифугированием при 19000 *g* в течение 15 минут.
- iii) Промойте осадки после центрифугирования два раза при помощи 1 мл ФБР и смешайте с 200 мкл хелатообразующей смолы (Sigma).
- iv) Инкубируйте смесь при температуре 56°C в течение 20 минут в водяной бане, встряхните на вортексе, а затем поместите в кипящую водяную баню на 8 минут.
- v) Встряхните образцы на вортексе и центрифугируйте при 8200 *g* (10000 об/мин) в течение 90 секунд.
- vi) Подвергните супернатант ПЦР.
- vii) Прямой праймер (F10) – 5'-GTA-CCG-AAA-CTC-CCG-AGT-C-3', а обратный праймер (R5) – 5'-AAC-TTG-AAC-TAC-TCC-GGG-G-3'.
- vii) Инкубируйте образцы, наборы праймеров и реакционные смеси в течение 30 циклов в автоматическом термоциклере (GeneAmp PCR 9700, Applied Biosystems), при этом каждый цикл состоит из денатурации при температуре

⁵³ Ссылка на конкретные коммерческие продукты в качестве примеров не подразумевает их одобрения со стороны МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, упоминаемым в настоящем *Руководстве по водным животным*.

94°C в течении 30 секунд, отжига при температуре 56°C в течение 30 секунд и элонгации при температуре 72°C в течение 30 секунд.

- ix) Проведите анализ продукта амплификации для определения размера и чистоты при помощи электрофореза (100 В в течение 30 минут) в 2% агарозном геле и произведите окраску бромидом этидия.
- x) С помощью ПЦР с использованием данных наборов праймеров амплифицировали сегмент ДНК длиной 439 пар-оснований, полученный из штаммов OMV, выделенных от симы, кижуча и радужной форели, а также печени, почки, мозга и нервной ткани, и сегмент ДНК длиной 800 пар-оснований, полученный из SalHV-1. SalHV-1 и SalHV-2 смогли дифференцировать посредством профиля данной амплифицированной ДНК в агарозном геле (Aso с соавт., 2001).

4.3.2. Серологические методы

4.3.2.1. Непрямая реакция флуоресцирующих антител

- i) Подготовьте монослой клеток в лунках (2 см²) культуральных пластиковых планшетов или на покровных стеклах с тем, чтобы получить приблизительно 80% конфлюэнтность, что обычно достигается в пределах 4 часов инкубирования при температуре 22°C (произведите высев шести клеточных монослоев на каждый изолят вируса, подлежащий идентификации, плюс два для положительных и два для отрицательных контролей). Содержание ФБС в среде для культивирования клеток можно сократить до 2–4%. Если необходимо идентифицировать многочисленные вирусные изоляты, настоятельно рекомендуется использовать планшеты Тerasaki.
- ii) Когда клеточные монослой будут готовы для инфицирования, то есть в тот же день или на следующий день после посева, инокулируйте вирусные суспензии, которые необходимо идентифицировать, выполнив шаги для десятикратного разведения непосредственно в культуральных лунках или матрасах.
- iii) Проведите разведение контрольной вирусной суспензии OMV аналогичным образом, чтобы получить вирусный титр приблизительно 5000-10000 бляшкообразующих единиц (БОЕ, PFU) мл⁻¹ в культуральной среде.
- iv) Инкубируйте при температуре 15°C в течение 48 часов.
- v) Удалите культуральную среду, ополосните один раз при помощи 0,01 М ФБР, рН 7,2, затем три раза в течение непродолжительного времени холодным ацетоном (хранившимся при температуре –20°C) для покровных стекол или смесью ацетона 30%/этанола 70%, также при –20°C, для пластиковых лунок.
- vi) Дайте фиксатору подействовать в течение 15 минут. Объем 0,5 мл достаточно для 2 см² клеточного монослоя.

- vii) Дайте клеточным монослоям просохнуть на воздухе в течение, по меньшей мере, 30 минут и сразу же процессируйте или заморозьте при температуре – 20°C.
- viii) Приготовьте раствор очищенного антитела или сыворотки к OMV в 0,01 М ФБР, pH 7,2, с содержанием 0,05% Tween 80 (PBST) при соответствующем разведении (которое было установлено ранее или предлагается поставщиком реактивов).
- ix) Регидратируйте клеточные монослои путем 4 шагов ополаскивания раствором PBST, и полностью удалите данный буфер после последнего ополаскивания.
- x) Проведите обработку клеточных монослоев раствором антитела в течение 1 часа при 37°C в камере влажности и не допускайте испарения. Объем раствора, который надлежит использовать, составляет 0,25 мл на лунку 2 см².
- xi) Ополосните четыре раза с помощью PBST, как описано выше.
- xii) Проведите обработку клеточных монослоев в течение 1 часа при температуре 37°C раствором конъюгированного с флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ, FITC) антитела к иммуноглобулину, использовавшегося в первом слое и подготовленного согласно инструкциям производителя. Эти FITC-меченые антитела представляют собой, в большинстве случаев, антитела кролика или козы.
- xiii) Ополосните четыре раза с помощью PBST.
- xiv) Исследуйте обработанные клеточные монослои непосредственно на пластиковых планшетах или смонтируйте покровные стекла, используя солевой раствор глицерина при pH 8,5 перед наблюдением под микроскопом.
- xv) Исследуйте под падающим УФ-светом, используя микроскоп с окулярами 10× и линзами объектива 20–40× с числовой апертурой > 0,65 и > 1,3, соответственно. Что касается положительных и отрицательных контролей, необходимо убедиться, что они дали ожидаемые результаты, до любого другого наблюдения.

4.3.2.2. Твердофазный иммуноферментный анализ

- i) Сенсибилизируйте лунки микропланшетов, предназначенных для твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA), соответствующими разведениями моноклонального антитела или очищенных иммуноглобулинов (Ig), специфических к OMV, в 0,01 М ФБР, pH 7,2 (200 мкл/лунку).
- ii) Инкубируйте в течение ночи при температуре 4°C.
- iii) Ополосните четыре раза с помощью 0,01 М ФБР с содержанием 0,05% Tween 20 (PBST).

- iv) Блокируйте обезжиренным молоком (5% в PBST) или другим блокирующим раствором в течение 1 часа при 37°C (200 мкл/лунку).
- v) Ополосните 4 раза с помощью PBST.
- vi) Добавьте 2% Triton X-100 к вирусной суспензии, подлежащей идентификации.
- vii) Распределите по 100 мкл/лунку разведения (с шагом 2 или 4) вируса, который необходимо идентифицировать, и контрольного вируса OMV, и оставьте для реакции с сенсибилизирующим антителом к OMV в течение 1 часа при 20°C.
- viii) Ополосните 4 раза с помощью PBST.
- ix) Добавьте в лунки биотинилированное поликлональное антитело к OMV.
- x) Инкубируйте в течение 1 часа при 37°C.
- xi) Ополосните 4 раза с помощью PBST.
- xii) Добавьте конъюгат пероксидазы хрена со стрептавидином к тем лункам, в которые вносили конъюгат антитела с биотином, и инкубируйте в течение 1 часа при 20°C.
- xiii) Ополосните 4 раза с помощью PBST.
- xiv) Добавьте субстрат и хромоген. Произведите остановку теста, когда среагируют положительные контроли, и осуществите мониторинг результатов.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

В качестве примера имеющиеся в настоящее время методы для целевого надзора и диагностики OMVD перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, использованные в Таблице, означают: а = данный метод является методом, рекомендованным по причинам доступности, целесообразности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = данный метод применяется в некоторых ситуациях, однако затраты, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение; и d = данный метод в настоящее время не рекомендуется для данной цели. Данные обозначения в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает в себя такие аспекты, как достоверность, чувствительность, специфичность и целесообразность. Хотя не все из тестов, перечисленных как относящиеся к категории А или В, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются, не давая при этом вызывающих сомнение результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	PL	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	b	b	b	b	c
Культура клеток	b	b	b	b	b	a
Прямая СМ	d	d	d	d	d	d
Гистопатология	b	b	b	b	b	a
Трансмиссионная ЭМ	c	c	c	c	c	c
Исследования, основанные на использовании антител	b	b	b	b	b	a
<i>In situ</i> с использованием ДНК-зондов	c	c	c	c	c	c
ПЦР	b	b	b	b	a	a
Секвенирование	d	d	d	d	d	d

PL = постличинки; СМ = световая микроскопия; ЭМ = электронная микроскопия; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора для объявления свободы от болезни, вызываемой вирусом *Oncorhynchus masou*

Информация о распределении и инцидентности OMV важна для предотвращения передачи потомству от зрелых лососевых. В этой связи важное значение имеет изучение распространенности OMV среди зрелых лососевых рыб. Произведен отбор образцов от шестидесяти рыб, и образцы отбирались в индивидуальном порядке. Образцы овариальной жидкости отбирали по методу Yoshimizu с соавт., 1985. Стерилизованный наконечник автоматической пипетки вводили в урогенитальное отверстие зрелой рыбы. Один миллилитр овариальной жидкости, отобранной от рыб, подвергали обработке в соответствии с методом обработки антибиотиками. Подвергнутые обработке антибиотиками образцы перевозили в лабораторию с использованием льда.

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

OMV подозревают, если удовлетворен по меньшей мере один из следующих критериев:

- Наличие типичных клинических признаков OMVD в популяции восприимчивых рыб.
- Демонстрация типичной гистопатологии на срезах тканей печени, соответствующей с OMVD.

- iii) Единственный положительный результат, полученный в ходе одного из диагностических исследований, таких как IFAT на мазках-отпечатках тканей печени или почки или ПЦР.
- iv) Перемещение живой рыбы с какого-либо места, где было подтверждено или подозревают присутствие OMV из-за наличия клинической болезни, в места, не подозрительные по OMV.
- v) Были обнаружены антитела к OMV.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Следующие критерии должны быть удовлетворены для подтверждения OMV:

- i) Смертность, клинические признаки и патологические изменения, сообразные с болезнью, вызываемой OMV, и обнаружение OMV с помощью одного или нескольких из нижеперечисленных методов:
 - a) Выделение и идентификация OMV в культуре клеток из по меньшей мере одного образца, полученного от любой рыбы в данном месте, как описано в Пункте 4.3.1.2.1;
 - b) Обнаружение OMV при помощи PCR методами, описанными в Пункте 4.3.1.2.3;
 - c) Обнаружение OMV в препаратах тканей путем использования специфических антител к OMV (например, IFAT на отпечатках тканей, как описано в Пункте 4.3.2.
- ii) При отсутствии смертности или клинических признаков – при помощи одного или нескольких из нижеперечисленных методов:
 - a) Обнаружение и подтверждение OMV при помощи PCR методами, описанными в Пункте 4.3.1.2.3;
 - b) Положительные результаты, полученные в ходе двух отдельных и отличных друг от друга диагностических исследований, описанных выше.

8. Библиография

ASO Y., WANI J., KLENNER D.A.S. & YOSHIMIZU M. (2001). Detection and identification of *Oncorhynchus masou* virus (OMV) disease by polymerase chain reaction (PCR). *Bull. Fish. Sci. Hokkaido Univ.*, **52**, 111–116.

FURIHATA M., HOSOE A., TAKEI K., KOHARA M., NAKAMURA J., MOTONISHI A. & YOSHIMIZU M. (2003). Outbreak of salmonid herpesviral disease in cultured rainbow trout. *Fish Pathol.*, **38**, 23–25.

GOU D.F., KUBOTA H., ONUMA M. & KODAMA H. (1991). Detection of salmonid herpesvirus (*Oncorhynchus masou* virus) in fish by southern-blot technique. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 43–48.

HATORI S., MOTONISHI A., NISHIZAWA T. & YOSHIMIZU M. (2003). Virucidal effect of

- disinfectants against *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Fish Pathol.*, **38**, 185–187.
- HAYASHI Y., IZAWA H., MIKAMI T. & KODAMA H. (1993). A monoclonal antibody cross-reactive with three salmonid herpesviruses. *J. Fish Dis.*, **16**, 479–486.
- KIMURA I. (1976). Tumor of lower vertebrates. *In: Cancer*. Sugiyama T. & Yamamoto Y., eds., Iwanami-Shoten, Tokyo, Japan, 270–283.
- KIMURA T., SUZUKI S. & YOSHIMIZU M. (1983a). *In vitro* antiviral effect of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine on the fish herpesvirus *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Antiviral Res.*, **3**, 93–101.
- KIMURA T., SUZUKI S. & YOSHIMIZU M. (1983b). *In vivo* antiviral effect of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine on experimental infection of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) fry with *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Antiviral Res.*, **3**, 103–108.
- KIMURA T., YOSHIMIZU M. & TANAKA M. (1980). Salmonid viruses, a syncytium-forming herpesvirus from landlocked *Oncorhynchus masou*. *Fish Health News*, **9**, iii.
- KIMURA T., YOSHIMIZU M. & TANAKA M. (1981a). Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou* II. Oncogenic nature. *Fish Pathol.*, **15**, 149–153.
- KIMURA T., YOSHIMIZU M. & TANAKA M. (1983c). Susceptibility of different fry stages of representative salmonid species to *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Fish Pathol.*, **17**, 251–258.
- KIMURA T., YOSHIMIZU M., TANAKA M. & SANNOHE H. (1981b). Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou* virus (OMV) I. Characteristics and pathogenicity. *Fish Pathol.*, **15**, 143–147.
- KOHARA K. & DENDA I. (2010). Production of allotriploid “Shinsyu Salmon” by chromosome manipulation. *Fish Health Breed. Sci.*, **37**, 6–66.
- KUMAGAI A., TAKAHASHI K. & FUKUDA H. (1994). Epizootics caused by salmonid herpesvirus type 2 infection in maricultured coho salmon. *Fish Pathol.*, **29**, 127–134.
- TANAKA M., YOSHIMIZU M. & KIMURA T. (1984). *Oncorhynchus masou* virus: Pathological changes in masu salmon (*Oncorhynchus masou*), chum salmon (*O. keta*) and coho salmon (*O. kisutch*) fry infected with OMV by immersion method. *Bull. Jpn Soc. Scientif. Fisheries*, **50**, 431–437.
- YOSHIMIZU M. (2009). Control strategy for viral diseases of salmonid fish, flounders and shrimp at hatchery and seeds production facility in Japan. *Fish Pathol.*, **44**, 9–13.
- YOSHIMIZU M., FUKUDA H., SANO T. & KIMURA T. (1995). Salmonid herpesvirus 2. Epizootiology and serological relationship. *Vet. Res.*, **26**, 486–492.
- YOSHIMIZU M. & KASAI H. (2011). Chapter 7: Oncogenic viruses and *Oncorhynchus masou* virus. *In: Fish Diseases and Disorders*, Vol. 3, Second Edition: Viral, Bacterial and Fungal Infections. Woo P.T.K. & Bruno D.D., eds., CAB International, UK, 276–301.
- YOSHIMIZU M., KIMURA T. & WINTON J.R. (1985). An improved technique for collecting reproductive fluid samples from salmonid fishes. *Prog. Fish Culturist*, **47**, 199–200.

YOSHIMIZU M. & NOMURA T. (2001). *Oncorhynchus masou* virus (OMV): Epidemiology and its control strategy. *Bull. Nat. Res. Inst. Aquaculture*, **Suppl. 5**, 11–14.

YOSHIMIZU M., NOMURA T., EZURA Y. & KIMURA T. (1993). Surveillance and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and *Oncorhynchus masou* virus (OMV) of wild salmonid fish returning to the northern part of Japan 1976 to 1991. *Fisheries Res.*, **17**, 163–173.

YOSHIMIZU M., TAKIZAWA H. & KIMURA T. (1986). U.V. susceptibility of some fish pathogenic viruses. *Fish Pathol.*, **21**, 47–52.

YOSHIMIZU M., TANAKA M. & KIMURA T. (1987). *Oncorhynchus masou* virus (OMV): Incidence of tumor development among experimentally infected representative salmonid species. *Fish. Pathol.*, **22**, 7–10.

YOSHIMIZU M., YOSHINAKA T., HATORI S. & KASAI H. (2005). Survivability of fish pathogenic viruses in environmental water, and inactivation of fish viruses. *Bull. Fish. Res. Agen.*, **Suppl. 2**, 47–54.

*
* *

NB: Существует Референтная лаборатория МЭБ по болезни, вызываемой вирусом
Oncorhynchus masou

(смотрите 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/>).

За любой дополнительной информацией о болезни, вызываемой вирусом *Oncorhynchus masou*, пожалуйста, обращайтесь в Референтные лаборатории МЭБ.

ВИРУСНАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ И РЕТИНОПАТИЯ

1. Область применения⁵⁴

В целях данной главы вирусная энцефалопатия и ретинопатия (ВЭР, VER) также называемая вирусным нервным некрозом (ВНН, VNN), - это тяжелая болезнь нескольких видов морских рыб, которая приводит к значительным потерям в популяции в связи с вакуолизацией нервной ткани в центральной нервной системе и поражением сетчатки.

2. Сведения о болезни

2.1. Характеристика возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Изначально возбудитель ВЭР или ВНН был причислен к семейству *Nodaviridae* по результатам очистки тканей мозга от инфицированной личинки полосатой ставриды, поэтому вирусу было дано наименование «вирус нервного некроза полосатой ставриды» (SJNNV) (Mori с соавт., 1992). Впоследствии от других видов рыб были выделены другие возбудители ВЭР/ВНН (Chi с соавт., 2001; Comps с соавт., 1994). В текущей таксономической классификации вирусы относятся к роду *Betanodavirus* семейства *Nodaviridae* (Schneemann с соавт., 2005). Бетанодавирусы являются безоболочечными, сферическими вирусами, приблизительно 25 нм в диаметре. Геном состоит из двух молекул положительно-полярной оцРНК; РНК1 (3,1 кб) кодирует репликазу (110 кДа), и РНК2 (1,4 кб) кодирует белок оболочки (42 кДа). Были расшифрованы полные нуклеотидные последовательности РНК1 и РНК2 SJNNV и др. (Iwamoto с соавт., 2001; Iwamoto с соавт., 2004; Sommerset&Nerland, 2004; Tan с соавт., 2001). На основании филогенетического анализа варибельной области Т4 РНК1 бетанодавирусы были предварительно поделены на четыре основных генотипа: тип SJNNV, тип вируса нервного некроза бурого скалозуба (TPNNV), тип вируса нервного некроза вераспера (BFNNV), и тип вируса нервного некроза краснопятнистого групера (RGNNV) (Nishizawa с соавт., 1997). Идентифицированные генотипы частично коррелируют с тремя разными серотипами, которые были идентифицированы в реакции нейтрализации с поликлональными антителами, разными видами хозяев и разной оптимальной температурой роста *in vitro* (Iwamoto с соавт., 2000; Mori с соавт., 2003). Также был предложен дополнительный генотип, включая штамм бетанодавируса тюрбо (TNV) (Johansen с соавт., 2004). Во избежание таксономической путаницы Thiery с соавт., 2004 предложили числовую номенклатуру (кластер I, II, III, IV), вне зависимости от происхождения видов хозяев (Iwamoto с

⁵⁴Примечание: Вариант текста принят Всемирной Ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2013 года. Данная болезнь была исключена из списка болезней МЭБ.

соавт., 2000). В Таблице 2.1 приведены официальные генотипы, целевые виды хозяев и оптимальная температура роста *in vitro*.

Таблица 2.1. Генотипические и фенотипические варианты бетанодавируса

Генотип	Серотип	Целевой вид рыбы-хозяина	Оптимальная температура роста
SJNNV	A	Полосатая ставрида	20-25°C
TPNNV	B	Бурый скалозуб	20°C
DFNNV	C	Холодноводные рыбы: атлантический палтус, атлантическая треска, камбала и т.д.	15-20°C
RGNNV	C	Тепловодные рыбы: азиатский морской окунь, европейский морской окунь, групперы и т.д.	25-30°C

2.1.2. Выживаемость вне организма-хозяина

Бетанодавирусы обладают высокой резистентностью в водной среде и могут долгое время выживать в морской воде при низких температурах (Frerichs с соавт., 2000), в то время как при 25°C и выше выживаемость значительно снижается. Контаминация водной среды после возникновения вспышки, сохраняется в течение длительного времени и представляет собой источник инфекции для диких восприимчивых видов. В замороженной рыбе вирус может сохраняться в течение длительного периода и представлять потенциальный риск, если в качестве корма используется сырая рыба (Mori с соавт., 2005). За пределами водной среды бетанодавирусы легко теряют свою цитопатогенность. В условиях высыхания после 7-дневного периода при 21°C наблюдалась инаktivация >99% бетанодавирусов (Maltese & Bovo, 2007).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инаktivации)

Обычные дезинфицирующие средства, такие как гипохлорит натрия, йод, перекись водорода и хлорид бензалкония, эффективны для инаktivации бетанодавирусов, в то время как формалин проявляет слабую активность (Frerichs с соавт., 2000). Озон также используется для предотвращения или уменьшения вирусной контаминации

поверхности икринок (Grotmol & Totland, 2000), а вода, контаминированная вирусами, может быть эффективно стерилизована ультрафиолетовым облучением (Fretrichs с соавт., 2000).

2.1.4. Жизненный цикл

Наличие водоемов в дикой природе является по всей вероятности первоначальным источником заражения культивируемых популяций, в то время как торговля инфицированной молодью представляет собой наиболее распространенный способ распространения большого количества вирусных частиц в окружающей среде. О жизненном цикле бетанодавирусов известно мало. Учитывая результаты экспериментальных исследований, проведенных различными авторами, вирус, скорее всего, проникает в организм хозяина через кишечный эпителий и периферическую нервную систему, очень быстро достигая центральных нервных тканей, где он может вызвать смерть хозяина или оставаться в течение нескольких лет у выживших особей (Johansen с соавт., 2004). Мертвая разложившаяся рыба может распространять вирус в окружающую среду через различных биологических переносчиков. Кроме того, зараженная рыба может быть съедена хищниками, которые могут не только сами заразиться, но распространить вирус через зараженные фекалии. С большой долей вероятности подозревалась вертикальная передача вируса у некоторых видов (Arimoto с соавт., 1992; Comps с соавт., 1994; Grotmol & Totland, 2000; Mushiake с соавт., 1994; Watanabe с соавт., 2000); в этом случае вирус может достичь развивающихся гонад, где он часто обнаруживался (Dalla Valle с соавт., 2000; Mushiake с соавт., 1994; Nishizawa с соавт., 1996), и инфицировать икринки и семенные жидкости (Nishizawa с соавт., 1994).

2.2. Факторы, связанные с хозяином

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

На сегодняшний день болезнь регистрировалось более чем у 50 видов рыб, главным образом морских, причем наиболее восприимчивыми оказались следующие виды: полосатая ставрида, европейский морской окунь (*Dicentrarchus labrax*), груперы и камбала (Munday с соавт., 2002; Sano с соавт., 2011). Несколько вспышек было также зарегистрировано в пресноводных хозяйствах (Bovo с соавт., 2011; Chi с соавт., 2003). Естественно восприимчивые к ВЭР виды рыб перечислены в Таблице 2.2; у других видов пресноводных рыб после экспериментального заражения появились клинические признаки (Furusawa с соавт., 2007), свидетельствующие о возможности появления новых хозяев, особенно в будущем, когда для аквакультурного разведения будут отбираться новые виды.

Таблица 2.2. Виды рыб, поражаемые ВЭР/ВНН

Отряд	Семейство	Общее название	Латинское название
Осетрообразные	Осетровые	Русский осетр	<i>Acipenser gueldenstaedti</i>
Угреобразные	Угревые	Европейский угорь	<i>Anguilla anguilla</i>
Гоноринхообразные	Молочные рыбы	Молочная рыба	<i>Chanos chanos</i>
Сомообразные	Сомовые	Китайский сом	<i>Parasilurus asotus</i>
		Австралийский сом	<i>Tandanus tandanus</i>
Трескообразные	Тресковые	Атлантическая треска	<i>Gadus morhua</i>
		Пикша	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>
Карпозубообразные	Пецилиевые	Гуппи	<i>Poecilia reticulata</i>
Окунеобразные	Хирурговые	Полосатый хирург	<i>Acanthurus triostegus</i>
	Апогоновые	Узкополосый кардинал	<i>Apogon exostigma</i>
	Зубатковые	Морской волк	<i>Anarchichas minor</i>
	Ставридовые	Зубатый каранкс	<i>Pseudocaranx dentex</i>
		Большая сериола	<i>Seriola dumerili</i>
		Круглый помпано	<i>Trachinotus falcatus</i>
		Тупорылый помпано	<i>Trachinotus blochii</i>
	<i>Centropomatidae</i>	Белый морской окунь	<i>Lates calcarifer</i>
		Японский морской судак	<i>Lateolabrax japonicus</i>
	Цихлиды	Тиляпия	<i>Oreochromis niloticus</i>
	<i>Eleotridae</i>	Сонная треска	<i>Oxyeleotris lineolata</i>
	Эфипповые	Голубой платакс	<i>Platax orbicularis</i>
	Трубачевые	Полосатый трубач	<i>Latris lineata</i>
	Луциановые	Красноперый луциан	<i>Lutjanus erythropterus</i>
		Красный луциан	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>
	Малакантовые	Японский кафельник	<i>Branchiostegus japonicus</i>
	Кефалевые	Черная кефаль	<i>Mugil cephalus</i>
		сингиль	<i>Liza aurata</i>
		Европейская барабуля	<i>Mullus barbatus</i>
	Оплегнатовые	Полосатый оплегнат	<i>Oplegnathus fasciatus</i>
		Пятнистый оплегнат	<i>Oplegnathus punctatus</i>
	<i>Percichthyidae</i>	Обыкновенный лаврак	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	<i>Rachicentridae</i>	Кобия	<i>Rachycentron canadum</i>
	Горбылевые	Красный горбыль	<i>Sciaenops ocellatus</i>
		Светлая умбрина	<i>Umbrina cirrosa</i>
		Белый горбыль	<i>Atractoscion nobilis</i>
	Скумбриевые	Тихоокеанский голубой тунец	<i>Thunnus orientalis</i>
	Серрановые	Краснопятнистый групер	<i>E. akaara</i>
		Желтый групер	<i>E. awoara</i>
		Семиполосный групер	<i>E. septemfasciatus</i>
		Чернопятнистый групер	<i>E. fuscoguttatus</i>
		Коричневопятнистый групер	<i>E. malabaricus</i>
		Темный групер	<i>E. marginatus</i>
		Бурый групер	<i>E. moara</i>

		Групер-таувина	<i>E. tauvina</i>
		Полосатый групер	<i>E. lanceolatus</i>
		Горбатый групер	<i>Chromileptes altivelis</i>
		Белополосый мероу	<i>Epinephelus aeneus</i>
		Оранжевопятнистый групер	<i>E. coioides</i>
	Спаровые	дорада	<i>Sparus aurata</i>
	Цихлиды	Нильская тилapia	<i>Oreochromis niloticus niloticus</i>
Иглобрюхообразные	Единороговые	Спинорог	<i>Stephanolepis cirrifer</i>
	Иглобрюховидные	Красный иглобрюх-фугу	<i>Takifugu rubripes</i>
Камбалообразные	Морские камбалы	Вераспер Мозера	<i>Verasper moseri</i>
	Солеевые	Обычная камбала	<i>Solea solea</i>
	Скольфталмовые	Тюрбо	<i>Psetta maxima</i>
		Японская камбала	<i>Paralichthys olivaceus</i>
		Атлантический палтус	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>
Скорпенообразные	<i>Sebastidae</i>	Белый горбыль	<i>Sebastes oblongus</i>

Для получения ссылок на источники обратитесь в Референтную лабораторию МЭБ

2.2.2. Восприимчивые стадии хозяина

Хотя болезнь поражает главным образом личиночную и молодь, имеются также сообщения о высокой смертности среди особей товарного размера и взрослых рыб, таких как атлантический палтус (*Hippoglossus hippoglossus*), семиполосный групер (*Epinephelus septemfasciatus*) и европейский морской окунь.

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность обнаружения)

На инфицированных фермах вероятность обнаружения возбудителя болезни обычно выше у молоди, чем у более взрослых рыб, в то время как в период икреметания вирус может быть обнаружен в гонадах популяций (Dalla Valle с соавт., 2000; Mushiake с соавт., 1994). По этой причине в программы надзора должны быть включены молодые особи, а также гонадные ткани, яичниковые жидкости и молоки.

2.2.4. Поражаемые органы и инфицированные ткани

Мозг, спинной мозг и сетчатка глаза считаются органами-мишенями, в которых вирус активно реплицируется, вызывая обширную вакуолизацию тканей.

Интрацитоплазматические включения были описаны в клетках головного мозга европейского морского окуня, азиатского морского окуня (*Lates calcarifer*), японской рыбы-попугая (*Oplegnathus fasciatus*) и коричневого групера (*Epinephelus malabaricus*) (Munday с соавт., 2002). Вирус был также обнаружен в гонадах маточного поголовья (Dalla Valle с соавт., 2000; Mushiake с соавт., 1994; Nishizawa с соавт., 1996). У некоторых видов, таких как полосатая ставрида, европейский морской окунь, камбала (*Verasper moseri*), семиполосный групер и атлантический палтус, разводимая рыба, вероятно, является наиболее устойчивым резервуаром вируса и наиболее значительным источником инфекции для личинок и молоди (Mushiake с соавт., 1994; Watanabe с соавт., 2000). Вирусы могут не размножаться и постоянно находиться в репродуктивных органах и с большей вероятностью могут быть обнаружены там при стрессовых условиях (Mushiake с соавт., 1994; Watanabe с соавт., 2000).

2.2.5. Хроническая инфекция с пожизненными носителями

У морского волка (*Anarhichas minor*), экспериментально инфицированного методом погружения, вирус был обнаружен в мозге, по крайней мере 16 недель после заражения (Johansen с соавт., 2003). После естественной вспышки у атлантического палтуса течение инфекции изучалось у выживших особей в течение 1 года (Johansen с соавт., 2002). Доля положительных рыб, исследованных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ИФА, оставалась высокой в течение всего этого периода, и в конце года вирус был вновь выделен от инфицированной субклинической рыбы, что позволяет предположить, что рыба, выжившая после заражения, может удерживать вирус в течение длительного периода времени и потенциально может быть переносчиком инфекции. Недавно была определена клеточная линия (BB), полученная из мозговой ткани баррамунди (*Lates calcarifer*), и на ее основе будет создана действующая модель для изучения вирусной инфекции и механизмов репликации как *in vivo*, так и *in vitro* (Chi с соавт., 2005).

2.2.6. Переносчики

Учитывая, что вода является наиболее важным абиотическим переносчиком, бетанодавирусы могут легко распространяться во время клинической вспышки с одного участка фермы на другой непосредственно через воду и контаминированный персонал, сети, сапоги и другое оборудование. Должны быть приняты адекватные меры биобезопасности, особенно внутри инкубаторов (Mori с соавт., 1998). В открытом море передача инфекции из одного места в другое вызвана приливом, преобладающими течениями, лодками, посещающими различные фермы, и дикой мигрирующей рыбой. Вследствие высокой устойчивости вируса к кислотным условиям и при температуре 37°C (Frerichs с соавт., 2000) следует рассматривать ихтиофаговых птиц в качестве потенциальных переносчиков. Кроме того, в связи с большим объемом торговли особое внимание следует уделять моллюскам, происходящим из инфицированных районов. Вирус был обнаружен у песчаных

червей, принадлежащих к семейству *Nereidae*, рода *Nereis*, собранных вблизи зараженной фермы (Vovo с соавт., неопубликованные наблюдения). Большой международный рынок червей для наживки следует рассматривать как дополнительный фактор риска распространения бетанодавирусов из одного региона в другой.

2.2.7. Известные или предполагаемые носители среди диких водных животных

Хотя роль диких носителей еще предстоит полностью понять, опубликованы данные по обнаружению бетанодавирусов у диких видов в различных регионах (Barker с соавт., 2002; Ciulli с соавт., 2006; Gomez с соавт., 2004). До сих пор неясно, следует ли рассматривать инфицированных особей в качестве вирусного резервуара, в котором патоген может размножаться, не вызывая смертность среди популяций, или их следует считать восприимчивыми к болезням. По этой причине необходимо проводить исследования в ходе экспериментального заражения для лучшего понимания значения бетанодавирусной инфекции для дикой рыбы.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Болезнь может быть передаваться здоровой рыбе в результате совместного обитания, погружения и инъекций (Munday с соавт., 2002). Горизонтальную передачу, часто наблюдаемую в полевых условиях, следует рассматривать как наиболее распространенный способ передачи болезни: через загрязненную воду. Кроме того, имеются некоторые данные о вертикальной передаче инфекции от маточного поголовья потомству у полосатой ставриды, европейского морского окуня, азиатского морского окуня, камбалы, атлантического палтуса и семиполосного групера, как упоминалось ранее (Comps с соавт., 1994; Mori с соавт., 1998; Mushiake с соавт., 1994; Watanabe с соавт., 2000). Этот факт в основном отражается в раннем появлении клинического заболевания и обнаружении вирусного генетического материала в зрелых гонадах (Dalla Valle с соавт., 2000; Mushiake с соавт., 1994; Nishizawa с соавт., 1996); находится ли вирус внутри или снаружи икринок в качестве загрязнителя внешней оболочки, еще предстоит окончательно доказать. Дополнительной возможностью передачи заболевания является кормление популяции сырой рыбой (Mori с соавт., 2005). Имеются также убедительные доказательства того, что озонирование оплодотворенной икры из инфицированной популяции исключает или снижает уровень заражения потомства (Mori с соавт., 1998), что указывает на то, что вертикальная передача может происходить в виде заражения поверхности икринок, по крайней мере, для некоторых видов.

2.3.2. Превалентность

Мало данных о превалентности болезни. В Канаде некоторые популяции дикой рыбы предположительно являются подлинными природными резервуарами, на самом деле, по данным ПЦР, вирус присутствует в 0,23% дикой зимней камбалы (*Pleuronectes americanus*) (Barker с соавт., 2002). В Японии репрезентативная выборка из 30 видов, собранных в двух различных заливах, подтвердила, что большинство культивируемых и диких рыб были положительными (Gomez с соавт., 2004).

2.3.3. Географическое распространение

Болезнь официально зарегистрирована во многих регионах. К ним относятся страны Южной и Восточной Азии (Китай [Китайская Народная Республика], китайский Тайбэй, Индия, Индонезия, Иран, Япония, Корея, Малайзия, Филиппины, Таиланд, Вьетнам), Океании (Австралия, Таити), Средиземноморья (Франция, Греция, Израиль, Италия, Мальта, Португалия, Испания, Тунис), Великобритания, Норвегия, Карибского бассейна и Северной Америки (Канада, США) (Munday с соавт., 2002). Кроме того, регистрировалась смертность, предположительно вызванная бетанодавирусами, среди диких популяций, обитающих вдоль сенегальского и ливийского побережья.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Существуют значительные различия в возрасте, в котором болезнь впервые отмечается, и периоде, в течение которого происходит смерть (Munday с соавт., 2002). В целом, чем раньше проявляются признаки болезни, тем выше уровень смертности. У полосатой ставриды смертность чаще всего наблюдается в течение 10 дней после инкубации икры, в то время как самое раннее проявление болезни происходит на второй день после вылупления, что приводит к почти полной потере личинок. У европейского морского окуня смертность обычно наблюдается лишь примерно через 30 дней после вылупления, однако вспышки болезни могут иметь место даже у рыбы товарного размера. Уровень смертности зависит от возраста. При поражении личиночных стадий наблюдается самая высокая смертность, часто достигающая 100%, в то время как у молоди и более старших особей, как правило, отмечаются более низкие потери.

2.3.5. Экологические факторы

Температура воды является важным фактором, и на появление клинических признаков может существенно влиять температура. Воздействие температуры

особенно хорошо известно при выращивании морского окуня, поэтому болезнь была предварительно идентифицирована как *летняя болезнь*. Корреляция между появлением клинических признаков и температурой воды частично подтверждается исследованиями *in vitro* (Iwamoto с соавт., 2000). Специфичность хозяина имеет место для генотипа RGNNV для тепловодных рыб и генотипа BFNNV для холодноводных рыб. У личинок полосатой ставриды, инфицированных SJNNV (оптимальная температура роста *in vitro*: 20-25°C), не было отмечено различий в смертности среди различных групп, выращенных при различных температурах воды - от 20°C до 26°C, в то время как в семи группах, инфицированных RGNNV (оптимальная температура роста *in vitro*: 25-30°C), температура воды для выращивания (16-28°C) может влиять на развитие болезни. Более высокая смертность и раннее проявление болезни наблюдались при более высоких температурах, в то время как температура воды выше 31°C препятствовала распространению RGNNV у горбатого групера (*Chromileptes altivelis*) (Yuasa с соавт., 2007). С другой стороны, инфицирование AHNV (генотип BFNNV, оптимальная температура: 15-20°C) атлантического палтуса происходит при 6°C. Соленость, по-видимому, не оказывает никакого влияния на возникновение болезни, так как вспышки были зарегистрированы у пресноводных видов.

2.4. Контроль и профилактика

Профилактика болезни может быть эффективной только в том случае, если удастся избежать воздействия возбудителей болезни на разводимые популяции. К сожалению, этот метод очень трудно применить на объектах, где осуществляется выращивание, однако он может быть очень полезен в инкубаторах при условии, что они используют воду, свободную от вирусов, и вводят молодь, полученную из популяций, свободных от вирусов.

2.4.1. Вакцинация

Различные исследования показали, что иммунизация с использованием рекомбинантного белка вирусной оболочки, экспрессированного в кишечной палочке *Escherichia coli*, или вирусоподобных частиц, экспрессированных в бакуловирусной системе экспрессии, или инаktivированного формалином вируса, может быть эффективной в борьбе с болезнью (Tanaka с соавт., 2001; Thiéry с соавт., 2006; Yamashita с соавт., 2005). Недавно в Японии в родаже появилась инаktivированная вакцина RGNNV против ВЭР для семиполосного групера. Одно из исследований показало, что первичная инфекция авирулентным аквабирнавиром эффективно подавляла вторичную бетанодавирусную инфекцию, что предполагает использование аквабирнавируса в качестве потенциального иммуномодулятора (Yamashita с соавт., 2009).

2.4.2. Химиотерапия

Химиотерапии не проводится.

2.4.3. Иммуностимулирование

Нет данных.

2.4.4. Разведение резистентных популяций

Нет данных.

2.4.5. Пополнение популяции резистентными видами

Данные о выборе резистентных линий внутри восприимчивых видов отсутствуют.

2.4.6. Блокирующие агенты

Нет данных.

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Промывка оплодотворенной икры в морской воде, обработанной озоном, или обработка воды для выращивания озоном или хлорированием эффективны для борьбы с болезнью в личиночном производстве полосатой ставриды, семиполосного группера, камбалы барфина и атлантического палтуса (Arimoto с соавт., 1992; Grotmol & Totland, 2000; Mori с соавт., 1998; Watanabe с соавт., 2000).

2.4.8. Общие практики разведения

Помимо общей гигиенической практики, такой как обработка ультрафиолетом воды, поступающей в инкубатор, установка санитарных барьеров, регулярное летование и дезинфекция аквариумов и биологических фильтров, дезинфекция помещений, посуды, исключение сырой рыбы для кормления, важно снизить стрессовые факторы путем совершенствования метода стимулирования икрометания и оплодотворения икры, который включает обеспечение достаточного количества корма для популяции и снижение плотности посадки личинок и молоди (Mushiake с соавт., 1994). Чтобы

избежать вертикальной передачи вируса в инкубаторах, было предложено тестировать каждую рыбу-производителя методом ПЦР на гонадальных биопсиях и отбраковывать все положительные образцы (Mori с соавт., 1998; Mushiake с соавт., 1994; Nishizawa с соавт., 1994); тем не менее, в некоторых случаях сообщалось о невозможности обнаружить вирусную инфекцию методом ПЦР у отдельных особей-производителей (Nishizawa с соавт., 1996).

Для борьбы с ВЭР у вераспера Мозера была также предложена комплексная стратегия борьбы, включающая использование ИФА для проверки уровня специфической активности антител у каждой рыбы-производителя, ПЦР, проводимого на генетическом материале, и дезинфекцию оплодотворенной икры озонированной водой (Watanabe с соавт., 2000).

К сожалению, обнаружение специфических антител с помощью ИФА или реакции нейтрализации не было достаточно изучено и мало известно о интерпретации серологических результатов.

Для хозяйствующих субъектов, занимающихся разведением морского окуня, было предложено пополнять популяции на объектах выращивания, расположенных в неблагоприятных регионах, осенью, когда количество клинических вспышек уменьшается.

3. Отбор проб

3.1. Отбор отдельных особей

Рыбы, демонстрирующие аномальное поведение при плавании, связанное с потерей аппетита и постепенным изменением пигментации, должны рассматриваться как потенциально инфицированные, и от этих особей, в дополнение к агонирующим и павшим особям, должны быть взяты пробы для диагностических целей, чтобы подтвердить подозрение. В лабораторию обычно отправляют целую рыбу, за исключением очень больших особей, от которых можно предоставить только голову. В программах надзора должен быть предусмотрен отбор проб от здоровой на вид рыбы в соответствии со всеобъемлющей статистической выборкой.

3.2. Хранение образцов

До подачи в лабораторию пробы необходимо хранить при температуре 4°C (2-3 дня) или заморозить при температуре -20°C, или -80°C (2-3 недели).

3.3. Объединение проб

Для диагностических целей могут быть приняты объединенные пробы из 5-10 рыб с клиническими признаками. При поиске потенциальных носителей должны быть протестированы отдельные образцы рыбы.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Мозг и глаза являются целевыми тканями для диагностических целей. При подозрении у личиночной или очень молодой стадии (<1 см) может быть исследован весь организм. При длине рыбы от 1 до 6 см вся голова, включая мозг и глаза, должна быть отделена от тела и включена в образец. Для более крупных рыб должны быть отобраны только мозг и глаза.

Другие органы, кроме мозга и глаз, должны считаться непригодными для диагностических целей. Тем не менее, когда рыба-производитель должна быть исследована неинвазивными методами, яйца, яичниковые и семенные жидкости, а также гонадные биопсии должны считаться подходящими образцами, при этом только положительные результаты должны рассматриваться в качестве основания для заключения.

3.5. Пробы/ткани, которые не являются подходящими

Почки, селезенка и сердце, которые обычно рекомендуются для обнаружения ряда вирусных возбудителей болезней рыб, не подходят для диагностики ВЭР или ВНН.

4. Методы диагностики

В течение нескольких лет метод «Золотого стандарта» для обнаружения ВЭР или ВНН заключался в выделении вирусных возбудителей в культуре клеток с последующей иммунологической или молекулярной идентификацией. В настоящее время описано несколько молекулярных инструментов, характеризующихся высокой чувствительностью, но их использование требует дальнейшего подтверждения посредством межлабораторных квалификационных испытаний или исследований эквивалентности с Золотым стандартом.

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

На поверхности тела и жабрах инфицированных рыб нет внешних признаков, кроме постепенного изменения пигментации, описанного у нескольких видов разными авторами. У европейского морского окуня иногда регистрировались кожные эрозии в мандибулярной и черепной области, возможно, травматического происхождения, вызванного нарушением зрения.

4.1.2. Изменения поведения

Инфицированные рыбы демонстрируют разнообразные неустойчивые модели поведения в плавании, такие как спирализация, завихрение или поднятие живота в состоянии покоя (иногда с надуванием плавательного пузыря), или лежание на дне аквариума, или быстрое плавание по кругу или по прямой. У камбалы обычно бывают менее заметные признаки. Особи могут оставаться на дне, сгибая тело при поднятых голове и хвосте. Часто регистрируется потеря аппетита.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

Макроскопических повреждений, связанных с инфекцией, не было, за исключением гиперинфляции плавательного пузыря, которая часто наблюдалась у различных видов, особенно на личиночных стадиях.

4.2.2. Клиническая химия

Нет данных.

4.2.3. Микроскопическая патология

Наиболее распространенные микроскопические поражения, обнаруженные у различных видов: вакуолизация и некроз нервных клеток спинного мозга, головного мозга и/или сетчатки глаза. Эти поражения гораздо более заметны у личинок и молоди, в то время как у более взрослых рыб они иногда встречаются очень редко и их трудно обнаружить. Воспалительный процесс обычно незаметен, а присутствие макрофагов, возможно, связано с вторичной инфекцией.

4.2.4. Влажные препараты

Нет данных.

4.2.5. Мазки

Нет данных.

4.2.6. Фиксированные срезы

Нет данных.

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Субсферические вирусные частицы диаметром около 25 нм могут быть обнаружены в мозге, спинном мозге и сетчатке глаза сильно инфицированных животных. Вирусы могут появляться либо свободно в цитоплазме, либо связанными с мембранами эндоплазматической сетчатки, в первую очередь, в астроцитах нервных клеток, олигодендроцитах и микроглиоцитах. Тем не менее, из-за ограниченной аналитической чувствительности метод не является надежным диагностическим средством.

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) является наиболее быстрым и удобным методом диагностики клинически инфицированных рыб, в то время как вложенная ПЦР или ПЦР в режиме реального времени являются полезными инструментами для диагностики субклинически инфицированных рыб в качестве рыб-носителей. В целом, методы ПЦР, применяемые для диагностики вирусных заболеваний, имеют следующие преимущества: короткое время обработки, быстрота получения результатов и высокая чувствительность и специфичность, и поэтому являются подходящими инструментами для быстрого обнаружения бетанодавируса как в клинически, так и в субклинически инфицированных рыбах. Тем не менее, эти методы нуждаются в дальнейшей проверке путем проведения межлабораторных квалификационных тестов. По этой причине выделение клеточных культур с

последующим иммунным окрашиванием или молекулярной идентификацией по-прежнему является «золотым стандартом» для диагностических целей.

Кроме того, вирус был идентифицирован с помощью иммунофлюоресценции (ИФ), выполненной на отпечатках мозга или замороженных срезах, а также иммуногистохимии (ИГХ) на мозге и сетчатке глаза. Иммуногистохимический анализ является наиболее подходящим анализом для обнаружения вируса в материале, зафиксированном для гистологического анализа.

Опубликованы методы на основе ИФА, выявляющие бетанодавирусные антигены из целевых тканей (Arimoto с соавт., 1992).

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Нет данных.

4.3.1.1.2. Мазки

Отпечатки мозга, окрашенные в соответствии с классическим тестом ИФ, были зарегистрированы в качестве подходящего метода для выявления бетанодавирусной инфекции. Из-за отсутствия данных о чувствительности метод рекомендуется только для рыб с клиническими признаками.

4.3.1.1.2.1. Косвенный флуоресцентный анализ на антитела на отпечатках мозга

Данный протокол долгое время успешно применялся в Референтной лаборатории МЭБ; тем не менее, процедура не была должным образом подтверждена с точки зрения чувствительности и воспроизводимости. Метод рекомендуется только для рыб с клиническими признаками.

- i) Отобрать пробы мозга у рыб с клиническими признаками (по крайней мере, три пробы).
- ii) Использовать адсорбирующую бумагу для удаления излишков жидкости.
- iii) Сделать легкие отпечатки на поверхности стекла (по пять от каждого из трех образцов).

- iv) Дать отпечаткам высохнуть на воздухе.
- v) Зафиксировать отпечатки в абсолютном этаноле или холодном ацетоне (-20°C) на 10 минут.
- vi) Промыть три раза с помощью 0,05% ФБР/Твин 80 (ФБРТ).
- vii) Покрыть отпечатки первичным антителом (т.е. кроличьей сывороткой с антибетанодавирусом) и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C во влажной камере.
- viii) Промыть три раза с помощью 0,05% ФБРТ.
- ix) Покрыть отпечатки коммерчески доступным вторичным антителом, конъюгированным с изотиоцианатом флуоресцеина (т.е. антителом против кроликов Ig) и инкубировать при температуре 37°C в течение 30 минут.
- x) Промыть три раза ФБРТ.
- xi) Закрыть крышкой, используя глицероловый солевой раствор, pH 8,5.
- xii) Наблюдать под ИФ-микроскопом при 100-250×.

4.3.1.1.2.1.1. Интерпретация результатов

4.3.1.1.2.1.1.1. Положительные пробы

Флуоресцентные ячейки, содержащие зеленые блестящие гранулы, легко обнаруживаются.

4.3.1.1.2.1.1.2. Отрицательные пробы

Не должно быть люминесцентного сигнала.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

Специфическое обнаружение возбудителя может быть достигнуто с помощью косвенного флуоресцентного теста на антитела (РИФ), который проводится на погруженных в парафин тканях, как сообщалось различными авторами (Johansen с соавт., 2003; Nguyen с соавт., 1997), с помощью поликлональных или моноклональных антител.

4.3.1.1.3.1. Косвенный флуоресцентный тест на антитела на парафиновых срезах

В качестве примера приводится следующий протокол, но могут быть использованы и другие протоколы, подтвержденные в РИФ.

- i) Сделать срезы толщиной 5 мкм и перенести их на слайды с полилизинным покрытием.
- ii) Оставить срез сушиться на ночь при температуре 37°C.
- iii) Депарафинизировать с ксилолом в течение 2×10 минут, с абсолютным этанолом в течение 2×5 минут.
- iv) Регидрировать срезы: 95°, 70°, 50° и дистиллированная вода.
- v) Промыть с помощью ФБРТ.
- vi) Покрыть секции 0,1% трипсином в ФБР и инкубировать при температуре 37°C в течение 30 минут.
- vii) Промыть три раза с ФБРТ.
- viii) Покрыть срезы первичным антителом (т.е. кроличьей антибетанодавирусной иммунной сывороткой) в течение 30 минут при 37°C во влажной камере.
- ix) Промыть три раза с ФБРТ.
- x) Покрыть срезы в течение 30 минут при температуре 37°C коммерческим конъюгированным изотиоцианатом флуоресцеина (т.е. антителом против кроликов Ig).
- xi) Промыть три раза ФБРТ.
- xii) Накрыть покровным стеклом с использованием глицеринового соляного раствора, pH 8,5.
- xiii) Наблюдать под ИФ-микроскопом и сравнивать с положительным и отрицательным контролем.

4.3.1.1.3.1.1. Интерпретация результатов

4.3.1.1.3.1.1.1. Положительные пробы

Специфическая блестящая флуоресценция наблюдается в цитоплазме пораженных клеток головного мозга и сетчатки глаза.

4.3.1.1.3.1.1.2. Отрицательные пробы

При отрицательном контроле флуоресцентный сигнал не должен присутствовать.

4.3.1.1.3.2. Косвенный флуоресцентный тест на антитела на криостатических срезах

Следующий протокол приводится в качестве примера, но могут быть использованы и другие протоколы, утвержденные для РИФ. Из-за ограниченной чувствительности метод применим только к рыбам с клиническими признаками.

- i) Отобрать пробы мозга или глаз у 2-3 рыб с клиническими признаками.
- ii) Поместить органы вместе на одну подставку для проб криостата.
- iii) Переместить подставку в криостатическую камеру при температуре -20°C .
- iv) При полном замораживании сделать срезы по 5 мкм и перенести их на предметные стекла с полилизинным покрытием.
- v) Дать срезам высохнуть на воздухе.
- vi) Зафиксировать срезы с помощью абсолютного этанола или холодного ацетона (-20°C).
- vii) Покрыть срезы первичным антителом (т.е. кроличьей сывороткой антибетанодавируса) на 30 минут при температуре 37°C во влажной камере.
- viii) Промыть три раза с помощью PBST.
- ix) Покрыть срезы на 30 минут при 37°C коммерчески доступным изотиоцианатом флуоресцеина (т.е. конъюгированные анти-кроличьи Ig антитела).
- x) Промыть с помощью PBST.
- xi) Накрыть покровным стеклом с помощью глицеринового солевого раствора, pH 8.5.
- xii) Наблюдать под иммунофлуоресцентным микроскопом и сравнить с отрицательным и положительным контролем.

4.3.1.1.3.2.1. Интерпретация результатов

4.3.1.1.3.2.1.1. Положительные пробы

Специфическая флуоресценция наблюдается в цитоплазме пораженных клеток мозга или сетчатки глаза.

4.3.1.1.3.2.1.2. Отрицательные пробы

При отрицательном контроле флуоресцентный сигнал должен отсутствовать.

4.3.1.1.3.3. Иммуногистохимия (техника авидин-биотин-пероксидаза)

Этот протокол уже давно применяется в Референтной лаборатории МЭБ и приводится в качестве примера; могут быть приняты различные протоколы, утвержденные для ИГХ.

- i) Депарафинизировать срезы с ксиленом (2×10 минут) и дегидрировать с этанолом (2×5 минут).
- ii) Инкубировать в 3% H_2O_2 в течение 20 минут при комнатной температуре для блокирования эндогенной пероксидазы.
- iii) Гидратировать срезы тканей в понижающей спиртовой серии 95° , 70° , 50° , дистиллированной водой (1 минута).
- iv) Промыть ФБР (pH 7,3) при температуре $37^\circ C$.
- v) Инкубировать срезы с помощью 0,1% трипсина и 0,1% $CaCl_2$ + Tris буфера в течение 30 минут при $37^\circ C$.
- vi) Промыть три раза с помощью ФБР.
- vii) Инкубировать срезы с 5% БСА в ФБР в течение 20 минут при комнатной температуре.
- viii) Удалить БСА и излишки.
- ix) Инкубировать срезы с первичным антителом (т.е. кроличьим антибетанодавирусом), разбавленным в 2,5% БСА в течение 60 минут.
- x) Промыть три раза в Трис-буфере.
- xi) Инкубировать со вторичной биотинизированной сывороткой (т.е. козьими анти-кроличьими иммуноглобулинами в 2,5% БСА в течение 20 минут).
- xii) Промыть три раза в Трис-буфере.
- xiii) Инкубировать с АВ-комплексом/HRP (приготовленным непосредственно перед использованием) в течение 20 минут при комнатной температуре.
- xiv) Удалить ABComplex/HRP.
- xv) Промыть три раза с помощью Трис-буфера.
- xvi) Инкубировать с хромогенным субстратом АЕС (3-амин-9-этилкарбазол; готовится непосредственно перед использованием) в течение 20 минут при комнатной температуре.
- xvii) Промыть дистиллированной водой в течение 5 минут.
- xviii) Контр-окрасить гематоксилином Харриса в течение 30 секунд.
- xix) Поместить срезы в глицерин-желатина.
- xx) Все иммуногистохимические анализы должны включать один положительный и один отрицательный контрольный срез.

4.3.1.1.3.3.1. Интерпретация результатов

4.3.1.1.3.3.1.1. Положительные пробы

Зернисто-красные отложения обнаруживаются в тканях. Бледно-рассеянное красное пятно тканей не рассматривается как специфическое иммунное окрашивание (фон).

4.3.1.1.3.3.1.2. Отрицательные пробы

Иммунного окрашивания не обнаружено.

4.3.1.2. Изоляция и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток

Изоляция бетанодавирусов в небольшом количестве установленных линий клеток рыб хорошо документирована. Две линии клеток рыбы для изоляции и размножения бетанодавирусов доступны для диагностических и исследовательских целей через Европейскую коллекцию клеточных культур (ECACC): линия клеток SSN-1, производная от полосатого змееголова (Frerichs с соавт., 1996) и линия клонированных клеток (E-11), полученная из SSN-1 (Iwamoto с соавт., 2000). Обе культуры клеток могут быть использованы для качественного и количественного анализа всех бетанодавирусов. Были разработаны и описаны другие восприимчивые клеточные культуры (GF-1) (Chi с соавт., 1999), которые могут быть использованы в исследовательских и диагностических целях при условии регулярного мониторинга чувствительности. Для проверки чувствительности используемых клеточных культур титрование замороженного эталонного вируса должно выполняться, по крайней мере, каждые 6 месяцев или всякий раз, когда подозревается снижение восприимчивости клеток.

4.3.1.2.1.1. Инокуляция клеточных монослоев

Подробную информацию о транспортировке, лечении антибиотиками и экстракции вирусов см. в главе «Общая информация».

i) Гомогенизировать пробы с 1:5-1:10 объемами сбалансированного солевого раствора Хэнкса или другой эквивалентной среды, содержащей антибиотика во избежание бактериальной контаминации.

ПРИМЕЧАНИЕ: Предлагается использовать гентамицин (1000 мкг/мл) или пенициллин (800 международных единиц [МЕ/мл]) и стрептомицин (800 мкг/мл), но могут быть использованы другие эффективные антибиотики. Антигрибковые соединения Микостатин или Фунгизон также могут быть включены в среду в конечной концентрации 400 МЕ/мл. Кроме того, может быть добавлено 5% сыворотки или белка.

Обработку антибиотиком можно проводить в течение 4 часов при температуре 15°C или на ночь при 4°C. Вместо этого может быть использована альтернатива фильтрации через мембранный фильтр 0,22 мкм.

ii) Инокулировать суспензию ткани, обработанную антибиотиком, при двух различных разбавлениях, т.е. при первичном разбавлении и при разбавлении в соотношении 1:10, в результате чего окончательное разбавление тканевого материала в среде культуры клеток составит 1:50-100 и 1:500-1000, соответственно.

ПРИМЕЧАНИЕ: Каждое из разбавлений по 100 мкл должно быть инокулировано, по крайней мере, в 2 см² активно реплицирующих монослоев клеточных культур. Может использоваться как обычный, так и адсорбционный метод.

iii) В случае применения метода адсорбции дать инокулуму впитаться на дренированных монослоях в течение 1 часа при температуре 20-25°C. После периода адсорбции добавить новую среду, дополненную 5% ФБР.

iv) Если используется обычный метод, то перед добавлением суспензии, обработанной антибиотиком, можно изменить культуральную среду на новую, дополненную 5% ФБР.

v) Инкубировать при 20-25°C в соответствии с ожидаемым генотипом.

ПРИМЕЧАНИЕ: Оптимальные температуры вирусного роста различаются между четырьмя генотипическими вариантами: 25-30°C для генотипа RGNNV, 20-25°C для генотипа SJNNV, 20°C для генотипа TPNNV и 15-20°C для генотипа BFNNV (табл. 2.1.). По этой причине температура инкубации должна быть выбрана в соответствии с генотипами, присутствующими в исследуемом участке.

4.3.1.2.1.2. Мониторинг инкубации

i) Наблюдать за течением инфекции в положительном контроле и других инокулированных культурах клеток путем регулярного микроскопического обследования при увеличении $\times 40-100$ в течение 10 дней.

ii) При появлении цитопатического эффекта (ЦПЭ) необходимо провести процедуры идентификации (см. ниже).

ПРИМЕЧАНИЕ: ЦПЭ в клетках SSN-1 или E-11 характеризуется тонкими или округлыми, рефрактивными, гранулированными клетками с вакуолями, а также частичным или полным распадом монослоя.

iii) Если после периода первичной инкубации (10 дней) ЦПЭ не происходит, субкультивацию необходимо проводить на свежих культурах, используя площадь выращивания клеток, аналогичную площади выращивания первичной культуры.

4.3.1.2.1.3. Процедуры субкультивации

i) Собрать аликвоты (10%) среды клеточной культуры из всех инокулированных монослоев.

ii) Инокулировать аликвоты, составляющие первичную культуру, в лунки с новыми монослоями клеток, как описано выше (субкультивация «из лунки в лунку»).

iii) Инкубировать и проводить мониторинг, как описано выше, в течение последующих 10 дней.

iv) Если в течение этого периода не происходит ЦПЭ, тест может считаться отрицательным.

v) При появлении ЦПЭ необходимо провести процедуру идентификации (см. ниже).

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигенов на основе антител

4.3.1.2.2.1. Непрямой метод флуоресцирующих антител

- i) Подготовить монослои восприимчивых клеток непосредственно в лунках (2 см²) пластиковых планшетов для клеточных культур, или покровных стеклах, или предметном стекле с лунками для достижения примерно 70-80% конфлюенции, которое обычно достигается в течение 24 часов после инкубации при 25°C.
- ii) Инокулировать вирусные суспензии, которые должны быть идентифицированы с использованием по крайней мере двух десятикратных разведений.
- iii) Инкубировать при температуре 20°C или 25°C в течение 48-72 часов (см. раздел 4.3.1.2.1 «Клеточная культура»).
- iv) Извлечь культуральную среду и зафиксировать ее абсолютным этанолом или 80% холодным ацетоном (-20°C) в течение 10-30 минут.
- v) Промыть три раза с ФБРТ.
- vi) Дать монослоям клеток высохнуть на воздухе.
- vii) Обработать клеточные монослои первичными антителами (т.е. кроличьей сывороткой иммунной против бетанодавируса) в течение 30 минут при температуре 37°C во влажной камере.
- viii) Промыть три раза с ФБРТ.
- ix) Покрыть монослои клеток в течение 30 минут при температуре 37°C коммерчески доступным конъюгированным изотиоцианатом флуоресцеина (т.е. кроличьи антитела Ig).
- x) Промыть ФБРТ.

Перед микроскопическим наблюдением осмотреть обработанные монослои клеток непосредственно на планшетах или установить покровные стекла с использованием глицеринового солевого раствора, pH 8,5.

4.3.1.2.2.1.1. Интерпретация результатов

4.3.1.2.2.1.1.1. Положительные пробы

Блестящие флуоресцентные клетки, разбросанные по монослою.

4.3.1.2.2.1.1.2. Отрицательные пробы

Люминесцентный сигнал не должен быть обнаружен.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Конвенциональная ПЦР

Увеличение количества доступных данных секвенирования позволило разработать диагностические методы на основе ПЦР для обнаружения бетанодавирусов, которые могут быть оптимизированы в соответствии с индивидуальными потребностями. Набор праймеров F2-R3, нацеленных на вариабельный регион T4 сегмента PHK2 (Nishizawa с соавт., 1994), широко использовался в ряде исследований как для диагностических, так и для исследовательских целей. Тем не менее, эти праймеры не удалось использовать в некоторых случаях из-за ограничений чувствительности и специфичности. Nishizawa с соавт., 1996, обратили внимание на то, что небольшое количество вируса у метающих икру особей может быть не обнаружено в реакции ПЦР, что дает ложноотрицательные результаты. С другой стороны, Thiéry с соавт., 1999, сообщили, что набор праймеров F2-R3 не способен распознать геном штамма бетанодавируса атлантического происхождения из-за генетического разнообразия этого вируса. В соответствии с этим наблюдением, Grotmol с соавт., 2000 предположили, что вариации последовательностей между бетанодавирусами могут привести к несоответствию между олигонуклеотидами и их целевой областью, таким образом, ухудшая диагностическую способность ПЦР. После публикации набора праймеров F2-R3 было разработано несколько других протоколов на основе ПЦР для повышения чувствительности и специфичности диагностики бетанодавируса, и некоторые из них представлены в Таблице 4.1. Анализы, разработанные Dalla Valle с соавт., 2000 и Thiéry с соавт., 1999, были протестированы на изолятах бетанодавируса средиземноморского происхождения, в то время как протокол, разработанный Grotmol с соавт., 2000, пригоден для обнаружения холодноводных штаммов.

Таблица 4.1. Наборы праймеров, используемые для обнаружения бетанодавируса методом конвенциональной ПЦР

Праймер	Мишень	Последовательность 5'-3'	Размер ампликона (п.о.)	Ссылки
VNNV1	PHK2	ACA-CTG-GAG-TTT-GAA-ATT-CA	605	Dalla Valle с соавт., 2000
VNNV2		GTC-TTG-TTG-AAG-TTG-TCC-CA		
VNNV3		ATT-GTG-CCC-CGC-AAA-CAC	255	
VNNV4		GAC-ACG-TTG-ACC-ACA-TCA-GT		
AH95-F1	PHK2	AGT-GCT-GTG-TCG-CTG-GAG-TG	341	Grotmol с соавт., 2000
AH95-R1		CGC-CCT-GTG-TGA-ATG-TTT-TG		
F2	PHK2	CGT-GTC-AGT-CAT-GTG-TCG-CT	около 430	Nishizawa с соавт., 1994
R3		CGA-GTC-AAC-ACG-GGT-GAA-GA		
F2	PHK2	CGT-GTC-AGT-CAT-GTG-TCG-CT	420	Thiéry с соавт., 1999b
R3		CGA-GTC-AAC-ACG-GGT-GAA-GA		
F'2		GTT-CCC-TGT-ACA-ACG-ATT-CC	294	
R'3		GGA-TTT-GAC-GGG-GCT-GCT-CA		

4.3.1.2.3.2. ПЦР в реальном времени

В целом, методы ПЦР в реальном времени могут повысить качество аналитических результатов по сравнению с обычными ПЦР анализами, обеспечивая надежные результаты при меньшем количестве используемых проб. Grove с соавт., 2006 разработали и апробировали метод ОТ-ПЦР в реальном времени для специального обнаружения вируса нервного некроза атлантического палтуса. Анализ оказался оптимальным для распознавания холодноводных вирусов, но неэффективным в борьбе со тепловодными штаммами (например, RGNNV). Dalla Valle с соавт., 2005, стандартизировали чувствительную ПЦР в реальном времени на основе SYBR Green для нодавирусов рыб на основе двух молекулярных мишеней (РНК1 и РНК2). Метод позволил обнаружить четыре известных генотипа и был частично валидирован с помощью штамма типа RGNNV. Несмотря на то, что использование неспецифических двухцепочечных красителей ДНК приводит к значительному повышению чувствительности теста, анализ плавления иногда дает сомнительные результаты. Известно, что химические анализы на основе зондов быстрее и обеспечивают более высокую специфичность. Hick & Whittington, 2010 оптимизировали ОТ-ПЦР в реальном времени (qR2T-анализ) на основе TaqMan для обнаружения бетанодавируса, который был проверен. Были оценены аналитическая и диагностическая чувствительность, повторяемость и воспроизводимость. Также была определена специфичность анализа, но протокол не тестировался на штаммы холодноводных вирусов. На сегодняшний день метод на основе TaqMan, разработанный Референтной лабораторией МЭБ для ВЭР или ВНН, апробированный в соответствии со стандартами МЭБ, по-видимому, подходит для обнаружения четырех установленных генотипов, а также бетанодавирусов атлантической трески (*Gadus morhua*) и атлантического палтуса (Panzarin с соавт., 2010). Все праймеры и наборы зондов, относящиеся к процитированной литературе, приведены в Табл. 4.1. Ниже приведен подробный протокол, составленный Panzarin с соавт., 2010, в котором могут быть использованы и другие методы.

4.3.1.2.3.2.1. Очистка РНК

Полная РНК может быть извлечена из тканевых гомогенатов, разбавленных в среде Игла 1:5 (тот же гомогенат может быть использован для выделения вируса в клеточных культурах; подготовку проб см. выше) или инфицированных клеточных монослоев, с помощью NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel GmbH&Co.²) в

² Упоминание отдельных коммерческих продуктов в качестве примеров не означает, что они были одобрены МЭБ. Данное утверждение относится ко всем коммерческим продуктам, упомянутым в настоящем *Водном Руководстве*.

соответствии с рекомендациями производителя. Могут быть использованы альтернативные наборы для выделения РНК с доказанной эффективностью.

4.3.1.2.3.2.2. Обратная транскрипция (ОТ) и синтез кДНК

i) Подготовить реакционную смесь для количества анализируемых образцов. Основная смесь в 30 мкл для одной реакции производится следующим образом (Комплект для обратной транскрипции кДНК высокой эффективности, Applied Biosystems): 6,3 мкл воды для ПЦР; 3 мкл ОТ буфера для 10×; 1,2 мкл 25× смесь дНТФ (100 мМ); 3 мкл 10× РТ рандомизированных праймеров; 1,5 мкл обратной транскриптазы MultiScribe™ (50 U/μl); 15 мкл очищенной РНК.

ii) Поместить пробирки в термоциклер и применять следующие условия: 10 минут преинкубации при 25°C, 120 минут обратной транскрипции при 37°C.

iii) Держать кДНК при температуре -20°C до использования.

4.3.1.2.3.2.3. ПЦР TaqMan в режиме реального времени

i) Подготовьте реакционную смесь для количества анализируемых образцов. Двадцать мкл основной смеси для одной реакции подготавливаются следующим образом (LightCycler® TaqMan® Master, Roche Diagnostics GmbH): 7,7 мкл воды для ПЦР; 0,9 мкл праймера RNA2 FOR (20 мкм); 0,9 мкл праймера RNA2 REV (20 мкм); 1,5 мкл зонда RNA2 (10 мкм); 4 мкл 5× мастер-микса; 5 мкл кДНК.

ii) Поместить образцы на платформу реального времени и установить следующий термический профиль: 10-минутная инкубация при 95°C, затем 45 циклов 10-секундной денатурации при 95°C, 35 секунд отжига при 58°C и 1 секунда удлинения при 72°C. Условия циклирования относятся к 2.0 платформе LightCycler.

iii) Проанализировать данные с помощью программного обеспечения, связанного с контрольно-измерительными приборами. Диагностический предел отсечения (cutoff limit) установлен на отметке 36 CP (crossing point - точка пересечения). В случае сомнительных результатов (например, $CP \geq 36$) повторите анализ.

ПРИМЕЧАНИЕ: Результаты анализа могут варьироваться в зависимости от условий, при которых выполняется протокол (например, тепловой профиль может нуждаться в оптимизации в зависимости от используемой платформы). Следует отметить, что настоятельно рекомендуется выполнить протокол Panzarin с соавт., 2010, в два этапа, в противном случае чувствительность теста может пострадать.

Таблица 4.2. Наборы праймеров/зондов, используемых для обнаружения бетанодавирусов методом ПЦР в реальном времени

Праймер	Мишень	Последовательность 5'-3'	Размер ампликона (п.о.)	Ссылки
Q-RdRP-1	PHK1	GTG-TCC-GGA-GAG-GTT-AAG-GAT-G	273	Dalla Valle с соавт., 2005
Q-RdRP-2		CTT-GAA-TTG-ATC-AAC-GGT-GAA-CA		
Q-CP-1	PHK2	CAA-CTG-ACA-ACG-ATC-ACA-CCT-TC		
Q-CP-2		CAA-TCG-AAC-ACT-CCA-GCG-ACA		
P1	PHK2	GGT-ATG-TCG-AGA-ATC-GCC-C	230	Grove с соавт., 2006
P2		TAA-CCA-CCG-CCC-GTG-TT		
Probe		TTA-TCC-CAG-CTG-GCA-CCG-GC*		
qR2TF	PHK2	CTT-CCT-GCC-TGA-TCC-AAC-TG	194	Hick & Whittington, 2010
qR2TR		GTT-CTG-CTT-TCC-CAC-CAT-TTG		
R2probe2		CAA-CGA-CTG-CAC-CAC-GAG-TTG*		
RNA2 FOR	PHK2	CAA-CTG-ACA-RCG-AHC-ACA-C	93	Panzarin с соавт., 2010
RNA2 REV		CCC-ACC-AYT-TGG-69CVA-C		
RNA2 probe		TYC-ARG-CRA-CTC-GTG-GTG-CVG*		

* Репортерный краситель, FAM; гаситель, BHQ1

ПРИМЕЧАНИЕ: за исключением вышеуказанного метода, ни один из протоколов, указанных в пунктах 4.3.1.2.3.1 и 4.3.1.2.3.2, не был официально утвержден посредством документированных межлабораторных квалификационных испытаний. Протокол Panzarin с соавт., 2012 был подвергнут кольцевому тестированию с участием пяти европейских лабораторий.

4.3.1.2.3.3. Секвенирование

Секвенирование генома не только важно для подтверждения диагноза, но и имеет фундаментальное значение для эпидемиологических исследований. Анализ последовательности варибельного региона T4 (Nishizawa с соавт., 1997) позволяет правильно определить генотип. Однако филогенетический анализ, основанный на последовательности обоих геномных сегментов, представляется более информативным и рекомендуется для выделения возможных реассортации, происходящих между различными генотипами бетанодавирусов и внутри генотипа (Oliveira с соавт., 2009; Panzarin с соавт., 2012; Toffolo с соавт., 2007).

4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

Бетанодавирусы могут быть легко очищены путем ультрацентрифугирования с помощью градиентов хлористого цезия (Chi с соавт., 2001; Comps с соавт., 1994; Mori с соавт., 1992).

4.3.2. Серологические методы

Поскольку исследований было недостаточно, обнаружение специфических антител до сих пор не рассматривалось в качестве рутинного метода скрининга для оценки вирусного статуса популяций рыбы. Тем не менее, различные авторы сообщали о наличии доказательств наличия специфических антител. Согласно полевым наблюдениям, титр в ИФА $\geq 1:40$ указывает на вирусную инфекцию, а значения $\leq 1:10$ - на свободу от вирусной инфекции (Watanabe с соавт., 2000).

5. Рейтинг тестов по цели использования

Методы, доступные в настоящее время для целевого надзора и диагностики ВЭР/ВНН, перечислены в таблице 5.1. Обозначения, используемые в таблице, указывают следующее: а = метод является рекомендуемым по причинам доступности, полезности, диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод имеет применение в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение; и d = метод в настоящее время не рекомендуется для этой цели. н.д. = не применяется. Они в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и полезности. Хотя не все тесты, перечисленные в категории а или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делает их приемлемыми.

Таблица 5.1. Надзор, обнаружение и методы диагностики бетанодавируса

Метод	Целевой надзор			Предварительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	Молодь	Взрослые особи		
Гистопатология	d	d	d	b	d
Гистопатология с последующим иммунным окрашиванием	d	d	d	b	d
Трансмиссионная электронная микроскопия	d	d	d	c	d
Изоляция в клеточной культуре с последующим иммунным окрашиванием	a	a	d	a	a

или ПЦР					
ОТ-ПЦР	b	b	b	a	a
ОТ-ПЦР с последующим секвенированием	d	d	d	b	a
ПЦР в реальном времени	a	a	a	a	a

ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

6. Тест(ы), рекомендуемый(ые) для целевого надзора с целью декларирования свободы от вирусной энцефалопатии и ретинопатии

Целевой надзор должен основываться на регулярном мониторинге хозяйств, занимающихся разведением восприимчивых видов. По возможности предпочтительно отбирать пробы от личинок и молоди в течение наиболее подходящего времени года с учетом оптимальной температуры для ожидаемых генотипов.

ПРИМЕЧАНИЕ: В настоящее время не существует официальных или рекомендованных процедур тестирования здоровых популяций для подтверждения свободы от болезни. ПЦР в реальном времени с последующей изоляцией вируса или конвенциональной ОТ-ПЦР и анализом последовательности в случае положительных результатов следует считать наиболее подходящим методом для целенаправленного надзора за бетанодавирусами.

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Определение случая с подозрением на болезнь

Подозревается наличие ВЭР или ВНН при одном из нижеперечисленных критериев:

- i) Появление аномального поведения при плавании у восприимчивых видов;
- ii) Типичные гистопатологические повреждения, обнаруженные в популяции восприимчивого вида;
- iii) Типичный ЦПЭ, наблюдаемое в культурах клеток без идентификации возбудителя;
- iv) Единый положительный результат одного из диагностических анализов, ранжированного как «а» или «b» в столбце *Предварительный диагноз* Таблицы 5.1;

- v) Перевозка живой рыбы из инфицированного хозяйства на другой объект;
- vi) Наличие различных эпидемиологических связей между одной инфицированной фермой и другой фермой;
- vii) Выявление специфической активности антител.

7.2. Определение случая с подтвержденным наличием болезни

Любая комбинация, по крайней мере, двух из следующих двух методов (с положительными результатами):

- i) Подозрительный случай, при котором в культуре клеток образовался типичный ЦПЭ с последующей идентификацией возбудителя либо с помощью теста на основе антител, либо с помощью молекулярного теста.
- ii) Второй положительный результат, полученный в результате другого диагностического анализа, отнесенного к категории «а» в столбце *Подтверждающий диагноз* Таблицы 5.1 (за исключением комбинации ПЦР + ПЦР в реальном времени).

8. Список литературы

ARIMOTO M., MUSHIAKE K., MIZUTA Y., NAKAI T., MUROGA K. & FURUSAWA I. (1992). Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol.*, 27, 191–195.

BARKER D.E., MACKINNON A.M., BOSTON L., BURT M.D.B., CONE D.K., SPEARE D.J., GRIFFITHS S., COOK M., RITCHIE R. & OLIVIER G. (2002). First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Dis. Aquat. Org.*, 49, 99–105.

BOVO G., GUSTINELLI A., QUAGLIO F., GOBBO F., PANZARIN V., FUSARO A., MUTINELLI F., CAFFARA M. & FIORAVANTI M.L. (2011). Viral encephalopathy and retinopathy outbreak in freshwater fish farmed in Italy. *Dis. Aquat. Org.*, 96, 45–54.

- CHI S.C., HU W.W. & LO B.L. (1999). Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *J. Fish Dis.*, 22, 173–182.
- CHI S.C., LO C.F. & LIN S.C. (2001). Characterization of grouper nervous necrosis virus. *J. Fish Dis.*, 24, 3–13.
- CHI S.C., SHIEH J.R. & LIN S.J. (2003). Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, 55, 221–228.
- CHI S.C., WU Y.C. & CHENG T.M. (2005). Persistent infection of betanodavirus in a novel cell line derived from the brain tissue of barramundi *Lates calcarifer*. *Dis. Aquat. Org.*, 65, 91–98.
- CIULLI S., DI MARCO P., NATALE A., GALLETTI E., BATTIMANI M., SCAGLIARINI A., PURPARI G., CANNELLA V., CASTIGLIONE F. & GUERCIO A. (2006). Detection and characterization of Betanodavirus in wild fish from Sicily, Italy. *Ittiopatologia*, 3, 101–112.
- COMPS M., PEPIN J.F. & BONAMI J.R. (1994). Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 123, 1–10.
- DALLA VALLE L., TOFFOLO V., LAMPRECHT M., MALTESE C., BOVO G., BELVEDERE P. & COLOMBO L. (2005). Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. *Vet. Microbiol.*, 110, 167–179.
- DALLA VALLE L., ZANELLA L., PATARNELLO P., PAOLUCCI L., BELVEDERE P. & COLOMBO L. (2000). Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *J. Fish Dis.*, 23, 321–327.
- FRERICHS G.N., RODGER H.D. & PERIC Z. (1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.*, 77, 2067–2071.
- FRERICHS G.N., TWEEDIE A., STARKEY W.G. & RICHARDS R.H. (2000). Temperature, pH, and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture*, 185, 13–24.
- FURUSAWA R., OKINAKA Y., UEMATSU K. & NAKAI T. (2007). Screening of freshwater fish species for their susceptibility to a betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, 77, 119–125.
- GOMEZ D.K., SATO J., MUSHIAKE K., ISSHIKI T., OKINAKA Y. & NAKAI T. (2004). PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *J. Fish Dis.*, 27, 603–608.

GROTMOL S., NERLAND A.H., BIERING E., TOTLAND G.K. & NISHIZAWA T. (2000). Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Dis. Aquat. Org.*, 39, 79–88.

GROTMOL S. & TOTLAND G.K. (2000). Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 39, 89–96.

GROVE S., FALLER R., SOLEIM K.B. & DANNEVIG B.H. (2006). Absolute quantitation of RNA by a competitive real-time RT-PCR method using piscine nodavirus as a model. *J. Virol. Methods*, 132, 104–112.

HICK P. & WHITTINGTON R.J. (2010). Optimisation and validation of a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of betanodavirus. *J. Virol. Methods*, 163, 368–377.

IWAMOTO T., NAKAI T., MORI K., ARIMOTO M. & FURUSAWA I. (2000). Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, 43, 81–89.

IWAMOTO T., MISE K., MORI K., ARIMOTO M., NAKAI T. & OKUNO T. (2001). Establishment of an infectious RNA transcription system for striped jack nervous necrosis virus, the type species of the betanodavirus. *J. Gen. Virol.*, 82, 2653–2662.

IWAMOTO T., OKINAKA Y., MISE K., MORI K., ARIMOTO K., OKUNO T. & NAKAI T. (2004). Identification of host-specificity determinants in betanodaviruses by using reassortants between striped jack nervous necrosis virus and sevenband grouper nervous necrosis virus. *J. Virol.*, 78, 1256–1262.

JOHANSEN R., RANHEIM T., HANSEN M.K., TAKSDAL T. & TOTLAND G.K. (2002). Pathological changes in juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* persistently infected with nodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, 50, 161–169.

JOHANSEN R., AMUNDSEN M., DANNEVIG B.H. & SOMMER A.I. (2003). Acute and persistent experimental nodavirus infection in spotted wolffish *Anarhichas minor*. *Dis. Aquat. Org.*, 57, 35–41.

JOHANSEN R., ROVE S., SVENDSEN N.A.K., MODAHL I. & DANNEVIG B. (2004). A sequential study of pathological findings in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*(L), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy. *J. Fish Dis.*, 27, 327–341.

MALTESE C. & BOVO G. (2007). Viral encephalopathy and retinopathy. *Ittiopatologia*, 4, 93–146.

MORI K., NAKAI T., MUROGA K., ARIMOTO M., MUSHIAKE K. & FURUSAWA I. (1992). Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 187, 368–371.

MORI K., MANGYOKU T., IWAMOTO T., ARIMOTO M., TANAKA S. & NAKAI T. (2003). Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, 57, 19–26.

MORI K., MUSHIAKE K. & ARIMOTO M. (1998). Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathol.*, 33, 443–444.

MORI K., SUGAYA T., NISHIOKA T., GOMEZ D.K., FUJINAMY Y., OKA M., ARIMOTO M., OKINAKA Y. & NAKAI T. (2005). Detection of Betanodaviruses from feed fish used in marine aquaculture. In: 12th International Conference Diseases of Fish and Shellfish, European Association of Fish Pathologists. Copenhagen (Denmark), 11–16 September 2005. Abstract O-142.

MUNDAY B.L., KWANG J. & MOODY N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, 25, 127–142.

MUSHIAKE K., NISHIZAWA T., NAKAI T., FURUSAWA I. & MUROGA K. (1994). Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, 29, 177–182.

NGUYEN H.D., MUSHIAKE K., NAKAI T. & MUROGA K. (1997). Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Dis. Aquat. Org.*, 28, 87–91.

NISHIZAWA T., MORI K., NAKAI T., FURUSAWA I. & MUROGA K. (1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.*, 18, 103–107.

NISHIZAWA T., MUROGA K. & ARIMOTO M. (1996). Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. *J. Aquat. Anim. Health*, 8, 332–334.

NISHIZAWA T., FURUHASHI M., NAGAI T., NAKAI T. & MUROGA K. (1997). Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1633–1636.

OLVEIRA J.G., SOUTO S., DOPAZO C.P., THIÉRY R., BARJA J.L. & BANDÍN I. (2009). Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *J. Gen. Virol.*, 90, 2940–2951.

PANZARIN V., FUSARO A., MONNE I., CAPPELLOZZA E., PATARNELLO P., BOVO G., CAPUA I., HOLMES E.C. & CATTOLI G. (2012). Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infect. Genet. Evol.*, 12, 63–70.

PANZARIN V., PATARNELLO P., MORI A., RAMPAZZO E., CAPPELLOZZA E., BOVO G. & CATTOLI G. (2010). Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Arch. Virol.*, 155, 1193–1203.

SANO M., NAKAI T. & FIJAN N. (2011). Viral diseases and agents of warmwater fish. In: *Fish Diseases and Disorders*, Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2nd edition. Woo P.T.K & Bruno D.W., eds. CABI, London, UK, 166–244.

SCHNEEMANN A., BALL L.A., DELSERT C., JOHNSON J.E. & NISHIZAWA T. (2005). Family Nodaviridae. In: *Virus Taxonomy*, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Elsevier Academic Press, London, UK, 865–872.

SOMMERSET I. & NERLAND A.H. (2004). Complete sequence of RNA1 and subgenomic RNA3 of Atlantic halibut nodavirus (AHNV). *Dis. Aquat. Org.*, 58, 117–125.

TAN C., HUANG B., CHANG S.F., NGOH G.H., MUNDAY B.L., CHEN S.C. & KWANG J. (2001). Determination of the complete nucleotide sequence of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. *J. Gen. Virol.*, 82, 647–653.

TANAKA S., MORI K., ARIMOTO M., IWAMO T. & NAKAI T. (2001). Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *J. Fish Dis.*, 24, 15–22.

THIÉRY R., ARNAULD C. & DELSERT C. (1999a). Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *J. Fish Dis.*, 22, 201–207.

THIÉRY R., RAIMOND J.C. & CASTRIC J. (1999b). Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Res.*, 63, 11–17.

THIÉRY R., COZIEN J., DE BOISSESON C., KERBART-BOSCHER S. & NEVAREZ L. (2004). Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggest a low host-fish species specificity. *J. Gen. Virol.*, 85, 3079–3087.

THIÉRY R., COZIEN J., CABON J., LAMOUR F., BAUD M. & SCHNEEMANN A. (2006). Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *J. Virol.*, 80, 10201–10207.

TOFFOLO V., NEGRISOLO E., MALTESE C., BOVO G., BELVEDERE P., COLOMBO L. & DALLA VALLE L. (2007). Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 43, 298–308.

WATANABE K., NISHIZAWA T. & YOSHIMIZU M. (2000). Selection of broodstock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 41, 219–223.

YAMASHITA Y., FUJITA Y., KAWAKAMI H. & NAKAI T. (2005). The efficacy of inactivated virus vaccine against viral nervous necrosis (VNN). *Fish Pathol.*, 40, 15–21.

YAMASHITA Y., MORI K. & NAKAI T. (2009). Protection against viral nervous necrosis conferred by simultaneous inoculation of aquabirnavirus and inactivated betanodavirus in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *J. Fish Dis.*, 32, 201–210.

YUASA K., ISTI KOESHARYANI & KETUT MAHARDIKA (2007). Effect of high water temperature on betanodavirus infection of fingerling humpback grouper *Cromileptes altivelis*. *Fish Pathol.*, 42, 219–221.

*
*
*

NB: Назначена Референтная лаборатория МЭБ по вирусной энцефалопатии и ретинопатии (см. Таблицу в конце настоящего Руководства или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ:

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

Для получения более подробной информации по вирусной энцефалопатии и ретинопатии можно обратиться в Референтные лаборатории МЭБ.

БОЛЕЗНИ МОЛЛЮСКОВ

ГЛАВА 2.4.0.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

ВВЕДЕНИЕ⁵⁵

Нижеследующая информация и процедуры подходят для патогенов из списка МЭБ и будут служить руководством для патологов, исследующих вспышки болезней моллюсков или проводящих процедуры эпиднадзора за болезнями. Однако следует проконсультироваться с опытными патологами моллюсков, если болезнь сохраняется или распространяется за пределы тех локаций, где она впервые была обнаружена.

1. Оценка состояния здоровья эпизоотологической единицы

1.1. Образцы материала, используемые для испытаний

Образцы материала зависят от вида, стадии жизни и размера животных, а также от цели тестирования (например, диагностика явно выраженной болезни или отбор проб для целевого надзора с целью демонстрации благополучия по определенной болезни). См. главы по отдельным болезням в данном *Руководстве по водным животным* для получения более подробной информации о требованиях к образцам.

1.2. Спецификации в зависимости от размера моллюска

1.2.1. Для перечисленных паразитов

1.2.1.1. Молодые особи размером менее 1 см

Образцом служит все животное целиком, необходимо удалить раковину или провести протокол декальцинации. Срезы должны быть подготовлены таким образом, чтобы включать большую часть органов. Это может означать необходимость приготовления двух срезов из каждого гистологического блока для получения органов из разных областей (например, расположенных вблизи поверхности или глубже в блоке).

1.2.1.2. Молодые и взрослые особи размером 1-6 см.

Образцом служит все животное целиком. Необходимо приготовить один или несколько срезов толщиной 3-5 мм, включающих губные щупальца, жабры и

⁵⁵ NB: версия, принятая Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 года

пищеварительную железу.

1.2.1.3. Моллюски размером более 6 см.

Подготавливают несколько срезов, содержащих отдельные органы / ткани, включая мантию, жабры, пищеварительную железу, половые железы и почки.

1.2.2. При синдроме увядания морского ушка

Для ушка ≥ 20 мм: делают несколько поперечных срезов толщиной 3-5 мм, содержащих задний пищевод (пост-пищевод), пищеварительную железу и pedalную мышцу.

1.2.3. Для герпесвирусных инфекций морского ушка

Приготавливают образец, как описано в разделе 1.2.2 выше, с добавлением дополнительного среза головы для получения церебрального ганглия и удалением нескольких участков ноги и аддукторного мышечного комплекса, включая один участок 0,25-1,0 см (длина зависит от максимальной длины ушка) сзади головы для получения pedalных ганглий. Кроме того, следует сделать продольный срез от передней pedalной ганглии до задней части pedalных мышц. Для получения более подробной информации о пробоотборе, пожалуйста, обратитесь к разделу С общего введения к этому Разделу *Руководства по водным животным*: Часть 2. Рекомендации, применимые к конкретным болезням.

1.3. Спецификации в зависимости от популяций моллюска

Общие рекомендации можно найти в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (2009), а конкретные сведения о требованиях к образцам для конкретной болезни из списка - в главе по отдельным болезням настоящего *Руководства по водным животным*.

1. Обычно аквакультурные популяции моллюсков выращивают полуинтенсивно (в лотках, мешках, сетях или на веревках, кольях и с использованием методов донного выращивания), и они имеют обширное взаимодействие с природной средой;
2. Культивируемые популяции моллюсков часто имеют компоненты своего жизненного цикла, происходящие в диком состоянии (например, сбор дикой молодежи для дальнейшего выращивания), и такие популяции не всегда доступны для наблюдения и отбора проб;
3. В пределах одной юрисдикции может существовать несколько методов культивирования для одного и того же вида и таким образом представлять различные популяции в отношении характеристик риска;
4. Чрезвычайно большие географические районы могут включать в себя множество мелких смежных ферм или производственных единиц с различными формами

собственности и управления. Это может создавать проблемы при разработке программ отбора проб на основании доли владения;

5. Моллюски могут быть неподвижными (например, взрослые устрицы) в некоторые моменты своего жизненного цикла и очень подвижными на других стадиях (например, личинки устриц);
6. Популяции моллюсков, особенно диких моллюсков, могут быть труднодоступны из-за их среды обитания (например, моллюски, способные заглубляться или сублитеральные популяции);
7. Географические районы часто включают многие виды и возрастные классы моллюсков, полученных из различных источников, что затрудняет идентификацию отдельных популяций моллюсков, на которые могут быть нацелены программы эпиднадзора;
8. Популяции диких моллюсков очень важны для статуса по болезни страны, но не всегда доступны для отбора проб в определенное время.

1.4. Спецификации в соответствии с клиническим статусом

В случае клинической инфекции, кроме целевых органов и тканей, необходимо также отбирать образцы таких органов, как мантия, щупальца и т. д., на которых видны макроскопические аномалии или повреждения. Для проведения теста(тестов) на патоген необходимо отобрать образцы от десяти больных или умирающих моллюсков. Следует также параллельно отбирать образцы ($n > 10$) от явно здоровых особей в одном и том же производственном регионе.

2. Общая обработка образцов

Все отобранные образцы моллюсков должны быть доставлены живыми в утвержденную диагностическую лабораторию. Лаборатория должна быть проинформирована о предполагаемом времени прибытия образца, чтобы иметь возможность подготовить необходимые материалы для обработки моллюсков до получения образцов.

Образцы моллюсков должны быть упакованы в соответствии с действующими стандартами, чтобы сохранить их живыми. Если место отбора проб находится на большом расстоянии от лаборатории, умирающие животные или животные с дурно пахнущими тканями могут оказаться малопригодными для последующего исследования. Необходимые образцы должны быть отправлены как можно скорее после сбора из воды, чтобы уменьшить накопление воздуха и возможную гибель во время транспортировки, особенно это касается умирающих больных моллюсков. Если не указано иное, умирающие животные должны быть помещены на лед (но не заморожены), чтобы замедлить разложение образца.

Для образцов, которые не могут быть доставлены в диагностическую лабораторию живыми, из-за поздней стадии болезни, большого расстояния или медленного транспортного сообщения и т. д. образцы должны быть зафиксированы на месте, как это рекомендовано в следующих разделах настоящей главы или в отдельных главах

настоящего *Руководства по водным животным*. Хотя это подходит, например, для последующего гистологического или просвечивающего электронного микроскопического исследования, другие методы, такие как свежие мазки, отпечатки тканей, рутинная бактериология, микология или жидкая тиогликолатная культура *Perkinsus* spp. *Perkinsus* spp. Рэя, не могут быть выполнены. Диагностические потребности и требования к образцу необходимо обсудить с диагностической лабораторией до сбора образца.

Образцы должны сопровождаться справочной информацией, включая причину подачи образца (эпиднадзор, аномальная смертность, аномальный рост и т. д.), макроскопические наблюдения и связанные с ними параметры окружающей среды, приблизительный уровень распространенности и характер смертности, происхождение и природа моллюсков (вид, возраст, независимо от того, взяты ли образцы из местных популяций моллюсков или запасов, перенесенных с другого места, дата перевозки и местоположение источника и т.д.). Данная информация должна помочь выявить возможные изменения в обращении или условиях окружающей среды, которые могут быть фактором смертности в связи или нет с присутствием возбудителей инфекции.

2.1. Макроскопическое исследование

Макроскопическое наблюдение за моллюсками должно быть направлено, насколько это возможно, на поведение животных, поверхность раковины, внутреннюю оболочку и мягкие ткани.

Часто бывает трудно наблюдать за поведением моллюсков в открытых водах. Однако наблюдение за моллюсками в некоторых местах выращивания, таких как маточное стадо в резервуарах и личинки в инкубаториях, может дать полезные указания на изменения в поведении, связанные с болезнями. Если отмечаются признаки (например, предварительное оседание личинок на дне, накопление пищи в резервуарах, признаки ослабления и т.д.), образцы могут быть исследованы на наличие макроскопических признаков, включая наблюдение под препаровальной лупой для обнаружения аномалий и деформаций, организмов-обрастателей, и зафиксированы для дальнейшей обработки, как это рекомендовано ниже. Для взрослых и молодых особей признаки ослабления могут включать зияние, скопление песка, грязи и мусора в мантии и на жабрах, втягивание мантии от края раковины, снижение активности (плавание гребешка, зарывание моллюска, выпас морского ушка) и т. д. Выпрямляющий рефлекс ушка после переворачивания не возникает у ослабленных животных, и это хороший показатель слабости. Смертность в открытой воде необходимо мониторить на предмет паттерна потерь, а для дальнейшего анализа необходимо отбирать пробы. Необходимо регистрировать факторы окружающей среды до и после смерти.

Даже в условиях культивирования раковины моллюсков могут не быть чистыми, и организмы-обрастатели являются нормальными колонистами поверхности раковин моллюсков. Организмы, такие как усоногие, морские блюдечки, губки, многощетинковые черви, личинки двустворчатых моллюсков, оболочники, мшанки и т. д., как правило, не угрожают здоровью моллюсков. Такие системы культивирования, как суспензия и мелководная культура, могут даже увеличить воздействие организмов-обрастателей, и раковины могут быть покрыты другими

животными и растениями. Это может непосредственно влиять на здоровье, препятствуя открытию и закрытию раковин, или косвенно - через конкуренцию за продовольственные ресурсы. Именно признаки ослабления, связанные с сильным обрастанием, а не само обрастание должно быть причиной для беспокойства. Повреждения скорлупы буровыми организмами, такими как губки и многощетинковые черви, обычно являются безопасными, но при определенных условиях могут достигать размеров, которые делают скорлупу хрупкой или пронзают мягкие ткани. Такая степень повреждения скорлупы может ослабить моллюска и сделать его восприимчивым к болезнетворным инфекциям. Необходимо отмечать деформацию оболочки (форма, отверстия на поверхности), хрупкость, поломку или восстановление, однако они не могут свидетельствовать о наличии болезни. Роющие эпibiонты могут вызывать деформации и ослаблять оболочку(оболочки). Аномальная окраска и запах могут указывать на возможную инфекцию мягких тканей, которую необходимо исследовать в лаборатории.

Моллюсков следует вскрывать осторожно, чтобы не повредить мягкие ткани, в частности мантию, жабры, сердце и пищеварительную железу. Наличие организмов-обрастателей на внутренней поверхности оболочки - явный признак слабости. Внутренняя поверхность раковины обычно гладкая и чистая из-за действия мантии и жабр. Может произойти перфорация внутренней поверхности, но отверстие может быть запечатано благодаря осаждению дополнительного конхиолина и перламутра. Это может привести к образованию пузырей, заполненных грязью или водой. Пузыри могут также образовываться над поверхностными раздражителями, такими как инородные тела. Степень перфорации оболочки можно определить, поднеся оболочку к яркому свету. В тех случаях, когда аномалии, происходящие в матрице оболочки, требуют дальнейшего исследования, свежесобранные образцы могут быть доставлены неповрежденными в лабораторию или зафиксированы для последующей декальцинации, если это необходимо. Внешний вид мягких тканей часто указывает на физиологическое состояние животного. Мягкие ткани необходимо исследовать на наличие абсцессов, гнойничков, обесцвечивания тканей, жемчужин, отеков, общей прозрачности или водянистости, деформаций жабр и т. д. и, когда они обнаруживаются в сочетании со слабыми или умирающими животными, такие аномалии должны быть причиной для беспокойства.

Следует отметить и зафиксировать аномалии и повреждения тканей, а также любые деформации оболочки, наличие организмов-сверлильщиков и заметных обитателей мантии. Необходимо зарегистрировать уровни повреждения тканей, а образцы пораженных и незатронутых животных необходимо как можно скорее собрать для лабораторного исследования.

2.2. Изучение популяций, где происходит аномальная смертность

Смертность моллюсков обычно считается аномальной, если возникает внезапная массовая смертность, которая происходит за короткий промежуток времени между двумя наблюдениями или инспекциями популяций (например, около 15 дней в случае объектов, расположенных в приливной зоне). В инкубатории аномальная смертность приводит к невозможности последовательного производства личинок, происходящих из разных маточных стад. Учитывая широкий спектр видов, окружающей среды и условий культивирования, эти определения должны быть адаптированы, когда и где это необходимо.

Всякий раз, когда происходит аномальная смертность в популяциях моллюсков, необходимо срочно провести исследование для определения болезни.

Пробы должны быть отобраны, сохранены или зафиксированы и должны храниться в соответствии с процедурами, описанными в настоящем *Руководстве по водным ресурсам*.

Там, где и когда это возможно, непораженные или контрольные моллюски также должны быть зафиксированы для гистологического сравнения с аномальными тканями. Каким бы ни был фиксатор, важно, чтобы раковина была удалена, чтобы обеспечить легкий доступ фиксатора. Двустворчатые моллюски и брюхоногие моллюски могут держать раковину закрытой от фиксатора до тех пор, пока не начнется аутолиз.

2.3. Диагностические методы

Методы, применимые к возбудителям болезней моллюсков, ограничены непосредственным выявлением возбудителя. Классические серологические методы не могут быть использованы в диагностических целях, поскольку моллюски не вырабатывают антител. В дополнение к гистологии и цитологии для обнаружения возбудителей болезней из списка можно провести иммуноанализ с использованием моноклональных антител или зондов нуклеиновых кислот. С этой точки зрения разработка методов ДНК-диагностики возбудителей болезней моллюсков, безусловно, является наиболее значительным достижением последних лет. Учитывая развитие и потенциал широкого применения этих диагностических методов, а также проблемы, связанные с их использованием, вопрос валидации имеет первостепенное значение.

В нижеследующих разделах предлагаются три уровня процедур проверки. Гистология рекомендуется в качестве стандартного метода скрининга, поскольку она дает большой объем информации. Это особенно важно, потому что макроскопическое исследование обычно не дает никаких патогномичных признаков или какой-либо надежной подтверждающей информации. Кроме того, смертность может быть вызвана несколькими возбудителями или физиологическими проблемами, такими как ухудшение состояния после нереста, и это может быть определено только с помощью гистологии. Скрининг (надзор) также регулярно проводится с помощью гистологических методов. Однако в зависимости от конкретной эпидемиологической ситуации и когда это оправдано, целенаправленный эпиднадзор может опираться на другие методы.

При возникновении аномальных вспышек смертности также рекомендуется использовать гистологические методы. В дополнение к гистологии могут быть использованы различные методы предварительной диагностики, при которых могут быть использованы тканевые отпечатки, культура жидкой тиогликоллазной среды Рэя (RFTM), или полимеразная цепная реакция (ПЦР), как это рекомендуется в главах по отдельным болезням. Данные методы дают такие преимущества как быстрота и / или дешевизна процедур при подозрении на заражение конкретным возбудителем.

При обнаружении возбудителя болезни во время скрининга или вспышек смертности, в дополнение к электронной микроскопии, все чаще используют молекулярные методы для специфической идентификации. Некоторые из болезней моллюсков, включенных в список МЭБ, вызывают возбудители, принадлежащие к родам, охватывающим близкородственные виды. В следующих главах рекомендуются специальные протоколы, предназначенные для обнаружения определенных возбудителей, включенных в список, которые можно использовать для подтверждения результатов гистологического исследования и/или постановки видоспецифического диагноза.

2.4. Гистологические методы

Поскольку гистология широко используется в диагностических процедурах для определения болезней моллюсков, в этой главе приводится подробное техническое руководство.

Гистология - это метод, который используется для изучения структуры клеток и тканей под световым микроскопом. Подготовка тканей предполагает различные этапы, включая фиксацию тканей, обезвоживание, пропитку и встраивание образцов, подготовку срезов, окрашивание и нанесение на предметное стекло.

Живые умирающие животные или только что умершие (в течение нескольких минут) животные обеспечивают оптимальные условия для сбора тканей. Следует избегать использования замороженных образцов из-за лизиса тканей, который происходит во время цикла замораживания-оттаивания. В случае задержки между гибелью животных и отбором проб рекомендуется хранить животных нетронутыми на льду или в холодильнике. Необходимо сделать стандартный срез через пищеварительную железу, чтобы включить жабры, мантию и щупальца, где это возможно. В качестве альтернативы для образцов большего размера следует сделать несколько срезов, чтобы включить все важные ткани.

2.4.1. Фиксация тканей

Роль фиксатора заключается в поддержании морфологии тканей как можно ближе к морфологии *in-vivo* и предотвращении некроза после взятия пробы. Рекомендуемыми фиксаторами, используемыми для изучения морских моллюсков, являются раствор Дэвидсона и раствор Карсона для крупных образцов. Для небольших образцов можно использовать глутаральдегидные фиксаторы, совместимые с электронной микроскопией. Соотношение фиксатора к объему ткани должно быть не менее 10:1 для обеспечения хорошей фиксации. Можно использовать не формальдегидные консерванты в соответствии с инструкциями производителя. Их следует использовать с осторожностью до тех пор, пока пользователь не будет удовлетворен результатами. Исследователь должен сам проверить, может ли заменитель формальдегида использоваться таким же образом, как и формальдегид.

Раствор Дэвидсона:

Морская вода	1200 мл
95% спирт	1200 мл
36-40% формальдегид ⁵⁶	800 мл
Глицерин	400 мл
Ледяная уксусная кислота	10% (добавить экстенпорально)
<i>Раствор Карсона:</i>	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	23,8 г
Гидроксид натрия (NaOH)	5,2 г
Дистиллированная вода	900 мл
40% формальдегид ¹	100 мл
Довести pH до 7,2-7,4	

⁵⁶ Насыщенный 37-39% водный раствор формальдегидного газа

** Исходный раствор 1G4F (может храниться при температуре 4°C до 3 месяцев):*

37-40%-ый буферный раствор формалина**	120 мл
50% глутаровый альдегид	20 мл
Водопроводная вода	360 мл

*** Буферный раствор формалина:*

37-40% формальдегида	1 литр
Динатрийфосфат (Na_2HPO_4)	15 г
NaOH	0,06 г
Феноловый красный (индикатор pH)	0,03 г

Рабочий раствор (должен быть приготовлен непосредственно перед использованием):

Профильтрованная морская вода комнатной температуры	500 мл
Исходный раствор 1G4F*	500 мл

Универсального фиксатора не существует, и выбор необходимо делать с учетом последующего использования зафиксированного материала, а также практических аспектов использования фиксатора (цена, доступность компонентов и т. д.). Раствор Дэвидсона - отличный выбор для сохранения структуры тканей. Кроме того, срезы ткани, зафиксированные в растворе Дэвидсона, могут быть окрашены позже различными гистохимическими методами, а также могут быть использованы для гибридизации *in-situ* с ДНК-зондами. Для этой цели следует избегать чрезмерной фиксации (более 24-48 часов). Раствор Карсона может быть не так хорошо подходит для гистологического анализа, как раствор Дэвидсона. Тем не менее, он позволяет хорошо сохранять ультраструктуру и может быть использован для сохранения образцов для последующего изучения с помощью электронной микроскопии. 1G4F также обеспечивает гибкость при сохранении тканей как для гистологии, так и для электронной микроскопии, но оптимальная толщина ткани составляет 2-3 мм. 1G4F дает высококачественные гистологические слайды и хорошие электронные микрофотографии. Поскольку электронная микроскопия может быть ценным дополнением в диагностике или подтверждении инфекций у моллюсков, можно рассмотреть фиксацию некоторых образцов (особенно небольших образцов) с помощью глутарового альдегида, как описано в разделе 2.5.1 настоящей главы, которая дает высочайшее качество электронных микрофотографий. В противном случае материал, зафиксированный в растворе Карсона и содержащий достаточные уровни целевых агентов болезни или аномалий, можно повторно зафиксировать в глутаровом альдегиде. Для дальнейшего расследования рекомендуется зафиксировать одну часть моллюска в растворе Дэвидсона, а другую - в растворе Карсона или 1G4F. Это должно быть сделано для того, чтобы обеспечить фиксацию всех тканей/органов в двух фиксаторах. Если нет ни того, ни другого, то достаточно 10% формалина, забуференного фильтрованной морской водой. В каждой стране представители индустрии аквакультуры моллюсков должны договориться о наиболее эффективном способе фиксации.

2.4.2 Обезвоживание, пропитка и встраивание образцов

Встраивание образцов в парафин требует нескольких этапов, в течение которых вода, содержащаяся в тканях, постепенно заменяется сначала спиртом, затем ксилолом или эквивалентным менее токсичным очищающим раствором и, наконец, парафином.

После фиксации образцов в растворе Дэвидсона, Карсона или 1G4F их переносят через серию спиртов повышающейся концентрации (70-95 [об/об]) до окончательного обезвоживания в абсолютном этаноле. Спирт, содержащийся в тканях, затем удаляют путем их погружения в ксилол. Затем ткани пропитывают парафином, который растворяется в ксилоле при температуре 60°C. Все эти этапы могут быть выполнены автоматически с помощью устройства для обработки тканей. В случае задержки обработки сохраненные ткани можно хранить в 70% этаноле.

Блоки производят путем охлаждения тканей в формах, заполненных парафином, на охлаждающем столе; охлаждение и увлажнение необходимы для приготовления срезов.

2.4.3. Приготовление срезов

После охлаждения блоков на холодной пластине, которая позволяет парафину затвердеть, с помощью микротомы делают гистологические срезы толщиной примерно 2-5 мкм. Срезы извлекают на гистологические предметные стекла, отводят влагу и сушат в течение 1 часа при температуре 40-42°C или в течение ночи при комнатной температуре. Сушка образцов позволяет устранить избыточную влагу, и таким образом секции прилипают к предметным стеклам.

2.4.4. Окрашивание и нанесение образца на предметное стекло

Перед окрашиванием парафин удаляют из срезов путем погружения их в ксилол или эквивалентный менее токсичный очищающий раствор на 10-20 минут. Это повторяют один раз, а затем растворитель удаляют путем последовательного погружения в две ванны с абсолютным спиртом (на 10 минут в каждую); затем их регидратируют путем последовательного погружения в ванны с этанолом в нисходящей концентрации (например, 95%, 70%, 50%, 30%, на 10 минут в каждую) с окончательным погружением в ванну с водопроводной водой на 10 минут. Затем можно использовать различные топографические или гистохимические методы окрашивания.

При проведении гематоксилин-эозинового (H&E) окрашивания (гематоксилин или его эквивалент) ядерные и базофильные структуры окрашиваются от синего до темно-фиолетового цвета, эндоплазматический ретикулум окрашивается в синий цвет, а цитоплазма приобретает серый цвет. Кислотный краситель эозин окрашивает другие структуры в розовый цвет. Этот метод окрашивания прост и воспроизводим, и, хотя он дает только ограниченную дифференцировку клеточных структур, можно обнаружить любые аномалии в тканях и клеточной структуре. При необходимости, для демонстрации определенных структур или особенностей (например, трихром для соединительной ткани и цитоплазматических гранул) можно использовать другие методы.

2.5. Методы просвечивающей электронной микроскопии

Поскольку просвечивающая электронная микроскопия очень часто используется для подтверждения идентификации возбудителей болезней в диагностических процедурах, в этой главе приводятся подробные технические рекомендации.

Фиксация для электронной микроскопии должна быть проведена сразу после того, как животное было убито, до фиксации для гистологии. Только образцы, быстро взятые от живых животных, могут иметь какую-либо пользу. Подготовка образцов для электронной микроскопии включает в себя следующие этапы: фиксацию тканей, декальцинацию образцов (при необходимости), дегидратацию, пропитку и встраивание образцов, подготовку и контрокрашивание срезов.

2.5.1. Фиксация тканей

Для тканей, которые должны быть исследованы с помощью электронной микроскопии, важно, чтобы фиксация была выполнена правильно, чтобы нанести как можно меньше повреждений ультраструктуре. Образцы нарезают таким образом, чтобы их размеры не превышали 1-2 мм. Этот небольшой размер позволяет различным растворам быстро проникать в образец.

Фиксация образцов осуществляется непосредственно в 3% глутаровом альдегиде в течение 1-4 часов. Образцы промывают в буфере три раза, затем фиксируют в 1% - ной осминовой кислоте (водный раствор OsO_4) и снова дважды промывают в буфере. Различные составы глутаральдегидного фиксатора и буферов работают одинаково хорошо.

Чтобы нанести как можно меньше повреждений ультраструктуре, образцы обрабатывают растворами, имеющими осмолярность, близкую к осмолярности тканей. Таким образом, ткани моллюсков обрабатывают растворами с осмолярностью около 1000 миллиосмоль. Осмолярность растворов регулируется искусственными морскими солями или NaCl. Поскольку ткани моллюсков почти изоосмотичны с морской водой, можно сделать глутаровый альдегид с фильтрованной морской водой (0,22 мкм) и использовать фильтрованную морскую воду для последующих промывок.

Какодилат натрия воды	0,4 М: 8,6 г в 100 мл дистиллированной воды
Хлорид натрия	10% в дистиллированной воде
<i>Какодилатный буфер, рН 7,4:</i>	
1000 миллиосмоль	
Какодилат натрия	50 мл от 0,4 М исходного раствора
NaCl	20 мл из 10% - го исходного раствора
Дистиллированная вода	30 мл
Довести рН до 7,4	
<i>3% глутаральдегид:</i>	
1000 миллиосмоль	

25% глутаральдегид	2.5 мл
0,4 М какодилата натрия	5 мл
10% NaCl	3.5 мл
Дистиллированная вода	9 мл
<i>1% осмиевая кислота:</i>	
1000 миллиосмоль	
4% осмиевая кислота	1 объем
0,4 М какодилата натрия	1 объем

NaCl	1 объем от 10% исходного раствора
Дистиллированная вода	1 объем
5% этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА):	
Динатрий ЭДТА	5 г
Какодилатный буфер	100 мл

ЭДТА растворяется при pH выше 8. Когда раствор становится прозрачным, необходимо довести pH до 7,4, добавив концентрированный HCl.

Если образцы были предварительно зафиксированы и хранились в растворе Карсона, их следует несколько раз промыть в ванне с буфером перед фиксацией 3% - ным глутаровым альдегидом. Ткани хранившиеся в 1G4F могут быть непосредственно пост-фиксированы в 1% растворе осмиевой кислоты.

2.5.2. Обезвоживание, пропитка и встраивание образцов

Образцы обезвоживают в последовательных ваннах с этанолом: 70% этанол - один раз, 95% этанол - два раза, абсолютный этанол - три раза. Дегидратация завершается двумя ваннами пропиленоксида, что позволяет проводить последующую пропитку Епон или другой смолой.

Образцы пропитывают постепенно. После первой ванны со смесью полипропиленоксид-Епон (50/50) образцы помещают в ванну с Епон. Чем дольше инкубация, тем лучше происходит пропитка тканей.

Встраивание осуществляется путем помещения образцов в формы, заполненные смолой Епон. Этикетку, идентифицирующую образец, включают в каждый блок, и затем блоки выдерживают при температуре 60°C (температура, при которой полимеризуется смола Епон) в течение 48 часов.

2.5.3. Подготовка секций и контрокрашивание

Блоки разрезают до соответствующих размеров лезвием бритвы, а затем срезы нарезают с помощью ультра-микротом. Полутонкие срезы (0,5-1 мкм) нарезают и помещают на стеклянные предметные стекла. Они будут использоваться для контроля качества образцов с помощью световой микроскопии и поиска интересных областей на срезе.

Полутонкие срезы окрашивают при температуре 90-100°C помощью 1% - ого раствора толудинового синего. После высыхания на предметное стекло накладывают покровное стекло и закрепляют его каплей синтетической смолы, и рассматривают под световым микроскопом.

Ультратонкие срезы толщиной 80-100 Нм помещают на медные сетки для электронно-микроскопического анализа. Для контрокрашивания ультратонких

участков используют уранилацетат и цитрат свинца.

2.6. Молекулярные методы

Преимуществом молекулярных методов является их чувствительность, однако, с другой стороны, очень часто возникают технические проблемы. ПЦР особенно зависит от условий, в которых она выполняется, и может давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты. Всякий раз, когда используются молекулярные методы, они должны выполняться с осторожностью и с особым вниманием к включению подходящего положительного и отрицательного контроля для преодоления возможного недостатка надежности, а также для поддержания адекватной точности. Важно признать, что ПЦР и анализы на основе последовательностей обнаруживают только нуклеиновую кислоту патогена и не указывают на наличие живого паразита или наличие инфекции и болезни. Однако использование ПЦР-анализа на основе РНК может указывать на наличие живого паразита, но все равно не подтвердит наличие инфекции или болезни.

Для подтверждения идентификации возбудителей болезни все чаще используют ПЦР, ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), секвенирование, гибридизацию *in-situ* и иммуногистохимию. Для этих методов образцы должны быть подготовлены таким образом, чтобы сохранить ДНК патогена. Аналогичным образом должны быть сохранены образцы, предназначенные для тестирования методами, основанными на антителах, чтобы сохранить реактивные антигенные участки для используемых антител.

2.6.1. Подготовка образцов

Образцы, отобранные для диагностических тестов на основе ДНК или антител, должны быть обработаны и упакованы с максимальной осторожностью, чтобы свести к минимуму вероятность перекрестной контаминации между образцами или разрушения до проведения анализа. Для предотвращения контаминации следует использовать новые контейнеры (пластиковые пакеты для образцов или флаконы). Внутри каждой упаковки или контейнера для каждого набора образцов должна быть помещена водостойкая этикетка с заполненными соответствующими данными. Необходимо избегать использования бытовых перманентных маркеров (например, Sharpies), так как их чернила растворяются в этаноле, который используется в молекулярных методах, что может привести к порче этикетки. Карандаш или гистологические ручки можно использовать только для маркировки флаконов или банок.

Некоторые подходящие методы сохранения и транспортировки образцов для проведения тестов на основе молекулярных методов или антител включают:

2.6.1.1. Живые замороженные образцы или охлажденные образцы

Что касается образцов, которые можно быстро транспортировать в лабораторию для тестирования в течение 24 часов - их необходимо упаковать в пакеты для образцов; упакованные образцы необходимо обложить достаточным количеством влажного льда в термоизолированном контейнере, и отправить в лабораторию.

2.6.1.2. Целые замороженные образцы

Живые образцы отбирают в соответствии с целью отбора проб, подвергают быстрой заморозке с помощью дробленого сухого льда (в полевых условиях) или в механической морозильной камере (в полевых лабораториях) при температуре -20°C или ниже. В контейнер с образцами вставляют заранее подготовленную этикетку, образцы упаковывают с достаточным количеством сухого льда в термоизолированный контейнер и отправляют в лабораторию.

2.6.1.3. Образцы, консервированные спиртом

В регионах, где хранение и транспортировка замороженных образцов проблематичны, для консервации, хранения и транспортировки определенных типов образцов можно использовать 90-100% неденатурированный этанол (т.е. этанол без метанола). Например, целые моллюски (когда образец маленький) и ткани от более крупных моллюсков. Упаковка для отправки осуществляется в соответствии с описанными выше способами.

2.6.1.4. Фиксированные ткани для гибридизации *in-situ* и иммуногистохимии

Для этого достаточно классических методов сохранения тканей. Раствор Дэвидсона обычно является хорошим выбором для последующего использования молекулярных зондов. В частности, что касается ДНК - следует избегать чрезмерной фиксации (в течение 24-48 часов).

2.7. Выделение ДНК

Для экстрагирования ДНК в ткани, гомогенизированные в 9 объемах экстракционного буфера (NaCl [100 ммоль], ЭДТА [25 ммоль], pH 8, додецилсульфат натрия [SDS, 0,5%]), добавляют протеиназу К (100 мкг мл^{-1}). После инкубации в течение ночи при температуре 50°C ДНК экстрагируют по стандартному протоколу фенол / хлороформ и осаждают этанолом.

Учитывая временные ограничения и риски для сотрудников лабораторий, имеющиеся в продаже наборы могут служить удовлетворительной технической альтернативой. Использование коммерческих наборов должно быть валидировано путем сравнения со стандартным протоколом фенол / хлороформ до их рутинного использования в диагностических лабораториях.

Для извлечения РНК используют 1 мл Tri Reagent (Trizol) на 50 мг ткани, $5-10 \times 10^6$ клеток или 10 см^2 культуральный планшет. Образцы гомогенизируют и оставляют при комнатной температуре на 5 минут, чтобы обеспечить диссоциацию нуклеопротеиновых комплексов. Добавляют 200 мкл хлороформа, энергично встряхивают и оставляют на 15 минут при комнатной температуре. Центрифугируют при 12000 g в течение 15 минут при 4°C . Водную фазу переносят в свежую пробирку и осаждают РНК из водной фазы, осторожно смешивая с 0,5 мл изопропанола на 1 мл Tri Reagent. Образцы хранят при комнатной температуре в течение 10 минут и

центрифугируют при 12000 *g* в течение 8 минут при 4°C. Удаляют супернатант и промывают осажденную РНК 75%-ым этанолом с последующим центрифугированием при 7500 *g* в течение 5 минут при 4°C. РНК можно растворить в воде или другом соответствующем растворе.

2.8. Подготовка слайдов для гибридизации *in-situ*

Для гибридизации *in situ* моллюски фиксируют в фиксаторе Дэвидсона примерно на 24 часа, а затем погружают в парафин в соответствии с описанными выше методами гистологии. Делают срезы толщиной 5 мкм и помещают на покрытые аминоалкилсилианом предметные стекла, которые затем сушат в течение ночи при комнатной температуре или в духовке при температуре 40°C. Срезы депарафинизируют путем погружения в ксилол на 10 минут. Эту стадию повторяют один раз, а затем растворитель удаляют путем погружения в две последовательные ванны с абсолютным этанолом на 10 минут в каждую. Затем секции регидратируют путем последовательного погружения в ванны с этанолом в нисходящей концентрации. Протокол может потребовать проведения мембранной пермеабилзации, позволяющей получить доступ к целевой ДНК. Для этого срезы обрабатывают протеиназой К (100 мкг мл⁻¹) в ТЕ-буфере (Трис [50 ммоль], ЭДТА [10 ммоль]) при 37°C в течение 10-30 минут.

3. КЛЮЧЕВЫЕ ССЫЛКИ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ЧТЕНИЯ

ALMEIDA M., BERTHE F., THEBAULT A. & DINIS M.T. (1999). Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture*, **177**, 325–332.

ANDERSON T.J., MCCAUL T.F., BOULO V., ROBLEDO J.A.F. & LESTER R.J.G. (1994). Light and electron immunohistochemical assays on paramyxean parasites. *Aquat. Living Resour.*, **7**, 47–52.

ANDREE K.B., FRIEDMAN C.S., MOORE J.D. & HEDRICK R.P. (2000). A polymerase chain reaction for detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with Withering Syndrome in Black Abalone (*Haliotis cracherodii*). *J. Shellfish Res.*, **19**, 213–218.

AZEVEDO C., CORRAL L. & CACHOLA R. (1990). Fine structure of zoosporulation in *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa: Perkinsea). *Parasitology*, **100**, 351–358.

BALSEIRO P., ARANGUREN R., GESTAL C., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2006). *Candidatus Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture*, **258**, 63–72.

BERTHE F.C.J., BURRESON E. & HINE M. (1999). Use of molecular tools for mollusc disease diagnosis. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **19** (6), 277–278.

BERTHE F.C.J., LE ROUX F., ADLARD R.D. & FIGUERAS A.J. (2004). Marteilirosis of

molluscs: a review. *Aquat. Living Resour*, **17** (4), 433–448.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Asian Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, No. 402, supplement 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 240 pp.

BOULO V., MIALHE E., ROGIER H., PAOLUCCI F. & GRIZEL H. (1989). Immunodiagnosis of *Bonamia ostreae* (Ascetospora) infection of *Ostrea edulis* L. and subcellular identification of epitopes by monoclonal antibodies. *J. Fish Dis.*, **12**, 257–262.

BOWER S.M., MCGLADDERY S.E. & PRICE I.M. (1994). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Ann. Rev. Fish Dis*, **4**, 1–199.

BURRESON E.M. & FORD S.E. (2004). A review of recent information on the *Haplosporidia*, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquat. Living Resour*, **17** (4), 499–517.

BUSHEK D., FORD S.E. & ALLEN SK (1994). Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Ann. Rev. Fish Dis*, **4**, 201–207.

CARNEGIE R.B., BARBER B.J., CULLOTY S.C., FIGUERAS A.J. & DISTEL D.L. (2000). Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the *Haplosporidia*. *Dis. Aquat. Org*, **42**, 199–206.

CARNEGIE R.B. & COCHENNEC-LAUREAU N. (2004). Microcell parasites of oysters: recent insights and future trends. *Aquat. Living Resour*, **17** (4), 519–528.

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 *Halitotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 23–27.

COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F. & GERARD A. (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.*, **76**, 26–32.

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.

CRANFIELD H.J., DUNN A., DOONAN I.J. & MICHAEL K.P. (2005). *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis*

from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES J. Mar. Sci.*, **62** (1), 3–13.

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.

DIGGLES B.K., COCHENNEC-LAUREAU N. & HINE P.M. (2003). Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosus* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Aquaculture*, **220**, 145–156.

DINAMANI P., HINE P.M. & JONES J.B. (1987). Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 37–44.

DUNGAN C.F. & ROBERSON B.S. (1993). Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 9–22.

ELSTON R.A. (1999). Health Management, Development and Histology of Seed Oysters. World Aquaculture Society., Baton Rouge, Louisiana, USA, 110 pp.

FARLEY C.A., WOLF P.H. & ELSTON R.A. (1988). A long-term study of ‘microcell’ disease in oysters with a description of new genus *Mikrocytos* (g.n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp.n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fish. Bull.*, **86**, 581–593.

FONG D., RODRIGUEZ R., KOO K., SUN J., SOGIN M.L., BUSHEK D., LITTLEWOOD D.T.J. & FORD S.E. (1993). Small subunit ribosomal RNA gene sequence of the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **2**, 346–350.

FORD S.E. (1992). Avoiding the transmission of disease in commercial culture of molluscs, with special reference to *Perkinsus marinus* (Dermo) and *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *J. Shellfish Res.*, **11**, 539–546.

FRIEDMAN C.S., ANDREE K.B., BEAUCHAMP K.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2000). “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*” a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 847–855.

FRIEDMAN C.S., BIGGS W., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2002). Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *J. Shellfish Res.*, **21** (2), 817–824.

GALTISOFF P.S. (1964). The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bull.*, **64**, 480 pp.

GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J-R, COUSSERANS F., DUTHOIT J.L. & LE PENNEC M.A. (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *science et Pêche. Bull Inst. Pêches marit.*, **240**, 7–30.

GRIZEL H., MIALHE E., CHAGOT D., BOULO V. & BACHÈRE E. (1988). Bonamiasis: a model study of diseases in marine molluscs. *In: Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs*, Fisher W.S., ed. American Fisheries Society Special Publication 18. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA, 1–4.

HERVIO D., BOWER S.M. & MEYER G.R. (1996). Detection, isolation, and experimental transmission of *Mikrocytos mackini*, a microcell parasite of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Invertebr. Pathol.*, **67**, 72–79.

HINE P.M., BOWER S.M., MEYER G.R., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J. (2001). The ultrastructure of *Mikrocytos mackini*, the cause of Denman Island disease in oysters *Crassostrea* spp. and *Ostrea* spp. in British Columbia, Canada. *Dis. Aquat. Org.*, **45**, 215–227.

HINE P.M. & THORNE T. (2000). A survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **40**, 67–78.

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.

HOWARD D.W. LEWIS E.J., KELLER J. & SMITH C.S. (2004). Histological techniques for marine bivalve molluscs and crustaceans. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5. National Oceanic and Atmospheric Administration, Honolulu, HI, USA, 218 pp.

KLEEMAN S.N., LE ROUX F., BERTHE F. & ADLARD R.D. (2002). Specificity of PCR and *in situ* hybridization assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*. *Parasitology*, **125**, 131–141.

KOTOB S., MCLAUGHLIN S.M., VAN BERKUM P. & FAISAL M. (1999). Discrimination between two *Perkinsus* spp. isolated from the softshell clam, *Mya arenaria*, by sequence analysis of two internal transcribed spacer regions and the 5.8S ribosomal RNA gene. *Parasitology*, **119**, 363–368.

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 ROUX F., AUDEMARD C., BARNAUD A. & BERTHE F. (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Mar. Biotechnol.*, **1**, 588–597.
- LE ROUX F., LORENZO G., PEYRET P., AUDEMARD C., FIGUERAS A., VIVARES C., GOUY M. & BERTHE F. (2001). Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **48**, 449–454.
- LESTER R.J.G. & DAVIS G.H.G. (1981). A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.*, **37**, 181–187.
- LONGSHAW M., FEIST S.W., MATTHEWS R.A. & FIGUERAS A. (2001). Ultrastructural characterization of *Marteilia* species (Paramyxea) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 137–142.
- MCDOWELL E. & TRUMP B.F. (1976). Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **100**, 405–414.
- MIALHE E., BACHERE E., BOULO V., CADORET J.P., ROUSSEAU C., CEDENO V., SARAIVA E., CARRERA L., CALDERON J. & COLWELL R.R. (1995). Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. *Molec. Mar. Biol. Biotechnol.*, **4**, 275–283.
- MURRELL A., KLEEMAN S.N., BARKER S.C. & LESTER R.J.G. (2002). Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester & Davis, 1981 and *P. atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **22**, 258–265.
- OSSIANDER F.J. & WEDEMEYER G. (1973). Computer program for sample size required to determine disease incidence in fish populations. *J. Fish. Res. Board Can.*, **30**, 1383–1384.
- PÉPIN 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.
- RAY S.M. (1966). A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications. *Proc. Natl Shellfish Assoc.*, **54**, 55–69.
- REECE K., SIDDALL M.E., BURRESON E.M. & GRAVES J.E. (1997). Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *J. Parasitol.*, **83**, 417–423.

RENAULT T., LE DEUFF R.-M., COCHENNEC N. & MAFFART P. (1994). 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.

RODRIGUEZ F. & NAVAS J.L. (1995). A comparison of gill and haemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Aquaculture*, **132**, 145–152.

SAVIN K.W., 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.

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**, 92–99.

STOKES N.A. & BURRESON EM (1995). A sensitive and specific DNA probe for the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **42**, 350–357.

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.

THOESON J.C. (1994). Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens, Fifth Edition. Bluebook, American Fisheries Society, Bethesda, USA.

VILLALBA A., REECE K.S., ORDÁS M.C., CASAS S.M. & FIGUERAS A. J. (2004). Perkinsosis in molluscs. *Aquat. Living Resour.*, **17** (4), 411–432.

WALKER P. & SUBASINGHE R.P. (2000). DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, n°395, 93 pp.

YARNALL H.A., REECE K.S., STOKES N.A. & BURRESON E.M. (2000). A quantitative competitive polymerase chain reaction assay for the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *J. Parasitol.*, **86**, 827–837.

*
* *

ЗАРАЖЕНИЕ ГЕРПЕСВИРУСОМ МОРСКОГО УШКА (АБАЛОНОВ)

1. Сфера применения⁵⁷

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.

⁵⁷ Примечание: Версия утверждена Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 г.

2.1.3.	Стабильность	агента
В	стадии	исследования.
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	–	<i>Haliotis laevis</i>
Галиотис	красный	–	<i>H. rubra</i>
Гибрид	(гладкий × красный)	–	<i>H. laevis</i> × <i>H. rubra</i>
Галиотис разноцветный – <i>H. diversicolor</i>			

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 абалон 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 абалон.

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 ненервных 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; Ноорет *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

Провсвечивающая электронная микроскопия может использоваться для подтверждения наличия вирусных частиц в инфицированных ганглиях. Частицы AbHV являются икосаэдрическими с электронно-плотными ядрами диаметром 100-110 нм. Внутриядерное расположение частиц и их ультраструктура характерны для представителей *Herpesviridae* (Тап 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)⁵⁸.

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)	

⁵⁸ 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.

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 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 × 2 г (100 мл) ⁻¹ 2 г (100 мл) ⁻¹ 2 г (100 мл) ⁻¹	раствора Альбумин Фиколл Поливинилпирролидон	Денхардта бычьей сыворотки (хранить при -20°C) (Фракция V) 400
Буфер 25 мл 10 мл 2,5 мл 10 мл 500 мкл Довести	для гибридизации Формамид 20 100 × 50% декстрансульфат 10 мг/мл до объема	(хранить при -20°C) SSC Денхардта в дистиллированной воде ДНК спермы сельди 50 мл водой MilliQ
10 × 23,6 г/л 127 г/л 87,66 г/л	Трис-буферный солевой раствор (TBS) Трис-основание Трис/HCl NaCl	(хранить при комнатной температуре)

4.3.1.2.3.3.1.1. Подготовка ДНК-зондов, меченных диоксигенином (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

- Нарезать ткань, погруженную в парафин, на кусочки толщиной 3 мкм и поместить на предметные стекла Superfrost plus (Menzel, кат. № SF41296SP) и дать высохнуть.
- Нагревать срезы при 65°C в течение 30 минут и депарафинировать в двух порциях ксилола.
- 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 ($4 \times \text{SSC}$, $5 \times$ раствора Денхардта, 10 мкг/мл ДНК спермы сельди, 10% декстрансульфата, 50% формамида, приблизительно 5 нг/мкл зонда).
- ii) Нагреть 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 высыхали.
- 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 контрокрасить 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: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = 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 а 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.

ИНФЕКЦИЯ *BONAMIA EXITIOSA*

1. Сфера применения⁵⁹

Bonamia exitiosa – это простейший паразит типа *Haplosporidia* (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004), инфицирующий гемоциты нескольких видов устриц и вызывающий физиологические нарушения и, в конечном итоге, гибель животного (Cranfield *с соавт.*, 2005; Dinamani *с соавт.*, 1987). Применительно к настоящей главе, инфекция *Bonamia exitiosa* означает инфекцию *B. exitiosa*, которая ранее называлась *B. exitiosus* (Berthe & Hine, 2003; Hine *с соавт.*, 2001). Это определение исключает инфекцию *B. ostreae* (Pichot *с соавт.*, 1979), *B. roughleyi* (Cochennec *с соавт.*, 2003; Farley *с соавт.*, 1988) и *B. perspora* (Carnegie *с соавт.*, 2006). Разновидности *Bonamia*, которые не идентифицированы до уровня видов (Burrenson *с соавт.*, 2004; Campalans *с соавт.*, 2000; Kroeck & Montes, 2005), следует направлять в соответствующую Справочную лабораторию МЭБ.

2. Информация о болезни

2.1. Особенности возбудителя

2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

Bonamia exitiosa (Berthe & Hine, 2003; Hine *с соавт.*, 2001), штаммы не идентифицированы.

2.1.2. Выживание вне хозяина

В настоящее время неизвестно.

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

В настоящее время неизвестно.

2.1.4. Жизненный цикл

Возможна прямая передача паразита от хозяина к хозяину, и предполагается, что между устричными банками по течению может происходить пассивная передача паразита, находящегося на инфекционных стадиях (Cranfield *с соавт.*, 2005; Hine, 1996).

2.2. Особенности хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды устриц *Ostrea chilensis* (= *Tiostrea chilensis* = *T. lutaria*) (Dinamani *с соавт.*, 1987), *O. angasi* (Corbeil *с соавт.*, 2006b; Hine, 1996; Hine & Jones, 1994), *O. edulis* (Abollo *с соавт.*, 2008; Narcisi *с соавт.*, 2010) и *O. stentina* (Hill *с соавт.*, 2010).

⁵⁹ Примечание: Версия утверждена Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 г.

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

Известно, что у *O. chilensis* восприимчивы устрицы молодой возрастной группы (устрицы, длина которых составляет не менее 58 мм) (Dinamani *с соавт.*, 1987). У *O. edulis* паразит был обнаружен в устрицах рыночного размера (> 60 мм) (Abollo *с соавт.*, 2008). Данные относительно других стадий развития устриц, включая молодь устриц, отсутствуют. ДНК *B. exitiosa* недавно была обнаружена у личинок плоских устриц *Ostrea edulis* (Arzul *с соавт.*, 2011).

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Ostrea chilensis и *O. angasi* (Dinamani *с соавт.*, 1987; Hine & Jones, 1994), длина которых составляет не менее 58 мм. У *O. chilensis* средняя интенсивность инфекции *Bonamia* была значительно выше у самок и устриц после икрометания, чем у самцов и устриц-гермафродитов (Hine *с соавт.*, 2002).

2.2.4. Органы-мишени и инфицируемые ткани

Bonamia exitiosa является простейшим паразитом, который проникает в гемоциты, но его можно обнаружить и вне клеток (Dinamani *с соавт.*, 1987). Данный простейший паразит, который проникает в гемоциты, быстро становится системным и может быть обнаружен в различных органах, особенно в соединительных тканях жабр и мантии (Hine, 1991a). У *Ostrea angasi* паразит является эпителиотропным, и, по-видимому, очень легкие инфекции могут вызывать обширную очаговую гемоцитную инфильтрацию с очагами некроза. У *O. edulis* паразит вызывает тяжелую гемоцитную инфильтрацию и наблюдается в соединительной ткани различных органов, в основном внутри гемоцитов, но иногда и за пределами клеток-хозяев (Abollo *с соавт.*, 2008). Что касается *O. stentina*, у животных, инфицированных паразитом, гемоцитоз не наблюдался (Hill *с соавт.*, 2010).

2.2.5. Персистентная инфекция с пожизненным носительством

Инфекция часто является смертельной в зависимости от хозяина и условий окружающей среды.

2.2.6. Переносчики инфекции

Не идентифицированы.

Обнаружение ДНК *B. exitiosa* у *Crassostrea gigas* позволяет предположить, что данный вид может выступать в качестве носителя или резервуара *B. exitiosa* (Lynch *с соавт.*, 2010).

2.2.7. Известные или потенциальные носители среди диких водных животных

Bonamia exitiosa обычно инфицирует дикие популяции восприимчивых видов (см. Раздел 2.2.1).

2.3. Модель болезни

2.3.1. Механизмы передачи

У *O. chilensis* возможна прямая передача паразита от хозяина к хозяину. Высвобожденные инфекционные частицы проглатываются устрицами и попадают в гемолимфу из кишечника (Hine, 1991a; Hine, 1991b). Инфекционные частицы фагоцитируются

агранулярными гемоцитами, но они способны противостоять лизису внутри гемоцита (Hine & Wesney, 1994).

ДНК паразита была обнаружена у личинок, развивающихся в мантийной полости взрослых устриц, что указывает на возможную передачу инфекции между этими двумя возрастными группами. Таким образом, личинки могут способствовать распространению паразита во время планктонной жизни (Arzul *с соавт.*, 2011).

2.3.2. Превалентность

Превалентность у *O. chilensis* варьируется (от 0% до почти 80%) (Cranfield *с соавт.*, 2005; Diggle & Hine, 2002). В южном полушарии инфекция *B. exitiosa* имеет самую высокую превалентность с января по апрель, причем в сентябре и октябре паразита обнаруживают крайне редко (Hine, 1991a). Стресс-факторы, такие как воздействие экстремальных температур (ниже 7°C или выше 26°C), соленость (40%), голод (длительное содержание в отфильтрованной морской воде), манипуляции (интенсивное перемешивание четыре раза в день) или сильное инфицирование простейшими со сложным жизненным циклом (Hine, 2002), может влиять на динамику заболевания *B. exitiosa* у *O. chilensis* (Hine *с соавт.*, 2002). В Галисии (Испания) максимальная зарегистрированная превалентность *B. exitiosa* у *O. edulis* составила 34% в одной партии, собранной в октябре (Abollo *с соавт.*, 2008). Несмотря на некоторые различия в превалентности, наблюдаемые между датами отбора проб, в настоящее время невозможно определить ежегодный сценарий заражения *B. exitiosa* у плоских устриц в Европе.

Превалентность различается у *O. edulis*, коинфицированных *B. ostreae* (Abollo *с соавт.*, 2008).

2.3.3. Географическое распределение

Инфекция *B. exitiosa* встречается у *O. chilensis* в проливе Фово и в других районах вокруг Южного острова, Новая Зеландия (Dinamani *с соавт.*, 1987; Doonan *с соавт.*, 1994); у *O. angasi* в Австралии (Порт-Филлип, Виктория; Georges Bay, Тасмания; и Олбани, Западная Австралия) (Corbeil *с соавт.*, 2006b; Hine, 1996; Hine & Jones, 1994); у *O. edulis* в Галисии (Испания) (Abollo *с соавт.*, 2008), в Адриатическом море в Италии (Narcisi *с соавт.*, 2010), в Средиземном море во Франции и в Корнуолле в Соединенном Королевстве; и у *O. stentina* в Тунисе (Hill *с соавт.*, 2010).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Инфекция часто является летальной. При *O. chilensis* гибель обычно происходит по достижении наивысшего уровня интенсивности инфекции, особенно в сочетании с сильным инфицированием простейшими со сложным жизненным циклом (Hine, 2002; Hine & Wesney, 1994). Болезнь, по-видимому, вызывает гибель более чем у 80% устриц, поскольку волна инфекции проходит через устричные банки в течение 2-3 лет (Cranfield *с соавт.*, 2005). Воздействие *B. exitiosa* на *O. edulis* или *O. stentina* еще не оценивали.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Превалентность была выше у устриц, которые содержались в течение короткого периода (14 дней) в теплой воде (25–26°C) в течение 1 часа в день или в сверхсоленой (39–40%) воде по сравнению с холодной водой (7°C в течение 1 часа в день) и в гипосоленой воде (15%)

(Hine *с соавт.*, 2002). Однако в данном исследовании изменение температуры и солености использовалось в качестве стресс-фактора.

У *O. chilensis* превалентность ежегодно характеризуется двумя пиками: в апреле (в начале осени) и августе (зимой) (Hine, 1991a). Эволюция *B. exitiosa* у *O. edulis* или *O. stentina* в зависимости от времени года еще не изучена.

2.4. Профилактика и борьба с болезнью

2.4.1. Вакцинация

Вакцины отсутствуют.

2.4.2. Лекарственное лечение

Отсутствует.

2.4.3. Иммуностимуляция

Отсутствует.

2.4.4. Разведение для получения резистентной популяции

Отсутствует.

2.4.5. Повторное заселение резистентными видами

Отсутствует.

2.4.6. Блокирующие агенты

Отсутствуют.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Нет данных.

2.4.8. Общие практики разведения

Более легкие драги и менее травматичные для животных промысловые стратегии должны снизить вероятность вспышек заболевания за счет снижения стресса (Cranfield *с соавт.*, 2005). Избегание стрессовых факторов, таких как воздействие экстремальных температур (ниже 7 или выше 26°C), соленость (40%), голод, манипуляции или сильное инфицирование другими паразитами, а также снижение плотности посадки, должно способствовать снижению воздействия болезни (Cranfield *с соавт.*, 2005; Hine *с соавт.*, 2002).

3. Отбор образцов

3.1. Отбор отдельных особей

В первую очередь следует отбирать особей с раскрытыми створками раковины или недавно погибших особей (двухлетнего возраста или старше), чтобы увеличить шансы на обнаружение инфицированных устриц. Для гистологии следует отбирать только живых (включая умирающих) устриц.

Отбор образцов должен быть организован один раз в год, когда превалентность достигает максимального значения. Если данные о превалентности в конкретной экосистеме отсутствуют, отбор образцов желательно проводить в период с января по апрель в Южном полушарии (Hine, 1991a).

3.2. Консервирование образцов

Для гистологии лучшим консервантом является фиксатор АФА Дэвидсона, но 10% буферный формалин или другие стандартные гистологические фиксаторы также пригодны для использования. Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) образцы должны консервироваться с использованием 95–100% этанола и неденатурированного спирта.

3.3. Объединение образцов в пулы

Объединение образцов в пулы может быть целесообразным, но его влияние на диагностическую чувствительность не оценивалось.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Срез ткани толщиной 3–5 мм, включая жабры, мантию, гонады и пищеварительную железу, используется для диагностики *V. exitiosa* с помощью гистологии. Жабры и/или сердце являются предпочтительными органами для проведения некоторых тестов, включая метод отпечатков и полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

3.5. Неподходящие образцы/ткани

Другие ткани, кроме жабр, сердца и мантии, являются менее подходящими.

4. Методы диагностики

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Клинические признаки включают мертвых устриц или устриц с раскрытыми створками раковины, но данные клинические признаки не являются патогномоничными для инфекции *V. exitiosa* и могут указывать на другие инфекции.

4.1.2. Изменение поведения

Раскрытие створок раковины.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Большинство живых инфицированных устриц выглядят нормальными, но иногда в жабрах могут наблюдаться повреждения (Dinamani *с соавт.*, 1987).

4.2.2. Клиническая химия

Отсутствует.

4.2.3. Микроскопическая патология

У *O. chilensis* поражения возникают в соединительной ткани жабр и мантии, а также в сосудистых пазухах вокруг желудка и кишечника. Подэпителиальный слой соединительной ткани мантии, в котором находятся группы гранулярных гемоцитов, пораженных паразитами, выглядит отделившимся (Dinamani *с соавт.*, 1987). При легких инфекциях жаберного и пищеварительного дивертикулярного эпителия у *O. angasi*, слабо окрашивающиеся бледные базофильные внутриклеточные *B. exitiosa* дают в результате обширную эпителиальную гиперплазию. У *O. edulis* паразит был обнаружен в соединительной ткани различных органов в сочетании с тяжелой гемоцитной инфильтрацией (Abollo *с соавт.*, 2008).

4.2.4. Влажные препараты

Отсутствуют.

4.2.5. Отпечатки

Внутри гемоцитов в отпечатках сердца или жабр можно наблюдать сферические или яйцевидные организмы (шириной 2–5 мкм).

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

При запущенной инфекции паразит может наблюдаться в гемоцитах.

4.3. Методы обнаружения и идентификации агента

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Нет.

4.3.1.1.2. Отпечатки

4.3.1.1.2.1. Подлежащие отбору образцы

Молодь устриц или желудочек сердца или жабры от живых хозяев в 2-летнем возрасте или старше.

4.3.1.1.2.2. Техническая процедура

После высушивания тканей на абсорбирующей бумаге, на предметном стекле делается несколько отпечатков. Предметные стекла сушат на воздухе, фиксируют в метаноле или в абсолютном этаноле и окрашивают с использованием коммерческого набора для окрашивания мазков крови, в соответствии с инструкциями производителя. После промывания в водопроводной воде и высушивания, на предметные стекла накладывается покровное стекло с использованием соответствующей синтетической смолы. Предметные стекла изучают сначала при увеличении $\times 200$, а затем с использованием масляной иммерсии при увеличении $\times 1000$.

4.3.1.1.2.3. Положительные контроли

Рекомендованы и имеются в наличии в Справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.1.2.4. Уровни валидации

4.3.1.1.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Низкая специфичность, но чувствительность выше, чем при гистологическом исследовании (Diggles *с соавт.*, 2003). При сравнении сочетания ПЦР и гибридизации *in situ* (ISH), отпечатки сердца демонстрируют чувствительность, равную 59,3% и специфичность, равную 100% у *O. chilensis* (Diggles *с соавт.*, 2003).

4.3.1.1.2.4.2. Золотой стандарт

Чувствительность метода отпечатков ткани выше, чем у гистологии, которая является золотым стандартом, хотя данный метод не определяет вид паразита.

4.3.1.1.2.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является наличие в гемоцитах мелких сферических или яйцевидных организмов (шириной 2-5 мкм). Но паразита можно обнаружить и вне клеток. Эти организмы имеют базофильную цитоплазму и эозинофильное ядро (цвета могут варьироваться в зависимости от используемого красителя), и, поскольку их растирают на предметном стекле, они могут казаться больше на отпечатках, чем при гистологическом исследовании.

У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. exitiosa* у *O. chilensis* и *O. angasi*, но что касается *O. edulis*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. exitiosa* или *B. ostreae*.

У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, положительный результат свидетельствует о заражении видами *Vonamia*, что должно быть подтверждено Справочной лабораторией МЭБ.

4.3.1.1.2.6. Наличие коммерческих тестов

Наборы для быстрого окрашивания имеются в продаже (например, Hemacolor®)

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы ткани

4.3.1.1.3.1. Гистология

4.3.1.1.3.1.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие устрицы.

4.3.1.1.3.1.2. Техническая процедура

Срезы ткани, которые включают жабры, пищеварительную железу, мантию и гонаду, следует фиксировать в течение 24 часов в фиксаторе Дэвидсона или в других стандартных гистологических фиксаторах, включая 10% буферный формалин, с последующей обычной обработкой для гистологии с использованием парафина, и окраской, например, гематоксилином и эозином. Исследования производятся при увеличении до $\times 1000$.

4.3.1.1.3.1.3. Положительные контроли

Рекомендованы и имеются в наличии в Справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.1.3.1.4. Уровни валидации

4.3.1.1.3.1.4.1. Специфичность и чувствительность

В отношении *O. chilensis*, специфичность анализа низкая, но чувствительность является высокой для инфекций средней и высокой интенсивности, и низкой для инфекций низкой интенсивности. При сравнении сочетания ПЦР и гибридизации *in situ*, гистология демонстрирует чувствительность, равную 44% (ниже, чем при использовании отпечатков сердца) и специфичность, равную 100% (Diggle *с соавт.*, 2003).

4.3.1.1.3.1.4.2. Золотой стандарт

Гистология является золотым стандартом и является рекомендуемым методом надзора в областях, зараженных только *B. exitiosa*. Однако в областях, где *B. exitiosa* и *B. ostreae* являются симпатрическими, положительный результат по гистологии должен быть подтвержден молекулярным исследованием.

4.3.1.1.3.1.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является наличие паразитов в виде очень маленьких клеток шириной 2–5 мкм внутри гемоцитов, или в свободном виде в соединительной ткани или эпителиальных синусах жабр, кишечника и мантии у *O. chilensis*. Они часто сопровождаются интенсивной диссеминированной гемоцитной инфильтрацией у *O. chilensis*, а у *O. angasi* - интенсивной очаговой гемоцитной инфильтрацией. Чтобы избежать каких-либо сомнений, для положительного диагноза паразит должен быть обнаружен внутри гемоцита. Метод не является видоспецифическим.

У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. exitiosa* у *O. chilensis* и *O. angasi*, но что касается *O. edulis*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. exitiosa* или *B. ostreae*.

У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, положительный результат свидетельствует о заражении видами *Bonamia*, что должно быть подтверждено Справочной лабораторией МЭБ.

4.3.1.1.3.1.6. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тесты отсутствуют.

4.3.1.1.3.2. Просвечивающая электронная микроскопия

4.3.1.1.3.2.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие устрицы.

4.3.1.1.3.2.2. Техническая процедура

Кусочек ткани небольшого размера (1–2 мм) следует зафиксировать в 3% глутаральдегиде (в 0,22 мкм отфильтрованной морской воды [FSW]) в течение 1 часа, трижды промыть в отфильтрованной морской воде, зафиксировать в 1% осмиевой кислоте и дважды промыть снова в отфильтрованной морской воде. После обезвоживания в последовательной серии растворов этанола, и в двух сериях пропиленоксида, образцы постепенно пропитываются и погружаются в эпоксидную смолу. После полимеризации при 60° С блоки следует сначала нарезать на кусочки размером 0,5–1 мкм для контроля качества, а затем на кусочки размером 80–100 нм для исследования под электронным микроскопом. Ультратонкие срезы помещают на медные сетки и контрокрашивают с использованием уранилацетата и лимоннокислого свинца.

4.3.1.1.3.2.3. Положительные контроли

Нет.

4.3.1.1.3.2.4. Уровни валидации

4.3.1.1.3.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Более высокая специфичность по сравнению с отпечатками и гистологией.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) позволяет отличать *B. exitiosa* от других близкородственных микробов, таких как *B. ostreae*.

4.3.1.1.3.2.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является наличие паразитов в гемоцитах. В отношении *O. chilensis* были описаны четыре стадии развития паразита у инфицированных устриц: плотные формы (стадия 1), промежуточные формы (стадия 2), плазмодиальные формы (стадия 3) и вакуолизированные формы (стадия 4) (Hine, 1991b; Hine *с соавт.*, 2001). Внутриклеточные структуры включают митохондрии, гаплоспоросомы, комплекс Гольджи и устойчивые внутриядерные микротрубочки.

В отличие от других гаплоспориций, включая *B. ostreae*, при *B. exitiosa* наблюдается стадия, содержащая большую вакуоль, полученную в результате увеличения одной или нескольких митохондрий (Hine, 1991b; Hine *с соавт.*, 2001). Плотные формы *B. exitiosa* немного больше по размеру (средний диаметр $3 \pm 0,3$ мкм (количество паразитов = 61) по сравнению с *B. ostreae* (средний диаметр $2,4 \pm 0,5$ мкм (количество паразитов = 64) и имеют больше гаплоспоросом, митохондриальных профилей и липоидных телец на срез, предназначенный для изучения ультраструктуры, а также более мелкие митохондрии с тубуло-везикулярными кристами. Кроме того, плотные, в отличие от неплотных форм *B. ostreae*, лишены ядерных мембраносвязанных комплексов Гольджи/ядерной чаши и вакуолизированной стадии (Hine *с соавт.*, 2001).

4.3.1.1.3.2.6. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тесты отсутствуют.

4.3.1.2. Выделение и идентификация агента

4.3.1.2.1. Культура клеток /искусственные среды

Отсутствуют.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

В настоящее время отсутствуют, но одно из двух моноклональных антител, полученных против клеточной мембраны *B. ostreae*, реагировало с *B. exitiosa* (Mialhe *c соавт.*, 1988).

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

4.3.1.2.3.1.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие устрицы.

4.3.1.2.3.1.2. Техническая процедура

Образцы ткани помещают в 95-100% этанол или замораживают до выделения ДНК. Выделение ДНК осуществляют путем расщепления протеиназой К в течение ночи при 50°C и при использовании фенольно-хлороформной экстракции с этаноловой преципитацией (Cochennec *c соавт.*, 2000).

Было продемонстрировано, что протокол ПЦР, разработанный для обнаружения *B. ostreae*, позволяет обнаруживать *B. exitiosa* (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004; Diggles *c соавт.*, 2003; Nine *c соавт.*, 2001). Пара праймеров Bo-Boas (5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' и 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3' соответственно) амплифицирует продукт длиной 304 пар оснований из малой субъединицы (SSU) рДНК (Cochennec *c соавт.*, 2000). Реакционные смеси для ПЦР содержат буфер (500 мМ KCl, 100 мМ Трис/HCl [pH 9,0 при 25°C] и 1% Triton® X-100), 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ смеси dNTP, 1 мкМ прямого и обратного праймера, 0,02 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы и 0,2 нг/мкл ДНК-матрицы в общем объеме 50 мкл. Образцы денатурируют в термоциклере в течение 5 минут при 94°C, после чего подвергают 30 циклам (94°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1 минуты, 72°C в течение 1 минуты), со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 10 минут.

Вторая пара праймеров C_F и C_R (5'-CGG-GGG-CAT-AAT-TCA-GGA-AC-3' и 5'-CCA-TCT-GCT-GGA-GAC-ACA-G-3' соответственно), также предназначенная для амплификации продукта длиной 760 пар оснований из малой субъединицы рДНК *B. ostreae*, должна амплифицировать *B. exitiosa* (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004). ПЦР по технологии TaqMan с использованием праймеров и зонда, нацеленного на область ITS1 (внутренний транскрибируемый спейсер), также можно использовать для обнаружения *Vonatia* spp. (Corbeil *c соавт.*, 2006a). Чувствительность достаточно высокая; данный анализ не амплифицирует *Haplosporidium nelsoni*, *H. costale* или *Mikrocytos mackini*. Однако, он еще не был полностью валидирован.

4.3.1.2.3.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительными контролями являются: 1) ПЦР со специфическими праймерами к геномной ДНК, полученной от хозяина с инфекцией высокой интенсивности, или ДНК из очищенного паразита; 2) неспецифическая амплификация (актин, SSU и др.). Отрицательные контроли: 3) отсутствие реакции на ДНК-мишень; 4) ПЦР со специфическими праймерами к геномной ДНК, полученной от неинфицированных хозяев. Положительные контроли предоставляются по запросу из Справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3.1.4. Уровни валидации

4.3.1.2.3.1.4.1. Специфичность и чувствительность

Исходя из сходства последовательности ДНК-мишени, пара праймеров Bo-Boas должна амплифицировать все гаплоспорииды микроклеток (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004). Чувствительность анализа выше, чем у гистопатологических методов, но ниже, чем у гибридизации *in situ* (Diggles *с соавт.*, 2003).

4.3.1.2.3.1.4.2. Золотой стандарт

При сравнении сочетания гистологии и отпечатков сердца, и при условии, что данные методы демонстрируют 100% чувствительность и специфичность, ПЦР демонстрирует чувствительность, равную 88,2% (ниже, чем при гибридизации *in situ*) и специфичность, равную 36,4% (Diggles *с соавт.*, 2003).

4.3.1.2.3.1.5. Интерпретация результатов

Положительные результаты теста определяются как наличие ампликонов соответствующего размера, причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными.

ПЦР-анализ не является видоспецифичным. Последовательность гена малой субъединицы рДНК *Bonamia exitiosa* демонстрирует полиморфизм с такой же последовательностью у *B. ostreae* и *B. roughleyi* с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), после расщепления ПЦР-продуктов Bo-Boas при помощи *Bgl* I и *Hae* II. *Bonamia ostreae* и *B. exitiosa* демонстрируют одинаковый профиль (два продукта длиной 115 и 189 пар оснований) при расщеплении при помощи *Hae* II, в то время как ПЦР-продукт *B. roughleyi* не расщепляется. Профиль *B. ostreae* состоит из двух полос (бэндов) длиной 120 и 180 пар оснований при расщеплении при помощи *Bgl* I, в то время как ПЦР-продукты *B. exitiosa* и *B. roughleyi* не расщепляются (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004; Hine *с соавт.*, 2001). Однако исходя из результатов секвенирования, метод ПЦР-ПДРФ не позволяет отличить *B. exitiosa* и другие родственные изоляты от *B. perspora*. У *O. chilensis* и *O. angasi* из Новой Зеландии и Австралии, соответственно, ожидаемый результат ПЦР-ПДРФ, ассоциированный с положительным результатом, полученным с помощью гистологии или отпечатков, подтверждает инфекцию *B. exitiosa*.

У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, ожидаемый результат ПЦР-ПДРФ, ассоциированный с положительным

результатом, полученным с помощью гистологии или отпечатков, указывает строго на инфекцию *B. exitiosa*, но перед подтверждающей диагностикой необходимо провести секвенирование ПЦР-продукта и, если возможно, просвечивающую электронную микроскопию.

4.3.1.2.3.1.6. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тесты отсутствуют

4.3.1.2.3.2. Гибридизация *in situ* (ISH)

4.3.1.2.3.2.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие устрицы.

4.3.1.2.3.2.2. Техническая процедура

Протокол гибридизации *in situ* (ISH), разработанный для обнаружения *B. ostreae*, позволяет выявить *B. exitiosa* (Cochennec *с соавт.*, 2000; Diggles *с соавт.*, 2003). В данном анализе используется меченый дигоксигенином зонд из 300 пар оснований, нацеленный на ген малой субъединицы рДНК. Образцы тканей помещают в фиксатор Дэвидсона на 24 часа, а затем погружают в парафин. Срезы толщиной 5 мкм нарезают, помещают на предметные стекла, покрытые силаном, а затем нагревают в печи при температуре 60°C в течение ночи. После депарафинирования предметные стекла обрабатывают протеиназой К (100 мкг/мл) в буфере TE (50 mM Трис, 10 mM ЭДТА [этилендиаминтетрауксусная кислота]) при температуре 37°C в течение 30 минут. Предметные стекла обезвоживают в серии растворов этанола и высушивают на воздухе. Затем предметные стекла покрывают буфером для гибридизации (4 × SSC [стандартный цитратно-солевой буфер; 60 mM NaCl, 600 mM NaCl, pH 7], 50% формамид, 1 × раствор Денхардта, 250 мкг/мл дрожжевой тРНК, 10% декстрансульфат), который содержит 20 нг меченого дигоксигенином зонда. После денатурации при 95°C в течение 5 минут, проводят гибридизацию путем инкубирования предметных стекол во влажной камере при 42°C в течение ночи. Зонд получают с помощью ПЦР с использованием ранее описанной пары праймеров Во-Воас с включением дигоксигенина. ПЦР проводят способом, описанным в разделе, посвященном ПЦР, за исключением того, что в реакционную смесь добавляют 25 mM DIG dUTP. Этапы обнаружения выполняются в соответствии с инструкциями производителя. В другом протоколе гибридизации *in situ* (ISH) используется комбинация из трех 5'-меченых дигоксигенином зондов, специфичных для близкородственных представителей группы *B. exitiosa*-*B. roughleyi* (Hill *с соавт.*, 2010). Однако, данный анализ еще не был полностью валидирован.

4.3.1.2.3.2.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительными контролями являются: 1) гибридизация *in situ* на инфицированном хозяине; 2) неспецифическая гибридизация *in situ* (SSU рДНК) на образцах. Отрицательные контроли: 3) отсутствие реакций зонда при гибридизации *in situ*; 4) гибридизация *in situ* на неинфицированных хозяевах.

Положительные контроли предоставляются по запросу из Справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3.2.4. Уровни валидации

4.3.1.2.3.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Специфичность анализа выше, чем у гистопатологических методов. Однако зонд Bo–Boas также способен выявлять *Haplosporidium nelsoni* у *Crassostrea virginica*, *B. ostreae* у *O. edulis*, но не *Mikrocytos mackini* у *C. gigas* (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004; Cochenne с соавт., 2000). Чувствительность анализа выше, чем у гистопатологических методов и ПЦР (Diggles с соавт., 2003).

4.3.1.2.3.2.4.2. Золотой стандарт

При сравнении сочетания гистологии и отпечатков сердца, и при условии, что данные методы демонстрируют 100% чувствительность и специфичность, гибридизация *in situ* демонстрирует чувствительность, равную 100% (выше, чем у ПЦР) и специфичность, равную 27,3% (Diggles с соавт., 2003).

4.3.1.2.3.2.5. Интерпретация результатов

Положительные результаты теста определяются как наличие темно-меченых паразитов внутри гемоцитов, причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными.

У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. exitiosa* у *O. chilensis* и *O. angasi*, но что касается *O. edulis*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. exitiosa* или *B. ostreae*.

У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, положительный результат свидетельствует о заражении видами *Bonamia*, что должно быть подтверждено Справочной лабораторией МЭБ.

4.3.1.2.3.2.6. Наличие коммерческих тестов

Набор для обнаружения нуклеиновых кислот DIG nucleic acid detection kit (Boehringer Mannheim).

4.3.1.2.3.3. Секвенирование

Секвенирование рекомендуется в качестве одного из финальных шагов для подтверждающей диагностики. Целевыми областями являются SSU рДНК и ITS1. Несмотря на то, что последовательности имеются в государственных банках генов, рекомендуется обращаться в соответствующую Справочную лабораторию МЭБ.

4.3.1.2.4. Выделение агента

Нет.

4.3.2. Серологические методы

Не применимо.

5. Категории тестов в зависимости от их назначения

В качестве примера, методы, имеющиеся в настоящее время для целевого надзора и диагностики инфекции *B. exitiosa*, перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = 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 а 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
Отпечатки тканей	d	d	a	a	a	c
Гистопатология	d	d	a	a	a	c
Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	d	d	d	d	d	b
ДНК зонды <i>in situ</i>	d	d	d	d	d	b
ПЦР и ПЦР по технологии TaqMan	a	a	a	a	a	c
ПЦР-ПДРФ	d	d	d	d	d	b
Секвенирование	d	d	d	d	d	a

ПЦР = полимеразная цепная реакция; ПДРФ = полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от инфекции *Bonamia exitiosa*

Методами, предписанными для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от инфекции, как указано в *Кодексе по водным животным*, являются отпечатки тканей (сердце или жабры), гистология или ПЦР в областях, зараженных только *B. exitiosa*. Однако в областях, где *B. exitiosa* и *B. ostreae* являются симпатрическими, положительный результат по гистологии должен быть подтвержден молекулярным исследованием.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение случая подозрения на болезнь

Любой положительный результат, полученный при помощи любого метода диагностики, следует считать подозрительным.

7.2. Определение подтвержденного случая болезни

У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, подтвержденным случаем *B. exitiosa* является положительный результат, полученный при использовании метода отпечатков тканей, гистологии или гибридизации *in situ* в сочетании с положительным результатом, полученным с помощью ПЦР-ПДРФ и секвенирования.

Для других видов хозяев или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, рекомендуется провести подтверждение при помощи просвечивающей электронной микроскопии. Однако этот метод подходит только для образцов, которые характеризуются высокой интенсивностью инфекции.

8. Список литературы

- ABOLLO E., RAMILO A., CASAS S.M., COMESAÑA P., CAO A., CARBALLAL M.J. & VILLALBA A. (2008). First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (*Haplosporidia*) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture*, **274**, 201–207.
- ARZUL I., LANGLADE A., CHOLLET B., ROBERT M., FERRAND S., OMNES E., LEROND S., COURALEAU Y., JOLY J.-P., FRANÇOIS C. & GARCIA C. (2011). Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Vet. Parasitol.*, **179** (1–3), 69–76.
- BERTHE F.C.J. & HINE P.M. (2003). *Bonamia exitiosa* Hine *c. coaem.*, 2001 is proposed instead of *B. exitiosus* as the valid name of *Bonamia* sp. infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 181.
- BURRESON E.M., STOKES N.A., CARNEGIE R.B. & BISHOP M.J. (2004). *Bonamia* sp. (*Haplosporidia*) found in nonnative oysters *Crassostrea ariakensis* in Bogue Sound, North Carolina. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 1–9.
- CAMPALANS M., ROJAS P. & GONZALEZ M. (2000). Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **20**, 31–33.
- CARNEGIE R.B., BURRESON E.M., HINE P.M., STOKES N.A., AUDEMARD C., BISHOP M.J. & PETERSON C.H. (2006). *Bonamia persporan.* sp. (*Haplosporidia*), a parasite of the oyster *Ostreaola equestris*, is the first *Bonamia* species known to produce spores. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **53**, 232–245.
- CARNEGIE R.B. & COCHENNEC-LAUREAU N. (2004). Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. *Aquat. Living Res.*, **17**, 519–528.
- COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F. & GÉRARD A. (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.*, **76**, 26–32.

- COCHENNEC N., REECE K.S., BERTHE F.C.J. & HINE P.M. (2003). Revisiting *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation points to the genus *Bonamia* (Haplosporidia). *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 209–217.
- CORBEIL S., ARZUL I., DIGGLES B., HEASMAN M., CHOLLET B., BERTHE F.C. & CRANE M.S. (2006a). Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Bonamia* species. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 75–80.
- CORBEIL S., ARZUL I., ROBERT M., BERTHE F.C.J., BESNARD-COCHENNEC N. & CRANE M.S.J. (2006b). Molecular characterization of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 81–85.
- CRANFIELD H.J., DUNN A., DOONAN I.J. & MICHAEL K.P. (2005). *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES J. Mar. Sci.*, **62**, 3–13.
- DIGGLES B.K., COCHENNEC-LAUREAU N. & HINE P.M. (2003). Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosus* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Aquaculture*, **220**, 145–156.
- DIGGLES B.K. & HINE P.M. (2002). *Bonamia exitiosa* epidemiology in Foveaux Strait oysters. Final research report, OYS1999/01. Ministry of Fisheries, New Zealand, 51 pp. (unpublished report held in NIWA library, Wellington).
- DINAMANI P., HINE P.M. & JONES J.B. (1987). Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 37–44.
- DOONAN I.J., CRANFIELD H.J. & MICHAEL K.P. (1994). Catastrophic reduction of the oyster, *Tiostrea chilensis* (Bivalvia: Ostreidae), in Foveaux strait, New Zealand, due to infestation by the protistan *Bonamia* sp. *NZ J. Mar. Freshwater Res.*, **28**, 335–344.
- FARLEY C.A., WOLF P.H. & ELSTON R.A. (1988). A long-term study of ‘microcell’ disease with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fishery Bull.*, **86**, 581–593.
- HILL K.M., CARNEGIE R.B., ALOUI-BEJAOU N., EL GHARSALLI R., WHITE D.M., STOKES N.A. & BURRESON G.M. (2010). Observation of a *Bonamia* sp. infecting the oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, and a consideration of its phylogenetic affinities. *J. Invertebr. Pathol.*, **103**, 179–185.
- HINE P.M. (1991a). The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters. *Tiostrea chilensis*. *Aquaculture*, **93**, 241–251.

HINE P.M. (1991b). Ultrastructural observations on the annual infection pattern of *Bonamia* sp. in flat oysters *Tiostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.*, **11**, 163–171.

HINE P.M. (1996). The ecology of *Bonamia* and decline of bivalve molluscs. *NZ J. Ecol.*, **20** (1), 109–116.

HINE P.M. (2002). Severe apicomplexan infection in the oyster *Ostrea chilensis*: a predisposing factor in bonamiosis. *Dis. Aquat. Org.*, **51**, 49–60.

HINE P.M., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J. (2001). *Bonamia exitiosus* n. sp. (*Haplosporidia*) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi) in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 63–72.

HINE P.M., DIGGLES B.K., PARSONS M.J.D., PRINGLE A. & BULL B. (2002). The effects of stressors on the dynamics of *Bonamia exitiosus* Hine, Cochenneec-Laureau and Berthe, infections in flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi). *J. Fish Dis.*, **25**, 545–554.

HINE P.M. & JONES J.B. (1994). *Bonamia* and other aquatic parasites of importance to New Zealand. *NZ J. Zool.*, **21**, 49–56.

HINE P.M. & WESNEY B. (1994). Interaction of phagocytosed *Bonamia* sp. (*Haplosporidia*) with haemocytes of oysters *Tiostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.*, **20**, 219–229.

KROECK M.A. & MONTES J. (2005). Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 231–235.

LYNCH S.A., ABOLLO E., RAMILLO A., CAO A., CULLOTY S.C. & VILLALBA A. (2010). Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology*, **137**, 1515–1526.

MIALHE E., BOULO V., ELSTON R., HILL B., HINE M., MONTES J., VAN BANNING P. & GRIZEL H. (1988). Serological analysis *Bonamia* in *Ostrea edulis* and *Tiostrea lutaria* using polyclonal and monoclonal antibodies. *Aquat. Living Res.*, **1**, 67–69.

NARCISI V., ARZUL I., CARGINI D., MOSCA F., CALZETTA A., TRAVERSA D., ROBERT M., JOLY J.-P., CHOLLET B., RENAULT T. & TISCAR P.G. (2010). Detection of *Bonamia ostreae* and *Bonamia exitiosa* (*Haplosporidia*) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 79–85.

PICHOT Y., COMPS M., TIGE G., GRIZEL H. & RABOUIN M.A. (1979). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **43**, 131–140.

*

* *

NB: Имеется Референтная лаборатория МЭБ по инфекции *Bonamia exitosia* (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 инфекции *Bonamia exitosia* свяжитесь со Референтными лабораториями МЭБ.

ИНФЕКЦИЯ *BONAMIA OSTREAE*

1. Сфера применения⁶⁰

Bonamia ostreae – это простейший паразит типа *Haplosporidia* (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004; Lopez-Flores *с соавт.*, 2007), инфицирующий гемоциты плоских устриц, *Ostrea edulis*, и вызывающий физиологические нарушения и, в конечном итоге, гибель животного (Grizel, 1985). Применительно к настоящей главе, инфекция *Bonamia ostreae* означает инфекцию *B. ostreae*. Это определение исключает инфекцию *B. exitiosa* (Hine *с соавт.*, 2001), *B. roughleyi* (Cochenne *с соавт.*, 2003) и *B. perspora* (Carnegie *с соавт.*, 2006). Разновидности *Bonamia*, которые не идентифицированы до уровня видов, следует направлять в соответствующую Справочную лабораторию МЭБ.

2. Информация о болезни

2.1. Особенности возбудителя

2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента
Bonamia ostreae (Pichot *с соавт.*, 1979), штаммы не идентифицированы.

2.1.2. Выживание вне хозяина

По-видимому, до 58% паразитов, выделенных из сильно инфицированных устриц, выживают после 1 недели пребывания в воде морского дна при 15°C (Arzul *с соавт.*, 2009).

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

Было продемонстрировано, что ванна с перуксусной кислотой (0,001% и 0,005%) снижает контаминацию устриц *B. ostreae* (Grizel, 1985).

2.1.4. Жизненный цикл

Жизненный цикл вне хозяина неизвестен, но возможна прямая передача паразита от хозяина к хозяину при совместном обитании или путем введения выделенных паразитов (Hervio *с соавт.*, 1995), что позволяет предположить, что промежуточного хозяина не требуется.

2.2. Особенности хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Естественный хозяин: Европейская плоская устрица, *Ostrea edulis*.

Виды устриц, инфицированные при перемещении в эндемичные по *B. ostreae* зоны: *Ostrea puelchana*, *O. angasi*, *O. chilensis* (= *Tiostrea chilensis*, *T. lutaria*) (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004). Однако у данных хозяев паразит не был идентифицирован до уровня вида.

⁶⁰ Примечание: Версия утверждена Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 г.

Экспериментальные тесты продемонстрировали низкую инфекционность *B. ostreae* в отношении *Crassostrea ariakensis* (Audemard *c соавт.*, 2005).

Было высказано предположение, что *Ostrea conchaphila* (= *O. lurida*) и *Crassostrea angulata* были инфицированы *B. ostreae* (Carnegie & Cochenne-Lauriau, 2004), но подтверждающая диагностика не была выполнена.

В результате экспериментальной работы было продемонстрировано, что следующие виды не восприимчивы к *B. ostreae*: *C. gigas*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* (Culloty *c соавт.*, 1999).

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

O. edulis как в возрасте 0+, так и в возрасте старше 1 года восприимчивы к инфекции и у них может наблюдаться высокая превалентность и высокая интенсивность инфекции и даже смертность на протяжении 6 месяцев (Lynch *c соавт.*, 2005). Однако особи старше 2 лет, по-видимому, более восприимчивы к этому заболеванию (Culloty & Mulcahy, 1996; Grizel, 1985; Engelsma *c соавт.*, 2010). Молодь устриц, полученная при оседании в природных источниках, по-видимому, значительно более заражена паразитами, чем молодь устриц из инкубаториев (Conchas *c соавт.*, 2003).

Недавно было продемонстрировано, что личинки могут быть инфицированы *B. ostreae* (Arzul *c соавт.*, 2010).

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Ostrea edulis — это единственный известный естественно восприимчивый вид, и интенсивность инфекции повышается одновременно со смертностью с возрастом и/или с размером устриц (Culloty & Mulcahy, 1996; Grizel, 1985).

2.2.4. Органы-мишени и инфицируемые ткани

Bonamia ostreae является простейшим паразитом, который проникает в гемоциты (Comps *c соавт.*, 1980; Pichot *c соавт.*, 1979), но его можно обнаружить и вне клеток между эпителиальными клетками или интерстициоцитами в жабрах и желудке или в некротизированных областях соединительной ткани. Сообщалось также о внутриэпителиальной локализации в жабрах (Montes *c соавт.*, 1994). Паразит также обнаруживали в ткани яичников (Van Banning, 1990). Запущенные инфекции становятся системными. У личинок паразит обнаруживался в эпителии, окружающем висцеральную полость (Arzul *c соавт.*, 2010).

2.2.5. Персистентная инфекция с пожизненным носительством

Инфекция часто является смертельной в зависимости от хозяина и условий окружающей среды.

2.2.6. Переносчики инфекции

Исследована возможная роль донных макробеспозвоночных и зоопланктона в жизненном цикле *B. ostreae*. Офиотрикс ломкий (*Ophiothrix fragilis*) был идентифицирован как возможный переносчик паразита (Lynch *c соавт.*, 2006).

Положительный сигнал, полученный в отношении *Crassostrea gigas* при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяет предположить, что этот вид может

выступать в качестве носителя или резервуара *B. ostreae* (Lynch *с соавт.*, 2010).

2.2.7. Известные или потенциальные носители среди диких водных животных
Дикие популяции плоских устриц *Ostrea edulis* также инфицируются *B. ostreae*.

2.3. Модель болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Возможна прямая передача паразита от хозяина к хозяину. Инфекционная форма и способы проникновения и высвобождения остаются неустановленными. Паразит наблюдался у личинок, развивающихся в мантийной полости взрослых устриц, что указывает на возможную передачу инфекции между этими двумя возрастными группами. Таким образом, личинки могут способствовать распространению паразита во время планктонной жизни (Arzul *с соавт.*, 2011).

Обычно проходит как минимум 3 месяца, прежде чем паразит будет обнаружен в свободных от болезни партиях, перемещенных в зараженные районы.

2.3.2. Превалентность

Превалентность варьируется (от 0% до 80%). Превалентность выше у особей старше 2 лет. Болезнь возникает и может передаваться в течение всего года, но у инфекции *B. ostreae* есть сезонные колебания. Превалентность инфекции повышается с осени и достигает пика в конце зимы/в начале весны (Arzul *с соавт.*, 2006; Culloty & Mulcahy, 1996; Grizel, 1985; Engelsma *с соавт.*, 2010).

2.3.3. Географическое распределение

Инфекция *B. ostreae* встречается в Европе (Франция, Ирландия, Италия, Нидерланды, Португалия, Испания и Великобритания), Канаде (Британская Колумбия) и Соединенных Штатах Америки (Калифорния, штаты Мэн и Вашингтон) (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Инфекция у диких и культивируемых плоских устриц часто является летальной, и гибель обычно происходит по достижении наивысшего уровня интенсивности инфекции.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Выживаемость паразитов, очищенных и содержащихся в морской воде, ниже при температуре 25°C, чем при 4 или 15°C (Arzul *с соавт.*, 2009). Вода с высоким содержанием солей (35, 40 и 45 епс.), по-видимому, способствует выживанию паразитов (Arzul *с соавт.*, 2009). Превалентность имеет ежегодную модель, которая меняется в зависимости от района. Превалентность инфекции повышается с осени и достигает пика в конце зимы/начале весны. Сообщается о двух пиках, которые обычно происходят зимой/весной и осенью (Arzul *с соавт.*, 2006; Culloty & Mulcahy, 1996). Более низкие летние температуры и более высокая соленость приводят к более высокой превалентности следующей зимой (Arzul *с соавт.*, 2006). *Ostrea edulis*, по-видимому, более восприимчивы к *B. ostreae* в условиях нехватки корма и сниженной солености (Engelsma *с соавт.*, 2010).

2.4. Профилактика и борьба с болезнью

2.4.1. Вакцинация

Вакцины отсутствуют.

2.4.2. Лекарственное лечение

Отсутствует.

2.4.3. Иммуностимуляция

Отсутствует.

2.4.4. Разведение для получения резистентной популяции

Было продемонстрировано, что селекционное разведение эффективно снижает восприимчивость и смертность, вызываемые *B. ostreae* (Naciri-Graven *с соавт.*, 1998).

2.4.5. Повторное заселение резистентными видами

Линии *Ostrea edulis*, устойчивые к болезни, полученные путем селекционного разведения, могут выступать в качестве альтернативы в зараженных районах.

2.4.6. Блокирующие агенты

Отсутствуют.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Нет данных.

2.4.8. Общие практики разведения

Смертность в результате бонамиоза можно снизить с помощью суспензионной культуры, более низкой плотности посадки или разведения *Ostrea edulis* вместе с *Crassostrea gigas*, которые не являются естественно восприимчивыми к инфекции (Carnegie & Cochenne-Laugeois, 2004). Молодь устриц из инкубаториев является более предпочтительной по сравнению с молодой устриц, полученной при оседании в природе, поскольку природные источники, по-видимому, намного больше заражены паразитами (Conchas *с соавт.*, 2003).

3. Отбор образцов

3.1. Отбор отдельных особей

В первую очередь следует отбирать особей с раскрытыми створками раковины или недавно погибших особей (двухлетнего возраста или старше), чтобы увеличить шансы на обнаружение инфицированных устриц. Для гистологии следует отбирать только живых (включая умирающих) устриц.

Отбор образцов должен быть организован один раз в год, когда превалентность достигает максимального значения. Если данные о превалентности в конкретной экосистеме отсутствуют, отбор образцов желательно проводить в конце зимы-начале весны или осенью (Arzul *с соавт.*, 2006; Culloty & Mulcahy, 1996; Engelsma *с соавт.*, 2010).

3.2. Консервирование образцов

Для гистологии лучшим консервантом является фиксатор АФА Дэвидсона, но 10% буферный формалин или другие стандартные гистологические фиксаторы также пригодны для использования. Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) образцы должны консервироваться с использованием 95–100% этанола и неденатурированного спирта.

3.3. Объединение образцов в пулы

Объединение образцов в пулы может быть целесообразным, но его влияние на диагностическую чувствительность не оценивалось.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Срез ткани толщиной 3–5 мм, включая жабры, мантию, гонады и пищеварительную железу, используется для диагностики *B. ostreae* с помощью гистологии. Жабры и/или сердце являются предпочтительными органами для проведения некоторых тестов, включая метод отпечатков и полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

3.5. Неподходящие образцы/ткани

Другие ткани, кроме жабр, сердца и мантии, являются менее подходящими.

4. Методы диагностики

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Клинические признаки включают мертвых устриц или устриц с раскрытыми створками раковины, но данные клинические признаки не являются патогномоничными для инфекции *B. ostreae* и могут указывать на другие инфекции.

4.1.2.	Изменение	поведения
Раскрытие створок раковины.		

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Макроскопическая патология включает эпизодическое пожелтение, обширные поражения, включая перфорированные язвы на соединительной ткани жабр, мантии и пищеварительной железы (Comps *с соавт.*, 1980). Данные макроскопические признаки не являются патогномоничными для инфекции *B. ostreae*, и большинство инфицированных устриц выглядят нормальными.

4.2.2.	Клиническая	химия
Отсутствует.		

4.2.3. Микроскопическая патология

На фиксированных срезах можно увидеть плотную инфильтрацию гемоцитами (некоторые из которых содержат паразитов) соединительной ткани жабр и мантии, а также сосудистых пазух вокруг желудка и кишечника, (Comps *с соавт.*, 1980).

4.2.4. Влажные препараты
Отсутствуют.

4.2.5. Отпечатки

Внутри гемоцитов в отпечатках сердца или жабр можно наблюдать сферические или яйцевидные организмы (шириной 2–5 мкм).

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

При запущенной инфекции паразит может наблюдаться в гемоцитах.

4.3. Методы обнаружения и идентификации агента

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты
Не применимо.

4.3.1.1.2. Отпечатки

4.3.1.1.2.1. Подлежащие отбору образцы

Мягкие ткани молоди устриц, желудочек сердца или жаберы от живых хозяев в 2-летнем возрасте или старше.

4.3.1.1.2.2. Техническая процедура

После высушивания тканей на абсорбирующей бумаге, на предметном стекле делается несколько отпечатков. Предметные стекла сушат на воздухе, фиксируют в метаноле или в абсолютном этаноле и окрашивают с использованием коммерческого набора для окрашивания мазков крови, в соответствии с инструкциями производителя. После промывания в водопроводной воде и высушивания, на предметные стекла накладывается покровное стекло с использованием соответствующей синтетической смолы. Предметные стекла изучают сначала при увеличении $\times 200$, а затем с использованием масляной иммерсии при увеличении $\times 1000$.

4.3.1.1.2.3. Положительные контроли

Рекомендованы и имеются в наличии в Справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.1.2.4. Уровни валидации

4.3.1.1.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Специфичность анализа низкая, но чувствительность выше, чем при гистологическом исследовании (Da Silva & Villalba, 2004). Но, по-видимому, метод отпечатков сердца не является надежным для обнаружения латентных инфекций.

4.3.1.1.2.4.2. Золотой стандарт

Чувствительность метода отпечатков ткани выше, чем у гистологии, которая является золотым стандартом, хотя данный метод не определяет вид паразита.

4.3.1.1.2.5. Интерпретация результатов

- Положительным результатом является наличие в гемоцитах мелких сферических или яйцевидных организмов (шириной 2-5 мкм). Но паразита можно обнаружить и вне клеток. Эти организмы имеют базофильную цитоплазму и эозинофильное ядро (цвета могут варьироваться в зависимости от используемого красителя), и, поскольку их растирают на предметном стекле, они могут казаться шире на отпечатках, чем при гистологическом исследовании. Можно наблюдать многоядерные клетки. Данный метод не определяет вид паразита.
- У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. ostreae*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. ostreae* или *B. exitiosa*.
- У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. ostreae*, положительный результат свидетельствует о заражении видами *Bonamia*, что должно быть подтверждено Справочной лабораторией МЭБ.

4.3.1.1.2.6. Наличие коммерческих тестов

Наборы для быстрого окрашивания имеются в продаже (например, Hemacolor®).

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы ткани

4.3.1.1.3.1. Гистология

4.3.1.1.3.1.1. Подлежащие отбору образцы
Живые или недавно погибшие устрицы.

4.3.1.1.3.1.2. Техническая процедура

Срезы ткани, которые включают жабры, пищеварительную железу, мантию и гонаду, следует фиксировать в течение 24 часов в фиксаторе Дэвидсона или в других стандартных гистологических фиксаторах, включая 10% буферный формалин, с последующей обычной обработкой для гистологии с использованием парафина, и окраской, например, гематоксилином и эозином. Исследования производятся при увеличении до $\times 1000$.

4.3.1.1.3.1.3. Положительные контроли
Рекомендованы и имеются в наличии в Справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.1.3.1.4. Уровни валидации

4.3.1.1.3.1.4.1. Специфичность и чувствительность

Специфичность анализа низкая, но чувствительность является высокой для инфекций средней и высокой интенсивности, и низкой для инфекций низкой интенсивности.

4.3.1.1.3.1.4.2. Золотой стандарт

Гистология является золотым стандартом и является рекомендуемым методом надзора в областях, зараженных только *B. ostreae*. Однако в областях, где *B. exitiosa* и *B. ostreae* являются симпатрическими, положительный результат по гистологии должен быть подтвержден молекулярным исследованием.

4.3.1.1.3.1.5. Интерпретация результатов

- Положительным результатом является наличие паразитов в виде очень маленьких клеток шириной 2–5 мкм внутри гемоцитов, или в свободном виде в соединительной ткани или эпителиальных синусах жабр, кишечника и мантии. Наличие паразитов часто сопровождается интенсивной воспалительной реакцией. Чтобы избежать каких-либо сомнений, для положительного диагноза паразит должен быть обнаружен внутри гемоцита. Метод не является видоспецифическим.

- У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. ostreae*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. ostreae* или *B. exitiosa*.
- У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. ostreae*, положительный результат свидетельствует о заражении видами *Bonamia*, что должно быть подтверждено Справочной лабораторией МЭБ.

4.3.1.1.3.1.6.	Наличие	коммерческих	тестов
Коммерческие	тесты		отсутствуют.

4.3.1.1.3.2.	Просвечивающая	электронная	микроскопия

4.3.1.1.3.2.1.	Подлежащие	отбору	образцы
Живые	или недавно	погибшие	устрицы.

4.3.1.1.3.2.2. Техническая процедура

Кусочек ткани небольшого размера (1–2 мм) следует зафиксировать в 3% глутаральдегиде (в 0,22 мкм отфильтрованной морской воды [FSW]) в течение 1 часа, трижды промыть в отфильтрованной морской воде, зафиксировать в 1% осмиевой кислоте и дважды промыть снова в отфильтрованной морской воде. После обезвоживания в последовательной серии растворов этанола, и в двух сериях пропиленоксида, образцы постепенно пропитываются и погружаются в эпоксидную смолу. После полимеризации при 60° С блоки следует сначала нарезать на кусочки размером 0,5–1 мкм для контроля качества, а затем на кусочки размером 80–100 нм для исследования под электронным микроскопом. Ультратонкие срезы помещают на медные сетки и контрокрашивают с использованием уранилацетата и лимоннокислого свинца.

4.3.1.1.3.2.3.	Положительные	контроли

Нет.

4.3.1.1.3.2.4. Уровни валидации

4.3.1.1.3.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Более высокая специфичность по сравнению с отпечатками и гистологией. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) может помочь отличить *B. ostreae* от других близкородственных микроклеток, таких как *B. exitiosa*.

4.3.1.1.3.2.5. Интерпретация результатов

- Положительным результатом является наличие паразитов в гемоцитах. Сообщалось о различных стадиях развития паразита, включая одноядерные, диплокариотические и плазмодиальные стадии (Montes *с соавт.*, 1994; Pichot *с соавт.*, 1979). Внутриклеточные структуры включают митохондрии, гаплоспоросомы, комплекс Гольджи и устойчивые внутриядерные микротрубочки.
- Плотные формы *B. ostreae* являются более плотными и мелкими (средний диаметр $2,4 \pm 0,5$ мкм (количество паразитов = 64) по сравнению с *B. exitiosa* (средний диаметр $3 \pm 0,3$ мкм (количество паразитов = 61), и имеют меньше гаплоспоросом, митохондриальных профилей и липоидных телец на срез, предназначенный для изучения ультраструктуры, а также более крупные митохондрии с тубуло-везикулярными кристами, по сравнению с *B. exitiosa*. Кроме того, плотные формы *B. ostreae* не имеют ядерных мембраносвязанных комплексов Гольджи/ядерной чаши и вакуолизированной стадии (Hine *с соавт.*, 2001).

4.3.1.1.3.2.6. Наличие коммерческих тестов
Коммерческие тесты отсутствуют.

4.3.1.2. Выделение и идентификация агента

4.3.1.2.1. Культура клеток /искусственные среды
Отсутствуют.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

Был разработан иммунофлуоресцентный метод на основе моноклональных антител, который имел чувствительность, сходную с чувствительностью метода отпечатков тканей. Однако данный метод дал сомнительные результаты при обширном тестировании, которое проводилось на устрицах из штата Мэн, США (Carnegie & Cochenne-Lauriau, 2004). Несмотря на то, что прямой сэндвич-иммуноанализ с использованием моноклональных антител для обнаружения *B. ostreae* в образцах гемолимфы *O. edulis* был разработан (Cochenne *с соавт.*, 1992) и продавался на рынке в течение нескольких лет в середине 1990-х годов, в настоящее время он не продается. Специфичность и чувствительность данного метода по сравнению с гистологией составила 76,7% и 106%, соответственно (Cochenne *с соавт.*, 1992).

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

4.3.1.2.3.1.1.	Подлежащие	отбору	образцы
Живые	или	погибшие	устрицы.

4.3.1.2.3.1.2. Техническая процедура

Образцы ткани помещают в 95-100% этанол или замораживают до выделения ДНК. Выделение ДНК осуществляют путем расщепления протеиназой К в течение ночи при 50-55°C и при использовании фенольно-хлороформной экстракции с этаноловой преципитацией

(Carnegie *с соавт.*, 2000; Cochenne *с соавт.*, 2000) или метода спин-колонок с использованием коммерческих наборов (например, QIAGEN) (Carnegie *с соавт.*, 2000).

- Для обнаружения *Bonamia ostreae* были разработаны три протокола традиционной ПЦР с тремя разными парами праймеров, нацеленных на малую субъединицу (SSU) рДНК: Первая пара праймеров Bo-Boas (5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' и 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3' соответственно) амплифицирует продукт длиной 300 пар оснований (Cochenne *с соавт.*, 2000). Реакционные смеси для ПЦР содержат буфер (500 mM KCl, 100 mM Трис/HCl [pH 9,0 при 25°C] и 1% Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM смеси dNTP, 1 мкМ прямого и обратного праймера, 0,02 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы и 0,2 нг/мкл ДНК-матрицы в общем объеме 50 мкл. Образцы денатурируют в термоциклере в течение 5 минут при 94°C, после чего подвергают 30 циклам (94°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1 минуты, 72°C в течение 1 минуты), со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 10 минут.

Вторая пара праймеров C_F и C_R (5'-CGG-GGG-CAT-AAT-TCA-GGA-AC-3' и 5'-CCA-TCT-GCT-GGA-GAC-ACA-G-3' соответственно), амплифицирует продукт длиной 760 пар оснований (Carnegie *с соавт.*, 2000). Реакционные смеси для ПЦР содержат буфер (200 mM Трис/HCl [pH 8,4], 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM смеси dNTP, 0,05 мкМ прямого и обратного праймера, 0,05 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, и 1 нг/мкл ДНК-матрицы в общем объеме 50 мкл. Образцы подвергают 35 циклам (94°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1 минуты, 72°C в течение 1 минуты), со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 10 минут.

Третья пара праймеров BoosF03 и BoosR03 (3'-CAA-TGG-TGC-GTT-CAA-CGA-T-5' и 3'-GGG-TTC-GCG-GTT-GAA-TTT-TA-5' соответственно), амплифицирует продукт длиной 352 пар оснований (Engelsma *с соавт.*, 2010). Реакционные смеси для ПЦР содержат буфер (1×), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM каждой смеси dNTP, 0,4 мкМ каждого праймера, 2 ед. Taq ДНК-полимеразы в дистиллированной воде с 0,005% (об/об) Nonidet P-40 и 2 мкл ДНК-матрицы в общем объеме 50 мкл. Образцы денатурируют в термоциклере в течение 2 минут при 94°C, после чего подвергают 40 циклам (94°C в течение 30 секунд, 58°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 45 секунд), со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 7 минут.

- Также можно использовать два анализа ПЦР по технологии TaqMan:

ПЦР по технологии TaqMan с использованием праймеров и зонда, нацеленного на область ITS1 (внутренний транскрибируемый спейсер), позволяет обнаружить *Bonamia* spp. (Corbeil *с соавт.*, 2006a). Чувствительность достаточно высокая; данный анализ не амплифицировал

Haplosporidium nelsoni, *H. costale* или *Mikrocytos mackini*. Однако, он еще не был полностью валидирован.

Другой анализ ПЦР по технологии TaqMan с использованием праймеров и зонда, нацеленного на небольшую область (67 пар оснований) малой субъединицы (SSU) рДНК, также был разработан для обнаружения *B. ostreae* (Marty *с соавт.*, 2006). Праймеры и зонды были разработаны специально для *Bonamia* spp. и не амплифицируют другие *Haplosporidia*. Чувствительность и специфичность выше, чем при гистопатологии. Наконец, был разработан анализ ПЦР в реальном времени на основе SYBR® Green для обнаружения и подсчета *B. ostreae* (Robert *с соавт.*, 2009). Данный анализ нацелен на область длиной 201 пар оснований гена актина 1 паразита. Было продемонстрировано, что данный анализ нацелен только на *B. ostreae*, а не на близкородственных паразитов, включая *B. exitiosa*. Минимальный предел обнаружения оценивался как 50 копий гена, и анализ оказался как минимум в десять раз более чувствительным, чем традиционная ПЦР. Между полуколичественным определением паразита с использованием метода отпечатков сердца и ПЦР в реальном времени наблюдалась хорошая корреляция.

4.3.1.2.3.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительными контролями являются: 1) ПЦР со специфическими праймерами к геномной ДНК, полученной от хозяина с инфекцией высокой интенсивности, или ДНК из очищенного паразита; 2) неспецифическая амплификация (актин, SSU и др.). Отрицательные контроли: 3) отсутствие реакции на ДНК-мишень; 4) ПЦР со специфическими праймерами к геномной ДНК, полученной от неинфицированных хозяев. Положительные контроли предоставляются по запросу из Справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3.1.4.

Уровни

валидации

4.3.1.2.3.1.4.1. Специфичность и чувствительность

Исходя из сходства последовательности ДНК-мишени, первый традиционный анализ (Cochennec *с соавт.*, 2000) должен амплифицировать все микроклеточные гаплоспоридии, а второй (Carnegie *с соавт.*, 2000) должен, по крайней мере, амплифицировать *B. ostreae* и *B. exitiosa* (Carnegie и Cochennec-Laureau, 2004); третий, по-видимому, амплифицирует только *B. ostreae* (Engelsma *с соавт.*, 2010). Чувствительность данных анализов выше, чем у гистопатологических методов. Два анализа ПЦР по технологии TaqMan выявляют *Bonamia* spp., но не другие *Haplosporidia*. Анализ ПЦР в реальном времени на основе SYBR® Green выявляет только *B. ostreae*.

4.3.1.2.3.1.4.2. Золотой стандарт

Чувствительность и специфичность первого традиционного ПЦР-анализа (Cochennec *с соавт.*, 2000) были подсчитаны в сопоставлении с гистопатологическими методами (гистология и отпечатки жабр), и составили 92% и 87% соответственно. Чувствительность и специфичность гистопатологических методов (гистология и отпечатки жабр) были подсчитаны в сопоставлении с первым традиционным ПЦР-анализом (Cochennec *с соавт.*, 2000) и составили 66% и 97% соответственно (Balseiro *с соавт.*, 2006). Чувствительность и специфичность также оценивали для второго анализа ПЦР по технологии TaqMan, и первоначально они составили 88% и 99% соответственно.

Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄, pH 7,2) при температуре 37°C в течение 15 минут во втором протоколе.

- В первом протоколе предметные стекла обезвоживают в серии растворов этанола и высушивают на воздухе. Затем предметные стекла покрывают буфером для гибридизации (4 × SSC [стандартный цитратно-солевой буфер; 60 mM NaCl, 600 mM NaCl, pH 7], 50% формамид, 1 × раствор Денхардта, 250 мкг/мл дрожжевой tРНК, 10% декстрансульфат), который содержит 20 нг меченого дигоксигенином зонда. После денатурации при 95°C в течение 5 минут, проводят гибридизацию путем инкубирования предметных стекол во влажной камере при 42°C в течение ночи. Зонд получают с помощью ПЦР с использованием ранее описанной пары праймеров Во-Воас с включением дигоксигенина. ПЦР проводят способом, описанным в разделе, посвященном ПЦР, за исключением того, что в реакционную смесь добавляют 25 mM DIG dUTP. Этапы обнаружения выполняются в соответствии с инструкциями производителя.

- Во втором протоколе после обработки протеиназой К, предметные стекла промывают в нескольких растворах, включая фосфатно-солевой буферный раствор плюс 0,2% глицин, в течение 5 минут, проводят ацетилирование с использованием 5% безводной уксусной кислоты в 0,1 М триэтанолламин/HCl (pH 8) в течение 10 минут при комнатной температуре, снова промывают в фосфатно-солевом буферном растворе в течение 10 минут и, наконец, дают отстояться в 5 × SET (750 mM NaCl, 6,4 mM ЭДТА, 100 mM Трис-основание) в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем предметные стекла покрывают 200 мкл буфера предварительной гибридизации (5 × SET, 0,02% альбумин бычьей сыворотки, 0,025% додецилсульфат натрия [SDS]) в течение 30 минут при температуре 45°C. Буфер предварительной гибридизации заменяют на 10–12 мкл буфера предварительной гибридизации, содержащего 2–10 нг/мкл олигонуклеотидов, и предметные стекла инкубируют в течение ночи во влажной камере при температуре 45°C. Затем предметные стекла трижды промывают в 0,2 × SET в течение 5 минут при 42°C, высушивают на воздухе и заключают в среду перед исследованием с использованием эпифлуоресцентного микроскопа при увеличении ×600–1000. Зонды состоят из смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, специфичных для *B. ostreae*: UME-BO-1 (5'-CGA-GGC-AGG-GTT-TGT-3'); UME-BO-2 (5'-GGG-TCA-AAC-TCG-TTG-AAC-3') и UME-BO-3 (5'-CGC-TCT-TAT-CCA-CCT-AAT-3').

4.3.1.2.3.2.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительными контролями являются: 1) гибридизация *in situ* на инфицированном хозяине; 2) неспецифическая гибридизация *in situ* (SSU рДНК) на образцах. Отрицательные контроли: 3) отсутствие реакций зонда при гибридизации *in situ*; 4) гибридизация *in situ* на неинфицированных хозяевах. Положительные контроли предоставляются по запросу из Справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3.2.4.

Уровни

валидации

4.3.1.2.3.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Специфичность и чувствительность анализа выше, чем у гистологических методов. Однако зонд Во–Воас также способен выявлять *Haplosporidium nelsoni* у *Crassostrea virginica*, *B.*

exitiosa у *O. chilensis*, но не *Mikrocytos mackini* у *C. gigas* (Cochennec с соавт., 2000). Специфичность смеси олигонуклеотидов UME-BO-1, -2 и -3 была протестирована, и была продемонстрирована ее способность выявлять *H. nelsoni* (Carnegie с соавт., 2003), но гибридизация *in situ*, по-видимому, обнаруживает другие микробы, включая *B. exitiosa* (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004).

4.3.1.2.3.2.4.2. Золотой стандарт
Гибридизация *in situ* еще не была валидирована в сопоставлении с гистологией.

4.3.1.2.3.2.5. Интерпретация результатов

- Положительные результаты теста определяются как наличие меченых паразитов внутри гемоцитов, причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными. В первом описанном протоколе они выглядят как темные пятна, тогда как во втором протоколе они представляют собой мелкие зеленые кольца: флуоресценция зеленого цвета окружает неровный темный участок.
- У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. ostreae*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. ostreae* или *B. exitiosa*.
- У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. ostreae*, положительный результат свидетельствует о заражении видами *Bonamia*, что должно быть подтверждено Справочной лабораторией МЭБ.

4.3.1.2.3.2.6. Наличие коммерческих тестов

Набор для обнаружения нуклеиновых кислот DIG nucleic acid detection kit (Boehringer Mannheim).

4.3.1.2.3.3. Секвенирование

Секвенирование рекомендуется в качестве одного из финальных этапов для подтверждающей диагностики. Целевыми областями являются SSU рДНК и ITS1. Несмотря на то, что последовательности имеются в государственных банках генов, рекомендуется обращаться в соответствующую Справочную лабораторию МЭБ.

4.3.1.2.3.4. Выделение агента

Bonamia ostreae можно выделить из сильно инфицированных устриц (Mialhe с соавт., 1988). Все органы гомогенизируются, за исключением аддукторов, и паразитов концентрируют с использованием дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, а затем выделяют изопикническим центрифугированием в градиенте перколлы.

4.3.2. Серологические методы
Не применимо.

5. Категории тестов в зависимости от их назначения

В качестве примера, методы, имеющиеся в настоящее время для целевого надзора и диагностики инфекции *B. ostreae*, перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице: а = 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
Отпечатки тканей	d	d	a	a	a	c
Гистопатология	d	d	a	a	b	c
Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	d	d	d	d	d	a
ДНК зонды <i>in situ</i>	d	d	d	d	d	b
ПЦР и ПЦР по технологии TaqMan	a	a	a	a	a	c
ПЦР-ПДРФ	d	d	d	d	d	b
ПЦР в реальном времени на основе SYBR® Green	a	a	a	a	a	c
Секвенирование	d	d	d	d	d	a

ПЦР = полимеразная цепная реакция; ПДРФ = полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от инфекции *Bonamia ostreae*

Методами, предписанными для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от инфекции, как указано в *Кодексе по водным животным*, являются: отпечатки тканей (сердце или жабры), гистология или ПЦР в областях, зараженных только *B. ostreae*. Однако в областях, где *B. exitiosa* и *B. ostreae* являются симпатрическими, положительный результат по гистологии должен быть подтвержден молекулярным исследованием.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение случая подозрения на болезнь

Любой положительный результат, полученный при помощи любого метода диагностики, следует считать подозрительным.

7.2. Определение подтвержденного случая болезни

У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. ostreae*, подтвержденным случаем *B. ostreae* является положительный результат, полученный при использовании метода отпечатков тканей, гистологии или гибридизации

in situ в сочетании с положительным результатом, полученным с помощью ПЦР-ПДРФ и секвенирования, или ПЦР в реальном времени на основе SYBR® Green.

Для других видов хозяев или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. ostreae*, рекомендуется провести подтверждение при помощи просвечивающей электронной микроскопии. Однако этот метод подходит только для образцов, которые характеризуются высокой интенсивностью инфекции.

8. Список литературы

ARZUL I., GAGNAIRE B., BOND C., CHOLLET B., MORGA B., FERRAND S., ROBERT M. & RENAULT T. (2009). Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 67–75.

ARZUL I., LANGLADE A., CHOLLET B., ROBERT M., FERRAND S., OMNES E., LEROND S., COURALEAU Y., JOLY J.-P., FRANÇOIS C. & GARCIA C. (2011). Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Vet. Parasitol.*, **179** (1–3), 69–76.

ARZUL I., MIOSSEC L., BLANCHET E., GARCIA C., FRANÇOIS C. & JOLY J.-P. (2006). *Bonamia ostreae* and *Ostrea edulis*: a stable host-parasite system in France? Symposia proceedings, *ISVEE conference XI*, Cairns, Australia, 6– 11 August 2006, 5 pp.

AUDEMARD C., CARNEGIE R., STOKES N.A., BURRESON E. & BISHOP M. (2005). Salinity effects on the susceptibility to and persistence of *Bonamia ostreae* and *Bonamiasp.* in *Crassostrea ariakensis*. *J. Shellfish Res.*, **24**, 639.

BALSEIRO P., CONCHAS R.F., MONTES J., GOMEZ-LEON J., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2006). Comparison of diagnosis techniques for the protozoan parasite *Bonamia ostreae* in flat oyster *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, **261**, 1135–1143.

CARNEGIE R., BARBER B.J., CULLOTY S.C., FIGUERAS A.J. & DISTEL D.L. (2000). Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the *Haplosporidia*. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 199–206.

CARNEGIE R.B., BARBER B.J. & DISTEL D.L. (2003). Detection of the oyster parasite *Bonamia ostreae* by fluorescent *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 247–252.

CARNEGIE R.B. & COCHENNEC-LAUREAU N. (2004). Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 519–528.

CARNEGIE R.B., BURRESON E.M., HINE P.M., STOKES N.A., AUDEMARD C., BISHOP M.J. & PETERSON C.H. (2006). *Bonamia perspora* n. sp. (*Haplosporidia*), a parasite of the oyster *Ostreaola equestris*, is the first *Bonamia* species known to produce spores. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **53**, 232–245.

COCHENNEC N., HERVIO D., PANATIER B., BOULO V., MIALHE E., ROGIER H., GRIZEL

H. & PAOLUCCI F. (1992). A direct monoclonal antibody sandwich immunoassay for detection of *Bonamia ostreae* (*Ascetosporea*) in hemolymph samples of the flat oyster *Ostrea edulis* (*Mollusca: Bivalvia*). *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 129–134.

COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F. & GERARD A. (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.*, **76**, 26–32.
COCHENNEC N., REECE K.S., BERTHE F.C.J. & HINE P.M. (2003). Revisiting *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation points to the genus *Bonamia* (*Haplosporidia*). *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 209–217.

COMPS M., TIGÉ G. & GRIZEL H. (1980). COMPS M., TIGÉ G. & GRIZEL H. (1980). Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* L. *C. R. Hebd. Acad. Sc. Paris (Sér. D)*, **290**, 383–385.

CONCHAS R.F., SANTAMARINA J., LAMA A., LONGA M.A. & MONTES J. (2003). Evolution of bonamiosis in Galicia (NW Spain). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **23**, 265–272.

CORBEIL S., ARZUL I., DIGGLES B., HEASMAN M., CHOLLET B., BERTHE F.C. & CRANE M.S. (2006). Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Bonamia* species. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 75–80.

CULLOTY S.C. & MULCAHY M.F. (1996). Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiosis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture*, **144**, 53–63.

CULLOTY S.C., NOVOA B., PERNAS M., LONGSHAW M., MULCAHY M.F., FEIST S.W. & FIGUERAS A. (1999). Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 73–80.

DA SILVA P.M. & VILLALBA A. (2004). Comparison of light microscopic techniques for the diagnosis of the infection of the European flat oyster *Ostrea edulis* by the protozoan *Bonamia ostreae*. *J. Invertebr. Pathol.*, **85**, 97–104.

ENGELSMA M.Y., KERKHOFF S., ROOZENBURG I., HAENEN O.L.M., VAN GOOL A., SISTERMANS W., WIJNHOFEN S. & HUMMEL H. (2010). Epidemiology of *Bonamia ostreae* infecting European flat oyster *Ostrea edulis* from Lake Grevelingen, The Netherlands. *Marine Ecology Progress Series*, **409**, 131–142.

GRIZEL H. (1985). Etudes des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* L. et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques de Languedoc, Montpellier, France

HERVIO D., BACHERE E., BOULO V., COCHENNEC N., VUILLEMIN V., LE COGUIC Y., CAILLETAUX G., MAZURIE J. & MIALHE E. (1995). Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster *Ostrea edulis* with the intraheamocytic protozoan parasite

Bonamia ostreae: application in the selection of parasite-resistant oyster. *Aquaculture*, **132**, 183–194.

HINE P.M., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J. (2001). *Bonamia exitiosus* n. sp. (*Haplosporidia*) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi) in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 63–72.

LOPEZ-FLORES I., SUAREZ-SANTIAGO V.N., LONGET D., SAULNIER D., CHOLLET B. & ARZUL I. (2007). Characterization of acting genes in *Bonamia ostreae* and their application to phylogeny of the *Haplosporidia*. *Parasitology*, **134**, 1941–1948.

LYNCH S.A., ARMITAGE D.V., COUGHLAN J., MULCAHY M.F. & CULLOTY S.C. (2006). Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplakton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. *Exp. Parasitol.*, **115** (4), 359–368.

LYNCH S.A., ARMITAGE D.V., WYLDE S., MULCAHY M.F. & CULLOTY S.C. (2005). The susceptibility of young prespawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. *J. Shellfish Res.*, **24**, 1019–1025.

LYNCH S.A., ABOLLO E., RAMILLO A., CAO A., CULLOTY S.C. & VILLALBA A. (2010). Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitol.*, **137**, 1515–1526.

MARTY G., BOWER S., CLARKE K., MEYER G., LOWE G., OSBORN A., CHOW E., HANNAH H., BYRNE S., SOJONKY K. & ROBINSON J. (2006). Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. *Aquaculture*, **261**, 33–42.

MIALHE E., BOULO V., ELSTON R., HILL B., HINE M., MONTES J., VAN BANNING P. & GRIZEL H. (1988). Serological analysis *Bonamia* in *Ostrea edulis* and *Tiostrea lutaria* using polyclonal and monoclonal antibodies. *Aquat. Living Resour.*, **1**, 67–69.

MONTES J., ANADON R. & AZEVEDO C. (1994). A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *J. Invertebr. Pathol.*, **63**, 1–6.

NACIRI-GRAVEN Y., MARTIN A.G., BAUD J.P., RENAULT T. & GERARD A. (1998). Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **224**, 91–107.

PICHOT Y., COMPS M., TIGE G., GRIZEL H. & RABOUIN M.A. (1979). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **43**, 131–140.

ROBERT M., GARCIA C., CHOLLET B., LOPEZ-FLORES I., FERRAND S., FRANÇOIS C., JOLY J.-P. & ARZUL I. (2009). Molecular detection and quantification of the protozoan *Bonamia ostreae* in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Molecular Cellular Probes*, **23**, 264–271.

VAN BANNING P. (1990). The life cycle of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* with a presumptive phase in the ovarian tissue of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, **84**, 189–192.

*

* *

NB: Имеется Референтная лаборатория МЭБ по инфекции *Bonamia ostreae* (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 инфекции *Bonamia ostreae* свяжитесь со Референтными лабораториями МЭБ.

ИНФЕКЦИЯ *MARTEILIA REFRINGENS*

1. Предмет рассмотрения⁶¹

Marteilia refringens – это простейший паразит типа Cercozoa класса Paramyxida (Cavalier-Smith & Chao, 2003; Feist с соавт., 2009), инфицирующий пищеварительную систему разных видов двусторчатых и вызывающий физиологические нарушения, а в некоторых случаях смерть животного (Alderman, 1979; Grizel с соавт., 1974). В целях настоящей главы, инфекция *Marteilia refringens* означает инфекцию *M. refringens*, согласно определению López-Flores с соавт., 2004, включая виды М и О согласно определению Le Roux с соавт., 2001. Эта дефиниция исключает инфекции *M. sydneyi* (Perkins & Wolf, 1976), *M. lenghei* (Comps, 1976) и *M. christenseni* (Comps, 1983). *Marteilia* spp., которые не определены на уровне видов (Berthe с соавт., 2004; Moyer с соавт., 1993; Norton с соавт., 1993), должны сообщаться в Референтную лабораторию МЭБ.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Marteilia refringens (Grizel с соавт., 1974) двух типов, типа О и М, была определена Le Roux с соавт., 2001.

2.1.2. Выживаемость за пределами хозяина

В зависимости от условий окружающей среды, *M. refringens* может выживать от нескольких дней до 2-3 недель за пределами хозяина (Grizel, 1985).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Нет информации.

2.1.4. Жизненный цикл

Предполагается, что жизненный цикл *M. refringens* непрямой и может включать *Paracartia grani* (Audemard с соавт., 2001; Audemard с соавт., 2002), по крайней мере в прудовых системах. У других видов, включая иные виды *Acartia* spp., циклопов *Oithona* sp. и неопределенные виды гарпактикоидов, паразит определялся с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в природном устье Дельта дель Эбро (Испания), но их роль в жизненном цикле не была продемонстрирована (Carrasco с соавт., 2007).

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяина

⁶¹ NB: Версия, принятая Мировой Ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2012 г.

Устрицы видов: *Ostrea edulis* (Grizel с соавт., 1974); мидии видов: *Mytilus* sp., включая *M. edulis* (Le Roux с соавт., 2001) и *M. galloprovincialis* (López-Flores с соавт., 2004; Novoa с соавт., 2005; Robledo с соавт., 1995a; Villalba с соавт., 1993b).

Инфекция *M. refringens* наблюдалась у устриц *Ostrea stentina*, у двустворчатых моллюсков видов *Solen marginatus* (López-Flores с соавт., 2008a) и *Chamelea gallina* (López-Flores с соавт., 2008b), а также мидии *Xenostrobus securis* (Pascual с соавт., 2010).

Другие виды *Ostrea*, включая *O. chilensis*, *O. puelchana*, *O. angasi*, и *O. denselamellosa*, оказались заражены *Marteilia* sp. при размещении в зараженном районе (Berthe с соавт., 2004; Martin, 1993). Однако в этих случаях, идентификация паразита не была проведена на молекулярном уровне.

В дополнение к этому, различные стадии, включая зрелую стадию паразитов, напоминающих *M. refringens*, наблюдались при гистологии съедобных сердцевидок (*Cerastoderma edule*), съедобных моллюсков (видов *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Tapes rhomboides*, *T. pullastra*, *Ensis minor*, *E. siliqua*) и устриц (*Crassostrea virginica*) среди других двустворчатых видов (Berthe с соавт., 2004; López-Flores с соавт., 2008b). Во всех этих случаях, идентификация паразитов является неточной.

И, наконец, копепод *Paracartia grani* оказался восприимчивым к *M. refringens* и эти виды могли участвовать в передаче паразитов между двустворчатыми (см. 2.3.1).

2.2.2. Восприимчивые стадии хозяина

Известно о восприимчивости молодых особей и особей, находящихся на более позднем этапе развития (Grizel, 1985).

2.2.3. Предрасположенность видов и субпопуляций (вероятность обнаружения)

Marteilia refringens обычно вызывает клиническую инфекцию у *O. edulis* (Grizel с соавт., 1974) и *Ostrea* spp. (Berthe с соавт., 2004; Grizel, 1985). У плоских устриц и мидий превалентность и интенсивность инфекции обычно выше у отдельных особей в возрасте двух лет или старше (Audemard с соавт., 2001; Villalba с соавт., 1993b).

2.2.4. Органы-мишени и зараженная ткань

Marteilia refringens инфицирует пищеварительный тракт. Молодые плазмиды обнаруживаются главным образом в эпителии нижнегубных щупалец и в желудке (Grizel с соавт., 1974). Спорообразование происходит в канальцах и протоках пищеварительных желез. Пропагулы высвобождаются в проток пищеварительного тракта и выделяются в среду через фекалии (Audemard с соавт., 2002; Berthe с соавт., 2004).

2.2.5. Персистирующая инфекция с пожизненными носителями

Инфекция *M. refringens* представляет собой смертельную болезнь устриц (Alderman, 1979; Audemard с соавт., 2002; Grizel с соавт., 1974). Смерть возникает

в течение второго года после первичной инфекции (Alderman, 1979; Grizel, 1985), таким образом, инфекция может персистировать более одного года и может быть пожизненной. Мидии обычно не подвергаются негативному воздействию *M. refringens* (Berthe с соавт., 2004), но о том, возникает ли спорообразование *M. refringens*, и могут ли мидии быть переносчиками *M. refringens*, неизвестно (Berthe с соавт., 2004; Le Roux с соавт., 2001).

2.2.6. Векторы

Некоторые виды зоопланктона, включая копепойдные виды (*Acartia discaudata*, *A. clausi*, *A. italica*, *Othoina* sp., *Euterpina acutifrons*) и личиночные стадии зооэа короткохвостых десятиногих ракообразных, а также неплактонных видов, таких как *Lineus gisserensis* (Nematoda) и *Cereus pendunculatus* (Cnidaria) были выявлены с помощью ПЦР и могут выступать в роли векторов для паразита (Audemard с соавт., 2002; Carrasco с соавт., 2007).

2.2.7. Известные или предполагаемые переносчики среди диких водных животных

Дикие популяции плоских устриц, *O. edulis*, мидии, *Mytilus edulis* и *M. galloprovincialis* заражаются *M. refringens* и могут не демонстрировать клинических признаков или смертности.

Marteilia refringens отмечалась у диких *Solen marginatus* (López-Flores с соавт., 2008a), *Chamelea gallina* (López-Flores с соавт., 2008b), *Xenostrobus securis* (Pascual с соавт., 2010) и *Ostrea stentina* без четкого влияния паразита на эти виды хозяина.

Другие двустворчатые виды были перечислены в качестве потенциально восприимчивых к *M. refringens* и, таким образом, могут выступать в роли переносчиков.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача *M. refringens* вероятно происходит через промежуточного хозяина (Audemard с соавт., 2002; Carrasco с соавт., 2008b). Паразит может передаваться экспериментальным путем от *O. edulis* и *M. galloprovincialis* копеподу *Paracartia grani* (Audemard с соавт., 2002; Carrasco с соавт., 2008b). Передача от *P. grani* к *O. edulis* или *M. galloprovincialis* не демонстрировалась экспериментально (Audemard с соавт., 2002; Carrasco с соавт., 2008b). У устриц ранние стадии болезни возникают в желудке, щупальцах и даже жаберном эпителии. Существует мнение, что первичная инфекция возникает через кормовые потоки. У мидий ранние стадии наблюдались в эпителии жабр, мантии, желудке и первичных пищеварительных канальцах (Carrasco с соавт., 2008a).

2.3.2. Превалентность

Превалентность крайне изменчива – до 98% у *O. edulis*. Более высокая превалентность ожидается в зависимости от практики разведения и в районах,

которые подвергались воздействию инфекции более 1 года (Berthe с соавт., 2004; Grizel, 1985).

2.3.3. Географическое распределение

Отмечается в Албании, Хорватии, Франции, Греции, Италии, Марокко, Португалии, Испании, Швеции, Тунисе и Соединенном Королевстве.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Инфекция является смертельной для устриц: уровень смертности составляет 50-90%, обычно отмечается летом и осенью и ассоциируется со спорообразованием паразита (Grizel, 1985; Grizel с соавт., 1974). Аналогичным образом, заболеваемость выше в более теплые периоды. Мидии менее подвержены инфекции, но в зонах, подвергнутых воздействию, отмечалась смертность до 40% (Berthe с соавт., 2004; Villalba с соавт., 1993b), интактные мидии демонстрировали 100% смертность после культивирования в течение 6 месяцев в зараженном районе (Thébault с соавт., 1999).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Пороговой температурой для спорообразования и передачи паразитов является 17°C. Эта температура типична для устьев рек или заливов, где превалентность обычно выше в верхних слоях воды (Audemard с соавт., 2001; Berthe с соавт., 2004; Carrasco с соавт., 2007; Grizel, 1985). Инфекция *M. refringens* редко наблюдается в открытых морских водах (Grizel, 1985). Высокое содержание солей и обновление воды могут пагубно сказываться на развитии и передаче *M. refringens*, хотя эти параметры оказываются менее важными по сравнению с температурой (Audemard с соавт., 2001).

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Отсутствует.

2.4.2. Химиотерапия

Отсутствует.

2.4.3.

Иммуностимуляция

Отсутствует.

2.4.4. Резистентное разведение

Отсутствует.

2.4.5. Возобновление поголовья резистентными видами

Попытки предпринимались в Европе с различными видами рода *Ostrea*, но все они демонстрировали чувствительность (Grizel, 1985). Нативные поголовья *Ostrea edulis* и *Mytilus edulis* являются высоко восприимчивы к инфекции. Несмотря на то, что некоторые первичные стадии *M. refringens* наблюдались у *Crassostrea gigas* (Berthe с соавт., 2004), эти виды оказываются резистентны к инфицированию таким паразитом.

2.4.6. Блокирующие агенты

Отсутствуют.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Нет данных.

2.4.8. Общие практики животноводства

Заселение при низкой плотности или в сочетании с резистентными видами моллюсков, такими как *Crassostrea gigas*, оказалось эффективным (Grizel, 1985).

3. Отбор образцов

3.1. Отбор индивидуальных образцов

Образцы от особей с раскрывающимися створками или недавно умерших особей (2 или более лет) должны отбираться по приоритету для того, чтобы увеличить шансы обнаружения зараженных устриц. Для гистологии образцы должны отбираться исключительно от живых (включая умирающих) устриц или мидий.

Отбор образцов от плоских устриц и мидий должен проводиться раз в год, когда известно, что превалентность будет максимальной. Если такая информация недоступна в конкретной экосистеме, предпочтительно осуществлять отбор образцов, когда температура достигает годового максимума (Audemard с соавт., 2001; Carrasco с соавт., 2007).

3.2. Сохранение образцов для представления

Для гистологии лучшим консервантом является фиксатор Дэвидсона (AFA), но 10% забуференный формалин или другие стандартные гистологические фиксаторы также допустимы. Для анализов полимеразной цепной реакции (ПЦР) образцы должны консервироваться в 95-100% этаноле или неденатурированном спирте.

3.3. Объединение образцов

Объединение образцов может иметь значение, но его влияние на рабочие характеристики диагностического инструмента не были оценены.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Для диагностики *M. refringens* при помощи гистологии используется срез ткани толщиной 3-5 мм, включающий жабры и пищеварительную массу. Для отдельных тестов, в том числе для отпечатков и ПЦР, фрагмент пищеварительной железы является наиболее предпочтительным.

3.5. Неподходящие образцы/ткани

Все ткани за исключением жабр и пищеварительной массы являются неподходящими.

4. Диагностические методы

4.1. Полевые диагностические методы

4.1.1. Клинические признаки

Клинические признаки включают мертвых или с раскрывающимися створками моллюсков, поскольку слабые животные особенно восприимчивы к любому дополнительному стрессу (Grizel, 1985; Grizel с соавт., 1974). Эти клинические признаки неспецифичны инфекции *M. refringens* и могут указывать на другие инфекции.

4.1.2. Изменения в поведении

Раскрытие створок.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

Бледная пищеварительная железа, тонкое водянистое мясо, втянутость мантии и сниженный уровень роста отмечались у инфицированных устриц (Berthe с соавт., 2004; Grizel, 1985; Grizel с соавт., 1974), несмотря на то, что эти макроскопические признаки неспецифичны для инфекции *M. refringens*. У зараженных мидий наблюдается сниженный уровень роста и угнетение гонадного развития (Villalba с соавт., 1993а).

4.2.2. Клиническая химия

Отсутствует.

4.2.3. Микроскопическая патология

Пищеварительная железа, в которой возникает *M. refringens* и другие виды *Marteilia*, является местом внутриклеточного пищеварения и одним из основных участков для хранения метаболических резервов (Berthe с соавт., 2004). При тяжелых инфекциях, *M. refringens* значительно снижает абсорбцию органического вещества (Robledo с соавт., 1995b). Тяжелые инфекции могут также вызывать ухудшение состояния, как следствие сниженного поглощения энергии. Кроме того, паразит может напрямую влиять на кормление хозяина и абсорбцию просто за счет его присутствия. Развитие адипогранулярных запасующих клеток в мантии *Mytilus galloprovincialis* было ингибировано в присутствии *M. refringens* (Villalba с соавт., 1993b). Вероятно, *M. refringens* также препятствует накоплению гликогена в *O. edulis* (Robert с соавт., 1991).

Marteilia sydneyi незначительно отличается от *M. refringens*. В световой и трансмиссионной электронной микроскопии критерии признания основаны на присутствии или отсутствии полосатых включений в споровых зачатках и концентрических мембранах, окружающих зрелые споры, количестве спорангиальных зачатков в плазмодии и количестве спор в спорангии.

4.2.4. Влажные препараты

При развившейся инфекции зрелые спорангии с преломными гранулами могут наблюдаться во влажных препаратах, полученных от устриц/мидий с

раскрывающимися створками или недавно умерших устриц/мидий или фекалий живых устриц/мидий.

4.2.5. Мазки

При развившейся инфекции паразиты размером до 30-40 мкм могут наблюдаться в отпечатках пищеварительной железы от устриц/мидий с раскрывающимися створками или недавно умерших устриц/мидий.

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

При развившейся инфекции могут наблюдаться различные стадии паразитов в эпителии пищеварительного тракта.

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

Влажные препараты готовят при развившейся инфекции.

4.3.1.1.1.1. Образцы для отбора

Устрицы/мидии с раскрывающимися створками или недавно умершие устрицы/мидии или фекалии живых устриц/мидий.

4.3.1.1.1.2. Техническая процедура

Нанесите фрагмент пищеварительной железы или фекалий на предметное стекло. Наблюдения проводятся при 400-кратном увеличении и теоретически могут демонстрировать преломные гранулы в зрелых спорангиях.

4.3.1.1.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Отсутствуют.

4.3.1.1.1.4. Уровни валидации

4.3.1.1.1.4.1. Специфичность и чувствительность

Неизвестна, но предположительно низкая.

4.3.1.1.1.4.2. Золотой стандарт

Не валидирован в отношении гистологии.

4.3.1.1.1.5. Интерпретация результатов

- Положительный результат означает присутствие крупных (20-30 мкм) сферических тел, содержащих толстостенные структуры.

- У восприимчивых видов в рамках известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат указывает на инфекцию *M. refringens*.
- У других видов за пределами известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат указывает на инфекцию *Marteilia* sp., которая должна быть подтверждена Референтной лабораторией МЭБ.

4.3.1.1.1.6. Доступность коммерческих тестов

Нет коммерчески доступных наборов.

4.3.1.1.2. Отпечатки

При развившейся инфекции подготавливают отпечатки пищеварительной железы.

4.3.1.1.2.1. Образцы для отбора

Устрицы/мидии с раскрывающимися створками или недавно умершие устрицы/мидии.

4.3.1.1.2.2. Техническая процедура

После высушивания тканей на абсорбирующей бумаге делают несколько отпечатков на предметном стекле. Стекла высушивают на воздухе, фиксируют в метаноле или абсолютном этаноле и окрашивают при помощи коммерчески доступного набора для окраски мазков крови, в соответствии с инструкциями производителя. После промывки в проточной воде и высушивания, на стекла устанавливается покровное стекло с помощью соответствующей синтетической смолы. Сначала стекла рассматривают при 200-кратном увеличении, а затем во время масляной иммерсии при 1000-кратном увеличении.

4.3.1.1.2.3.

Положительные/отрицательные контроли

Рекомендуются и доступны по запросу в Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.1.2.4. Уровни валидации

4.3.1.1.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Неизвестна. Инфекция может быть фокальной, а также в виду того, что инфекция нацелена на различные ткани на ранних или поздних этапах, отпечатки могут пропускать ранние и вялотекущие уровни инфекции.

4.3.1.1.2.4.2. Золотой стандарт

Не валидирован в отношении гистологии.

4.3.1.1.2.5. Интерпретация результатов

- Положительный результат — это наблюдение клеток, варьирующих в размере до 30-40 мкм. Цитоплазма окрашивается базофильно, тогда как ядро имеет эозинофильную окраску. Наблюдаются бледные ореолы вокруг крупных, сильно окрашенных (преломных) гранул и у более крупных клеток - клетка внутри группы клеток (Berthe с соавт., 2000; Berthe с соавт., 2004; Grizel с соавт., 1974).
- У восприимчивых видов в пределах известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат точно указывает на инфекцию *M. refringens*.
- У других видов или за пределами известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат указывает на инфекцию *Marteilia* spp., которая должна подтверждаться Референтной лабораторией МЭБ.

4.3.1.1.2.6. Доступность коммерческих тестов

Коммерчески доступные наборы для быстрого окрашивания включают Difquick®/ Nemascolor®.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

4.3.1.1.3.1. Гистология

4.3.1.1.3.1.1. Образцы для отбора

Живые устрицы/мидии.

4.3.1.1.3.1.2. Техническая процедура

Срезы ткани, которые включают жабры, пищеварительную железу, мантию и гонаду, должны фиксироваться в течение 24 часов в фиксаторе Дэвидсона, с последующей нормальной подготовкой для парафиновой гистологии и окрашивания, например, гематоксилином и эозином. Наблюдения проводятся при повышенном увеличении до $\times 1000$.

4.3.1.1.3.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Рекомендованы и доступны по запросу в Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.1.3.1.4. Уровни валидации

4.3.1.1.3.1.4.1. Специфичность и чувствительность

Значения чувствительности и специфичности для гистологии оценивались на 70% и 99%, соответственно (Thébault с соавт., 2005).

4.3.1.1.3.1.4.2. Золотой стандарт

Гистология является золотым стандартом и *in situ* гибридизация валидируется совместно с гистологией.

4.3.1.1.3.1.5. Интерпретация результатов

- Положительный результат – наблюдение клеток, варьирующих в размере от 4 до 40 мкм. Молодые плазмиды (однойдерные) обнаруживаются главным образом в эпителии нижнегубных щупалец и желудка. Образование спор подразумевает клеточные деления внутри клеток и происходит в канальцах и протоках пищеварительной железы. Преломные гранулы возникают в процессе образования спор, но не наблюдаются на ранних стадиях. На поздних стадиях инфекции, спорангии свободно наблюдаются в полости пищеварительной железы. Цитоплазма окрашивается базофильно, тогда как ядро имеет эозинофильную окраску. Гранулы могут варьировать от темно-красного до темно-оранжевого цвета.
- *Marteilia refringens* незначительно отличается от *M. sydneyi*. Критерии признания основаны на отсутствии полосатых включений в зачатках споронта *M. sydneyi*, формировании 8-16 споровых зачатков в каждом плазмидии вместо 8 для *M. refringens*, появлении двух спор в каждом спорангии в отличие от 4 у *M. refringens*, и присутствии толстого слоя концентрических мембран, окружающих зрелые споры *M. sydneyi*.
- У восприимчивых видов в пределах известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительные результаты позволяют сделать вывод об инфекции *M. refringens*.
- У других видов или за пределами известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат, особенно с наблюдаемыми преломными гранулами, свидетельствует об инфекции *Marteilia* spp., которая требует подтверждения от Референтной лаборатории МЭБ

4.3.1.1.3.1.6. Доступность коммерческих тестов

Нет коммерчески доступных наборов.

4.3.1.1.3.2. Трансмиссионная электронная микроскопия

4.3.1.1.3.2.1. Техническая процедура

Кусок ткани небольшого размера (1–2 мм) фиксируют в 3% глутаральдегиде (в 0,22 мкм фильтрованной морской воды [FSW]) в течение одного часа, промывают трижды в FSW, фиксируют в 1% осмиевой кислоте и промывают дважды еще раз в FSW. После дегидратации в последовательных ванночках с этанолом, и двух ванночках с пропиленоксидом, образцы постепенно пропитывают и погружают в Эпон. После полимеризации при 60°C сначала отрезают блоки по 0,5–1 мкм для контроля качества, а затем по 80-100 нм для изучения под электронным микроскопом. Ультратонкие срезы помещают на медные сетки и подвергают контр-окрашиванию с помощью уранилацетата и лимоннокислого свинца.

4.3.1.1.3.2.2. Положительные контроли

Отсутствуют.

4.3.1.1.3.2.3. Уровни валидации

4.3.1.1.3.2.3.1. Специфичность и чувствительность

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) аналогично гистологии позволяет дифференцировать *Marteilia refringens* и *M. sydneyi*. Критерии признания такие же, как те, что представлены в разделе 4.3.1.1.3.1. Гистология.

4.3.1.1.3.2.4. Интерпретация результатов

- Положительный результат означает присутствие паразитов в эпителии пищеварительной железы или желудка. Могут наблюдаться различные стадии паразита (Longshaw с соавт., 2001). Первичная клетка представляет единичную вторичную клетку внутри себя. Вторичные клетки происходят из серий делений и включают восемь преспорангиев. Третичные клетки включают эти 8 преспорангиев, которые разделились, содержащих четырехспоровые примордии (зачатки). Споровые зачатки отщепляются внутри, чтобы продуцировать зрелые споры. Зрелые споры состоят из трех спороплазм, одна внутри другой; наиболее удаленные от середины содержат гаплоспоросомы.

4.3.1.1.3.2.5. Доступность коммерческих тестов

Нет коммерчески доступных тестов.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные среды

Недоступно.

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе антител

Недоступны или не используются в настоящее время в диагностических целях, но моноклональные антитела были разработаны и опубликованы (Berthe с соавт., 2004). Эти антитела не дают кросс-реакции в отношении *M. sydneyi*.

4.3.1.2.3. Молекулярные технологии

4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Протоколы ПЦР разработаны и опубликованы (Berthe с соавт., 2000; Le Roux с соавт., 1999; Le Roux с соавт., 2001; López-Flores с соавт., 2004).

Рекомендуются праймеры ПЦР, которые нацелены на регион ITS1 (внутренний транскрибируемый спейсер) (Le Roux с соавт., 2001), поскольку они могут амплифицировать исключительно *M. refringens*. Однако некоторые праймеры, направленные на малую субъединицу (SSU) рРНК комплекса генов, также доступны и позволяют проводить амплификацию *M. refringens* и *M. sydneyi*.

(Grizel с соавт., 1974; Le Roux с соавт., 1999). В дополнение к этому, «гнездовая» ПЦР была разработана с использованием праймеров, нацеленных на межгенный спейсер рДНК (López-Flores с соавт., 2004). Исследование проводилось только с *M. refringens*. Этот анализ продемонстрировал большую чувствительность, чем анализ ПЦР ITS1, но он должен быть исследован более тщательно на специфичность.

4.3.1.2.3.1.1. Образцы для отбора

Живые или недавно умершие устрицы/мидии.

4.3.1.2.3.1.2. Техническая процедура

Образцы ткани помещают в 95–100% этанол или замораживают до выделения ДНК. Выделение ДНК сопровождается разрушением протеиназы К в течение ночи при 50–55°C, и выделении фенол-хлороформа с этаноловой преципитацией или методикой центрифужной колонки с использованием коммерчески доступных наборов (например, Qiagen). ПЦР проводится при объеме 50 мкл. ПЦР смеси содержат буфер (500 мМ KCl, 100 мМ Трис/HCl [pH 9,0 при 25°C] и 1% Triton® X-100), 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ смеси дНТФ, 1 мкМ прямого и обратного праймеров, 0,02 ед. мкл⁻¹ ДНК-полимеразы Taq, и 10–100 нг выделенной ДНК. После денатурации ДНК при 94°C в течение 5 минут проводят 30 циклов по следующей схеме: денатурация при 94°C в течение 1 минуты, отжиг при 55°C в течение 1 минуты и элонгация при 72°C в течение 1 минуты на т.п.о. Проводится финальный этап элонгации в течении 10 минут при 72°C. Для обнаружения *M. refringens*, проводят ПЦР с праймерами, которые нацелены на регион ITS1 (5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3' и 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3') (Le Roux с соавт., 2001).

4.3.1.2.3.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны. Положительные контроли 1) ПЦР со специфичными праймерами для геномной ДНК от высокоинфицированного хозяина или ДНК от очищенных паразитов; 2) неспецифичная амплификация (актин, SSU, и т.п.). Отрицательные контроли: 3) отсутствуют реакции целевой ДНК; 4) ПЦР со специфичными праймерами на геномной ДНК от неинфицированных хозяев. Положительные контроли доступны по запросу в Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3.1.4. Уровни валидации

4.3.1.2.3.1.4.1. Специфичность и чувствительность

Неизвестные значения. Кросс-реакции с исследуемыми образцами не возникало и специфичность расценивается, как очень высокая (Kleeman с соавт., 2002; Le Roux с соавт., 1999). Ожидается, что эта ПЦР технология будет обнаруживать *M. refringens*. Поскольку инфекция может быть фокальной, а также из-за того, что инфекция затрагивает различные ткани

на ранних и поздних этапах, чувствительность обнаружения ПЦР может быть ниже, чем ожидалось при теоретическом исполнении ПЦР.

4.3.1.2.3.1.4.2. Золотой стандарт

Отсутствует валидация в отношении гистологии.

4.3.1.2.3.1.5. Интерпретация результатов

- Положительный результат это положительная ПЦР-амплификация при ожидаемом размере, с отрицательными показателями всех отрицательных контролей и положительными показателями всех положительных контролей.
- У восприимчивых видов в пределах известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат ПЦР, ассоциированный с положительным результатом, полученным посредством гистологии или отпечатков, подтверждает инфекцию *M. refringens*.
- У других видов или за пределами известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат ПЦР, ассоциированный с положительным результатом, полученным путем гистологии или отпечатков, является весьма показательным для инфекции *M. refringens*, но необходимо секвенирование продукта ПЦР перед постановкой подтверждающего диагноза.

4.3.1.2.3.1.6. Доступность коммерческих тестов

Нет коммерчески доступных наборов.

4.3.1.2.3.2. In-situ гибридизация (ISH)

Протоколы ISH были разработаны и опубликованы (Berthe с соавт., 2000; Le Roux с соавт., 1999).

Рекомендуется использование зонда, который нацелен на SSU генного комплекса рРНК, поскольку он был валидирован в отношении гистологии (Le Roux с соавт., 1999; Thébault с соавт., 2005). Однако этот зонд продемонстрировал кросс-реакцию с *Marteilia sydneyi* и *Marteilioïdes chungmuensis* (Kleeman с соавт., 2002). В дополнение к этому, анализ ISH был разработан с использованием зонда, направленного на межгенный трейсер рДНК (López-Flores с соавт., 2008a; López-Flores с соавт., 2008b). Этот анализ продемонстрировал большую специфичность, чем анализ ISH SSU, но требует тщательной валидации.

4.3.1.2.3.2.1. Образцы для отбора

Живые мидии/устрицы или мидии/устрицы с раскрывающимися створками.

4.3.1.2.3.2.2. Техническая процедура

Для проведения ISH моллюсков фиксируют в фиксаторе примерно на 24 часа, а затем помещают в парафин. Делают срезы по 5 мкм и помещают на стекла, покрытые аминоалкилсилианом, которые затем подвергают термообработке в печи в течение ночи при 40°C. Срезы депарафинизируют путем погружения в ксилен или эквивалентное вещество на 10 минут. Этот этап повторяют один раз и затем растворитель устраняется путем последовательного погружения в две ванночки с абсолютным спиртом, по 10 минут каждая. Затем срезы регидрируют путем погружения в серии этанола. Эти срезы обрабатывают протеиназой К (100 мкг мл⁻¹) в ТЭ буфере (Трис [50 мМ], ЭДТА [10 мМ]), при 37°C в течение 30 минут. Стекла дегидрируют путем погружения в серии этанола и затем высушивают. Срезы инкубируют с 100 мкл гибридизационного буфера (4 × SSC [стандартный цитратно-солевой буфер], 50% формамид, 1 × раствор Денхардта, 250 мкг мл⁻¹ тРНК дрожжей, 10% декстрансульфат), содержащим 10 нг (1 мкл ПЦР реакции, приготовленной согласно описанию выше с использованием праймеров CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG и TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) диоксигенин-меченного зонда (Le Roux с соавт., 1999). Срезы покрывают пластиковыми покрывными стеклами *in-situ* и помещают в термостат при 95°C на 5 минут. Затем предметные стекла охлаждают на льду 1 минуту перед проведением гибридизации в течение ночи при 42°C в камере влажности. Далее срезы дважды промывают в течение 5 минут в 2 × SSC при комнатной температуре и однократно в течение 10 минут в 0,4 × SSC при 42°C. Этапы обнаружения осуществляются в соответствии с инструкциями производителя. Затем стекла промывают стерильной дистиллированной водой (dH₂O). Срезы контрастно окрашивают красителем Бисмарка (коричнево-желтый), промывают в dH₂O, и используют покрывные стекла с помощью водной монтирующей среды.

4.3.1.2.3.2.3.

Положительные/отрицательные контроли

Обязательны. Положительные контроли:

1) ISH зараженного хозяина; 2) неспецифичная ISH (SSU рДНК) образцов.

Отрицательные контроли:

3) отсутствие реакций зонда ISH; 4) ISH незараженных хозяев. Положительные контроли доступны по запросу в Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3.2.4. Уровни валидации

4.3.1.2.3.2.4.1. Специфичность и чувствительность

90% и 99%, соответственно, в случае с ISH (Thébault с соавт., 2005). Ожидается, что протокол ISH будет выявлять *M. refringens*; однако этот зонд продемонстрировал кросс-реакцию с *M. sydneyi* и *Marteiloides chungmuensis* (Kleeman с соавт., 2002).

4.3.1.2.3.2.4.2. Золотой стандарт

Совместно валидирован с гистологией.

4.3.1.2.3.2.5. Интерпретация результатов

- Положительный результат демонстрируется фиолетово-черным мечением клеток *M. refringens* в пределах известных целевых тканей, с отрицательными показателями всех отрицательных контролей и положительными показателями всех положительных контролей.
- У восприимчивых видов в пределах известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат ISH подтверждает инфекцию *M. refringens*.
- У других видов или за пределами известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат ISH требует дополнительной молекулярной характеристики с целью определения видов паразита. Однако такого рода случай должен быть адресован в соответствующую Референтную лабораторию МЭБ.

4.3.1.2.3.2.6. Доступность теста

Зонд может быть получен из соответствующей Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3.3. Секвенирование

Секвенирование рекомендуется в качестве одного из финальных этапов для подтверждающей диагностики. Целевые регионы - SSU рДНК, ITS1 и IGS (межгенный спейсер). Несмотря на то, что последовательности доступны в общественных генетических банках, рекомендуется сообщать о таких случаях в соответствующую Референтную лабораторию МЭБ.

4.3.1.2.4. Очищение возбудителя

Очищение возбудителя в настоящее время не применяется для диагностических целей, но протоколы очищения разработаны и опубликованы (Miahle с соавт., 1985; Robledo с соавт., 1995a).

4.3.2. Серологические методы

Не применяются.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели их применения

В качестве примера, методы, доступные в настоящее время для целевого надзора и диагностики *M. Refringens*, перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице, указывают: а = метод является рекомендуемым методом исходя из соображений доступности, функциональности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод представляет собой стандартный метод с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы существенно ограничивают его применение; и d = метод, в настоящее время не рекомендованный для этой цели. Это несколько субъективно, поскольку соответствие метода охватывает вопросы надежности, чувствительности,

специфичности и функциональности. Несмотря на это, не все тесты, перечисленные под категориями а или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинное применение и тот факт, что они широко использовались без неточных результатов, делает их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	PLs	Молодые особи	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	d	c	c	c	d
Влажные препараты	d	d	c	c	c	d
Отпечатки	d	d	b	b	a	c
Гистопатология	d	d	a	a	b	c
<i>In situ</i> ДНК зонды	d	d	d	d	d	b
ПЦР	a	a	a	a	a	a
Секвенирование	d	d	d	d	d	a
Трансмиссионная электронная микроскопия	d	d	d	d	d	b

PLs = постличинки; ПЦР = полимеразная цепная реакция

6. Тест(ы) рекомендуемые для целевого надзора для признания свободы от инфекции *Marteilia refringens*

Предписанные методы для целевого надзора для признания свободы от инфекции в соответствии с Водным Кодексом: отпечатки ткани (пищеварительная железа), гистология или ПЦР.

7. Подтверждающие диагностические тесты

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Любой положительный результат, полученный с помощью любой диагностической методики следует рассматривать в качестве подозрительного.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

У известных восприимчивых видов и в пределах известного географического диапазона, подтвержденный случай *M. refringens* представляет собой положительный результат, полученный с помощью отпечатков ткани или гистологии совместно с ISH или ПЦР.

У других видов хозяев или за пределами известного диапазона *M. refringens*, рекомендуется подтверждение путем секвенирования и описания транскрипционной электронной микроскопии.

8. Список литературы

- ALDERMAN D.J. (1979). Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Mar. Fishery Rev.*, **41**, 67–69.
- AUDEMARD C., BARNAUD A., COLLINS C.M., LE ROUX F., SAURIAU P.-G., COUSTAU C., BLACHIER P. & BERTHE F.C.J. (2001). Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **257**, 87–108.
- AUDEMARD C., LE ROUX F., BARNAUD A., COLLINS C., SAUTOUR B., SAURIAU P.-G., DE MONTAUDOUIN X., COUSTAU C., COMBES C. & BERTHE F.C.J. (2002). Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. *Parasitology*, **124** (3), 315–323.
- BERTHE F.C.J., LE ROUX F., PEYRETAILLADE E., PEYRET P., RODRIGUEZ D., GOUY M. & VIVARÈS C.P. (2000). The existence of the phylum Paramyxea Desportes and Perkins, 1990 is validated by the phylogenetic analysis of the *Marteilia refringens* small subunit ribosomal RNA. *J. Euk. Microbiol.*, **47** (3), 288–293.
- BERTHE F.C.J., LE ROUX F., ADLARD R.D. & FIGUERAS A. (2004). Marteilirosis in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 433–448.
- CARRASCO N., ARZUL I., BERTHE F.C.J. & FURONES M.D. (2008a). *In situ* hybridization detection of initial infective stages of *Marteilia refringens* (Paramyxea) in its host *Mytilus galloprovincialis*. *J. Fish Dis.*, **31**, 153–157.
- CARRASCO N., ARZUL I., CHOLLET B., ROBERT M., JOLY J.-P., FURONES M.D. & BERTHE F. (2008b). Comparative experimental infection of the copepod *Paracartia grani* with *Marteilia refringens* and *M. maurini*. *J. Fish Dis.*, **31**, 497–504.
- CARRASCO N., LOPEZ-FLORES I., ALCARAZ M., FURONES M.D., BERTHE F.C.J. & ARZUL I. (2007). Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxea) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitology*, **134**, 1541–1550.
- CAVALIER-SMITH T. & CHAO E.E. (2003). Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist.*, **154** (3-4), 341–358.
- COMPS M. (1976). *Marteilia lengehi* n. sp., parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **40**, 347–349.
- COMPS M. (1983). Etude morphologique de *Marteilia christenseni* sp. n. parasite du lavignon *Scrobicularia piperata* P. (mollusque pélécy-pode). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **47**, 99–104.
- FEIST S.W., HINE P.M., BATEMAN K.S., GRANT D.S. & LONGSHAW M. (2009). *Paramarteilia canceri* sp. n.

(Cercaria) in the European edible crab (*Cancer pagarus*) with a proposal for the revision of the order Paramyxida Chatton, 1911. *Folia Parasitologica*, **56** (2), 73–85.

GRIZEL H. (1985). Etude des récentes épizooties de l'huître plate (*Ostrea edulis* Linné) et leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse Doctorat es Sciences, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 145 pp.

GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J.R., COUSSERANS F., DUTHOIT J.L. & LE PENNEC M.A. (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Sci. Pêche Bull. Inst. Pêches marit.*, **240**, 7–29.

KLEEMAN S.N., LE ROUX F., BERTHE F. & ADLARD R.D. (2002). Specificity of PCR and *in situ* hybridisation assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*. *Parasitology*, **125**, 131–141.

LE ROUX F., LORENZO G., PEYRET P., AUDEMARD C., FIGUERAS A., VIVARÈS C., GOUY M. & BERTHE F.C.J.

(2001). Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J. Euk. Microbiol.*, **48** (4), 449–454.

LE ROUX F., AUDEMARD C., BARNAUD A. & BERTHE F.C.J. (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Mar. Biotechnol.*, **1** (6), 588–597.

LONGSHAW M., FEIST S.W., MATTHEWS A. & FIGUERAS A. (2001). Ultrastructural characterisation of *Marteilia* species (Paramyxea) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 137–142.

LÓPEZ-FLORES I., DE LA HERRAN R., GARRIDO-RAMOS M.A., NAVAS J.I., RUIZ-REJON C. & RUIZ-REJON M. (2004). The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology*, **129**, 411–419.

LÓPEZ-FLORES I., GARRIDO-RAMOS M.A., DE LA HERRAN R., RUIZ-REJÓN C., RUIZ-REJÓN M. & NAVAS J.I. (2008a). Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and *in situ* hybridization. *Mol. Cell Probes*, **22**, 151–155.

LÓPEZ-FLORES I., ROBLES F., VALENCIA J.M., GRAU A., VILLALBA A., DE LA HERRÁN R., GARRIDO-RAMOS M.A., RUIZ-REJÓN C., RUIZ-REJÓN M. & NAVAS J.I. (2008b). Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and *in situ* hybridisation in *Chamelea gallina* from the Balearic Islands (Spain). *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 79–87.

MARTIN A.G. (1993). Relance de l'huître plate – Rapport d'avancement des travaux année 1991. Rapport Ifremer. RIDRV-93.026 RA/Trinité, 40 pp. MIAHLE E., BACHERE E., LE BEC C. & GRIZEL H. (1985). Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) parasites de bivalves marins. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **301**, Serie III, 4, 137–142.

MOYER M.A., BLAKE N.J. & ARNOLD W.S. (1993). An ascetosporan disease causing mass mortality in the Atlantic calico scallop, *Argopecten gibbus* (Linnaeus, 1758). *J. Shellfish Res.*, **12** (2), 305–310.

- NORTON J.H., PERKINS F.P. & LEDUA E. (1993). *Marteilia*-like infection in a giant clam, *Tridacna maxima*, in Fiji. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 328–330.
- NOVOA B., POSADA D. & FIGUERAS A. (2005). Polymorphisms in the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *J. Fish Dis.*, **28** (6), 331–338.
- PASCUAL S., VILLALBA A., ABOLLO E., GARCI M., GONZALES A.F., NOMBELA M., POSADA D. & GUERRA A. (2010). The mussel *Xenostrobus securis*: a well established alien invader in the Ria de Vigo (Spain, NE Atlantic). *Biological Invasions*, **12**, 2091–2103.
- PERKINS F.O. & WOLF P.H. (1976). Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. – Haplosporidian pathogen of Australian oysters. *J. Parasitol.*, **62**, 528–538.
- ROBERT R., BOREL M., PICHOT Y. & TRUT G. (1991). Growth and mortality of the european oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquatic Living Resource*, **4**, 265–274.
- ROBLEDO J.A.F., MIAHLE E. & FIGUERAS A. (1995a). Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (Protozoa: Asctospora) from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). In: Techniques in Fish Immunology – 4. Immunology and pathology of aquatic invertebrates, Stolen J.C., Fletcher T.C., Smith S.A., Zelikoff J.T., Kaattari S.L., Anderson R.S., Soderhall K. & Weeks-Perkins B.A., eds. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, USA, 117–121.
- ROBLEDO J.A.F., SANTAREM M.M., GONZALEZ P. & FIGUERAS A. (1995b). Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic loads. *Aquaculture*, **133**, 311–322.
- THÉBAULT A., BAUD J.P., LE SAUX J.C., LE ROUX F., CHOLLET B., LE COGUIC M.J., FLEURY P.G., BERTHE F. & GERARD A. (1999). Compte rendu sur les mortalité de juillet 1999 des moules (*Mytilus edulis*) en poches dans l’Aber Benoît. Rapport IFREMER., 12 pp.
- THÉBAULT A., BERGMANN S., POUILLOT S., LE ROUX F. & BERTHE F.C.J. (2005). Validation of *in situ* hybridization and histology assays for the detection of the oyster parasite *Marteilia refringens*. *Dis. Aquat. Org.*, **65** (1), 9–16.
- VILLALBA A., MOURELLE S.G., CARBALLAL M.J. & LOPEZ M.C. (1993a). Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 205–213.
- VILLALBA A., MOURELLE S.G., LOPEZ M.C., CARBALLAL M.J. & AZEVEDO C. (1993b). Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW. Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 61–72.

*
* *

NB: Существует Референтная лаборатория МЭБ по инфекции *Marteilia refringens* (см. Таблицу в конце настоящего *Водного Руководства* или перейдите по ссылке на вебсайт МЭБ для получения более актуального перечня:
<http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>)

Для получения любой дополнительной информации относительно инфекции *Marteilia refringens*, пожалуйста, обратитесь в Референтную лабораторию МЭБ

ИНФИЦИРОВАНИЕ МИКРОВАРИАНТАМИ ГЕРПЕСВИРУСА УСТРИЦ 1 (OsHV-1)

1. Область применения⁶²

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 (μ Var) и связанных вариантов. Термин μ 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).

62 NB: Версия текста принята Всемирной Ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2014 года.

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 1×10^5 мл⁻¹, максимум в 1×10^6 мл⁻¹ 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 Na₂SO₄, 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 соавторами (Perin с соавт., 2008) продемонстрировали, что количество копий ДНК в 1 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 соавторами (Oden с соавт., 2011) предположили, что пороговое количество вирусных копий - 10^4 в 1 мг^{-1} ткани устриц связано со смертностью, данное наблюдение поддержали Paul-Pont с соавторами (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 (μ 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 (μ 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⁻²). 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., 1994a; 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) глutarальдегида 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 лопастьях, 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 мм² 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 мм² 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® Green², специфичная для OsHV-1 (Pepin с соавт., 2008)

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 ТЕ буфера. ДНК хранится при температуре -20°C. Перед проведением ПЦР концентрация ДНК может быть

² 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.

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 BIR) и C9/C10 (Barbosa-Solomieu с соавт., 2004; ORF4) были ранее разработаны для одиночной ПЦР, тогда как пара праймеров Gr4/Gr7 (ORF88, кодирующая мембранный белок класса I) может быть использована для количественной ПЦР. С помощью пар праймеров B4/B3, C9/C10 и Gr4/Gr7 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'

Gr4: 5'-GGC-GTC-CAA-ACT-CGA-TTA-AA-3'

Gr7: 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 Gr4/Gr7 менее эффективна (E = 91,3%) и менее чувствительна (≥ 50 копий мкл⁻¹). 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⁻¹) 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*²) - >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⁻¹. 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 5×10^6 копий мкл⁻¹.

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 B4 (5'-ACT-GGG-ATCCGA-CTG-ACA-AC-3') праймеры. Праймер B4, используемый для ПЦР TaqMan, идентичен праймеру, упомянутому в публикации Pepin с соавт., 2008.

Амплификация региона-мишени и IC осуществлялась с помощью праймеров OsHV1BF и B4. Зонды В (5'-TGC-CCC-TGT-CAT-CTT-GAG-GTA-TAG-ACA-ATC-3') и IC (5'-ATC-GGGGG-GGT-TTT-TTT-ATC-G-3') были помечены на 5' конце флуоресцентным репортерным красителем - TxR и FAM соответственно, а на 3' конце - соответствующим гасителем (BHQI или BHQII).

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 (Pépin 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⁻¹ тканей для метода на основе SYBR® Green и TaqMan®, соответственно, и последний протокол имеет предел обнаружения 6 UG мг⁻¹ 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 (Pépin 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 пермеабелизируют с протеиназой К (100 мкг мл⁻¹ 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 Na₃citrate, 0,6 NaCl, pH 7], 250 мкг мл⁻¹ дрожжевой tРНК 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⁻¹) и 50 мкл буфера для гибридизации (50% формамид, 10% декстран сульфат, 4× SSC, 250 мкг мл⁻¹ 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 мышиных 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⁻¹). 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	Молody	Взрослые особи	Личинки	Молody	Взрослые особи	Личинки	Молody	Взрослые особи
Макропатология	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Биопробы	d	d	d	d	d	d	c	c	d
Гистопатология	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Просвечивающая ЭМ	d	d	d	d	d	d	b	b	b
Исследования на основе антител	d	d	d	d	d	d	d	d	d
ДНК-зонды <i>in-situ</i>	c	c	c	c	c	c	b	b	b
ПЦР	a	a	a	a	a	a	b	b	b

Количес- венная ПЦР	a	a	a	a	a	a	b	b	b
Секвенир- ование	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 μ 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 μ 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/>).

ИНФЕКЦИЯ *PERKINSUS MARINUS*

1. Сфера применения⁶³

Применительно к настоящей главе, инфекция *Perkinsus marinus* означает инфекцию *P. marinus*. Данный паразит вызывает дерматологическую болезнь у устриц.

2. Информация о болезни

2.1. Особенности возбудителя

2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

Этиологический агент представлен всеми штаммами *Perkinsus marinus*.

2.1.2. Выживание вне хозяина

Максимальное время выживания вне хозяина неизвестно.

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

Perkinsus marinus относительно стабилен благодаря толстой клеточной оболочке. Было продемонстрировано, что высушивание, обработка хлором ($>0,3$ мг/мл = 300 частей на миллион), УФ-излучение ($>28\ 000$ мкВт/см²) и пресная вода инактивируют клетки *P. marinus* (Bushek *c соавт.*, 1997; Bushek & Howell, 2000). Ультрафиолетовое облучение от 4000 до 14000 мкВт/см² препятствует размножению *P. marinus* (Bushek & Howell, 2000).

2.1.4. Жизненный цикл

Жизненный цикл прямой, от хозяина к хозяину, и все стадии развития паразита являются контагиозными (Andrews, 1996; Villalba *c соавт.*, 2004).

2.2. Особенности хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Американская устрица (*Crassostrea virginica*), тихоокеанская устрица (*C. gigas*), устрицы Suminoe (*C. ariakensis*), мангровая устрица (*C. rhizophorae*), устрица *C. corteziensis* (Andrews, 1996; Calvo *c соавт.*, 1999; Calvo *c соавт.*, 2001; Villalba *c соавт.*, 2004; Cáceres-Martínez *c соавт.*, 2008); песчаная ракушка (*Mya arenaria*); балтийский моллюск (*Macoma balthica*) (Dungan *c соавт.*, 2007).

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

Все стадии после оседания молоди устриц являются восприимчивыми.

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

⁶³ Примечание: Версия утверждена Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 г.

Crassostrea virginica - наиболее восприимчивый вид; *C. gigas* и *C. ariakensis* могут инфицироваться, но инфекция обычно протекает в легкой форме (Calvo *c соавт.*, 1999; Calvo *c соавт.*, 2001). Превалентность среди *M. arenaria* и *M. balthica* в природе составляет менее 10% (Reese *c соавт.*, 2008). Инфекция *Perkinsus marinus* у *C. corteziensis* требует дополнительных исследований, но данный хозяин, по-видимому, занимает промежуточное положение по восприимчивости между *C. virginica* и азиатскими видами *C. gigas* и *C. ariakensis* (Cáceres-Martínez *c соавт.*, 2008; Dungan *c соавт.*, 2007).

2.2.4. Органы-мишени и инфицируемые ткани

Эпителий кишечника, соединительная ткань всех органов и гемоциты (Mackin, 1951).

2.2.5. Персистентная инфекция с пожизненным носительством

Инфекция *P. marinus* часто является смертельной в зависимости от хозяина и условий окружающей среды (Andrews, 1996; Burrenson & Ragone Calvo, 1996). Персистентная инфекция с пожизненным носительством возможна.

2.2.6. Переносчики инфекции

Переносчиков инфекции не требуется: жизненный цикл прямой.

2.2.7. Известные или потенциальные носители среди диких водных животных

Неизвестно.

2.3.	Модель	болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача паразита происходит напрямую от хозяина к хозяину. Все стадии жизни контагиозны (Villalba *c соавт.*, 2004). Жизнеспособные клетки выходят с фекалиями хозяина (Bushek *c соавт.*, 2002b) или после смерти хозяина, и заражение ими происходит при заглатывании моллюском пищи.

2.3.2. Превалентность

Превалентность варьируется в зависимости от солености и особенностей хозяина, но у *C. virginica* она часто достигает 100%. Предполагается, что превалентность выше у особей, подвергавшихся воздействию патогена в течение более 1 года (Andrews, 1996; Burrenson & Ragone Calvo, 1996). Превалентность у двустворчатых моллюсков низкая, обычно менее 10%.

2.3.3. Географическое распределение

Восточное побережье Северной Америки от штата Мэн, США, до Кампече, Мексика. Недавно произошел занос паразита на тихоокеанское побережье Мексики (Cáceres-Martínez *c соавт.*, 2008).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Инфекция у *C. virginica* часто бывает смертельной. Гибель обычно наступает через 1-2 года после заражения, во время или вскоре после периода, когда температура воды достигает

самых высоких годовых значений (Burrison & Ragone Calvo, 1996). Интенсивность инфекции у двусторчатых моллюсков очень низкая, и признаки смертности отсутствуют.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Превалентность и интенсивность инфекций, вызываемых *P. marinus*, достигают максимума при солености выше 12 практических единиц солёности (ПЕС). Передача может происходить в диапазоне от 9 до 12 ПЕС, но интенсивность инфекции остается низкой. *Perkinsus marinus* может долгое время выживать в хозяине при солености менее 9 ПЕС, но репликация является слабой и гибели хозяина не происходит. Температура влияет на годовой цикл *P. marinus*, при этом максимальная превалентность и интенсивность наблюдаются спустя 1-2 месяца после максимальных летних температур воды, а минимальная превалентность и интенсивность наблюдаются спустя 1-2 месяца после минимальных зимних температур. Таким образом, инфекции, вызываемые *P. marinus*, имеют самый высокий уровень интенсивности осенью и самый низкий уровень интенсивности ранней весной (Burrison & Ragone Calvo, 1996).

2.4. Профилактика и борьба с болезнью

2.4.1.

Вакцинация

Вакцины отсутствуют.

2.4.2. Лекарственное лечение

Соединения дезинфектанта N-Halamine убивали культивируемые клетки *P. marinus*, не оказывая негативного воздействия на личинок устриц (Delaney *с соавт.*, 2003). Было продемонстрировано, что бацитрацин, циклогексимид и пресная вода сокращают количество, но не уничтожают *P. marinus* у инфицированных устриц-хозяев (Calvo & Burrison, 1994; Faisal *с соавт.*, 1999; La Peyre *с соавт.*, 2003). Эти методы обработки могут применяться для аквакультуры, но непригодны для использования в естественной среде.

2.4.3.

Иммуностимуляция

Отсутствует.

2.4.4. Разведение для получения резистентной популяции

Было продемонстрировано, что селекционное разведение устриц, выживших в результате эпизоотий, эффективно снижает смертность, вызываемую *P. marinus* (Ragone Calvo *с соавт.*, 2003).

2.4.5. Повторное заселение резистентными видами

Линии *C. virginica*, устойчивые к болезни, полученные путем селекционного разведения, используются в аквакультуре в Чесапикском заливе и в других местах (Ragone Calvo *с соавт.*, 2003), но их не рекомендуется использовать для восстановления естественных популяций устриц из-за генетических проблем.

2.4.6. Блокирующие агенты

Отсутствуют.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Неизвестно случаев заражения икринок или личинок инфекцией *Perkinsus marinus*, но клетки могут встречаться во внеклеточном пространстве. Дезинфекция икринок или личинок возможна с использованием соединений дезинфектанта N-Halamine (Delaney *с соавт.*, 2003).

2.4.8. Общие практики разведения

Разведение в районах, где соленость составляет менее 12 ПЕС, и использование быстрорастущих, устойчивых к болезням линий, имело полезный результат (Andrews, 1996; Bureson & Ragone Calvo, 1996).

3.

Отбор

образцов

3.1. Отбор отдельных особей

Следует отбирать живых или недавно погибших особей.

3.2. Консервирование образцов

Для диагностики с использованием метода культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рэя (RFTM), образцы должны быть свежими. Для гистологии лучшим консервантом является фиксатор АФА Дэвидсона, но 10% буферный формалин или другие стандартные гистологические фиксаторы также пригодны для использования. Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) образцы должны консервироваться с использованием 95–100% этанола и неденатурированного спирта.

3.3. Объединение образцов в пулы

Объединение образцов, полученных от молоди устриц и взрослых особей, не рекомендуется, так как это приведет к сокращению массы анализируемой ткани на особь, и, следовательно, снизит чувствительность обнаружения. Для ПЦР-анализа всего организма устрицы допустимо объединение в пулы очень мелкой молоди устриц (от пяти до десяти особей в зависимости от размера) или личинок, хотя это не позволяет провести точную оценку превалентности патогена.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Для RFTM обычно используются кусочки жабр, мантии и прямой кишки. Для гистологии используется срез тканей внутренних органов толщиной 5 мм, который включает пищеварительную железу, жабры и мантию. Для ПЦР лучше всего подходят ткани жабр или мантии.

3.5. Неподходящие образцы/ткани

Ткани прямой кишки не подходят для ПЦР из-за присутствия ингибиторов.

4. Методы диагностики

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Perkinsus marinus вызывает хроническое истощение. Клиническими признаками могут быть мертвые двустворчатые моллюски или двустворчатые моллюски с раскрытыми створками раковины, с тонкой водянистой тканью, но эти клинические признаки не являются специфичными для инфекции *P. marinus*.

4.1.2. Изменение поведения

Зараженные хозяева могут медленно смыкать створки при воздействии внешних факторов, но эти поведенческие изменения не являются специфичными для инфекции *P. marinus*.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Макроскопическим признаком является тонкая водянистая ткань, но данный макроскопический признак не является специфичными для инфекции *P. marinus*.

4.2.2.	Клиническая	химия
Отсутствует.		

4.2.3. Микроскопическая патология

На фиксированных срезах имеются обширные многоочаговые поражения в эпителии кишечника или в соединительной ткани любого органа, содержащего клетки *P. marinus* (Maskin, 1951). Инфильтрация гемоцитами и фагоцитоз клеток *P. marinus* происходит при большинстве инфекций. При инфекциях с высоким уровнем интенсивности эпителий кишечника может быть почти полностью разрушен.

4.2.4. Влажные препараты

Не рекомендуется в качестве клинического метода.

4.2.5. Мазки

Не рекомендуется в качестве клинического метода.

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

Нет данных.

4.3.	Методы	обнаружения	и	идентификации	агента

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Не рекомендуется.

4.3.1.1.2. Мазки

Мазки целесообразно использовать только при запущенных инфекциях.

4.3.1.1.2.1. Подлежащие отбору образцы

Живые хозяева.

4.3.1.1.2.2. Техническая процедура

Хозяина обескровливают с использованием иглы и шприца, введенного в аддуктор. Каплю гемолимфы помещают на предметное стекло и размазывают. Предметные стекла изучают при увеличении $\times 100$ –400 после окрашивания.

4.3.1.1.2.3. Положительные контроли

Нет.

4.3.1.1.2.4. Уровни валидации

4.3.1.1.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Специфичность анализа очень низкая, чувствительность неизвестна.

4.3.1.1.2.4.2. Золотой стандарт

Чувствительность не валидирована в сопоставлении с методом культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рэя (метод определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме устрицы) [Fisher & Oliver, 1996]).

4.3.1.1.2.5. Интерпретация результатов

Наличие сферических клеток диаметром 2–15 мкм с большой вакуолью и эксцентричным ядром, часто фагоцитированных гемоцитами хозяина, указывает на присутствие *Perkinsus* sp., но данный метод не является видоспецифическим.

4.3.1.1.2.6. Наличие коммерческих тестов

Наборы для быстрого окрашивания имеются в продаже.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы ткани

4.3.1.1.3.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие устрицы.

4.3.1.1.3.2. Техническая процедура

Срезы ткани, которые включают пищеварительную железу, жабры и мантию, следует фиксировать в течение 24 часов в фиксаторе Дэвидсона или в другом подходящем фиксаторе, с последующей обычной обработкой для гистологии с использованием парафина, и окраской гематоксилином и эозином. Исследования производятся при увеличении до $\times 400$.

4.3.1.1.3.3.

Положительные

контроли

Рекомендованы и имеются в наличии в Справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.1.3.4. Уровни валидации

4.3.1.1.3.4.1. Специфичность и чувствительность

Видовая специфичность анализа низкая, но чувствительность является высокой для инфекций средней и высокой интенсивности, и низкой для инфекций низкой интенсивности.

4.3.1.1.3.4.2. Золотой стандарт

Метод культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рэя (метод определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме устрицы) является золотым стандартом, хотя он не является видоспецифическим. Гистология является менее чувствительным методом, хотя не валидирована формально в сопоставлении с методом культивирования в жидкой тиогликолевой среде.

4.3.1.1.3.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является наличие сферических одноядерных клеток диаметром приблизительно 2-5 мкм (иногда до 10 мкм) с большой вакуолью и эксцентрически смещенным ядром. Обычно они наблюдаются в кишечнике хозяина или иногда в эпителии при легких инфекциях; для случаев запущенной инфекции характерна колонизация соединительных тканей. Можно обнаружить двоядерные схизонты *P. marinus* (делящиеся формы), хотя более крупные схизонты с большим числом ядер достоверно не определяются. Клетки часто фагоцитируются гемоцитами хозяина. Клетки *Perkinsus marinus* окрашиваются базофильно.

У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *P. marinus*, положительный результат является косвенным доказательством наличия инфекции *P. marinus*, и он должен быть подтвержден с помощью видоспецифической ПЦР, гибридизации *in situ* (ISH) и/или секвенирования ДНК области ITS1 (внутренний транскрибируемый спейсер), из-за возможного присутствия *P. chesapeakei* или неописанных видов *Perkinsus*.

4.3.1.1.3.6. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тесты отсутствуют.

4.3.1.1.4. Метод культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рэя (RFTM)

Инкубация в жидкой тиогликолевой среде обычно используется для надзора за *P. marinus*. Метод является простым, недорогим и имеет высокую чувствительность, но не является видоспецифическим. Трофозоиты *P. marinus* в тканях устриц увеличиваются в результате культивирования в течение как минимум 5 дней в жидкой тиогликолевой среде, содержащей декстрозу, обогащенную антибиотиками (пенициллин, стрептомицин) и противогрибковой смесью (нистатин) для замедления роста бактерий и грибов. Когда происходит мацерация ткани в результате культивирования, и в нее проникает водный раствор йода (Люголя), увеличенные трофозоиты (гипноспоры или презооспорангии в старой терминологии) легко впитывают раствор Люголя и становятся легко видимыми при малом увеличении из-за их синевато-черной окраски и сферической формы.

4.3.1.1.4.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие моллюски.

4.3.1.1.4.2. Техническая процедура

4.3.1.1.4.2.1. Анализ тканей (Ray (Рэй), 1966)

Образцы ткани размером приблизительно 5–10 мм вырезают, отдавая предпочтение ректальной ткани, ткани жабр и мантии устриц, и помещают в пробирки, содержащие тиогликолевую среду (тиогликолевая среда содержит 14,6 г декстрозы; 10,0 г NaCl; 485 мл стерильной дистиллированной воды (dH₂O)). Всего 9,5 мл наливают в одноразовые пробирки, которые автоклавируют в течение 15 минут при давлении 1,2 кг/см². Автоклавируемый раствор можно хранить в пробирках до 3 недель. Принадлежности, используемые для препарирования, следует промывать в 95% этаноле и стерилизовать пламенем в промежутке между манипуляциями с образцами от других хозяйев, чтобы предотвратить загрязнение проб. Рекомендуемые противогрибковые препараты/антибиотики: 500 ед/мл пенициллина G и 500 ед/мл дигидрострептомицина в среде (3,13 г пенициллина; 6,55 г стрептомицина; 500 мл dH₂O; заморозить в аликвотах по 50 мл; добавить 0,5 мл в каждую пробирку) и 50 мкл микостатина (нистатина) на пробирку. Хлоромицетин можно использовать вместо пенициллина/стрептомицина. Пробирка закупоривается пробкой из губчатой резины или ваты. Инкубация проводится при 22–25°C в течение 5–7 дней в темноте. После инкубации фрагменты ткани собирают и измельчают лезвием скальпеля на предметном стекле, добавляют каплю раствора Люголя (исходный раствор Люголя: 6,0 г йодида калия; 4,0 г йода; 100 мл dH₂O. Рабочий раствор Люголя: 30,0 мл dH₂O; 15,0 мл исходного раствора Люголя), и препарат накрывают покровным стеклом и выдерживают в течение 10 минут. Препараты исследуют в свежем виде.

4.3.1.1.4.2.2. Метод определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме устрицы (Fisher & Oliver, 1996)

Целую устрицу-хозяина разрезают на кусочки величиной 2–5 мм, помещают в жидкую тиогликолевую культуральную среду и инкубируют, как описано выше в анализе тканей. Раствор центрифугируют при 1500 *g* в течение 10 минут и надосадочную жидкость сливают. Добавляют 2 М NaOH (20 мл/г ткани) и раствор инкубируют при 60°C в течение 2–6 часов, до расщепления ткани. Раствор центрифугируют при 1500 *g* в течение 10 минут и надосадочную жидкость сливают. Раствор трижды промывают деионизированной водой, осадок ресуспендируют в 1 мл рабочего раствора Люголя и подсчитывают количество клеток. Может потребоваться серийное разведение для уменьшения общего количества клеток до приемлемого количества.

4.3.1.1.4.3. Уровни валидации

4.3.1.1.4.3.1. Специфичность и чувствительность

Специфичность низкая, так как метод не позволяет различать виды *Perkinsus*. Чувствительность высокая, особенно для метода определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме (Bushek с соавт., 1994).

4.3.1.1.4.3.2. Золотой стандарт

Культивирование в жидкой тиогликолевой среде (метод определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме) является золотым стандартом. Анализ тканей с использованием культивирования в жидкой тиогликолевой среде является рекомендованным методом надзора. Метод был валидирован в сопоставлении с методом определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме (Bushek *c соавт.*, 1994) и оказался менее чувствительным.

4.3.1.1.4.4. Интерпретация результатов

Культивированные паразиты увеличиваются от 2–10 до 20–70 мкм во время инкубации. Клетки *Perkinsus* spp. имеют сферическую форму, а клеточные оболочки окрашиваются в синий или синевато-черный цвет раствором Люголя (Bushek *c соавт.*, 1994; Ray, 1966).

У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *P. marinus*, положительный результат является косвенным доказательством наличия инфекции *P. marinus*, но он должен быть подтвержден с помощью видоспецифической ПЦР, гибридизации *in situ* (ISH) или секвенирования ДНК области ITS1 (внутренний транскрибируемый спейсер), из-за возможного присутствия *P. chesapeaki* или неописанных видов *Perkinsus*.

Если для молекулярной диагностики параллельные пробы не консервировали, ДНК паразита может быть выделена и амплифицирована при помощи ПЦР непосредственно из положительных тиогликолевых препаратов (Audemard *c соавт.*, 2008).

4.3.1.1.4.5. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тесты отсутствуют.

4.3.1.2. Выделение и идентификация агента

4.3.1.2.1. Культура клеток /искусственные среды

Клетки *Perkinsus marinus* легко культивируются в различных средах (например, La Peyre *c соавт.*, 1993). Культуральная среда обычно инокулируется тканью сердца, гемолимфы или жабр. Были проведены сравнения коммерческих сред (Dungan & Hamilton, 1995), и рост поддерживался во всех средах, но был максимальным в 1/1 DME (среда Игла в модификации Дульбекко)/среда Хэма F-12.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

Для обнаружения *P. marinus* были разработаны моноклональные и поликлональные антитела, но они не являются специфичными для *P. marinus*, и было продемонстрировано, что поликлональные антитела дают перекрестную реакцию с некоторыми видами динофлагеллят (Bushek *c соавт.*, 2002a).

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Родоспецифические анализы для обнаружения *Perkinsus* (ПЦР и ISH)

Для надзора с использованием ПЦР, рекомендуется сначала провести родоспецифические ПЦР-анализы для обнаружения *Perkinsus*, а затем образцы с положительными результатами протестировать с помощью *P. marinus*-специфического анализа. О меж- и внутривидовых

вариациях последовательности области ITS (внутренний транскрибируемый спейсер) известно гораздо больше, чем об области NTS (нетранскрибируемый спейсер) генного комплекса рРНК *Perkinsus* sp., с использованием последовательностей, доступных в базе генетических данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (США). Поэтому рекомендуется использовать ПЦР-праймеры, нацеленные на область ITS, поскольку можно быть более уверенным в том, что они обнаружат различные штаммы *P. marinus*. Для ISH были разработаны зонды, нацеленные на ген малой субъединицы (SSU) генного комплекса рРНК (Elston *с соавт.*, 2004). Кроме того, для использования с тканями хозяина была разработана родоспецифическая ПЦР в реальном времени для обнаружения *Perkinsus* (Gauthier *с соавт.*, 2006). Она была протестирована только с *P. marinus*, *P. olsenii* и *P. chesapeaki* и оказалась более специфичной при ограниченной валидации в сопоставлении с анализом RFTM. Данный анализ требует более тщательного тестирования на инклюзивность, но он может быть подходящим для лабораторий, которые имеют необходимое оборудование.

4.3.1.2.3.1.1. Родоспецифическая ПЦР для обнаружения *Perkinsus*

4.3.1.2.3.1.1.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие моллюски. Кусочки ткани размером 2–3 мм² асептически вырезают из жабр и мантии и помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, содержащие 95–100% этанол. Для предотвращения перекрестной контаминации, принадлежности, используемые для препарирования, следует стерилизовать пламенем в промежутке между манипуляциями с образцами.

4.3.1.2.3.1.1.2. Техническая процедура

Выделение ДНК осуществляют путем расщепления протеиназой К в течение ночи при 56°C и методом спин-колонки с использованием коммерческих наборов. Рекомендуется использовать праймеры для *Perkinsus*-родоспецифической ПЦР, разработанные Audemard *с соавт.*, 2004. Прямой праймер PerkITS-85 (5'-CCG-CTT-TGT-TTG-GAT-CCC-3') и обратный праймер PerkITS-750 (5'-ACA-TCA-GGC-CTT-CTA-ATG-ATG-3') нацелены на область ITS генного комплекса рРНК. Данные праймеры амплифицируют продукт длиной 703 пар оснований и могут использоваться для обнаружения ДНК любых известных и, возможно, неизвестных видов *Perkinsus*, за исключением *P. qugwadi*. Реакционные смеси для ПЦР содержат: 20 мМ Трис/HCl [pH 8,4], 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждой смеси dNTP, 0,1 мкМ каждого праймера, 0,025 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, 0,05 мг/мл BSA (альбумина бычьего сывороточного) и 0,5 мкл геномной ДНК (всего 10–50 нг). Условия амплификации:

образцы денатурируют в течение 4 минут при 95°C, после чего подвергают 40 циклам (95°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1 минуты, 72°C в течение 1 минуты), со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 10 минут. После амплификации 4 мкл ПЦР-продукта визуализируют на 2% агарозном геле.

4.3.1.2.3.1.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительным контролем является геномная ДНК, полученная от моллюска, инфицированного любым видом *Perkinsus*, кроме *P. qugwadi*.

Отрицательные контроли — это либо анализы без препарата ДНК, либо анализы, проводимые с неинфицированными моллюсками.

4.3.1.2.3.1.1.4. Уровни валидации

- Специфичность и чувствительность

Праймеры для *Perkinsus*-родоспецифической ПЦР были протестированы на инклюзивность в отношении всех известных видов *Perkinsus*, и протестированы на специфичность к различным видам гаплоспориций, а также к паразитарным и непаразитарным видам динофлагеллят (Reese & Dungan, 2005). Чувствительность не сравнивалась с методом RFTM.

4.3.1.2.3.1.1.5. Интерпретация результатов

Положительный результат теста определяется как наличие в агарозном геле полосы (бэнда) подходящего размера (703 пары оснований), причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными.

4.3.1.2.3.1.2. *Perkinsus*-родоспецифическая ISH

4.3.1.2.3.1.2.1. Подлежащие отбору образцы

Следует использовать процедуру для фиксированных срезов тканей (4.3.1.1.3), описанную выше, за исключением того, что срезы ткани необходимо помещать на предметные стекла с положительно заряженной поверхностью, или предметные стекла, покрытые 3-аминопропилтриэтоксисиланом, без окрашивания. Депарафинизирование срезов проводят в ксилоле в течение 10 минут, а затем повторно регидратируют в серии растворов этанола. Срезы промывают дважды в течение 5 минут в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS).

4.3.1.2.3.1.2.2. Техническая процедура

Для обнаружения рода *Perkinsus* был разработан специфичный ДНК-зонд, нацеленный на ген малой субъединицы (SSU) рРНК (Elston *с соавт.*, 2004): Perksp700DIG (5'-CGC-ACA-GTT-AAG-TRC-GTG-RGC-ACG-3'). 5 конец зонда метят дигоксигенином.

Срезы тканей обрабатывают 125 мкг/мл проназы в PBS при 37°C в течение 30 минут. Затем реакцию останавливают, промывая срезы в PBS с 0,2% глицином в течение 5 минут. Затем срезы помещают в 2 × SSC (стандартный цитратно-солевой буфер; 20 × SSC = 3 M NaCl; 0,3 M цитрат Na; pH 7,0) на 10 минут.

Срезы подвергают предварительной гибридизации в течение 1 часа при 42°C в растворе для предварительной гибридизации (4 × SSC, 50% формамид, 5 × раствор Денхардта, 0,5 мг/мл дрожжевой тРНК и 0,5 мг/мл ДНК спермы лосося, подвергнутой термической денатурации) во влажной камере.

Затем раствор для предварительной гибридизации заменяют буфером предварительной гибридизации, содержащим 7 нг/мкл зонда, меченного дигоксигенином, специфичного для рода *Perkinsus*. Срезы покрывают пластиковыми покровными стеклами для гибридизации *in situ* и помещают на нагревательный блок при 90°C на 12 минут. Затем предметные стекла

охлаждают на льду в течение 1 минуты перед гибридизацией, которая проводится в течение ночи при 42°C во влажной камере.

Каждый срез дважды промывают в $2 \times \text{SSC}$ в течение 5 минут при комнатной температуре, дважды в $1 \times \text{SSC}$ в течение 5 минут при комнатной температуре, и дважды в $0,5 \times \text{SSC}$ в течение 10 минут при 42°C. Затем срезы помещают в Буфер 1 (100 мМ Трис, pH 7,5, 150 мМ NaCl) на 1-2 минуты.

Срезы помещают в Буфер 1 (см. выше) с добавлением 0,3% Triton X-100 и 2% овечьей сыворотки на 30 минут. Конъюгат антител против дигоксигенина с щелочной фосфатазой разводят 1/500 (или в соответствии с рекомендациями производителя) в Буфере 1 с добавлением 0,3% Triton X-100 и 1% овечьей сыворотки, а затем наносят на срезы тканей. Срезы покрывают покровными стеклами для гибридизации *in situ* и инкубируют в течение 3 часов при комнатной температуре во влажной камере.

Каждое предметное стекло дважды промывают в Буфере 1 в течение 5 минут, и дважды промывают в Буфере 2 (100 мМ Трис, pH 9,5, 100 мМ NaCl, 50 мМ MgCl_2) в течение 5 минут. Затем предметные стекла помещают в окрашивающий раствор (337,5 мкг/мл нитросинего тетразолия, 175 мкг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат п-толуидин соли, 240 мкг/мл левамизола в Буфере 2) на 2 часа в темноте. Реакцию останавливают промыванием в буфере TE (10 мМ Трис, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА [этилендиаминтетрауксусная кислота]).

Затем предметные стекла ополаскивают стерильной дистиллированной водой (dH_2O). Срезы контрокрашивают с использованием раствора бисмарка коричневого Y, промывают dH_2O и покрывают покровным стеклом с использованием водной заливочной среды.

4.3.1.2.3.1.2.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительные контроли представляют собой срезы тканей моллюска, инфицированного любым видом *Perkinsus*. Отрицательные контроли — это либо анализы без использования зонда, либо анализы, проводимые с неинфицированными устрицами.

4.3.1.2.3.1.2.4. Уровни валидации

- Специфичность и чувствительность

ДНК-зонд, специфичный для рода *Perkinsus*, был протестирован на специфичность к различным видам *Perkinsus*, гаплоспоридий и паразитарным видам динофлагеллят (Elston *с соавт.*, 2004). Чувствительность оказалась выше по сравнению с гистологией с использованием парафина, но зонд не сравнивали с RFTM.

4.3.1.2.3.1.2.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является наличие клеток паразита фиолетово-чёрного цвета, причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными (Elston *с соавт.*, 2004).

4.3.1.2.3.2. Анализы для обнаружения *Perkinsus* (ПЦР и ISH)

4.3.1.2.3.2.1. *Perkinsus marinus*-специфичная полимеразная цепная реакция

Для обнаружения *P. marinus* были разработаны ПЦР-праймеры, нацеленные на область NTS и область ITS генного комплекса рРНК. Хотя праймеры, нацеленные на область NTS, продемонстрировали высокую видовую специфичность, мало что известно о внутривидовых вариациях последовательности области NTS, и существует риск ложноотрицательных результатов. Вариации последовательности области ITS более широко охарактеризованы (см. базу генетических данных GenBank), а праймеры, нацеленные на область ITS, более тщательно протестированы на специфичность. По этим причинам рекомендуются праймеры, нацеленные на область ITS (Audemard *с соавт.*, 2004). В данной главе представлена самая последняя версия рекомендованного специфичного ITS анализа на *P. marinus*. Для надзора рекомендуется сначала провести родоспецифические анализы для обнаружения *Perkinsus*, а затем специфичный анализ. Кроме того, для обнаружения *P. marinus* в тканях хозяина была разработана ПЦР в реальном времени (Gauthier *с соавт.*, 2006). Она была протестирована только с *P. marinus*, *P. olseni* и *P. chesapeaki* и оказалась более чувствительной при ограниченной валидации в сопоставлении с анализом RFTM. Данный анализ требует более тщательного тестирования на специфичность ко всем известным видам *Perkinsus*, но он может быть подходящим для лабораторий, которые имеют необходимое оборудование.

4.3.1.2.3.2.1.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие моллюски. Кусочки ткани размером 2–3 мм² асептически вырезают из жабр и мантии и помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, содержащие 95–100% этанол. Для предотвращения перекрестной контаминации, принадлежности, используемые для препарирования, следует стерилизовать пламенем в промежутке между манипуляциями с образцами.

4.3.1.2.3.2.1.2. Техническая процедура

Выделение ДНК осуществляют путем расщепления протеиназой К в течение ночи при 56°C и методом спин-колонки с использованием коммерческих наборов. Были разработаны ПЦР-праймеры, нацеленные на область ITS генного комплекса рРНК *P. marinus* (Audemard *с соавт.*, 2004): прямой праймер PmarITS-70F (5'-CTT-TTG-YTW-GAG-WGT-TGC-GAG-ATG-3') и обратный праймер PmarITS600R (5'-CGA-GTT-TGC-GAG-TAC-CTC-KAG-AG-3'). Размер амплифицированного продукта составляет 509 пар оснований. Реакционная смесь для ПЦР содержит ПЦР буфер: 20 мМ Трис/HCl [pH 8,4], 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждой смеси dNTP, 0,1 мкМ каждого праймера, 0,025 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, 0,05 мг/мл BSA (альбумина бычьего сывороточного) и 0,5 мкл геномной ДНК (10–50 нг) в общем объеме 25 мкл. Условия амплификации: образцы денатурируют в течение 4 минут при 95°C, после чего подвергают 40 циклам (94°C в течение 1 минуты, 57°C в течение 1 минуты, 65°C в течение 3 минут), со стадией финальной элонгации при 65°C в течение 10 минут.

ПЦР-продукты подвергают электрофорезу в 2% агарозном геле (1 × TAE или TBE), окрашивают бромидом этидия и визуализируют в УФ свете.

4.3.1.2.3.2.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительными контролями являются: ДНК из очищенных клеток *P. marinus* или геномная ДНК, полученная от хозяина с инфекцией высокой интенсивности. Отрицательные контроли: отсутствие реакции на ДНК-мишень;

4.3.1.2.3.2.1.4. Уровни валидации

- Специфичность и чувствительность

Праймеры, нацеленные на область ITS, были протестированы на специфичность к *P. olseni*, *P. chesapeaki*, *P. andrewsi* и *P. mediterraneus*, а также к нескольким видам динофлагеллят (Audemard *с соавт.*, 2004). Чувствительность оказалась высокой, продемонстрирована способность обнаружения одной клетки *P. marinus* в 30 мг ткани устрицы, но ошибка при взятии субпробы в случае легких локализованных инфекций может привести к ложноотрицательным результатам.

- Золотой стандарт

ПЦР с использованием праймеров, нацеленных на область ITS, не была валидирована в сопоставлении с методом RFTM.

4.3.1.2.3.2.1.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является продукт ПЦР-амплификации подходящего размера (509 пар оснований), причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными.

4.3.1.2.3.2.1.6. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тесты отсутствуют.

Кроме того, был разработан анализ ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), использование которого может быть целесообразным для специфичной диагностики *P. marinus* (Abollo *с соавт.*, 2006), хотя он не был протестирован на специфичность ко всем известным видам *Perkinsus*.

4.3.1.2.3.2.2. *Perkinsus marinus*-специфическая ISH

4.3.1.2.3.2.2.1. Подлежащие отбору образцы

Следует использовать процедуру для фиксированных срезов тканей (4.3.1.1.3), описанную выше, за исключением того, что срезы ткани необходимо помещать на предметные стекла с положительно заряженной поверхностью, или предметные стекла, покрытые 3-аминопропилтриэтоксисиланом, без окрашивания. Депарафинизирование срезов проводят в ксилоле в течение 10 минут, а затем повторно регидратируют в серии растворов этанола. Срезы промывают дважды в течение 5 минут в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS).

4.3.1.2.3.2.2.2. Техническая процедура

Был разработан ДНК-зонд, нацеленный на LSU гена рРНК *P. marinus* (Moss *с соавт.*, 2006) (PmarLSU-181DIG 5'-GAC-AAA-CGG-CGA-ACG-ACT-C-3'). Конец зонда метят дигоксигенином. Для ISH используются те же процедуры, которые описаны выше для зонда, специфичного для рода *Perkinsus*.

4.3.1.2.3.2.2.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительные контроли представляют собой срезы тканей *C. virginica*, инфицированных *P. marinus*. Отрицательные контроли — это либо анализы без зонда, либо анализы, проводимые с неинфицированными устрицами.

4.3.1.2.3.2.2.4. Уровни валидации

- Специфичность и чувствительность

ДНК-зонд, специфичный для *P. marinus*, был протестирован на специфичность к различным видам *Perkinsus* (Moss *с соавт.*, 2006). Чувствительность оказалась выше, чем у гистологии с использованием парафина, но зонд не сравнивали с RFTM.

4.3.1.2.3.2.2.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является наличие клеток паразита фиолетово-чёрного цвета, причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными.

4.3.1.2.4. Выделение агента

Perkinsus marinus можно выделить путем создания клональных культур.

4.3.2.

Серологические

методы

Не применимо.

5. Категории тестов в зависимости от их назначения

В качестве примера, методы, имеющиеся в настоящее время для целевого надзора и диагностики инфекции *Perkinsus marinus*, 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	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	d	d	d	d
Мазки гемолимфы	d	c	c	c	d
Гистопатология	b	b	b	b	d

RFTM, анализ тканей ¹	d	a	a	b	d
RFTM, метод определения общего содержания клеток <i>P. marinus</i> во всем организме устрицы ¹	d	c	c	c	d
ПЦР	a	b	b	a ²	b ²
ДНК зонды <i>in situ</i>	d	b	b	b	a
Секвенирование	d	d	d	d	b ²

1. Метод не является видоспецифическим, но может эффективно применяться в отношении хозяйств/областей, в которых присутствует или преобладает только один вид *Perkinsus*.

2. Следует использовать только в том случае, если инфекции визуализируются при помощи мазка, RFTM или гистологии.

RFTM = Метод культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рэя; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от инфекции *Perkinsus marinus*

Методами, предписанными для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от инфекции *P. marinus*, являются: ПЦР-анализы в сочетании с RFTM (анализ тканей или метод определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме устрицы).

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение случая подозрения на болезнь

У известных восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *P. marinus*, случаем подозрения на инфекцию *P. marinus* является положительный результат, полученный при использовании одного из следующих методов: мазки гемолимфы, гистология, культивирование в жидкой тиогликолевой среде или ПЦР.

У других видов хозяйств или за пределами известного ареала распространения инфекции *P. marinus*, случаем подозрения на инфекцию *P. marinus* является положительный результат, полученный при использовании ПЦР. Данные положительные результаты должны быть подтверждены Справочной лабораторией МЭБ.

7.2. Определение подтвержденного случая болезни

Подтвержденным случаем *P. marinus* является положительный результат, полученный при использовании мазков гемолимфы, гистологии или культивирования в жидкой тиогликолевой среде, в сочетании с положительным результатом, полученным с помощью ПЦР или гибридизации *in situ* (ISH). Секвенирование области ITS рекомендуется в качестве последнего этапа для подтверждающей диагностики.

8. Список литературы

ABOLLO E., CASAS S.M., CESCHIA G. & VILLALBA A. (2006). Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Mol. Cell. Probes*, **20**, 323–329.

ANDREWS J.D. (1996). History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *J. Shellfish Res.*, **15**, 13–16.

AUDEMARD C., CARNEGIE R.B. & BURRESON E.M. (2008). Shellfish tissues evaluated for *Perkinsus* spp. using the Ray's fluid thioglycollate medium culture assay can be used for downstream molecular assays. *Dis. Aquat. Org.*, **800**, 235–239.

AUDEMARD C., REECE K.S. & BURRESON E.M. (2004). Real-time PCR for the detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6611–6618.

BURRESON E.M. & RAGONE CALVO L.M. (1996). Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Res.*, **15**, 17–34.

BURRESON E.M., RAGONE CALVO L.M., LA PEYRE J.F., COUNTS F. & PAYNTER K.T. Jr. (1994). Acute osmotic tolerance of cultured cells of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsida). *Comp. Biochem. Physiol.*, **109A**, 575–582.

BUSHEK D., DUNGAN C.F. & LEWITUS A.J. (2002a). Serological affinities of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) with some dinoflagellates (Dinophyceae). *J. Euk. Microbiol.*, **49**, 11–16.

BUSHEK D., FORD S.E. & ALLEN S.K. (1994). Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **4**, 201–217.

BUSHEK D., FORD S.E. & CHINTALA M.M. (2002b). Comparison of in vitro-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. *Dis. Aquat. Org.*, **51**, 217–225.

BUSHEK D., HOLLEY R. & KELLY M. (1997). Treatment of *Perkinsus marinus*-contaminated materials. *J. Shellfish Res.*, **16**, 330.

BUSHEK D. & HOWELL T.L. (2000). The effect of UV irradiation on *Perkinsus marinus* and its potential use to reduce transmission via shellfish effluents. Northeastern Regional Aquaculture Center (NRAC) Publication No. 00-008., North Dartmouth, Massachusetts, USA, 4 pp.

CÁCERES-MARTÍNEZ J., VÁSQUEZ-YEOMANS R., PADILLA-LARDIZÁBAL G. & DEL RÍO PORTILLA M.A. (2008). *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *J. Invert. Pathol.*, **99**, 66–73.

CALVO G.W. & BURRESON E.M. (1994). *In vitro* and *in vivo* effects of eight chemotherapeutants on the oyster parasite *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen, and Collier). *J. Shellfish Res.*, **13**, 101–107.

CALVO G.W., LUCKENBACH M.W., ALLEN S.K. & BURRESON E.M. (1999). A comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *J. Shellfish Res.*, **18**, 465–474.

- CALVO G.W., LUCKENBACH M.W., ALLEN S.K. & BURRESON E.M. (2001). A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *J. Shellfish Res.*, **20**, 221–229.
- CASAS S.M., VILLALBA A. & REECE K.S. (2002). Study of the perkinsosis of the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the etiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 51–65.
- DELANEY M.A., BRADY Y. J., WORLEY S.D. & HUELS K.L. (2003). The effectiveness of N-Halamine disinfectant compounds on *Perkinsus marinus*, a parasite of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.*, **22**, 91–94.
- DUNGAN C.F. & HAMILTON R.M. (1995). Use of a tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of *in vitro* conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexan) proliferation. *J. Euk. Microbiol.*, **42**, 379–388.
- DUNGAN C.F., REECE K.S., HAMILTON R.M., STOKES N.A. & BURRESON E.M. (2007). Experimental cross-infections by *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* in three sympatric species of Chesapeake Bay oysters and clams. *Dis. Aquat. Res.*, **76**, 67–75.
- ELSTON R.A., DUNGAN C.F., MEYERS T.R. & REECE K.S. (2004). *Perkinsus* sp. infection risk for manila clams, *Venerupis philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) on the Pacific coast of North and Central America. *J. Shellfish Res.*, **23**, 101–105.
- FAISAL M., LA PEYRE J.F. & ELSAYED E.E. (1999). Bacitracin inhibits the oyster pathogen *Perkinsus marinus* *in vitro* and *in vivo*. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 130–138.
- FISHER W.S. & OLIVER L.M. (1996). A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *J. Shellfish Res.*, **15**, 109–117.
- GAUTHIER J.D., MILLER C.R. & WILBUR A.E. (2006). TaqMan® MGB real-time PCR approach to quantification of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus* spp. in oysters. *J. Shellfish Res.*, **25**, 619–624.
- LA PEYRE J.F., FAISAL M. & BURRESON E.M. (1993). *In vitro* propagation of the protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Euk. Microbiol.*, **40**, 304–310.
- LA PEYRE M.K., NICKENS A.D., VOLETY A.K., TOLLEY G.S. & LA PEYRE J.F. (2003). Environmental significance of freshets in reducing *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica*: potential management applications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **248**, 165–176.
- MACKIN J.G. (1951). Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* Gmelin by *Dermocystidium marinum* (Mackin, Owen and Collier). *Bull. Marine Sci. Gulf Caribb.*, **1**, 72–87.

MOSS J.A., BURRESON E.M. & REECE K.S. (2006). Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. *J. Shellfish Res.*, **25**, 65–72.

RAGONE CALVO L.M., CALVO G.W. & BURRESON E.M. (2003). Dual disease resistance in a selectively bred eastern oyster, *Crassostrea virginica*, strain tested in Chesapeake Bay. *Aquaculture*, **220**, 69–87.

RAY S.M. (1966). A review of the culture method of detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications and precautions. *Proc. Natl Shellfish Assoc.*, **54**, 55–69.

REECE K. & DUNGAN C. (2005). Chapter 5.2. *Perkinsus* sp. infections of marine molluscs. *In*: Fish Health Section Blue Book, suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. Published in CD format by American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.

REECE K.S., DUNCAN C.F. & BURRESON E.M. (2008). Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 237–248.

VILLALBA A., REECE K.S., ORDAS M.C., CASAS S.M. & FIGUERAS A. (2004). Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 411–432.

*

* *

NB: Референтной лаборатории МЭБ по инфекции *Perkinsus marinus* в настоящее время не существует (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/>).

1. Предмет рассмотрения¹

В данной главе инфицирование *Perkinsus olseni* представляет собой заражение *P. olseni*. *Perkinsus atlanticus* является младшим синонимом.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Этиологическим возбудителем является *Perkinsus olseni*.

2.1.2. Выживание вне хозяина

Максимальный период выживания вне хозяина неизвестен, но составляет как минимум несколько месяцев для презооспорангия или для гипноспор (Casas с соавт., 2002b).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Perkinsus olseni – относительно стабилен ввиду толстых стенок своих клеток. Выделенные клетки *P. olseni* погибают в свежей воде в течение 10 минут при комнатной температуре и при обработке хлором, $0,006 \text{ мг мл}^{-1} = 6 \text{ ч/млн}$ (частей на миллион) в течение 30 минут (Goggin с соавт., 1990). Клетки *Perkinsus olseni* в ткани хозяина демонстрируют намного более высокую резистентность к таким обработкам. Выявлено, что ультрафиолетовый свет ($>28,000 \text{ мкWs см}^{-2}$) инактивировал трофозоиты *P. marinus* (Bushek & Howell, 2000), а ультрафиолетовый свет при $60\,000 \text{ мкWs см}^{-2}$, как было выявлено убивает гипноспоры *P. olseni* (Lester & Hayward, 2005).

2.1.4. Жизненный цикл

Жизненный цикл - прямой: от хозяина к хозяину, и все стадии жизни являются инфекционными (Villalba с соавт., 2004).

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды-хозяева

Perkinsus olseni имеет очень широкий круг хозяев. Известные хозяева включают двустворчатых моллюсков *Anadara trapezia*, *Austrovenus stutchburyi*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Tridacna maxima*, *T. crocea*, *Protothaca jadoensis* и

¹ NB: Версия, принятая Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2015 г.

Pitar rostrata (Goggin & Lester, 1995; Villalba с соавт., 2004; Cremonete с соавт., 2005; Park с соавт., 2006; Sheppard & Phillips, 2008); устриц *Crassostrea ariakensis*, и *C. sikamea* (Villalba с соавт., 2004); жемчужниц *Pinctada margaritifera*, *P. martensii*, и *P. fucata* (Goggin & Lester, 1995; Sanil с соавт., 2010); абалонов *Haliotis rubra*, *H. laevigata*, *H. scalaris*, и *H. cyclobates* (Goggin & Lester, 1995). К данному паразиту могут быть восприимчивы и другие виды двустворчатых и брюхоногих, особенно в известном географическом ареале. Особенно восприимчивы члены семейств *Arcidae*, *Malleidae*, *Isognomonidae*, *Chamidae* и *Veneridae*, и селективный отбор образцов у них может выявить присутствие *P. olsenii*, когда в том же месте обитания у представителей других семейств наблюдаются только слабые инфекции.

2.2.2. Восприимчивые стадии хозяина

Все стадии после стадии оседания являются восприимчивыми.

2.2.3. Предрасположенность видов и субпопуляций (вероятность обнаружения)

Существует широкий круг хозяев и степень восприимчивости варьирует (см 2.2.1. выше); интенсивность инфекции повышается с возрастом хозяина.

2.2.4. Целевые органы и инфицированные ткани

Соединительная ткань всех органов и гемоциты.

2.2.5. Персистентное инфицирование пожизненными носителями

Инфицирование *P. olsenii* может быть летальным в зависимости от хозяина и условий окружающей среды. Может происходить персистентное инфицирование пожизненными носителями.

2.2.6. Переносчики

Не требуются, поскольку жизненный цикл - прямой: от хозяина к хозяину.

2.2.7. Известные или подозреваемые дикие водные животные-носители

Известных нет. Lester & Hayward, 2005 исследовали 32 неабалоновых вида моллюсков на острове Тейлор, Южная Австралия, методом культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рея (RFTM) и не выявили инфекций. Превалентность *P. olsenii* у абалонов (*H. rubra*) в данном месте в трех различных выборках варьировала от 26 до 56%.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача прямая: от хозяина хозяину (Villalba с соавт., 2004), и все стадии жизни являются инфекционными.

2.3.2. Превалентность

Превалентность очень вариабельна, в зависимости от хозяина и условий окружающей среды, но часто составляет 100%, по результатам исследования методом гистологии или полимеразной цепной реакции (ПЦР). Ожидается, что у отдельных особей, находящихся под воздействием данного патогена в течение более одного года, превалентность будет выше.

2.3.3. Географическое распространение

Данные паразиты широко распространены во всей тропической части Тихого океана, в Австралии, Норт-Айленде Новой Зеландии, Вьетнаме, Республике Корея, Японии, Китайской Народной Республике, Португалии, Испании, Франции, Италии и Уругвае (Goggin & Lester, 1995; Villalba с соавт., 2004; Cremonese с соавт., 2005). Недавно они были выявлены в Индии (Sanil с соавт., 2010). *Perkinsus* sp., зарегистрированные в Таиланде у волнистой пафии, *Paphia undulate*, почти несомненно являются *P. olseni*, исходя из ДНК последовательностей из внутренних транскрибирующихся спейсерных (ITS) областей паразита. *Perkinsus olseni* неизвестны в Северной Америке.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Инфекции у двустворчатых моллюсков-хозяев могут быть летальными в зависимости от условий окружающей среды, гибель может наступать через один или два года после инфицирования. Инфекции у абалонов в Австралии по видимому не приводят к гибели даже при том, что превалентность может быть высокой (Lester & Hayward, 2005).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Годовой цикл *P. olseni* контролируется температурой. У *R. decussatus* в Испании, интенсивность *P. olseni* инфекции достигала пика весной, поскольку температура повышалась до 15°C, оставалась высокой в течение лета и ранней осени, когда температура была 19–21°C, и затем снижалась в течение зимы и ранней весны, что совпадало с температурами в 9–10°C (Villalba с соавт., 2005). Наивысший уровень смертности хозяев наблюдался ранней осенью во время периода максимальных годовых температур. Солеустойчивость *P. olseni* изучена недостаточно. В Испании во время указанного исследования соленость составляла выше 15 единиц практической солености (psu). Результаты лабораторных исследований с использованием *P. olseni* из культуры (La Peyre с соавт., 2006) позволяют предположить, что оптимальный рост *P. olseni* происходит при 25 psu, и они не являются устойчивыми к солености воды ниже 15 psu.

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Нет.

2.4.2. Фармакотерапия

Циклогексамид, пиреметамин, дефероксамин (DFO) и 2, 2-бипиридил ингибирует *P. olsenii* *in vitro*, а дефероксамин (DFO) ингибирует *P. olsenii* *in vivo*. (Elandalloussi с соавт., 2005). Соединения N-халамин дезинфектанта эффективны против культивированных клеток *P. marinus* в морской воде (Delaney с соавт., 2003), а бацитрацин, как было продемонстрировано, сокращает количество, но не уничтожает *P. marinus* у инфицированных хозяев-устриц (Faisal с соавт., 1999). Эти соединения могут быть эффективными при использовании их против *P. olsenii*, но сравнительное исследование не проводилось.

2.4.3. Иммуностимуляция

Нет.

2.4.4. Выведение резистентной популяции

Отсутствует для *P. olsenii*, хотя была продемонстрирована некоторая эффективность селективного разведения для *P. marinus*.

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

Нет.

2.4.6. Блокирующие агенты

Нет.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Нет сведений о том, что *Perkinsus olsenii* инфицируют икринки или личинки своих хозяев, но клетки паразита могут присутствовать в межклеточном пространстве. Соединения N-халамин дезинфектанта продемонстрировали свою эффективность при их использовании против *P. marinus* без оказания явного воздействия на личинок устриц (Delaney с соавт., 2003), и данные соединения, возможно, также полезно использовать против *P. olsenii*.

2.4.8. Общие практики ведения хозяйства General husbandry practices

Низкая плотность заселения может снижать степень передачи патогена.

3. Отбор образцов

3.1. Выбор отдельных образцов

Следует отбирать образцы у живых или только что умерших особей.

3.2. Сохранение образцов для представления для исследования

Для проведения диагностики методом RFTM, образцы должны быть свежими. Для

гистологии самым лучшим консервантом является фиксирующий раствор Дэвидсона (уксусная кислота, формальдегид, спирт) (Davidson's AFA), но также допускается использование 10% забуференного формалина или других стандартных фиксирующих растворов. Для проведения ПЦР анализов образцы необходимо сохранять в 95-100% этаноле или в неденатурированном спирте.

3.3. Объединение образцов в пулы

Допускается объединение в пулы очень маленькой молодежи (5-10 в зависимости от размера) для проведения ПЦР анализов.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Для исследования двустворчатых моллюсков методом RFTM обычно используют части жабр, мантию и прямую кишку. У абалонов культивируют срезы тканей, которые включают жабры, мантию и ногу. Для гистологии используют срез в 5 мм толщиной висцеральной массы, которая включает пищеварительную железу, жабры и мантию. Для ПЦР лучшими тканями являются жабры и ткани мантии.

3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

Ректальная ткань не является достоверной для ПЦР анализов из-за присутствия ингибиторов.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Клиническими признаками являются погибшие или «зевающие» моллюски, но данные клинические признаки не являются специфичными для *P. olseni* инфекции.

4.1.2. Изменения в поведении

Некоторые особи двустворчатых моллюсков на поздней стадии заражения могут медленно закрывать свои створки, но данные изменения не являются специфичными для *P. olseni*.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Макроскопические признаки представляют собой тонкую водянистую ткань, бледную пищеварительную железу и узелки в мантии и жабрах некоторых хозяев, но данные признаки не являются специфичными для инфекции *P. olseni*.

4.2.2. Клиническая химия

Данные отсутствуют.

4.2.3. Микроскопическая патология

В зафиксированных срезах наблюдаются крупные многоочаговые поражения в соединительной ткани, содержащие клетки *P. olsenii*. В ходе большинства инфекций наблюдается инфильтрация гемоцитов (гемоцитоз). У двустворчатых моллюсков-хозяев, клетки *P. olsenii* часто инкапсулированы в толстый слой эозинофильного материала, образованного в результате дегрануляции гемоцитов (Villalba с соавт., 2004).

4.2.4. Влажные препараты

Не рекомендуются в качестве клинического метода.

4.2.5. Мазки

Не рекомендуются в качестве клинического метода.

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

Ультраструктурные данные показывают, что лизис гемоцитов и слияние метахроматических гранул приводят к образованию узелка, который заключает в себе трофозоиты (Sagrista с соавт., 1995).

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

Не рекомендуются.

4.3.1.1.2. Мазки

Использование мазков полезно только при развитой инфекции.

4.3.1.1.2.1. Образцы, которые следует отбирать

Живые хозяева.

4.3.1.1.2.2. Техническая процедура

Отбирают кровь у хозяина иглой и шприцем, внедренным в мускул-замыкатель устриц и двустворчатых моллюсков или цефалический синус абалона. Помещают каплю гемолимфы на стеклянное предметное стекло и размазывают. Обследуют при $\times 100$ – 400 после

окрашиванию по Гимза.

4.3.1.1.2.3. Положительные/отрицательные контроли

Нет.

4.3.1.1.2.4. Уровни валидации

4.3.1.1.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Очень низкая специфичность при неизвестной чувствительности.

4.3.1.1.2.4.2. Золотой стандарт

Степень чувствительности не валидирована по сравнению с культивированием в жидкой тиогликолевой среде (анализ нагрузки во всем организме [Fisher & Oliver, 1996]).

4.3.1.1.2.5. Интерпретация результатов

Наличие сферических, моноклеарных клеток 5–15 мкм в диаметре с большой вакуолью и эксцентричным ядром указывает на присутствие *Perkinsus* sp., но данный метод не является видоспецифичным.

4.3.1.1.2.6. Наличие коммерческих тестов

В настоящее время в продаже имеются наборы быстрого окрашивания.

4.3.1.1.3. Зафиксированные срезы

4.3.1.1.3.1. Образцы, которые следует отбирать

Живые или только что погибшие моллюски.

4.3.1.1.3.2. Техническая процедура

Срезы тканей, которые включают пищеварительную железу, жабры и мантию, следует фиксировать в течение 24 часов в фиксирующем AFA растворе Дэвидсона или другом стандартном гистологическом фиксирующем растворе с последующей обычной обработкой для гистологии в парафине и окрашивания гематоксилином и эозином. Обследование осуществляют при возрастающем до $\times 400$ увеличении.

4.3.1.1.3.3. Положительные контроли

Рекомендуется использовать такие контроли, их можно получить из Референтной лаборатории МЭБ в зависимости от хозяина.

4.3.1.1.3.4. Уровни валидации

4.3.1.1.3.4.1. Специфичность и чувствительность

Видовая специфичность очень низкая, а чувствительность – хорошая при умеренной до тяжелой формах инфекции, но низкая – при инфекциях низкой интенсивности.

4.3.1.1.3.4.2. Золотой стандарт

Культивирование в жидкой тиогликолевой среде (анализ нагрузки во всем организме [Fisher & Oliver, 1996]) является золотым стандартом, хотя он не является видоспецифичным. Метод гистологии официально не валидирован в сравнении с культивированием в жидкой тиогликолевой среде, хотя недавнее исследование показало, что гистология является менее чувствительной (Balseiro с соавт., 2010).

4.3.1.1.3.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является присутствие сферических одноядерных клеток приблизительно от 5 до 15 мкм в диаметре с большой вакуолью и эксцентрически расположенным ядром с выступающим ядрышком. Многоядерные схизонты (делящиеся формы) часто сопровождают одноядерные трофозоиты. Клетки могут быть фагоцитированы гемоцитами хозяина. Клетки *Perkinsus olseni* дают слегка базофильное окрашивание.

У восприимчивых видов-хозяев, в регионе, где, как известно, присутствуют только *P. olseni*, положительный результат представляет собой предварительное свидетельство о наличии *P. olseni* инфекции, но он должен быть подтвержден результатами гибридизации *in-situ* (ISH) или секвенирования ДНК ввиду возможного присутствия других видов *Perkinsus*.

4.3.1.1.3.6. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тесты отсутствуют.

4.3.1.1.4. Метод культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рея (RFTM)

Обычно для надзора за *P. olseni* используется инкубация в тиогликоле. Данный метод является простым, недорогим и очень чувствительным, но он не является видоспецифичным. Трофозоиты *P. olseni* будут увеличиваться в ткани хозяина при культивировании в течение не менее 5 дней в жидкой тиогликолевой среде, содержащей декстрозу, которая обогащена антибиотиками (пенициллин, стрептомицин) и противогрибковым соединением (нистатин) для уменьшения роста бактерий и грибов. При мацерации ткани после культивирования для обеспечения проникновения водного раствора йода (раствор Люголя), увеличенные трофозоиты (гипноспоры или презооспорангий по старой терминологии) без труда поглощают раствор Люголя и становятся хорошо видимыми при низкой мощности из-за их обычно иссиня-черного

окрашивания и сферической формы.

4.3.1.1.4.1. Образцы, которые следует отбирать

Живые или только что погибшие моллюски.

4.3.1.1.4.2. Техническая процедура

4.3.1.1.4.2.1. Анализ тканей (Ray, 1966)

Отсекают образцы тканей размером приблизительно 5–10 мм, отдавая предпочтение ректальным тканям, тканям жабр и мантии у устриц и двустворчатых моллюсков и мышцам аддуктора или ноги или мантии у абалона и помещают в тест-пробирки, содержащие тиогликолевую среду (тиогликолевая среда, содержащая, декстрозу, 14,6 г; NaCl, 10,0 г; стерильная дистиллированная вода (dH₂O), 485 мл). В одноразовые тест-пробирки вносят по 9,5 мл, затем данные пробирки автоклавируют в течение 15 минут при давлении 1,2 кг см⁻². Автоклавированный раствор можно хранить в пробирках в течение периода до 3 недель. В целях недопущения переноса инструменты для отсечения следует промывать в 95% этаноле и фламбировать после окончания работы с одним хозяином и перед началом работы с другим хозяином. Рекомендуется использовать следующие противогрибковые препараты/антибиотики: 500 Е мл⁻¹ пенициллина G и 500 Е мл⁻¹ дегидрострептомицина в среде (пенициллин, 3,13 г; стрептомицин, 6,55 г; 500 мл dH₂O; заморозить в 50 мл аликвотах, добавить 0,5 мл в каждую пробирку), и 50 мкл микостатина (нистатин) на каждую пробирку. Вместо пенициллина/стрептомицина можно использовать хлоромецитин. Пробирку закрывают пробкой из вспененной резины или пробкой из хлопка. Инкубируют при 22–25°C в течение 5 - 7 дней, в темноте. После инкубации собирают фрагменты ткани и измельчают их лезвием скальпеля на стеклянном предметном стекле, добавляют одну каплю йодного раствора Люголя (исходный йодный раствор Люголя: йодид калия, 6,0 г; йод, 4,0 г; dH₂O, 100 мл. Рабочий йодный раствор Люголя: dH₂O, 30,0 мл; исходный раствор Люголя, 15,0 мл) и данный препарат накрывают покровным стеклом и оставляют для усадки на 10 минут. Препараты исследуют свежими.

Анализ нагрузки во всем организме (Fisher & Oliver, 1996): целого хозяина, разрезанного на кусочки по 2–5 мм, помещают в жидкую тиогликолевую культуральную среду и инкубируют в соответствии с процедурой анализа тканей, описанной выше. Если организмы-хозяева слишком большие для того, чтобы использовать целый организм хозяина, то можно использовать выбранную целевую ткань. Данный раствор центрифугируют при 1500 g в течение 10 минут, супернатант удаляют. Добавляют 2 М NaOH (20 мл г⁻¹ ткани) и раствор инкубируют при 60°C в течение

2–6 часов до расщепления ткани. Раствор центрифугируют при 1500 *g* в течение 10 минут, супернатант удаляют. Раствор промывают три раза в деионизированной воде, осадок ресуспендируют в 1 мл рабочего йодного раствора Люголя и производят подсчет клеток. Возможно понадобится приготовить серийные разведения для снижения общего количества клеток до количества, поддающегося контролю.

4.3.1.1.4.3. Уровни валидации

4.3.1.1.4.3.1. Специфичность и чувствительность

Специфичность является низкой, поскольку данный метод не позволяет дифференцировать виды *Perkinsus*. Чувствительность является высокой, особенно для анализа нагрузки во всем организме (Bushek с соавт., 1994).

4.3.1.1.4.3.2. Золотой стандарт

В качестве метода для надзора рекомендуется использовать метод культивирования в жидкой тиогликолевой среде (анализ ткани). Анализ ткани не валидирован в сравнении с анализом нагрузки во всем организме в отношении *P. olseni*, но в отношении *P. marinus* анализ ткани, как было выявлено, является менее чувствительным (Bushek с соавт., 1994). Недавнее исследование, в ходе которого производилось сравнение RFTM метода анализа тканей с методом гистологии и недавно разработанным анализом методом ПЦР, показало, что RFTM анализ является наиболее чувствительным из этих трех анализов (Balseiro с соавт., 2010).

4.3.1.1.4.3.4. Интерпретация результатов

Во время инкубации культивируемые паразиты увеличиваются в размерах с 5–15 до 50–70 мкм. Клетки *Perkinsus* spp. являются сферическими и их стенки окрашены обычно в синий или иссиня-черный цвет йодным раствором Люголя (Ray, 1966).

У восприимчивых видов-хозяев из известного круга хозяев *P. olseni*, положительный результат является предполагаемым свидетельством наличия *P. olseni* инфекции, но он должен быть подтвержден результатами видоспецифичной ПЦР, ISH или ДНК секвенирования ITS (внутренней транскрибирующейся спейсерной) области, ввиду возможного присутствия других видов *Perkinsus*. Если не производится сохранение параллельных образцов для проведения молекулярной диагностики, ДНК паразита можно экстрагировать и амплифицировать с помощью ПЦР непосредственно из положительных тиогликолевых препаратов (Audemard с соавт., 2008).

4.3.1.1.4.3.5. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тест-наборы отсутствуют.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культуры клеток/искусственные среды

Клетки *Perkinsus* spp. без труда поддаются культивированию в разнообразных средах (Casas с соавт., 2002a; Dungan & Hamilton, 1995; La Peyre с соавт., 1993). Культуральную среду обычно инокулируют тканями сердца, гемолимфой или тканями жабр. Были проведены сравнительные исследования имеющихся в продаже сред для культивирования *P. marinus*, но не *P. olsenii* (Dungan & Hamilton, 1995). Изолят *P. marinus* обычно демонстрировал более быструю пролиферацию в 1:1 DME/Ham's F-12 среде.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

Были получены поликлональные антитела на компонент клеточной стенки *P. olsenii* (Montes с соавт., 2002), но они также связываются с *P. marinus*. Диагностический анализ на основе данных антител не разработан.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Анализ на наличие микроорганизмов рода *Perkinsus* (ПЦР или гибридизация *in situ* (ISH))

В целях надзора с помощью ПЦР рекомендуется, сначала проводить ПЦР анализы на наличие микроорганизмов рода *Perkinsus*, а затем образцы, показавшие положительные результаты, следует тестировать с помощью *P. olsenii*-специфичного анализа. Учитывая последовательности, имеющиеся в GenBank базе данных Национального центра (США) по информации в сфере биотехнологии о меж- и внутриспецифичной вариации в последовательности ITS области известно намного больше, чем о таковых нетранскрибирующейся спесейрной (NTS) области генов комплекса рРНК *Perkinsus* sp. Поэтому, чтобы быть более уверенным, что будут обнаружены различные штаммы *P. olsenii*, рекомендуется использовать ПЦР праймеры, которые нацелены на ITS область. Для метода ISH были созданы зонды, которые нацелены на небольшую субъединицу (SSU) генов комплекса рРНК (Elston с соавт., 2004). Кроме того, был разработан анализ методом ПЦР в реальном времени для выявления микроорганизмов рода *Perkinsus* для использования на тканях хозяина (Gauthier с соавт., 2006). Он был протестирован только с использованием *P. marinus*, *P. olsenii* и *P. chesapeakei*, и продемонстрировал более высокую чувствительность в ходе ограниченной валидации в сравнении с RFTM анализом. Данный анализ необходимо протестировать более тщательно на специфичность, но он может быть полезным для лабораторий, которые имеют необходимое оборудование.

4.3.1.2.3.1.1. Специфичная для рода *Perkinsus* полимеразная цепная реакция

4.3.1.2.3.1.1.1. Образцы, которые следует отбирать

Живые и только что погибшие моллюски, Асептическим образом отсекают кусочки ткани по 2–3 мм² от жабр и мантии и помещают в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки, содержащие 95–100% этанол. Инструменты, используемые для отсечения, следует фламбировать перед отбором следующего образца для недопущения перекрестной контаминации.

4.3.1.2.3.1.1.2. Техническая процедура

Экстракцию ДНК производят с помощью протеиназы К в течение ночи при 56°C и методом спин-колонок с применением имеющихся в продаже наборов. Рекомендуются использовать специфичные для рода *Perkinsus* ПЦР праймеры, указанные в работе Audemard с соавт., 2004. Прямой праймер, PerkITS-85 (5'-CCG-CTT-TGT-TTG-GAT-CCC-3'), и обратный праймер, PerkITS-750 (5'-ACA-TCA-GGC-CTT-CTA-ATG-ATG-3'), нацелены на ITS область генов комплекса рРНК. Данные праймеры амплифицируют 703 п.н.-продукт и могут быть использованы для обнаружения ДНК любого известного и возможно неизвестного вида *Perkinsus*, кроме *P. qugwadi*. Каждая ПЦР реакционная смесь содержит: 20 mM Tris/HCl (pH 8.4); 50 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 0,2 mM каждой dNTP, каждого праймера по бычьего сывороточного альбумина (BSA), и 0,5 мкл геномной ДНК (10–50 нг всего). Условия амплификации являются следующими: первоначальная денатурация при 95°C в течение 4 минут с последующими 40 циклами при 95°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1 минуты, 72°C в течение 1 минуты, с конечным удлинением при 72°C в течение 10 минут. После амплификации, 4 мкл ПЦР продукта визуализируют на 2% агарозном геле.

4.3.1.2.3.1.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Использование данных контролей является обязательным. Положительный контроль представляет собой геномную ДНК любого моллюска, инфицированного *Perkinsus* sp. (кроме *P. qugwadi*). Отрицательные контроли – это либо анализы без ДНК, либо анализы с использованием неинфицированных моллюсков.

4.3.1.2.3.1.1.4. Уровни валидации

- Специфичность и чувствительность

ПЦР праймеры для рода *Perkinsus* были протестированы на

всеохватность против всех известных видов *Perkinsus*, и протестированы на специфичность против разнообразных гаплоспоридий и паразитических и непаразитических динофлагеллятов (Реес с соавт., 2005). Сравнение чувствительности анализа с таковой при анализе RFTM методом не производилось.

4.3.1.2.3.1.1.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является присутствие в агарозном геле полосы надлежащего размера (703 п.н.), при том что все отрицательные контроли дают отрицательные результаты, а все положительные контроли дают положительные результаты.

4.3.1.2.3.1.2. Специфичная для рода *Perkinsus* genus гибридизация *in situ*

4.3.1.2.3.1.2.1. Образцы, которые следует отбирать

Приготовление фиксированных срезов следует производить в соответствии с процедурой (4.3.1.1.3), описанной выше, кроме того, что срезы тканей необходимо помещать на положительно заряженные стеклянные предметные стекла или стекла, с нанесенным на них 3-аминопропил-триэтоксиланом, без окрашивания. Срезы депарафинизируют в ксилене в течение 10 минут, а затем регидратируют в серии спиртов. Срезы промывают дважды в течение 5 минут забуференным фосфатом солевым раствором (ФБР).

4.3.1.2.3.1.2.2. Техническая процедура

Для рода *Perkinsus* был создан специфичный ДНК зонд, который нацелен на ген малой субъединичный рРНК (Elston с соавт., 2004): Perksp700DIG (5'-CGC-ACA-GTT-AAG-TRC-GTG-RGC-ACG-3'). Данный зонд должен быть 5' конец-меченным дигоксигенином.

Срезы тканей обрабатывают 125 мкг мл⁻¹ проназой в ФБР, при 37°C в течение 30 минут. Затем реакцию останавливают посредством промывания срезов в ФБР с 0,2% глицином в течение 5 минут. После этого срезы помещают в 2 × SSC (стандартный цитратно-солевой буфер; 20× SSC = 3 M NaCl; 0,3 M Na-цитрат; pH 7,0) на 10 минут.

Срезы подвергают предгибридации в течение 1 часа при 42°C в предгибризационном растворе (4× SSC, 50% формамид, 5× раствора Денхадта, 0,5 мг мл⁻¹ дрожжевая тРНК, и 0,5 мг мл⁻¹ термо-денатурированной ДНК спермы лосося) во влажной камере.

Затем предгибризационный раствор заменяют предгибризационным буфером, содержащие 7 нг мкл⁻¹ меченного дигоксигенином зонда для рода *Perkinsus*. Срезы накрывают ISH пластиковыми покровными стеклами и помещают в термостат при 90°C в течение 12 минут. Затем покровные стекла охлаждают на льду в течение 1 минуты перед гибридизацией в течение ночи при 42°C во влажной камере.

Срезы промывают два раза в течение 5 минут, каждый раз в 2× SSC при комнатной температуре, дважды в течение 5 минут, каждый раз в 1× SSC при комнатной температуре, и дважды в течение 10 минут, каждый раз в 0,5× SSC при 42°C. Затем срезы помещают в Буфер 1 (100 mM Tris; pH 7,5; 150 mM NaCl) в течение 1-2 минут.

Срезы помещают в Буфер 1 (см. выше), обогащенный 0,3% Triton X-100 и 2% овечьей сывороткой, на 30 минут. Конъюгат анти-дигоксигенин антитела и щелочной фосфатазы разводят 1/500 (или в соответствии с рекомендациями изготовителя) в Буфере 1, обогащенном 0,3% Triton X-100 и 1% овечьей сывороткой и наносят на срезы тканей. Срезы накрывают покровными стеклами для гибридизации *in situ* и инкубируют в течение 3 часов при комнатной температуре во влажной камере.

Покровные стекла промывают дважды в Буфере 1 в течение 5 минут, каждый раз, и дважды в Буфере 2 (100 mM Tris; pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂) в течение 5 минут каждый раз. Затем покровные стекла помещают в раствор для появления окрашивания (337,5 мкг мл⁻¹ нитросинего тетразолия, 175 мкг мл⁻¹ 5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфата р-толуидиновой соли, 240 мкг мл⁻¹ левамизоля в Буфере 2) в течение 2 часов в темноте. Цветовую реакцию останавливают промыванием в ТЕ буфере (10 mM Tris, pH 8,0; 1 mM ЭДТА [этилен диамин тетрауксусная кислота]).

Затем предметные стекла ополаскивают в стерильной дистиллированной воде (dH₂O). Срезы подвергают контрастному окрашиванию бисмарк коричневым Y, ополаскивают в dH₂O, и накрывают покровными стеклами с использованием водной заливочной среды.

4.3.1.2.3.1.2.3. Положительные/отрицательные контроли

Включение данных контролей является обязательным. Положительные контроли представляют собой срезы тканей от любого моллюска, инфицированного *Perkinsus* sp. Отрицательные контроли представляют собой либо анализы без зонда, либо анализы с использованием неинфицированных устриц.

4.3.1.2.3.1.2.4. Уровни валидации

- Специфичность и чувствительность

ДНК зонд для рода *Perkinsus* был протестирован на специфичность против разнообразных видов *Perkinsus species*, гаплоспоридий и паразитических динофлагеллятов (Elston с соавт., 2004). Чувствительность выше, чем таковая метода гистологии в парафине, но не было произведено сравнение исследования с помощью данного зонда с RFTM методом.

4.3.1.2.3.1.2.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является присутствие лилово-черного мечения клеток паразита при условии, что все отрицательные контроли дают отрицательные результаты, а все положительные контроли дают положительные результаты.

4.3.1.2.3.2. Анализы на наличие *Perkinsus olseni* (ПЦР и гибридизация *in situ*)

4.3.1.2.3.2.1. *Perkinsus olseni*-специфичная полимеразная цепная реакция

Для *P. olseni* были разработаны ПЦР праймеры, нацеленные на NTS область и на ITS область генов комплекса рРНК. Хотя праймеры, нацеленные на NTS область продемонстрировали хорошую видовую специфичность, очень мало известно о вариации внутри вида в отношении NTS области, и имеется риск получения ложно положительных результатов. Вариация последовательности внутри ITS области охарактеризована более широко (см. базу данных GenBank), и праймеры, нацеленные на ITS область, более тщательно протестированы на специфичность. Поэтому, рекомендуется использовать праймеры, которые нацелены на ITS область. В данной главе представлена самая последняя версия специфичного для *P. olseni* ITS анализа. Рекомендуется сначала проводить надзор с использованием ITS анализа на наличие микроорганизмов рода *Perkinsus*, а затем проводить специфичный анализ. Разработан анализ методом ПЦР- полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. (RFLP), который может быть полезен для специфичной диагностики *P. olseni* (Abollo с соавт., 2006), хотя он не был протестирован на специфичность по отношению ко всем известным видам *Perkinsus*.

4.3.1.2.3.2.1.1. Образцы, которые следует отбирать

Живые или только что погибшие моллюски. Асептически иссекают кусочки ткани по 2–3 мм² от жабр и мантии и помещают в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки, содержащие 95–100% этанол. Инструменты для отсечения следует фламбировать после отбора предыдущего образца и перед отбором следующего

образца для недопущения перекрестной контаминации.

4.3.1.2.3.2.1.2. Техническая процедура

Экстракцию ДНК производят с помощью протеиназы К в течение ночи при 56°C и методом спин-колонок с применением имеющихся в продаже наборов. Были разработаны ПЦР праймеры, нацеленные на ITS область генов комплекса рРНК *P. olseni* (Moss с соавт., 2006): прямой праймер, P_{olsITS-140F} (5'-GAC-CGC-CTT-AAC-GGG-CCG-TGT-T-3'), и обратный праймер, P_{olsITS-600R} (5'-GGR-CTT-GCG-AGC-ATC-CAA-AG-3'). Размер амплифицированного продукта составляет примерно 450 п.н.. ПЦР реакционные смеси содержат ПЦР буфер в концентрации 20 мМ Tris/HCl (pH 8,4); 50 мМ KCl; 1,5 мМ MgCl₂; 0,2 мМ каждой dNTP, каждый праймер по 0,1 мкМ; 0,025 Е мкл⁻¹ *Taq* полимеразы; 0,05 мг мл⁻¹ бычьего сывороточного альбумина и 0,5 мкл геномной ДНК (~10–50 нг) в общем объеме, равном 25 мкл. Амплификации проводят с первоначальной денатурацией при 95°C в течение 4 минут с последующими 40 циклами: при 94°C в течение 1 минуты, 62°C в течение 1 минут, 65°C в течение 3 минут, с этапом итогового удлинения при 65°C в течение 10 минут.

ПЦР продукты подвергают электрофорезу в 2% агарозных (в 1× TAE или TBE) гелях, окрашивают этидиумом бромидом и визуализируют с помощью ультрафиолетового света.

4.3.1.2.3.2.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Использование данных контролей является обязательным. Положительными контролями являются ДНК из очищенных клеток *P. olseni*, или геномная ДНК сильно инфицированных хозяев. Отрицательными контролями является отсутствие реакций целевой ДНК.

4.3.1.2.3.2.1.4. Уровень валидации

- Специфичность и чувствительность

Праймеры к ITS области были протестированы на специфичность против *P. marinus*, *P. chesapeaki*, *P. mediterraneus* и *P. honshuensis* (Moss, 2007; Moss с соавт., 2006). Чувствительность – высокая со способностью выявлять одну клетку *P. olseni* в 30 мг ткани устрицы, но ошибка подвыборки при легких локализованных инфекциях может приводить к получению ложно отрицательных результатов.

- Золотой стандарт

ITS ПЦР анализ на наличие *P. olseni* был подвергнут ограниченной валидации в сравнении с RFTM анализом (анализ ткани) и, как было выявлено, имеет более высокую степень чувствительности (Moss, 2007).

4.3.1.2.3.2.1.5. *Интерпретация результатов*

Положительным результатом является продукт ПЦР амплификации соответствующего размера (455 п.н.), при условии что все отрицательные контроли дают отрицательные результаты, а все положительные контроли дают положительные результаты.

4.3.1.2.3.2.1.6. *Наличие коммерческих тестов*

Коммерческие тест-наборы отсутствуют.

4.3.1.2.3.2.2. *Perkinsus olseni-специфичная гибридизация in situ (ISH)*

4.3.1.2.3.2.2.1. *Образцы, которые следует отбирать*

Приготовление фиксированных срезов следует производить в соответствии с процедурой (4.3.1.1.3), описанной выше, кроме того, что срезы ткани должны быть помещены на положительно заряженные стеклянные предметные стекла или предметные стекла, на которые нанесен 3-аминопропил-триэтоксилан без окрашивания. Срезы депарафинизируют в ксилене в течение 10 минут, а затем регидратируют в серии спиртов. Срезы промывают дважды в течение 5 минут в ФБР.

4.3.1.2.3.2.2.2. *Технические процедуры*

Был создан ДНК зонд, нацеленный на большую субъединицу (LSU) рРНК гена *P. olseni* (Moss с соавт., 2006) (PolsLSU-464DIG 5'-CTC-ACA-AGT-GCC-AAA-CAA-CTG-3'). Данный зонд должен быть меченным на концах диоксигенином. Процедуры ISH – такие же, как процедуры, используемые для зонда для рода *Perkinsus*, изложенные выше.

4.3.1.2.3.2.2.3. *Положительные/отрицательные контроли*

Использование данных контролей является обязательным. Положительными контролями являются срезы ткани, отобранные у любого восприимчивого хозяина, инфицированного *P. olseni*. Отрицательными контролями являются либо анализы без зонда, либо анализы с использованием неинфицированных устриц.

4.3.1.2.3.2.2.4. *Уровень валидации*

- *Специфичность и чувствительность*

ДНК зонд для *P. olseni* был протестирован против разнообразных видов *Perkinsus species* (Moss, 2007; Moss с соавт., 2006), включая *P. marinus*, *P. chesapeakei*, *P. mediterraneus*, и *P. honshuensis*. Степень чувствительности – выше, чем таковая метода гистологии в парафине, но не было произведено сравнение анализа с использованием данного зонда с RFTM методом.

4.3.1.2.3.2.2.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является присутствие лилово-черного мечения клеток паразита, при условии что все отрицательные контроли дают отрицательные результаты, а все положительные контроли дают положительные результаты.

4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

Очистку *Perkinsus olseni* можно произвести посредством создания клональных культур.

4.3.2. Серологические методы

Не применяются.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для целевого надзора и диагностики *Perkinsus olseni* указаны в таблице 5.1. Используемые в таблице обозначения означают: а = данный метод является рекомендованным методом ввиду его наличия, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = данный метод применяется в некоторых ситуациях, но его стоимость, точность или другие факторы значительно ограничивают его применение; и d = данный метод в настоящее время не рекомендуется использовать для этой цели. Данные рекомендации в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает аспекты достоверности, чувствительности, специфичности и полезности. Хотя не все тесты, обозначенные, как категория а или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются без получения сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор			Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	Ювенильная стадия	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	d	d	d	d
Мазки гемолимфы	d	c	c	c	d
Гистопатология	b	b	b	b	d
RFTM, анализ тканей¹	d	a	a	b	d
RFTM, анализ нагрузки на весь организм¹	d	c	c	c	d
ПЦР	a	b	b	a ²	b ²
In-situ ДНК зонды	d	b	b	b	a ²

Секвенирование	d	d	d	d	b

1. Данный метод не является видоспецифичным, но может с высокой степенью достоверности использоваться у хозяев/в районах, где присутствует или доминирует только один вид *Perkinsus*.
2. Следует использовать только, когда инфекция визуализирована при исследовании мазков методом RFTM или гистологии.

RFTM = Метод культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рея;

ПЦР= полимеразная цепная реакция.

6. Тест(-ты), рекомендованные для целевого надзора в целях объявления свободы от *Perkinsus olseni* инфекции

Для целевого надзора с целью объявления свободы от *P. olseni* инфекции следует использовать ПЦР анализы в комбинации с RFTM анализами ткани или, если возможно, анализами нагрузки на весь организм.

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

У известных восприимчивых видов в известном географическом ареале *P. olseni*, подозрительным случаем инфекции *P. olseni* является положительный результат, полученный при исследовании одним из следующих методов: исследование мазков гемолимфы, гистология, культивирование в жидкой тиогликолевой среде или ПЦР. У других видов-хозяев или вне известного ареала *P. olseni*, подозрительным случаем является положительный результат, полученный при исследовании методом ПЦР. Такие подозрительные случаи должны отправляться в Референтную лабораторию МЭБ для подтверждения.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Подтвержденным случаем *P. olseni* является положительный результат при исследовании мазков гемолимфы, методом гистологии или культивирования в жидкой тиогликолевой среде вместе с положительным результатом, полученным при исследовании методом ПЦР или гибридизации in situ (ISH). В качестве итогового этапа для проведения подтверждающей диагностики рекомендуется проводить секвенирование ITS области.

8. Список литературы

ABOLLO E., CASAS S.M., CESCHIA G. & VILLALBA A. (2006). Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Mol. Cell. Probes*, **20**, 323–329.

AUDEMARD C., CARNEGIE R.B. & BURRESON E.M. (2008). Shellfish tissues evaluated for *Perkinsus* spp. using the Ray's fluid thioglycollate medium culture assay can be used for downstream molecular assays. *Dis. Aquat. Org.*, **800**, 235–239.

- AUDEMARD C., REECE K.S. & BURRESON E.M. (2004). Real-time PCR for the detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6611–6618.
- BALSEIRO P., MONTES J., FERNÁNDEZ CONCHAS R., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2010). Comparison of diagnostic techniques to detect the clam pathogen *Perkinsus olseni*. *Dis. Aquat. Org.*, **90**, 143–151.
- BUSHEK D., FORD S.E. & ALLEN S.K. (1994). Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **4**, 201–217.
- BUSHEK D. & HOWELL T.L. (2000). The effect of UV irradiation on *Perkinsus marinus* and its potential use to reduce transmission via shellfish effluents. Northeastern Regional Aquaculture Center (NRAC) Publication No. 00-008, North Dartmouth, Massachusetts, USA, 4 pp.
- CASAS S.M., LA PEYRE J.F., REECE K.S., AZEVEDO C. & VILLALBA A. (2002a). Continuous *in vitro* culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 217–231.
- CASAS S.M., VILLALBA A. & REECE K.S. (2002b). Study of the perkinsosis of the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the etiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 51–65.
- CREMONTE F., BALSEIRO P. & FIGUERAS A. (2005). Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 85–90.
- DELANEY M.A., BRADY Y.J., WORLEY S.D. & HUELS K.L. (2003). The effectiveness of N-halamine disinfectant compounds on *Perkinsus marinus*, a parasite of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.*, **22**, 91–94.
- DUNGAN C.F. & HAMILTON R.M. (1995). Use of a tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of *in vitro* conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexan) proliferation. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **42**, 379–388.
- ELANDALLOUSSI L.M., LEITE R.B., RODRIGUES P.M., AFONSO R., NUNES P.A. & CANCELA M.L. (2005). Effect of antiprotozoal drugs on the proliferation of the bivalve parasite *Perkinsus olseni*. *Aquaculture*, **243**, 9–17.
- ELSTON R.A., DUNGAN C.F., MEYERS T.R. & REECE K.S. (2004). *Perkinsus* spp. infection risk for manila clams, *Venerupis philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) on the Pacific coast of North and Central America. *J. Shellfish Res.*, **23**, 101–105.
- FAISAL M., LA PEYRE J.F. & ELSAYED E.E. (1999). Bacitracin inhibits the oyster pathogen

Perkinsus marinus in vitro and in vivo. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 130–138.

FISHER W.S. & OLIVER L.M. (1996). A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *J. Shellfish Res.*, **15**, 109–117.

GAUTHIER J.D., MILLER C.R. & WILBUR A.E. (2006). TaqMan® MGB real-time PCR approach to quantification of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus* spp. in oysters. *J. Shellfish Res.*, **25**, 619–624.

GOGGIN C.L. & LESTER R.J.G. (1995). *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, **46**, 639–646.

GOGGIN C.L., SEWELL K.B. & LESTER R.J.G. (1990). Tolerances of *Perkinsus* spp. (Protozoa, Apicomplexa) to temperature, chlorine and salinity. *J. Shellfish Res.*, **9**, 145–148.

LA PEYRE M., CASAS S. & LA PEYRE J. (2006). Salinity effects on viability, metabolic activity and proliferation of three *Perkinsus* species. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 59–74.

LA PEYRE J.F., FAISAL M. & BURRESON E.M. (1993). *In vitro* propagation of the protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **40**, 304–310.

LESTER R.J.G. & HAYWARD C.J. (2005). Control of *Perkinsus* disease in abalone. Fisheries Research and Development Corporation Project 2000/151 Final Report. University of Queensland, Brisbane, Australia, 50 pp.

MONTES J.F., DURFORT M., LLADO A. & GARCIA VALERO J. (2002). Characterization and immunolocalization of a main proteinaceous component of the cell wall of the protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Parasitology*, **124**, 477–484.

MOSS J.A. (2007). Characterization of exotic pathogens associated with the suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. Ph.D. Dissertation. Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary, Gloucester Point, Virginia, USA, 230 pp.

MOSS J.A., BURRESON E.M. & REECE K.S. (2006). Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. *J. Shellfish Res.*, **25**, 65–72.

PARK K.I., NGO T.T., CHOI S.D., CHO M. & CHOI K.S. (2006). Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jedgeensis* in Korean waters. *J. Invertebr. Parasitol.*, **93**, 81–87.

RAY S.M. (1966). A review of the culture method of detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications and precautions. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.*, **54**, 55–69.

REECE K., DUNGAN C. & (2005). Chapter 5.2. *Perkinsus* sp. infections of marine molluscs. *In*: Fish Health Section Blue Book, suggested procedures for the detection and identification of

certain finfish and shellfish pathogens. Published in CD format by American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.

SAGRISTA E., DURFORT M. & AZEVEDO C. (1995). *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructural observations of the cellular response of the host. *Aquaculture*, **132**, 153–160.

SANIL N.K., VIJAYAN K.K., KRIPA V. & MOHAMED K.S. (2010). Occurrence of the protozoan parasite, *Perkinsus olseni* in the wild and farmed pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould) from the Southeast coast of India. *Aquaculture*, **299**, 8–14.

SHEPPARD B.J. & PHILLIPS A.C. (2008). *Perkinsus olseni* detected in Vietnamese aquacultured reef clams *Tridacna crocea* imported to the USA, following a mortality event. *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 229–235.

VILLALBA A., CASAS S.M., LÓPEZ C. & CARBALLAL M.J. (2005). Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 257–267.

VILLALBA A., REECE K.S., ORDAS M.C., CASA S.M. & FIGUERAS A. (2004). Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 411–432.

*

* *

NB: В настоящее время нет Референтной лаборатории МЭБ по инфицированию *Perkinsus olseni*

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

Инфекция

XENOHALLOTIS CALIFORNIENSIS

1. Предмет рассмотрения¹

Внутрицитоплазматические инфекции, вызванные *Xenohalotis californiensis*, риккетсиозной бактерией, в эпителии желудочно-кишечного тракта вызывают заболевание (так называемый синдром увядания [Naaker с соавт., 1992]) у диких и выращиваемых на фермах морских ушек, *Haliotis* spp. (Vetigastropoda: Mollusca [Friedman с соавт., 2000]). К серьезным признакам заболевания относятся атрофия стопы, пятнистость пищеварительной железы, анорексия, слабость и летаргия (Balseiro с соавт., 2006; Friedman с соавт., 2000; Gardner с соавт., 1995).

2. Информация о болезни**2.1. Факторы агента****2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента**

Xenohalotis californiensis является внутриклеточной бактерией семейства *Anaplasmataceae* (Dumler с соавт., 2001) и близко родственна представителям родов *Ehrlichia*, *Anaplasma* и *Cowdria* (Friedman с соавт., 2000). Болезнь, вызываемая этой бактерией, известна как синдром увядания (Friedman с соавт., 2002; Naaker с соавт., 1992), и ее более уместно называть риккетсиозом морских ушек. Информация о наличии разновидностей штаммов этой бактерии отсутствует; однако недавние наблюдения показали, что некоторые бактерии *X. californiensis* могут быть инфицированы фагами (Friedman & Crosson, неопубликованные данные). Диморфная бактерия от палочковидной до сферической формы имеет размеры в среднем 332×1550 нм в бациллярной форме и в среднем 1405 нм в сферическом морфотипе. Бактерия размножается в внутрицитоплазматических вакуолях диаметром 14-56 мкм в желудочно-кишечном эпителии (Friedman с соавт., 2000).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Несмотря на то, что *X. californiensis* считается облигатным внутриклеточным организмом, бактерия может выживать вне хозяина в течение неопределенного периода времени, что подтверждается исследованиями передачи через воду (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2002; Friedman с соавт., 2007; Rosenblum с соавт., 2008).

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

Опираясь на результаты успешной деконтаминации в лаборатории, эта бактерия легко инактивируется погружением в <10% отбеливатель. Кроме того, воздействие гипохлорита кальция на морскую воду, содержащую бактерию, >10 мг на литр 1 [ppm] и дезинфекция

¹ NB: Версия принята Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 г.

оборудования в ванне с 1% йодоформом в пресной воде в течение 1 часа являются эффективными дезинфицирующими средствами, основанными на результатах использования этих методов дезинфекции в морской лаборатории с проточной морской водой при отсутствии обнаружения этого патогенного организма в соседних популяциях морских ушек (Friedman & Finley, 2003; Friedman, pers. obs.).

2.1.4. Жизненный цикл

Бактерия делится бинарным делением (Friedman с соавт., 2000) и имеет прямую горизонтальную передачу (Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2001b). Хотя ее обычно не обнаруживают у аквакультурных морских ушек до тех пор, пока она не перейдет в стадию выращивания (максимальный размер > 2,5 см), исследование с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) 6-недельных морских ушек, подвергшихся воздействию бактерии, показало, что ушки размером 1-2 мм могут быть инфицированы (Moore с соавт., неопубликованные наблюдения).

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяина

Xenohaliotis californiensis поражает представителей рода *Haliotis*, и естественные инфекции наблюдались у черных морских ушек (*H. cracherodii*), белых морских ушек (*H. sorenseni*), красных морских ушек (*H. rufescens*), розовых морских ушек (*H. corrugata*), зеленых морских ушек (*H. fulgens*), маленьких морских ушек (*H. diversicolor supertexta*) (Wetchateng, 2008; Wetchateng с соавт., 2010), европейских морских ушек (*H. tuberculata*) (Balseiro с соавт., 2006) в дикой природе или в условиях аквакультуры, а также плоских (*H. wallalensis*) и японских морских ушек (*H. Discus-hannai*) при лабораторных испытаниях (Friedman, неопубликованные наблюдения). Исследования других видов морских ушек не проводились. Температура является важным фактором как для передачи патогенных организмов, так и для проявления болезни (Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 1997; Raimondi с соавт., 2002; Rosenblum с соавт., 2008).

2.2.2. Стадии восприимчивости хозяина

Несмотря на то, что на всех пост-личиночных стадиях развития наблюдалась чувствительность к инфекции *X. californiensis*, клиническое проявление болезни обычно наблюдается у животных в возрасте старше 1 года у аквакультурных морских ушек (Friedman, неопубликованные наблюдения) и у всех классов размеров морских ушек, наблюдаемых в диких популяциях, обследованных на настоящее время (например, Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 1997; Haaker с соавт., 1992; Steinbeck с соавт., 1992; Van Blaricom с соавт., 1993; Van Blaricom с соавт., 2011).

2.2.3. Вероятность обнаружения видов или субпопуляций

Вероятность обнаружения увеличивается с увеличением размера морского ушка. Животные размером менее 10 мм имеют меньшую вероятность обнаружения с помощью гистологии, но равную вероятность обнаружения с помощью ПЦР (Friedman с соавт., 2007; Moore с соавт., 2011).

2.2.4. Целевые органы и инфицированные ткани

Xenohaliotis californiensis инфицирует эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта задней части пищевода, пищеварительной железы и, в меньшей степени, кишечника (Friedman с соавт., 2000).

2.2.5. Устойчивая инфекция пожизненными носителями

Инфекции могут сохраняться в течение длительного времени без развития клинических проявлений болезни, если хозяин находится в прохладной воде (например, 15°C для красных морских ушек) и воздействие повышенных температур морской воды (например, > 17°C для красных, черных и белых морских ушек) обычно приводит к развитию клинического заболевания (Friedman & Finley, 2003; Moore с соавт., 2000; Steinbeck с соавт., 1992). Изменение температуры морской воды с более низкой средней температурой (например, 16,5°C для красного морского ушка) может усугубить потери (Moore с соавт., 2011). Последние данные свидетельствуют о том, что некоторые виды, особенно те, которые населяют более теплые воды, могут содержать бактерии без развития клинических проявлений болезни (Wetchateng, 2008; Wetchateng с соавт., 2010).

2.2.6. Векторы

Хотя не было идентифицировано альтернативных хозяев, не принадлежащих к семейству галиотидов (морских ушек), было высказано предположение, что некоторые колониальные асцидии могут концентрировать бактерию (на основании данных ПЦР). Таким образом, возможность того, что такие виды действуют как переносчики бактерий, существует, но необходимы дальнейшие исследования возможных переносчиков (J.D. Moore, неопубликованное наблюдение).

2.2.7. Известные или подозрительные дикие водные животные-носители

Отсутствуют

2.3. Паттерн болезни

Болезнь (синдром увядания) возникает при повышенной температуре воды (~ 18°C и выше) у морских ушек со средними и тяжелыми инфекциями (Friedman с соавт., 2000; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000). Инкубационный период синдрома увядания является продолжительным и обычно составляет от 3 до 7 месяцев (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 1997; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2001b). Клиническое заболевание характеризуется морфологическими изменениями пищеварительной железы, которые различаются у разных видов и могут включать дегенерацию (атрофию канальцев, увеличение соединительной ткани и воспаление) и/или метаплазию пищеварительных канальцев. Метаплазия включает замену терминальных секреторных/абсорбтивных ацинусов абсорбционными/транспортными протоками, внешне похожими на постэзофагус. Эти морфологические изменения сопровождаются анорексией, истощением запасов гликогена с последующим использованием мышц стопы в качестве источника энергии и

последующей смертью (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 1997; Friedman с соавт., 2007; Kismohandaka с соавт., 1995; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2001b). Стопа пораженных ушек содержит меньше организованных мышечных пучков, обильную соединительную ткань и может содержать больше церозных клеток, чем у здоровых людей (Friedman с соавт., 2007; Moore с соавт., 2000; Van Blaricom с соавт., 1993). Выжившие морские ушки остаются инфицированными даже в условиях низкой температуры воды, например, в северной Калифорнии (Friedman & Finley, 2003).

2.3.1. Механизмы передачи

Передача *X. californiensis* является горизонтальной и предполагается, что она осуществляется фекально-оральным путем. Воздействие морской воды, содержащей инфекционный материал, на морских ушек достаточно для передачи бактерии, и прямой контакт с животными не требуется (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000; Мур и др., 2001b). Было продемонстрировано, что температуры ниже 13 ° C ограничивают передачу бактерий (т.е. менее 1% передачи) по сравнению с температурой, сохраняющейся в пределах ~ 18 ° C (передача 72-94%) (Braid с соавт., 2005).

2.3.2.Превалентность

Таблица 2.1. Вариации превалентности Xenohaliotis californiensis: виды и локализация

Виды	ПЦР, превалентность		Гистологические исследования, превалентность		Ссылки
	Дикие	Аквакультура	Дикие	Аквакультура	
<i>Haliotis rufescens</i>	ND	0–100%	1–75% ^a	0–100% ^b	Friedman & Finley, 2003; Moore с соавт., 2000; Friedman, unpublished obs.
<i>Haliotis cracherodii</i>	ND	NA	74–98%	NA	Friedman & Finley, 2003
<i>Haliotis sorenseni</i>	0	0–100%	0	0–100%	Friedman с соавт., 2007; Moore с соавт., unpublished obs.
<i>Haliotis fulgens</i>	ND	ND	44–100%	ND	Moore с соавт., 2009; Tinajero с соавт., 2002
<i>Haliotis corrugata</i>	ND	ND	62–63%	ND	Tinajero с соавт., 2002
<i>Haliotis walallensis</i>	NA	NA	0	NA	J.D. Moore, unpublished obs.
<i>Haliotis discus-hannai</i>	ND	0	0	0	C.S. Friedman, unpublished obs.
<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	ND	61%	ND	53%	Wetchateng, 2008; Wetchateng с соавт., 2010 ^c
<i>Haliotis tuberculata</i>	ND	ND	0%	14.5-52%	Balseiro с соавт., 2006

- a. Превалентность 1–17% наблюдалась в северной Калифорнии и до 75% в центральной и южной Калифорнии.
- b. У морских ушек больших размеров обычно наблюдается более высокая превалентность инфекции.
- c. Всего было отобрано 36 животных с одной фермы в Таиланде. ND = нет данных; NA = не применимо.

2.3.3. Географическое распространение

Xenohalictis californiensis встречается вдоль юго-западного побережья Северной Америки в Калифорнии, США и Нижней Калифорнии, Мексика. Тем не менее, поскольку инфицированные морские ушки были доставлены в Чили, Китай (Народную Республику), Китайский Тайбэй, Исландию, Ирландию, Израиль, Японию, Испанию и Таиланд и, возможно, в другие страны, предполагается, что географический диапазон этиологического агента широкий там, где выращиваются калифорнийские красные морские ушки, *Halictis rufescens*, или в районах, где местные виды контактировали с красными морскими ушками (Wetchateng, 2008).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Восприимчивость зависит от вида, так как известно, что бактерия вызывает заболевание у черных (до 99% смертности; Moore с соавт., 2009), белых (до 100% смертности; Friedman & McCormick, неопубликованные наблюдения), красных (до 35% смертность; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2001b), розовых (также называемых желтыми) и зеленых (также называемых синими) морских ушек (Tinajero с соавт., 2002). В отличие от других видов морских ушек, изученных на сегодняшний день, масштаб смертности морских ушек недостаточно хорошо задокументирован относительно розовых и зеленых морских ушек. Однако в Нижней Калифорнии, Мексика, до 100% зеленых (синих) и 63% розовых (желтых) морских ушек могут быть инфицированы, причем до 43% зеленых и 71% розовых ушек имеют микроскопические признаки заболевания. (дегенерация и метаплазия пищеварительной железы; Tinajero с соавт., 2002). Инкубационный период варьируется в зависимости от температуры, но обычно включает в себя длительный предварительный период от 3 до 7 месяцев. Смертность обычно наступает через 1-2,5 месяца после появления видимых клинических признаков (Friedman с соавт., 1997). *Xenohalictis californiensis* была недавно обнаружена на основании гистологических и молекулярных данных в нескольких азиатских странах, включая Китай (Народную Республику), Китайский Тайбэй и Таиланд (Wetchateng, 2008; Wetchateng с соавт., 2010). Распространенность не подтверждена документально, но до 61% *H. diversicolor supertexta* были инфицированы на ферме в Таиланде, однако, как и у европейского морского ушка, *H. tuberculata*, ни у одного морского ушка не было клинических признаков синдрома увядания (Balseiro с соавт., 2006; Van Blaricom с соавт., 2011).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Болезнь (синдром увядания) возникает при повышенной температуре воды (~ 18-25 ° C у морских ушек с умеренными и тяжелыми инфекциями (Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2000; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2011; Rosenblum

с соавт., 2008). Передача паразитов усиливается у откормленных (94%) морских ушек по сравнению с голодными (72%) морскими ушками (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005 г.). Количество субклинических инфекций у *H. diversicolor supertexta* увеличивалось при 27–29°C (Van Blaricom с соавт., 2011). Поскольку морские ушки являются облигатными морскими видами, устойчивость к солености у *Rickettsia*-подобных организмов (RLO) не исследовалась.

2.4. Контроль и профилактика

Самая эффективная профилактика - избегание возбудителя. В случае возникновения инфекции содержание морских ушек при температуре $\leq 15^{\circ}\text{C}$ может снизить передачу RLO и последующую передачу болезни (Braid с соавт., 2005). Применение окситетрациклина (см. Раздел 2.4.2 ниже) снижает потери.

2.4.1. Вакцинация

Вакцинация не является эффективным вариантом контроля инфекции *X. californiensis*.

2.4.2. Химиотерапия

Уменьшение плотности и применение диеты, содержащей окситетрациклин, может снизить потери (Friedman с соавт., 2003; Friedman с соавт., 2007; Rosenblum с соавт., 2008). Пероральный прием 12-19% ТМ-100 (90-100 мг / кг) с лечебной диетой в течение 10 или 20 дней обеспечивает защиту от повторного инфицирования бактериями на несколько месяцев. Последние данные показывают, что пероральный прием 12% ТМ-100 в течение одного дня может снизить распространенность бактериальных инфекций с 80% до 10% и среднюю интенсивность инфекции с 1,4 до 0,1 по шкале 0–3 (Friedman с соавт., 2000; Friedman и др., 2007). Основываясь на наблюдении за окситетрациклином в необработанных морских ушках, которые получали морскую воду от обработанных животных, считается, что либо потребление морской воды, содержащей лекарственное средство, либо абсорбция может быть ключевым путем потребления этого терапевтического средства (Friedman с соавт., Неопубликованные данные).

2.4.3. Иммуностимуляция

Нет данных об иммуностимуляции как о мере контроля данной болезни.

2.4.4. Разведение резистентных особей

Интерес к селекции резистентных морских ушек, особенно с целью восполнения популяции, повышается. Дикие черные морские ушки продолжают пополнять популяцию вдоль островов Чаннел Айлендс у берегов Калифорнии с 2002г. И некоторые особи, участвующие в пополнении популяции выживают, что свидетельствует о том, что эти особи могут быть более устойчивы к данной болезни, вызываемой риккетсиями (Tinajero с соавт., 2002). Недавние лабораторные исследования продемонстрировали повышенную резистентность к болезни у потомства черных морских ушек, которые выжили после инфицирования *X. californiensis* по сравнению с особями из популяций, неинфицированных болезнью (Friedman с соавт. неопубликованные данные).

2.4.5. Восполнение популяции устойчивыми видами

В настоящее время данных нет, и необходимо учитывать относительные преимущества выращивания альтернативных видов.

2.4.6. Блокирующие агенты

Нет данных

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Не было предпринято попыток дезинфекции икры и личинок. Личинки морских ушек не питаются и маловероятно, что передача происходит до оседания и метаморфоза, после того, как начинается кормление (Moore & Friedman, неопубликованные данные).

2.4.8. Общие практики содержания

Практика содержания, направленная на уменьшение проблем, вызываемых *X. californiensis*, типична для любой бактериальной болезни и включает покупку проверенных семян (без признаков инфекции), содержание в отдельных семьях или группах (т.е. избегание высокой степени сортировки и смешения разрозненных групп), ополаскивание рук и оборудования в пресной или йодированной воде и их просушивание между использованием. По возможности рекомендуется изоляция инфицированных групп. Если применяется лечение окситетрациклином, терапевтическое применение в соответствии с федеральными рекомендациями (например, FDA-CVM² в США или ЕМЕА³ в Европе) до наступления тепловодного сезона может снизить потери и инфицирование. Как правило, требуется только одно применение в течение второго или третьего года роста в течение типичного 3–4-летнего цикла культивирования.

3. Отбор образцов

3.1. Отбор индивидуальных особей

Для рутинного отбора проб рекомендуется выборочный или случайный отбор особей, а оптимальное количество собранных образцов будет варьироваться в зависимости от размера популяции и желаемого уровня обнаружения (например, $n = 60$ для популяции > 2000 особей). Для оптимизации обнаружения (целевого отбора проб) рекомендуется отбор морских ушек с клиническими признаками снижения веса (атрофированная pedalная мышца). По возможности, у животных следует отбирать пробы после тепловодного периода (например, 30 дней) ($> 18^\circ \text{C}$).

3.2. Консервация образцов для передачи

Образцы следует поместить в 80–95% неденатурированный этанол (ткань: этанол 1: 9 [об. / об.]) и хранить при температуре 4–20°C. Образцы также можно мгновенно заморозить в жидком азоте и хранить при -80°C до тестирования. Образцы этанола следует отправлять

² Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США - Центр ветеринарной медицины

³ Европейское агентство по лекарственным средствам

в лабораторию на льду в соответствии с национальными или международными стандартами транспортировки легковоспламеняющихся материалов, если применимо. Замороженные образцы следует отправлять на сухом льду в соответствии с национальными или международными стандартами транспортировки, если применимо.

3.3. Объединение образцов в пул

В идеале образцы следует иссечь и хранить отдельно. Если в качестве меры экономии средств желательно объединение образцов в пул, рекомендуется объединять образцы ($n = 5$ / пул) для выделения ДНК и последующих ПЦР-анализов. Чтобы учесть возможное разбавление целевой ДНК, соответствующее объединению в пул, ПЦР следует проводить в трех повторностях.

3.3. Наилучшие органы и ткани

Лучшая целевая ткань - это задний пищевод, а вторая лучшая ткань - комплекс пищеварительной железы и кишечника.

3.4. Неподходящие образцы/ткани

Ткани, не относящиеся к пищеварительной системе не содержат риккетсиозной ДНК, и их следует избегать.

4. Диагностические методы

Макроскопические признаки болезни, при их наличии, включают атрофию педальной мышцы, пятнистость пищеварительной железы, потерю аппетита и вялость. Следует иметь в виду, что животные могут страдать от преคลินิกической инфекции во время инкубационного периода, если это более устойчивые к болезни виды, или если они содержатся в воде с температурой не выше 15°C. Болезнь характеризуется внутрицитоплазматическими бактериальными включениями в заднем отделе пищевода, кишечнике и абсорбирующем/транспортном эпителии пищеварительной железы, в то время как при умеренных и обширных инфекциях наблюдаются дегенеративные или метапластические изменения в пищеварительной железе с последующей атрофией педальной мышцы у восприимчивых видов.

4.1. Полевые диагностические методы

4.1.1. Клинические признаки

Морские ушки, пораженные инфекциями *X. californiensis*, могут страдать от субклинических инфекций в течение препатентного периода или при температуре воды не выше 15°C. Инфицированные особи могут демонстрировать различные уровни истощения (атрофии), от незначительного до серьезного, при более высоких температурах воды.

4.1.2. Изменения в поведении

Во время эпидемии пораженные морские ушки часто прикрепляются к горизонтальным (а не вертикальным или перевёрнутым) поверхностям, выглядят слабыми (их легко отделить от поверхности рукой) и истощенными (сморщенными) (Naaker с соавт., 1992). Аквакультурные морские ушки также отказываются от приема пищи. К тому же, присутствие аномально большого количества свежих раковин также может указывать на болезнь.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Клиническая характеристика болезни, вызванной *X. californiensis*, основана на комбинации морфологических изменений в ткани в присутствии возбудителя. Морфологические изменения включают атрофированную мышцу ноги, что заметно на макроскопическом и микроскопическом уровне (гистология). Как непосредственный результат катаболизма pedalной мышцы, инфицированные морские ушки выделяют значительно более высокие уровни аммиака по сравнению с неинфицированными особями (Kismohandaka с соавт., 1995). Если обнаруживаются умирающие особи морских ушек, то наличие пятнистости пищеварительной железы (темно-коричневая с небольшими очагами рыжевато-коричневой ткани), указывающая на метапластические изменения, является убедительным доказательством наличия этой болезни (Friedman с соавт., 2000).

4.2.2. Клиническая химия

Можно использовать стандартный гликогеновый тест (Balseiro с соавт., 2006) для проверки снижения уровня гликогена в пищеварительной железе и pedalной мышце. Однако снижение уровня гликогена связано с отказом от потребления пищи и неспособностью ее переваривать, что является неспецифичным для этой болезни (т.е. схоже с признаками голодания) [Balseiro с соавт., 2006]).

4.2.3. Микроскопическая патология

Наличие базофильных, овальных внутрицитоплазматических включений в эпителии пищеварительного тракта (задний отдел пищевода, транспортные протоки и метапластический эпителий пищеварительной железы и/или кишечника). Метапластические изменения в пищеварительной железе, которые включают трансформацию секреторных концевых отделов - ацинусов в абсорбирующий/транспортный эпителий, усиливаются у морских ушек, зараженных *X. californiensis* (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2001b). Несмотря на то, что метаплазия наблюдалась у всех пораженных видов, исследованных до настоящего времени, реакция на инфекцию может варьировать у разных хозяев. Красные морские ушки и белые морские ушки, например, обычно реагируют метапластическими изменениями (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Moore с соавт., 2000), в то время как черные морские ушки обычно реагируют комбинацией метаплазии, дегенерации пищеварительных каналов и воспаления (Friedman с соавт., 1997; Friedman с соавт., 2002). Уровень гликогена в pedalной мускулатуре у пораженных особей ниже, и количество мышечных пучков меньше, чем у здоровых особей (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Gardner с соавт., 1995). У некоторых морских ушек может наблюдаться повышение уровня серозных клеток в мышце ноги (Van Blaricom с соавт., 1993), но эти признаки не являются патогномоничными для этого заболевания. Молодые особи белых морских ушек могут демонстрировать очевидные метапластические изменения в пищеварительном тракте без присутствия *X. californiensis* (Friedman с соавт., 2007). Таким образом, присутствие *X. californiensis* в эпителии пищеварительного тракта параллельно с морфологическими изменениями, отмеченными выше, указывают на наличие клинического синдрома увядания.

4.2.4. Влажные препараты

Несмотря на отсутствие рекомендаций, цитоплазматические включения можно увидеть посредством метода фазового контраста или микроскопии по методу дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) при исследовании заднего отдела пищевода; морфология пищеварительных тканей усложняет интерпретацию влажных препаратов.

4.2.5. Мазки

Окрашенные мазки эпителия пищеварительного тракта могут использоваться с целью обнаружения бактериальных включений. Однако исследование небольших кусочков заднего отдела пищевода, которые были высушены на слайде и окрашены ДНК флуорохромом, может быть более легким для интерпретации, чем окрашенные мазки.

4.2.6. Фиксированные срезы

Не применяется.

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) может использоваться для подтверждения присутствия *Риккетсия*-подобных организмов. Однако, этот метод не может быть подтверждающим в отношении этого возбудителя по причине недостаточного количества уникальных морфологических характеристик. Если используется ТЭМ, то она обнаружит межклеточные колонии палочковидных прокариот с большим количеством рибосом и имеющих трехслойные клеточные стенки внутри мембранно-связанных вакуолей в цитоплазме эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта. Диморфные бактерии, с формами от палочковидных до круглых, имеют в среднем размеры 332×1550 нм, если имеют форму бациллы, и 1405 нм при сферическом морфотипе. Бактерия репродуцируется внутри внутрицитоплазматических вакуолей 14–56 мкм в диаметре (Friedman с соавт., 2000).

4.3. Методы выявления и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

Некоторые методы идентификации и обнаружения *X. californiensis* в образцах ткани или экстрагированной ДНК приведены в разделах ниже.

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Ткани (задний отдел пищевода) могут быть рассечены, помещены на предметное стекло и исследованы с помощью микроскопии методом дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) или фазово-контрастной микроскопии при $\times 200$ или $\times 400$ увеличении после расплющивания покровным стеклом. Риккетсиозные включения и прозрачные круглые включения появляются внутри эпителия пищевода. Этот метод не рекомендуется для использования, так как включения иногда трудно идентифицировать.

4.3.1.1.2. Мазки

Отпечатки ткани можно использовать для выявления инфекции *X. californiensis*, при ее интенсивности от умеренной до высокой. Однако гистология является более чувствительным методом, чем исследование отпечатков ткани.

4.3.1.1.2.1. Метод окрашивания

Делают надрез заднего отдела пищевода и отпечатают на слайде. Фиксируют мазок метанолом и окрашивают по модифицированному методу Гимза. Высушивают и исследуют на наличие риккетсиозных включений при погружении в масло, либо покрывают покровным стеклом и изучают при $\times 200$ – 400 увеличении.

4.3.1.1.2.2. Метод флуоресценции

Делают надрез заднего отдела пищевода, измельчают и помещают на слайд, высушивают феном в течение ~ 20 минут. Окрашивают предметные слайды флуоресцентным красителем для нуклеиновой кислоты, например пропидием йодида или Хехстом 33258 (Naaker с соавт., 1992). Инкубируют в темноте в течение 3 минут и просматривают в режиме эпифлуоресценции при $\times 200$ увеличении. Бактериальные включения отличаются от ядра хозяина по размеру и частоте. Однако, если предметные стекла с образцами необходимо оставить для будущих исследований, их следует тщательно высушить и хранить высушенными до момента окрашивания.

Включения паразита, 14 – 56 мкм в диаметре, перемежаются с более мелкими ядрами хозяина. Изучение одного предметного стекла в течение 5 минут достаточно при $\times 200$ увеличении (Moore с соавт., 2001a). Этот метод менее чувствителен, чем гистология, поэтому невозможно различить бактериальную морфологию. Лучше всего его применять как экспресс-метод внутри известного ареала болезни.

Эти тесты не были валидированы и не доступны для приобретения.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

4.3.1.1.3.1. Гистология

Гистологическая процедура подробно описана в Главе 2.4.0 этого *Водного Руководства*. Удаляют раковину и делают несколько 3 – 5 мм поперечных срезов, содержащих задний отдел пищевода, пищеварительную железу и мышцу ноги. Поместить надрезанную ткань в растворы Дэвидсона или Карсона (см. Главу этого *Водного Руководства*) на 24 часа и подготовить для рутинной гистологии в парафине. С поперечными срезами легче всего работать, если их поместить в кассеты до проведения фиксации. Соотношение должно составлять не более одного объема ткани на десять объемов фиксирующего раствора.

Депарафинизированные 3 – 5 мкм срезы следует окрашивать гематоксилином и эозином и просматривать при помощи световой микроскопии на наличие бактериальных включений (продолговатые, базофильные внутрицитоплазматические вакуоли, 14 – 56 мкм в диаметре [Friedman с соавт., 2000]) в заднем отделе пищевода и пищеварительной железе и морфологических изменений в пищеварительной железе и ноге. Рекомендуется исследовать срезы при $\times 200$ или $\times 400$ увеличении.

Xenohalotis californiensis могут быть морфологически схожи с другими морскими риккетсиозными бактериями. У калифорнийских морских ушек обнаруживались до трех морфологически различных внутрицитоплазматических бактерий (Friedman с соавт., неопубликованные данные). Окончательный диагноз по бактериям может включать молекулярные способы (e.g. гибридизация *in-situ* [ISH]). Окончательный диагноз синдрома увядания с помощью гистологии должен включать обнаружение бактерии и морфологические изменения в пищеварительной железе, метаплазию и/или атрофию, и такие же признаки в мышце ноги.

При обнаружении отхода в географическом ареале синдрома увядания, визуализация внутриклеточных бактериальных очагов в эпителии пищеварительного тракта с помощью гистологического исследования, может считаться подтверждающим методом и считается золотым стандартом в отношении этой болезни. Однако подтверждение с помощью гистологии параллельно с ПЦР и секвенированием или ISH рекомендуется для определения вида риккетсиозных бактерий у морских ушек, которые прежде не были известны, как восприимчивые к бактерии или инфекции в новом географическом регионе.

Этот тест не был официально валидирован. Однако гистология считалась подтверждающим исследованием на наличие *X. californiensis*.

4.3.1.1.3.2. Исследование с помощью трансмиссионной электронной микроскопии

Процедуры трансмиссионной электронной микроскопии описаны в Главе 2.4.0 этого *Водного Руководства*. При этом исследовании просматриваются палочковидные прокариоты с большим количеством рибосом, имеющие трехслойные клеточные стенки, собирающиеся в межклеточные колонии внутри мембранно-связанных вакуолей в цитоплазме эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта. Диморфные, от палочковидных до круглых, бактерии имеют в среднем размеры 332×1550 нм, если имеют форму бациллы, и в среднем 1405 нм при сферическом морфотипе. Бактерия репродуцируется внутри внутрицитоплазматических вакуолей, 14–56 мкм в диаметре (Friedman с соавт., 2000). Это исследование не было официально валидировано.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

Размножение *X. californiensis* в культуре клеток (по причине отсутствия клеточных линий, полученных от морских моллюсков) и на искусственных средах до настоящего времени было неуспешным.

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные среды

Не разработаны.

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе антител

Не разработаны.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция

Положительная ПЦР амплификация дает только предположительный диагноз, так как выявляет ДНК, но не обязательно жизнеспособный патоген. Необходимо использовать другие методы, предпочтительно гистологию и ISH, для визуализации патогена. При использовании параллельно с гистологией, ПЦР можно использовать для подтверждения. Изучение амплифицированной последовательности рекомендуется при исследовании новых видов хозяев или случаев в новой географической зоне. Последовательности должны быть сопоставимы с известной 16S рДНК последовательностью этой бактерии (Номер доступа в GenBank AF133090; [Andree с соавт., 2000]).

Пробы для ПЦР должны отбираться от заднего отдела пищевода или пищеварительной железы и подготавливаться с помощью классического метода выделения фенолом-хлороформом или коммерческих тест-систем для выделения ДНК с возможностью удаления ингибиторов (напр. тест-системы для выделения ДНК из фекалий или почвы), которые присутствуют в пищеварительной железе морских ушек. Ткань заднего отдела

пищевода рекомендована для использования, так как инфекции в этой области неизменно более сильные, чем в ткани пищеварительной железы. Положительная контрольная реакция должна всегда быть включена в ПЦР и должна состоять из геномного ДНК, экстрагированной от зараженной особи, или плазмиды, содержащей инсерцию в виде амплифицированного продукта. Если используют плазмиду в качестве положительного контроля, рекомендуется добавить ~100 п.о. инсерцию в клонированный фрагмент с целью снятия беспокойности в отношении перекрёстной контаминации аэрозолированной плазмидной ДНК. К тому же, в ситуациях, когда присутствует низкое количество копий целевой ДНК, эта плазида может вытеснить саму мишень. Отрицательный контроль, состоящий из мастер-микса без добавления матрицы, также должен быть включен в ПЦР. Все реакции должны прогоняться в двух повторностях. Обнаружение 160 п.о. полосы в пробах ткани и положительных контрольных реакциях является признаком успешного исследования. Чувствительность и специфичность этого теста находятся в процессе формальной оценки со стороны Референтной лаборатории МЭБ (Friedman *с соавт.*, неопубликованные данные). Коммерческих тестов на данный момент не существует.

ПЦР праймеры, разработанные для выявления *X. californiensis*, специфично амплифицируют 160 п.о. сегмент *Риккетсия*-подобного патогена. На данный момент праймеры имеют следующие обозначения: RA 5–1 (5'-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3') и RA 3–6 (5'-ACT-TGG-ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA-3'). Они нацелены на малую субъединичную рибосомную ДНК и, как было продемонстрировано, чувствительны и специфичны к этому патогену (Andree *с соавт.*, 2000). ПЦР амплификация проводится в стандартном 20 мкл реакционном объеме, содержащем 1 × ПЦР буфер, 1,5 ммоль MgCl₂, 400 нг мл⁻¹ BSA, 200 мкмоль dNTPs, 0,5 мкмоль каждого праймера, 1,6 единиц Taq-полимеразы и 100 нг матричной ДНК. Реакционные смеси прогоняют в амплификаторе. Программа реакции амплификации следующая: предварительная денатурация при 95°C в течение 5 минут, 40 циклов при 95°C в течение 1 минуты, при 62°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 30 секунд и конечная элонгация при 72°C в течение 10 минут. Аликвота каждой ПЦР реакции проверяется в отношении 160 п.о. продукта амплификации с помощью электрофореза в агаровом геле и окрашивания этидием бромидом.

Тест был валидирован при диагностической специфичности и чувствительности в 1.0 (Friedman *с соавт.*, неопубликованные данные). Не доступен для приобретения.

4.3.1.2.3.2. Анализ последовательности

Анализ амплифицированной ДНК необходим для подтверждения идентичности последовательности с целевой бактерией (код доступа в GenBank AF133090). Анализ можно завершить стандартным клонированием и секвенированием множества клонов после проведения ПЦР амплификации исследуемой ДНК.

(ПРИМЕЧАНИЕ: рекомендуется проведение как прямого, так и обратного секвенирования.) Также можно использовать прямое секвенирование ПЦР продуктов.

4.3.1.2.3.3. In-situ гибридизация

ISH это предпочтительный метод для подтверждения идентификации, так как он позволяет визуализировать гибридизацию специфичного зонда с целевым организмом. Однако ДНК зонды должны быть тщательно исследованы на предмет специфичности и валидированы в сравнительных исследованиях до того, как они могут быть использованы для подтверждающей идентификации.

ISH была разработана для выявления *Риккетсия*-подобных прокариотов в срезах ткани (Antonio с соавт., 2000). Специфично меченые олигонуклеотидные зонды гибридизируются с малой субъединичной рибосомной РНК бактерии. Эта гибридизация обнаруживается с помощью конъюгата антител, который распознает меченые зонды. Добавляют субстрат для конъюгата антител, вызывая колориметрическую реакцию, что позволяет визуализировать гибридизацию зонда с ДНК паразита. Несмотря на то, что этот метод не был официально валидирован, анализы на специфичность с использованием некоторых риккетсиозных организмов двустворчатых моллюсков и рыб, указывают на то, что тест специфичен в отношении *X. californiensis* (Antonio с соавт., 2000).

Процедура ISH проводится следующим образом. Положительные (известно инфицированные ткани) и отрицательные (неинфицированные и инфицированные различными бактериями) контроли должны быть включены в процедуру. Зонд синтезируют с помощью ПЦР, используя PCR DIG Probe Synthesis Kit. До использования DIG-меченого зонда, денатурируют зонд при 95°C в течение 3 минут и немедленно помещают на лед на ~30 минут с целью сепарации двуцепочечной ДНК. Хранят при –20°C или –80°C до использования. Последовательности зондов, обозначаемых как RA 5-1, RA 3-6, RA 3-8 и RA 5-6 (Antonio с соавт., 2000) следующие: 5'-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3', 5'-ACT-TGG-ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA-3', 5'-CCA-CTG-TGA-GTG-GTT-ATC-TCC-TG-3', и 5'-GAA-GCA-ATA-TTG-TGA-GAT-AAA-GCA-3'.

1. После удаления раковины делают поперечный срез (3 -5 мм) таким образом, чтобы он содержал задний отдел пищевода, пищеварительную железу и мышцу ноги, и помещают в фиксирующий AFA раствор Дэвидсона (глицерин [10%], формалин [20%], 95% этиловый спирт [30%], dH₂O [30%], ледяная уксусная кислота [10%]) на 24–48 часов, затем переносят в 70% этанол до проведения гистологических процедур (этап ii). Пропорция должна быть не более одного объема ткани на 10 объемов фиксирующего раствора.
2. Образцы последовательно заливают в парафин с помощью классических гистологических процедур. Делают 5-6 мкм срезы и помещают на предметные стекла с положительно заряженной поверхностью или стекла, покрытые 3-аминопропил-триэтоксисилоном. Затем гистологические срезы оставляют сушиться на ночь в печи при 40°C.

ПРИМЕЧАНИЕ: этап просушки можно пропустить при использовании предметных стекол с положительно заряженной поверхностью.

3. Срезы депарафинизируют путем погружения в ксилен или другой менее токсичный осветлитель на 10 минут. Растворитель удаляют последовательным погружением в две ванны с абсолютным спиртом на 10 минут каждая и регидратируют погружением в серию разведений спирта. Срезы затем дважды моют в течение 5 минут Трис буфером (pH 7.2; 0.2 M Tris/HCl, 2.0 ммоль CaCl₂).
4. Срезы обрабатывают протеиназой K, 50 мкг мл⁻¹ в Трис буфере при 37°C в течение 45 минут. Реакцию останавливают посредством трехкратного отмывания срезов ФБР в течение 10 минут для каждой из процедур.
5. Срезы предварительно гибридизируют в течение 10 минут – 1 часа при 37°C в буфере предварительной гибридизации (4 × SSC, 50% формамид).

6. Затем раствор для предварительной гибридизации смывают в $2\times$ SSC и недолго просушивают до замены на буфер для предварительной гибридизации, содержащий диоксигенин-меченые зонды (1:373, зонд:буфер [о:о]). Срезы можно денатурировать* поместив их на термостат при 100°C в течение 10 минут и затем закрывают пластиковыми покровными стёклами для ISH. Предметные стекла затем гибридизируют в течение ночи при 53°C в камере влажности. *Этот этап можно пропустить при желании.
7. Аккуратно удаляют покровные стекла со срезов, погрузив предметные стекла на 5 – 10 минут в $2\times$ SSC при комнатной температуре. Срезы моют дважды в течение 15 минут в $1\times$ SSC при 40°C , и один раз в течение 15 минут в $0.5\times$ SSC при 40°C . Срезы затем помещают в Буфер 1 (100 ммоль Tris/HCl, 10 ммоль NaCl, pH 7.5) на 10 минут.
8. Срезы помещают в Буфер 1 (см. этап vii), в который был добавлен 0,3% Triton X-100 и 2% овечьей сыворотки, на один час при комнатной температуре (не позволять предметным слайдам высыхать).
9. Анти-диоксигениновый конъюгат антител с щелочной фосфатазой разбавляют 1:1000 (или в соответствии с рекомендациями производителя) в Буфере 1 с добавлением 0,3% Triton X-100 и 1% овечьей сыворотки и обрабатывают срезы тканей. Срезы покрывают покровными стёклами для ISH и инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре в камере влажности.
10. Предметные стекла промывают дважды в Буфере 1 в течение 10 минут для каждого этапа (см. этап vii) и дважды в Буфере 2 (100 ммоль Tris/HCl, 100 ммоль NaCl, 50 ммоль MgCl_2 , pH 9.5) в течение 10 минут. Раствор для проявления цветной реакции (добавляют 45 мкл нитросинего тетразолия, 35 мкл 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат, р-толуидин соль [BCIP]) в 10 мл Буфера 2 на 30 минут – 1 час в камере влажности в темноте.
11. Затем предметные стекла ополаскивают трижды стерильной дистиллированной водой (dH_2O). Срезы контрастно окрашивают Бисмарком коричневым Y в течение 3 минут, ополаскивают dH_2O , затем 70% этиловым спиртом с последующим кратким ополаскиванием 100% спиртом до этапа просушки на воздухе и покрытия покровными стёклами с помощью заливочной среды. Присутствие патогена демонстрируется фиолетово-черным мечением клеток паразитов.

Этот тест не был официально валидирован и не доступен для приобретения.

4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

До сегодняшнего дня не разработано.

5. 5. Рейтинг исследований на основании цели использования

Методы, доступные на данный момент для надзора, выявления и диагностики *X. californiensis* перечислены в Таблице 5.1. ниже. В таблице используются следующие обозначения: a = метод является рекомендуемым методом по причине доступности, практичности, диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод может применяться в некоторых ситуациях, но затраты, точность или другие

факторы значительно ограничивают диапазон его применения; и d = метод на настоящий момент не рекомендуется для проведения в этих целях. Эти данные неким образом субъективны, так как пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и практичности. Несмотря на то, что не все тесты, перечисленные как категория а или b, прошли формальные процедуры стандартизации и валидации, их рутинная природа и тот факт, что они широко использовались без получения сомнительных результатов, делает их пригодными для использования.

Таблица 5.1. Методы целевого надзора, выявления и диагностики

Метод	Целевой надзор			Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	Молодые	Взрослые		
Макроскопические признаки	d	c	c	c	d
Биопроба	d	d	c	c	c(a) ^{a.}
Отпечатки ткани – окрашивание по Гимза	d	c	c	b	b(c) ^{b.}
Гистопатология	d	b	b	a	a ^{c.}
ТЭМ	d	d	d	b	c
<i>In-situ</i> ДНК зонды	d	c	c	a	a
ПЦР	d	a	a	a	c(a) ^{d.}
SSU рДНК секвенирование	d	d	d	a	a

a. Для ценной маточной популяции возможно использовать полимеразную цепную реакцию (ПЦР) на образцах фекалий в качестве первого скрининг-теста, при отрицательных результатах, можно в последствии использовать биопробу в комбинации с гистологией (см Раздел 6).

b. Отпечатки ткани используют в комбинации с ПЦР и возможным секвенированием для подтверждения возбудителя.

c. В новых случаях, таких как новый географический регион, ПЦР и секвенирование рекомендуются для подтверждения вида бактерии.

d. ПЦР сама по себе не является подтверждающим анализом, но при применении в комбинации с гистологией ее можно считать подтверждающим тестом. ТЭМ = трансмиссионная электронная микроскопия; SSU рДНК = малая субъединичная рибосомная ДНК.

6. Тесты, рекомендуемые для целевого надзора с целью объявления свободы от инфекции *Xenohalotis californiensis*

Метод для целевого надзора с целью объявления свободы от *X. californiensis* это гистология в комбинации с ПЦР и анализом последовательности либо с помощью ISH. Учитывая хронический характер заболевания и влияние температуры, на каждой производственной площадке рекомендуется исследовать животных в инкубаторах и выростных прудах в течение теплого сезона. Морские ушки, содержащиеся в более холодных водах, могут быть хронически инфицированы без демонстрации каких-либо признаков заболевания. Также рекомендуется ПЦР исследование образцов фекалий или биопроба с более мелкими морскими ушками (напр. 1 - 4 см), живущими среди маточного поголовья в течение не менее 6 недель при $>17^{\circ}\text{C}$.

7. Подтверждающие диагностические критерии

В соответствии с *Водным кодексом* все случаи у других видов должны быть немедленно отправлены в Референтную лабораторию МЭБ для подтверждения, неважно связаны ли с этим случаем клинические признаки или нет.

7.1. Определение случая подозрения

Случай подозрения на инфекцию *X. californiensis* и ассоциированное с ней клиническое заболевание (синдром увядания) могут включать макроскопические клинические признаки (слабость, вялость, отказ от приема пищи, атрофия педальной мышцы и пятнистость пищеварительной железы) и смертность в совокупности с тепловодными условиями, в частности внутри известного географического ареала этого заболевания. У аквакультурных морских ушек отказ от пищи может быть первым признаком болезни. Эти клинические признаки в комбинации с обнаружением атрофии мышцы ноги при микроскопии, телец включения в эпителии желудочно-кишечного тракта или ПЦР результаты (без подтверждения секвенированием) также представляют собой случай подозрения.

7.2. Определение подтвержденного случая

Подтверждение инфекции *X. californiensis* зависит от обнаружения возбудителя при гистологии и ПЦР в совокупности с секвенированием, или ISH. Макроскопические признаки и отпечатки ткани сами по себе не могут использоваться для подтверждающей диагностики и должны дополняться гистологией, ISH или ПЦР с секвенированием.

Подтверждение синдрома увядания зависит как от наличия возбудителя, так и от наличия микроскопических признаков болезни. Как минимум метаплазия или дистрофия пищеварительной железы, наблюдаемые при гистологическом исследовании, должны сопровождать инфекцию *X. californiensis* для диагностирования клинического синдрома увядания.

8. Список литературы

ANDREE K.B., FRIEDMAN C.S., MOORE J.D. & HEDRICK R.P. (2000). A polymerase chain reaction for detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with Withering Syndrome in Black Abalone (*Haliotis cracherodii*). *J. Shellfish Res.*, **19**, 213–218

ANTONIO D.B., ANDREE K.B., MOORE J.D., FRIEDMAN C.S. & HEDRICK R.P. (2000). Detection of Rickettsiales-like prokaryotes (RLPs) by *in situ* hybridization in black abalone *Haliotis cracherodii* with withering syndrome. *J. Invertebr. Pathol.*, **75**, 180–182

- BALSEIRO P., ARANGUREN R., GESTAL C., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2006). *Candidatus Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture*, **258**, 63–72
- BRAID B.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., HEDRICK R.P., TJEERDEMA R.S. & FRIEDMAN C.S. (2005). Health and survival of red abalone, *Haliotis rufescens*, under varying temperature, food supply and exposure to the agent of withering syndrome. *J. Invertebr. Pathol.*, **89**, 219–231
- DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P.J., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C., RIKIHISA Y. & RURANGIRWA F.R. (2001). Reorganization of general in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. System. Evol. Microbiol.*, **51**, 2145–2165
- FRIEDMAN C.S., ANDREE K.B., BEAUCHAMP K.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2000). “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*” a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 847–855
- FRIEDMAN C.S., BIGGS W., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2002). Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *J. Shellfish Res.*, **21** (2), 817–824
- FRIEDMAN C.S. & FINLEY C.A. (2003). Evidence for an anthropogenic introduction of “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*”, the etiological agent of withering syndrome, into northern California abalone populations via conservation efforts. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **60**, 1424–1431
- FRIEDMAN C.S., SCOTT B.B., STRENGE R.E. & MCCORMICK T.B. (2007). Oxytetracycline as a tool to manage and prevent losses of the endangered white abalone, *Haliotis sorenseni*, due to withering syndrome. *J. Shellfish Res.*, **26** (3), 877–885
- FRIEDMAN C.S., THOMSON M., CHUN C., HAAKER P.L. & HEDRICK R.P. (1997). Withering syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *J. Shellfish Res.*, **16**, 403–411
- FRIEDMAN C.S., TREVELYAN G., MULDER E.P. & FIELDS R. (2003). Development of an oral administration of oxytetracycline to control losses due to withering syndrome in cultured red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*, **224** (1–4), 1–23
- GARDNER G.R., HARSHBARGER J.C., LAKE J., SAWYER T.K., PRICE K.L., STEPHENSON M.D., HAAKER P.L. & TOGSTAD H.A. (1995). Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *J. Invertebr. Pathol.*, **66**, 111–120
- HAAKER P.L., PARKER D.O., TOGSTAD H., RICHARDS D.V., DAVIS G.E. & FRIEDMAN C.S. (1992). Mass mortality and withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*, in

California. In: Abalone of the World. , Shepard S.A., Tegner M.J. & Guzman del Proo S.A., eds, Blackwell Scientific, Oxford, UK, 214–224

KISMOHANDAKA G., ROBERTS W., HEDRICK R.P. & FRIEDMAN C.S. (1995). Physiological alterations of the black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach, with withering syndrome. *J. Shellfish Res.*, **14** (1), 269–270

MOORE J.D., CHERR G.N. & FRIEDMAN C.S. (2001a). Detection of “*CandidatusXenohaliotis californiensis*” (Rickettsiales-like procaryote) inclusions in tissue squashes of abalone (*Haliotis* spp.) gastrointestinal epithelium using a nucleic acid fluorochrome. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 147–152

MOORE J.D., JUHASZ C.I., ROBBINS T.T. & VILCHIS I. (2009). Green abalone, *Haliotis fulgens*, infected with the agent of withering syndrome do not express disease signs under a temperature regime permissive for red abalone, *Haliotis rufescens*. *Marine Biol.*, **156**, 2325–2330

MOORE J.D., MARSHMAN B.C. & CHUN C.C. (2011). Health and survival of red abalone *Haliotis rufescens* from San Miguel Island, California, USA, in a laboratory simulation of La Niña and El Niño conditions. *J. Aquat. Anim. Health*, **23** (2), 78–84

MOORE J.D., ROBBINS T.T. & FRIEDMAN C.S. (2000). Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with a gastrointestinal rickettsia-like procaryote. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 26–34

MOORE J.D., ROBBINS T.T., HEDRICK R.P. & FRIEDMAN C.S. (2001b). Transmission of the Rickettsiales-like procaryote “*CandidatusXenohaliotis californiensis*” and its role in withering syndrome of California abalone *Haliotis* spp. *J. Shellfish Res.*, **20** (2), 867–874

RAIMONDI P.T., WILSON C.M., AMBROSE R.F., ENGLE J.M. & MINCHINTON T.E. (2002). Continued declines of black abalone along the coast of California: Are mass mortalities related to El Nino events? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **242**, 143–152

ROSENBLUM E.S., JUHASZ C., FRIEDMAN C.S., ROBBINS T.T., CRAIGMILL A., TJEERDEMA R.S. & MOORE J.D. (2008). Oxytetracycline as a treatment for abalone withering syndrome. Part II: Efficacy, pharmacokinetics, and long term resistance to re-infection at elevated sea water temperatures. *Aquaculture*, **277** (3–4), 138–148

STEINBECK J.R., GROFF J.M., FRIEDMAN C.S., MCDOWELL T. & HEDRICK R.P. (1992). Investigations into mortality among populations of the California black abalone, *Haliotis cracherodii*, on the central coast of California, USA. In: Abalone of the World. , Shepard S.A., Tegner M.J. & Guzman del Proo S.A., eds. Blackwell Scientific, Oxford, UK, 203–213

TINAJERO M.D.C.A., CACERES-MARTINEZ J. & AVILES J.G.G. (2002). Histopathological evaluation of the yellow abalone *Haliotis corrugata* and the blue abalone *Haliotis fulgens* from Baja California, Mexico. *J. Shellfish Res.*, **21** (2), 825–830

VAN BLARICOM G.R., FRIEDMAN C.S. & NEUMAN M.J. (2011). Dynamics of endangered black abalone populations at San Nicolas Island, Naval Base Ventura County, California. *Nat. Selections (US Department of Defense, Legacy Natural Resource Management Program)*, (in press).

VAN BLARICOM G.R., RUEDIGER J.L., FRIEDMAN C.S., WOODARD D.D. & HEDRICK R.P. (1993). Discovery withering syndrome among black abalone populations at San Nicolas Island, California. *J. Shellfish Res.*, **12** (2), 185–188

WETCHATENG T. (2008). *Rickettsia*-like organism (RLO) infection in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*: Histopathology, diagnosis and treatment. , PhD. Dissertation, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 49 pp

WETCHATENG T., FRIEDMAN C.S., WIGHT N.A., LEE P.Y., TENG P.H., SRIURAIRATTANA S., WONGPRASERT K. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2010). Withering syndrome in abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Dis. Aquat. Org.*, **90** (1), 69–76

*

* *

NB: В настоящее время нет справочной лаборатории МЭБ по инфицированию *Xenohaliotis californiensis*.

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

-
1. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США - Центр ветеринарной медицины.
 2. .

Инфекция

XENOHALLOTIS CALIFORNIENSIS

3. Предмет рассмотрения¹

Внутрицитоплазматические инфекции, вызванные *Xenohalotis californiensis*, риккетсиозной бактерией, в эпителии желудочно-кишечного тракта вызывают заболевание (так называемый синдром увядания [Naaker с соавт., 1992]) у диких и выращиваемых на фермах морских ушек, *Haliotis* spp. (Vetigastropoda: Mollusca [Friedman с соавт., 2000]). К серьезным признакам заболевания относятся атрофия стопы, пятнистость пищеварительной железы, анорексия, слабость и летаргия (Balseiro с соавт., 2006; Friedman с соавт., 2000; Gardner с соавт., 1995).

4. Информация о болезни**2.1. Факторы агента****2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента**

Xenohalotis californiensis является внутриклеточной бактерией семейства *Anaplasmataceae* (Dumler с соавт., 2001) и близко родственна представителям родов *Ehrlichia*, *Anaplasma* и *Cowdria* (Friedman с соавт., 2000). Болезнь, вызываемая этой бактерией, известна как синдром увядания (Friedman с соавт., 2002; Naaker с соавт., 1992), и ее более уместно называть риккетсиозом морских ушек. Информация о наличии разновидностей штаммов этой бактерии отсутствует; однако недавние наблюдения показали, что некоторые бактерии *X. californiensis* могут быть инфицированы фагами (Friedman & Crosson, неопубликованные данные). Диморфная бактерия от палочковидной до сферической формы имеет размеры в среднем 332×1550 нм в бациллярной форме и в среднем 1405 нм в сферическом морфотипе. Бактерия размножается в внутрицитоплазматических вакуолях диаметром 14-56 мкм в желудочно-кишечном эпителии (Friedman с соавт., 2000).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Несмотря на то, что *X. californiensis* считается облигатным внутриклеточным организмом, бактерия может выживать вне хозяина в течение неопределенного периода времени, что подтверждается исследованиями передачи через воду (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2002; Friedman с соавт., 2007; Rosenblum с соавт., 2008).

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

Опираясь на результаты успешной деконтаминации в лаборатории, эта бактерия легко инактивируется погружением в <10% отбеливатель. Кроме того, воздействие гипохлорита кальция на морскую воду, содержащую бактерию, >10 мг на литр 1 [ppm] и дезинфекция

¹ NB: Версия принята Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 г.

оборудования в ванне с 1% йодоформом в пресной воде в течение 1 часа являются эффективными дезинфицирующими средствами, основанными на результатах использования этих методов дезинфекции в морской лаборатории с проточной морской водой при отсутствии обнаружения этого патогенного организма в соседних популяциях морских ушек (Friedman & Finley, 2003; Friedman, pers. obs.).

2.1.4. Жизненный цикл

Бактерия делится бинарным делением (Friedman с соавт., 2000) и имеет прямую горизонтальную передачу (Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2001b). Хотя ее обычно не обнаруживают у аквакультурных морских ушек до тех пор, пока она не перейдет в стадию выращивания (максимальный размер > 2,5 см), исследование с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) 6-недельных морских ушек, подвергшихся воздействию бактерии, показало, что ушки размером 1-2 мм могут быть инфицированы (Moore с соавт., неопубликованные наблюдения).

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяина

Xenohaliotis californiensis поражает представителей рода *Haliotis*, и естественные инфекции наблюдались у черных морских ушек (*H. cracherodii*), белых морских ушек (*H. sorenseni*), красных морских ушек (*H. rufescens*), розовых морских ушек (*H. corrugata*), зеленых морских ушек (*H. fulgens*), маленьких морских ушек (*H. diversicolor supertexta*) (Wetchateng, 2008; Wetchateng с соавт., 2010), европейских морских ушек (*H. tuberculata*) (Balseiro с соавт., 2006) в дикой природе или в условиях аквакультуры, а также плоских (*H. wallalensis*) и японских морских ушек (*H. Discus-hannai*) при лабораторных испытаниях (Friedman, неопубликованные наблюдения). Исследования других видов морских ушек не проводились. Температура является важным фактором как для передачи патогенных организмов, так и для проявления болезни (Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 1997; Raimondi с соавт., 2002; Rosenblum с соавт., 2008).

2.2.2. Стадии восприимчивости хозяина

Несмотря на то, что на всех пост-личиночных стадиях развития наблюдалась чувствительность к инфекции *X. californiensis*, клиническое проявление болезни обычно наблюдается у животных в возрасте старше 1 года у аквакультурных морских ушек (Friedman, неопубликованные наблюдения) и у всех классов размеров морских ушек, наблюдаемых в диких популяциях, обследованных на настоящее время (например, Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 1997; Haaker с соавт., 1992; Steinbeck с соавт., 1992; Van Blaricom с соавт., 1993; Van Blaricom с соавт., 2011).

2.2.3. Вероятность обнаружения видов или субпопуляций

Вероятность обнаружения увеличивается с увеличением размера морского ушка. Животные размером менее 10 мм имеют меньшую вероятность обнаружения с помощью гистологии, но равную вероятность обнаружения с помощью ПЦР (Friedman с соавт., 2007; Moore с соавт., 2011).

2.2.4. Целевые органы и инфицированные ткани

Xenohaliotis californiensis инфицирует эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта задней части пищевода, пищеварительной железы и, в меньшей степени, кишечника (Friedman с соавт., 2000).

2.2.5. Устойчивая инфекция пожизненными носителями

Инфекции могут сохраняться в течение длительного времени без развития клинических проявлений болезни, если хозяин находится в прохладной воде (например, 15°C для красных морских ушек) и воздействие повышенных температур морской воды (например, > 17°C для красных, черных и белых морских ушек) обычно приводит к развитию клинического заболевания (Friedman & Finley, 2003; Moore с соавт., 2000; Steinbeck с соавт., 1992). Изменение температуры морской воды с более низкой средней температурой (например, 16,5°C для красного морского ушка) может усугубить потери (Moore с соавт., 2011). Последние данные свидетельствуют о том, что некоторые виды, особенно те, которые населяют более теплые воды, могут содержать бактерии без развития клинических проявлений болезни (Wetchateng, 2008; Wetchateng с соавт., 2010).

2.2.6. Векторы

Хотя не было идентифицировано альтернативных хозяев, не принадлежащих к семейству галиотидов (морских ушек), было высказано предположение, что некоторые колониальные асцидии могут концентрировать бактерию (на основании данных ПЦР). Таким образом, возможность того, что такие виды действуют как переносчики бактерий, существует, но необходимы дальнейшие исследования возможных переносчиков (J.D. Moore, неопубликованное наблюдение).

2.2.7. Известные или подозрительные дикие водные животные-носители

Отсутствуют

2.3. Паттерн болезни

Болезнь (синдром увядания) возникает при повышенной температуре воды (~ 18°C и выше) у морских ушек со средними и тяжелыми инфекциями (Friedman с соавт., 2000; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000). Инкубационный период синдрома увядания является продолжительным и обычно составляет от 3 до 7 месяцев (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 1997; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2001b). Клиническое заболевание характеризуется морфологическими изменениями пищеварительной железы, которые различаются у разных видов и могут включать дегенерацию (атрофию канальцев, увеличение соединительной ткани и воспаление) и/или метаплазию пищеварительных канальцев. Метаплазия включает замену терминальных секреторных/абсорбтивных ацинусов абсорбционными/транспортными протоками, внешне похожими на постэзофагус. Эти морфологические изменения сопровождаются анорексией, истощением запасов гликогена с последующим использованием мышц стопы в качестве источника энергии и

последующей смертью (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 1997; Friedman с соавт., 2007; Kismohandaka с соавт., 1995; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2001b). Стопа пораженных ушек содержит меньше организованных мышечных пучков, обильную соединительную ткань и может содержать больше церозных клеток, чем у здоровых людей (Friedman с соавт., 2007; Moore с соавт., 2000; Van Blaricom с соавт., 1993). Выжившие морские ушки остаются инфицированными даже в условиях низкой температуры воды, например, в северной Калифорнии (Friedman & Finley, 2003).

2.3.1. Механизмы передачи

Передача *X. californiensis* является горизонтальной и предполагается, что она осуществляется фекально-оральным путем. Воздействие морской воды, содержащей инфекционный материал, на морских ушек достаточно для передачи бактерии, и прямой контакт с животными не требуется (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000; Мур и др., 2001b). Было продемонстрировано, что температуры ниже 13 ° C ограничивают передачу бактерий (т.е. менее 1% передачи) по сравнению с температурой, сохраняющейся в пределах ~ 18 ° C (передача 72-94%) (Braid с соавт., 2005).

2.3.2.Превалентность

Таблица 2.1. Вариации превалентности Xenohaliotis californiensis: виды и локализация

Виды	ПЦР, превалентность		Гистологические исследования, превалентность		Ссылки
	Дикие	Аквакультура	Дикие	Аквакультура	
<i>Haliotis rufescens</i>	ND	0–100%	1–75% ^a	0–100% ^b	Friedman & Finley, 2003; Moore с соавт., 2000; Friedman, unpublished obs.
<i>Haliotis cracherodii</i>	ND	NA	74–98%	NA	Friedman & Finley, 2003
<i>Haliotis sorenseni</i>	0	0–100%	0	0–100%	Friedman с соавт., 2007; Moore с соавт., unpublished obs.
<i>Haliotis fulgens</i>	ND	ND	44–100%	ND	Moore с соавт., 2009; Tinajero с соавт., 2002
<i>Haliotis corrugata</i>	ND	ND	62–63%	ND	Tinajero с соавт., 2002
<i>Haliotis walallensis</i>	NA	NA	0	NA	J.D. Moore, unpublished obs.
<i>Haliotis discus-hannai</i>	ND	0	0	0	C.S. Friedman, unpublished obs.
<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	ND	61%	ND	53%	Wetchateng, 2008; Wetchateng с соавт., 2010 ^c
<i>Haliotis tuberculata</i>	ND	ND	0%	14.5-52%	Balseiro с соавт., 2006

- d. Превалентность 1–17% наблюдалась в северной Калифорнии и до 75% в центральной и южной Калифорнии.
- e. У морских ушек больших размеров обычно наблюдается более высокая превалентность инфекции.
- f. Всего было отобрано 36 животных с одной фермы в Таиланде. ND = нет данных; NA = не применимо.

2.3.3. Географическое распространение

Xenohalictis californiensis встречается вдоль юго-западного побережья Северной Америки в Калифорнии, США и Нижней Калифорнии, Мексика. Тем не менее, поскольку инфицированные морские ушки были доставлены в Чили, Китай (Народную Республику), Китайский Тайбэй, Исландию, Ирландию, Израиль, Японию, Испанию и Таиланд и, возможно, в другие страны, предполагается, что географический диапазон этиологического агента широкий там, где выращиваются калифорнийские красные морские ушки, *Halictis rufescens*, или в районах, где местные виды контактировали с красными морскими ушками (Wetchateng, 2008).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Восприимчивость зависит от вида, так как известно, что бактерия вызывает заболевание у черных (до 99% смертности; Moore с соавт., 2009), белых (до 100% смертности; Friedman & McCormick, неопубликованные наблюдения), красных (до 35% смертность; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2001b), розовых (также называемых желтыми) и зеленых (также называемых синими) морских ушек (Tinajero с соавт., 2002). В отличие от других видов морских ушек, изученных на сегодняшний день, масштаб смертности морских ушек недостаточно хорошо задокументирован относительно розовых и зеленых морских ушек. Однако в Нижней Калифорнии, Мексика, до 100% зеленых (синих) и 63% розовых (желтых) морских ушек могут быть инфицированы, причем до 43% зеленых и 71% розовых ушек имеют микроскопические признаки заболевания. (дегенерация и метаплазия пищеварительной железы; Tinajero с соавт., 2002). Инкубационный период варьируется в зависимости от температуры, но обычно включает в себя длительный предварительный период от 3 до 7 месяцев. Смертность обычно наступает через 1-2,5 месяца после появления видимых клинических признаков (Friedman с соавт., 1997). *Xenohalictis californiensis* была недавно обнаружена на основании гистологических и молекулярных данных в нескольких азиатских странах, включая Китай (Народную Республику), Китайский Тайбэй и Таиланд (Wetchateng, 2008; Wetchateng с соавт., 2010). Распространенность не подтверждена документально, но до 61% *H. diversicolor supertexta* были инфицированы на ферме в Таиланде, однако, как и у европейского морского ушка, *H. tuberculata*, ни у одного морского ушка не было клинических признаков синдрома увядания (Balseiro с соавт., 2006; Van Blaricom с соавт., 2011).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Болезнь (синдром увядания) возникает при повышенной температуре воды (~ 18-25 ° C у морских ушек с умеренными и тяжелыми инфекциями (Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2000; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2011; Rosenblum

с соавт., 2008). Передача паразитов усиливается у откормленных (94%) морских ушек по сравнению с голодными (72%) морскими ушками (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005 г.). Количество субклинических инфекций у *H. diversicolor supertexta* увеличивалось при 27–29°C (Van Blaricom с соавт., 2011). Поскольку морские ушки являются облигатными морскими видами, устойчивость к солености у *Rickettsia*-подобных организмов (RLO) не исследовалась.

2.4. Контроль и профилактика

Самая эффективная профилактика - избегание возбудителя. В случае возникновения инфекции содержание морских ушек при температуре $\leq 15^{\circ}\text{C}$ может снизить передачу RLO и последующую передачу болезни (Braid с соавт., 2005). Применение окситетрациклина (см. Раздел 2.4.2 ниже) снижает потери.

2.4.1. Вакцинация

Вакцинация не является эффективным вариантом контроля инфекции *X. californiensis*.

2.4.2. Химиотерапия

Уменьшение плотности и применение диеты, содержащей окситетрациклин, может снизить потери (Friedman с соавт., 2003; Friedman с соавт., 2007; Rosenblum с соавт., 2008). Пероральный прием 12-19% ТМ-100 (90-100 мг / кг) с лечебной диетой в течение 10 или 20 дней обеспечивает защиту от повторного инфицирования бактериями на несколько месяцев. Последние данные показывают, что пероральный прием 12% ТМ-100 в течение одного дня может снизить распространенность бактериальных инфекций с 80% до 10% и среднюю интенсивность инфекции с 1,4 до 0,1 по шкале 0–3 (Friedman с соавт., 2000; Friedman и др., 2007). Основываясь на наблюдении за окситетрациклином в необработанных морских ушках, которые получали морскую воду от обработанных животных, считается, что либо потребление морской воды, содержащей лекарственное средство, либо абсорбция может быть ключевым путем потребления этого терапевтического средства (Friedman с соавт., Непубликованные данные).

2.4.3. Иммуностимуляция

Нет данных об иммуностимуляции как о мере контроля данной болезни.

2.4.4. Разведение резистентных особей

Интерес к селекции резистентных морских ушек, особенно с целью восполнения популяции, повышается. Дикие черные морские ушки продолжают пополнять популяцию вдоль островов Чаннел Айлендс у берегов Калифорнии с 2002г. И некоторые особи, участвующие в пополнении популяции выживают, что свидетельствует о том, что эти особи могут быть более устойчивы к данной болезни, вызываемой риккетсиями (Tinajero с соавт., 2002). Недавние лабораторные исследования продемонстрировали повышенную резистентность к болезни у потомства черных морских ушек, которые выжили после инфицирования *X. californiensis* по сравнению с особями из популяций, неинфицированных болезнью (Friedman с соавт. неопубликованные данные).

2.4.5. Восполнение популяции устойчивыми видами

В настоящее время данных нет, и необходимо учитывать относительные преимущества выращивания альтернативных видов.

2.4.6. Блокирующие агенты

Нет данных

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Не было предпринято попыток дезинфекции икры и личинок. Личинки морских ушек не питаются и маловероятно, что передача происходит до оседания и метаморфоза, после того, как начинается кормление (Moore & Friedman, неопубликованные данные).

2.4.8. Общие практики содержания

Практика содержания, направленная на уменьшение проблем, вызываемых *X. californiensis*, типична для любой бактериальной болезни и включает покупку проверенных семян (без признаков инфекции), содержание в отдельных семьях или группах (т.е. избегание высокой степени сортировки и смешения разрозненных групп), ополаскивание рук и оборудования в пресной или йодированной воде и их просушивание между использованием. По возможности рекомендуется изоляция инфицированных групп. Если применяется лечение окситетрациклином, терапевтическое применение в соответствии с федеральными рекомендациями (например, FDA-CVM² в США или ЕМЕА³ в Европе) до наступления тепловодного сезона может снизить потери и инфицирование. Как правило, требуется только одно применение в течение второго или третьего года роста в течение типичного 3–4-летнего цикла культивирования.

3. Отбор образцов

3.1. Отбор индивидуальных особей

Для рутинного отбора проб рекомендуется выборочный или случайный отбор особей, а оптимальное количество собранных образцов будет варьироваться в зависимости от размера популяции и желаемого уровня обнаружения (например, $n = 60$ для популяции > 2000 особей). Для оптимизации обнаружения (целевого отбора проб) рекомендуется отбор морских ушек с клиническими признаками снижения веса (атрофированная pedalная мышца). По возможности, у животных следует отбирать пробы после тепловодного периода (например, 30 дней) ($> 18^\circ \text{C}$).

3.2. Консервация образцов для передачи

Образцы следует поместить в 80–95% неденатурированный этанол (ткань: этанол 1: 9 [об. / об.]) и хранить при температуре 4–20°C. Образцы также можно мгновенно заморозить в жидком азоте и хранить при -80°C до тестирования. Образцы этанола следует отправлять

² Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США - Центр ветеринарной медицины

³ Европейское агентство по лекарственным средствам

в лабораторию на льду в соответствии с национальными или международными стандартами транспортировки легковоспламеняющихся материалов, если применимо. Замороженные образцы следует отправлять на сухом льду в соответствии с национальными или международными стандартами транспортировки, если применимо.

3.3. Объединение образцов в пул

В идеале образцы следует иссечь и хранить отдельно. Если в качестве меры экономии средств желательно объединение образцов в пул, рекомендуется объединять образцы ($n = 5$ / пул) для выделения ДНК и последующих ПЦР-анализов. Чтобы учесть возможное разбавление целевой ДНК, соответствующее объединению в пул, ПЦР следует проводить в трех повторностях.

3.3. Наилучшие органы и ткани

Лучшая целевая ткань - это задний пищевод, а вторая лучшая ткань - комплекс пищеварительной железы и кишечника.

3.4. Неподходящие образцы/ткани

Ткани, не относящиеся к пищеварительной системе не содержат риккетсиозной ДНК, и их следует избегать.

4. Диагностические методы

Макроскопические признаки болезни, при их наличии, включают атрофию педальной мышцы, пятнистость пищеварительной железы, потерю аппетита и вялость. Следует иметь в виду, что животные могут страдать от преคลินิกической инфекции во время инкубационного периода, если это более устойчивые к болезни виды, или если они содержатся в воде с температурой не выше 15°C. Болезнь характеризуется внутрицитоплазматическими бактериальными включениями в заднем отделе пищевода, кишечнике и абсорбирующем/транспортном эпителии пищеварительной железы, в то время как при умеренных и обширных инфекциях наблюдаются дегенеративные или метапластические изменения в пищеварительной железе с последующей атрофией педальной мышцы у восприимчивых видов.

4.1. Полевые диагностические методы

4.1.1. Клинические признаки

Морские ушки, пораженные инфекциями *X. californiensis*, могут страдать от субклинических инфекций в течение препатентного периода или при температуре воды не выше 15°C. Инфицированные особи могут демонстрировать различные уровни истощения (атрофии), от незначительного до серьезного, при более высоких температурах воды.

4.1.2. Изменения в поведении

Во время эпидемии пораженные морские ушки часто прикрепляются к горизонтальным (а не вертикальным или перевёрнутым) поверхностям, выглядят слабыми (их легко отделить от поверхности рукой) и истощенными (сморщенными) (Naaker с соавт., 1992). Аквакультурные морские ушки также отказываются от приема пищи. К тому же, присутствие аномально большого количества свежих раковин также может указывать на болезнь.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Клиническая характеристика болезни, вызванной *X. californiensis*, основана на комбинации морфологических изменений в ткани в присутствии возбудителя. Морфологические изменения включают атрофированную мышцу ноги, что заметно на макроскопическом и микроскопическом уровне (гистология). Как непосредственный результат катаболизма pedalной мышцы, инфицированные морские ушки выделяют значительно более высокие уровни аммиака по сравнению с неинфицированными особями (Kismohandaka с соавт., 1995). Если обнаруживаются умирающие особи морских ушек, то наличие пятнистости пищеварительной железы (темно-коричневая с небольшими очагами рыжевато-коричневой ткани), указывающая на метапластические изменения, является убедительным доказательством наличия этой болезни (Friedman с соавт., 2000).

4.2.2. Клиническая химия

Можно использовать стандартный гликогеновый тест (Balseiro с соавт., 2006) для проверки снижения уровня гликогена в пищеварительной железе и pedalной мышце. Однако снижение уровня гликогена связано с отказом от потребления пищи и неспособностью ее переваривать, что является неспецифичным для этой болезни (т.е. схоже с признаками голодания) [Balseiro с соавт., 2006]).

4.2.3. Микроскопическая патология

Наличие базофильных, овальных внутрицитоплазматических включений в эпителии пищеварительного тракта (задний отдел пищевода, транспортные протоки и метапластический эпителий пищеварительной железы и/или кишечника). Метапластические изменения в пищеварительной железе, которые включают трансформацию секреторных концевых отделов - ацинусов в абсорбирующий/транспортный эпителий, усиливаются у морских ушек, зараженных *X. californiensis* (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2001b). Несмотря на то, что метаплазия наблюдалась у всех пораженных видов, исследованных до настоящего времени, реакция на инфекцию может варьировать у разных хозяев. Красные морские ушки и белые морские ушки, например, обычно реагируют метапластическими изменениями (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Moore с соавт., 2000), в то время как черные морские ушки обычно реагируют комбинацией метаплазии, дегенерации пищеварительных каналов и воспаления (Friedman с соавт., 1997; Friedman с соавт., 2002). Уровень гликогена в pedalной мускулатуре у пораженных особей ниже, и количество мышечных пучков меньше, чем у здоровых особей (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Gardner с соавт., 1995). У некоторых морских ушек может наблюдаться повышение уровня серозных клеток в мышце ноги (Van Blaricom с соавт., 1993), но эти признаки не являются патогномоничными для этого заболевания. Молодые особи белых морских ушек могут демонстрировать очевидные метапластические изменения в пищеварительном тракте без присутствия *X. californiensis* (Friedman с соавт., 2007). Таким образом, присутствие *X. californiensis* в эпителии пищеварительного тракта параллельно с морфологическими изменениями, отмеченными выше, указывают на наличие клинического синдрома увядания.

4.2.4. Влажные препараты

Несмотря на отсутствие рекомендаций, цитоплазматические включения можно увидеть посредством метода фазового контраста или микроскопии по методу дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) при исследовании заднего отдела пищевода; морфология пищеварительных тканей усложняет интерпретацию влажных препаратов.

4.2.5. Мазки

Окрашенные мазки эпителия пищеварительного тракта могут использоваться с целью обнаружения бактериальных включений. Однако исследование небольших кусочков заднего отдела пищевода, которые были высушены на слайде и окрашены ДНК флуорохромом, может быть более легким для интерпретации, чем окрашенные мазки.

4.2.6. Фиксированные срезы

Не применяется.

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) может использоваться для подтверждения присутствия *Риккетсия*-подобных организмов. Однако, этот метод не может быть подтверждающим в отношении этого возбудителя по причине недостаточного количества уникальных морфологических характеристик. Если используется ТЭМ, то она обнаружит межклеточные колонии палочковидных прокариот с большим количеством рибосом и имеющих трехслойные клеточные стенки внутри мембранно-связанных вакуолей в цитоплазме эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта. Диморфные бактерии, с формами от палочковидных до круглых, имеют в среднем размеры 332×1550 нм, если имеют форму бациллы, и 1405 нм при сферическом морфотипе. Бактерия репродуцируется внутри внутрицитоплазматических вакуолей 14–56 мкм в диаметре (Friedman с соавт., 2000).

4.3. Методы выявления и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

Некоторые методы идентификации и обнаружения *X. californiensis* в образцах ткани или экстрагированной ДНК приведены в разделах ниже.

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Ткани (задний отдел пищевода) могут быть рассечены, помещены на предметное стекло и исследованы с помощью микроскопии методом дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) или фазово-контрастной микроскопии при $\times 200$ или $\times 400$ увеличении после расплющивания покровным стеклом. Риккетсиозные включения и прозрачные круглые включения появляются внутри эпителия пищевода. Этот метод не рекомендуется для использования, так как включения иногда трудно идентифицировать.

4.3.1.1.2. Мазки

Отпечатки ткани можно использовать для выявления инфекции *X. californiensis*, при ее интенсивности от умеренной до высокой. Однако гистология является более чувствительным методом, чем исследование отпечатков ткани.

4.3.1.1.2.1. Метод окрашивания

Делают надрез заднего отдела пищевода и отпечатаывают на слайде. Фиксируют мазок метанолом и окрашивают по модифицированному методу Гимза. Высушивают и исследуют на наличие риккетсиозных включений при погружении в масло, либо покрывают покровным стеклом и изучают при $\times 200$ – 400 увеличении.

4.3.1.1.2.2. Метод флуоресценции

Делают надрез заднего отдела пищевода, измельчают и помещают на слайд, высушивают феном в течение ~ 20 минут. Окрашивают предметные слайды флуоресцентным красителем для нуклеиновой кислоты, например пропидием йодида или Хехстом 33258 (Naaker с соавт., 1992). Инкубируют в темноте в течение 3 минут и просматривают в режиме эпифлуоресценции при $\times 200$ увеличении. Бактериальные включения отличаются от ядра хозяина по размеру и частоте. Однако, если предметные стекла с образцами необходимо оставить для будущих исследований, их следует тщательно высушить и хранить высушенными до момента окрашивания.

Включения паразита, 14–56 мкм в диаметре, перемежаются с более мелкими ядрами хозяина. Изучение одного предметного стекла в течение 5 минут достаточно при $\times 200$ увеличении (Moore с соавт., 2001a). Этот метод менее чувствителен, чем гистология, поэтому невозможно различить бактериальную морфологию. Лучше всего его применять как экспресс-метод внутри известного ареала болезни.

Эти тесты не были валидированы и не доступны для приобретения.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

4.3.1.1.3.1. Гистология

Гистологическая процедура подробно описана в Главе 2.4.0 этого *Водного Руководства*. Удаляют раковину и делают несколько 3–5 мм поперечных срезов, содержащих задний отдел пищевода, пищеварительную железу и мышцу ноги. Поместить надрезанную ткань в растворы Дэвидсона или Карсона (см. Главу этого *Водного Руководства*) на 24 часа и подготовить для рутинной гистологии в парафине. С поперечными срезами легче всего работать, если их поместить в кассеты до проведения фиксации. Соотношение должно составлять не более одного объема ткани на десять объемов фиксирующего раствора.

Депарафинизированные 3–5 мкм срезы следует окрашивать гематоксилином и эозином и просматривать при помощи световой микроскопии на наличие бактериальных включений (продолговатые, базофильные внутрицитоплазматические вакуоли, 14–56 мкм в диаметре [Friedman с соавт., 2000]) в заднем отделе пищевода и пищеварительной железе и морфологических изменений в пищеварительной железе и ноге. Рекомендуется исследовать срезы при $\times 200$ или $\times 400$ увеличении.

Xenohaliotis californiensis могут быть морфологически схожи с другими морскими риккетсиозными бактериями. У калифорнийских морских ушек обнаруживались до трех морфологически различных внутрицитоплазматических бактерий (Friedman с соавт., неопубликованные данные). Окончательный диагноз по бактериям может включать молекулярные способы (e.g. гибридизация *in-situ* [ISH]). Окончательный диагноз синдрома увядания с помощью гистологии должен включать обнаружение бактерии и морфологические изменения в пищеварительной железе, метаплазию и/или атрофию, и такие же признаки в мышце ноги.

При обнаружении отхода в географическом ареале синдрома увядания, визуализация внутриклеточных бактериальных очагов в эпителии пищеварительного тракта с помощью гистологического исследования, может считаться подтверждающим методом и считается золотым стандартом в отношении этой болезни. Однако подтверждение с помощью гистологии параллельно с ПЦР и секвенированием или ISH рекомендуется для определения вида риккетсиозных бактерий у морских ушек, которые прежде не были известны, как восприимчивые к бактерии или инфекции в новом географическом регионе.

Этот тест не был официально валидирован. Однако гистология считалась подтверждающим исследованием на наличие *X. californiensis*.

4.3.1.1.3.2. Исследование с помощью трансмиссионной электронной микроскопии

Процедуры трансмиссионной электронной микроскопии описаны в Главе 2.4.0 этого *Водного Руководства*. При этом исследовании просматриваются палочковидные прокариоты с большим количеством рибосом, имеющие трехслойные клеточные стенки, собирающиеся в межклеточные колонии внутри мембранно-связанных вакуолей в цитоплазме эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта. Диморфные, от палочковидных до круглых, бактерии имеют в среднем размеры 332×1550 нм, если имеют форму бациллы, и в среднем 1405 нм при сферическом морфотипе. Бактерия репродуцируется внутри внутрицитоплазматических вакуолей, 14–56 мкм в диаметре (Friedman с соавт., 2000). Это исследование не было официально валидировано.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

Размножение *X. californiensis* в культуре клеток (по причине отсутствия клеточных линий, полученных от морских моллюсков) и на искусственных средах до настоящего времени было неуспешным.

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные среды

Не разработаны.

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе антител

Не разработаны.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция

Положительная ПЦР амплификация дает только предположительный диагноз, так как выявляет ДНК, но не обязательно жизнеспособный патоген. Необходимо использовать другие методы, предпочтительно гистологию и ISH, для визуализации патогена. При использовании параллельно с гистологией, ПЦР можно использовать для подтверждения. Изучение амплифицированной последовательности рекомендуется при исследовании новых видов хозяев или случаев в новой географической зоне. Последовательности должны быть сопоставимы с известной 16S рДНК последовательностью этой бактерии (Номер доступа в GenBank AF133090; [Andree с соавт., 2000]).

Пробы для ПЦР должны отбираться от заднего отдела пищевода или пищеварительной железы и подготавливаться с помощью классического метода выделения фенолом-хлороформом или коммерческих тест-систем для выделения ДНК с возможностью удаления ингибиторов (напр. тест-системы для выделения ДНК из фекалий или почвы), которые присутствуют в пищеварительной железе морских ушек. Ткань заднего отдела

пищевода рекомендована для использования, так как инфекции в этой области неизменно более сильные, чем в ткани пищеварительной железы. Положительная контрольная реакция должна всегда быть включена в ПЦР и должна состоять из геномного ДНК, экстрагированной от зараженной особи, или плазмиды, содержащей инсерцию в виде амплифицированного продукта. Если используют плазмиду в качестве положительного контроля, рекомендуется добавить ~100 п.о. инсерцию в клонированный фрагмент с целью снятия беспокойности в отношении перекрёстной контаминации аэрозолированной плазмидной ДНК. К тому же, в ситуациях, когда присутствует низкое количество копий целевой ДНК, эта плазида может вытеснить саму мишень. Отрицательный контроль, состоящий из мастер-микса без добавления матрицы, также должен быть включен в ПЦР. Все реакции должны прогоняться в двух повторностях. Обнаружение 160 п.о. полосы в пробах ткани и положительных контрольных реакциях является признаком успешного исследования. Чувствительность и специфичность этого теста находятся в процессе формальной оценки со стороны Референтной лаборатории МЭБ (Friedman *с соавт.*, неопубликованные данные). Коммерческих тестов на данный момент не существует.

ПЦР праймеры, разработанные для выявления *X. californiensis*, специфично амплифицируют 160 п.о. сегмент *Риккетсия*-подобного патогена. На данный момент праймеры имеют следующие обозначения: RA 5–1 (5'-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3') и RA 3–6 (5'-ACT-TGG-ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA-3'). Они нацелены на малую субъединичную рибосомную ДНК и, как было продемонстрировано, чувствительны и специфичны к этому патогену (Andree *с соавт.*, 2000). ПЦР амплификация проводится в стандартном 20 мкл реакционном объеме, содержащем 1 × ПЦР буфер, 1,5 ммоль MgCl₂, 400 нг мл⁻¹ BSA, 200 мкмоль dNTPs, 0,5 мкмоль каждого праймера, 1,6 единиц Taq-полимеразы и 100 нг матричной ДНК. Реакционные смеси прогоняют в амплификаторе. Программа реакции амплификации следующая: предварительная денатурация при 95°C в течение 5 минут, 40 циклов при 95°C в течение 1 минуты, при 62°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 30 секунд и конечная элонгация при 72°C в течение 10 минут. Аликвота каждой ПЦР реакции проверяется в отношении 160 п.о. продукта амплификации с помощью электрофореза в агаровом геле и окрашивания этидием бромидом.

Тест был валидирован при диагностической специфичности и чувствительности в 1.0 (Friedman *с соавт.*, неопубликованные данные). Не доступен для приобретения.

4.3.1.2.3.2. Анализ последовательности

Анализ амплифицированной ДНК необходим для подтверждения идентичности последовательности с целевой бактерией (код доступа в GenBank AF133090). Анализ можно завершить стандартным клонированием и секвенированием множества клонов после проведения ПЦР амплификации исследуемой ДНК.

(ПРИМЕЧАНИЕ: рекомендуется проведение как прямого, так и обратного секвенирования.) Также можно использовать прямое секвенирование ПЦР продуктов.

4.3.1.2.3.3. In-situ гибридизация

ISH это предпочтительный метод для подтверждения идентификации, так как он позволяет визуализировать гибридизацию специфичного зонда с целевым организмом. Однако ДНК зонды должны быть тщательно исследованы на предмет специфичности и валидированы в сравнительных исследованиях до того, как они могут быть использованы для подтверждающей идентификации.

ISH была разработана для выявления *Риккетсия*-подобных прокариотов в срезах ткани (Antonio с соавт., 2000). Специфично меченые олигонуклеотидные зонды гибридизируются с малой субъединичной рибосомной РНК бактерии. Эта гибридизация обнаруживается с помощью конъюгата антител, который распознает меченые зонды. Добавляют субстрат для конъюгата антител, вызывая колориметрическую реакцию, что позволяет визуализировать гибридизацию зонда с ДНК паразита. Несмотря на то, что этот метод не был официально валидирован, анализы на специфичность с использованием некоторых риккетсиозных организмов двустворчатых моллюсков и рыб, указывают на то, что тест специфичен в отношении *X. californiensis* (Antonio с соавт., 2000).

Процедура ISH проводится следующим образом. Положительные (известно инфицированные ткани) и отрицательные (неинфицированные и инфицированные различными бактериями) контроли должны быть включены в процедуру. Зонд синтезируют с помощью ПЦР, используя PCR DIG Probe Synthesis Kit. До использования DIG-меченого зонда, денатурируют зонд при 95°C в течение 3 минут и немедленно помещают на лед на ~30 минут с целью сепарации двуцепочечной ДНК. Хранят при -20°C или -80°C до использования. Последовательности зондов, обозначаемых как RA 5-1, RA 3-6, RA 3-8 и RA 5-6 (Antonio с соавт., 2000) следующие: 5'-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3', 5'-ACT-TGG-ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA-3', 5'-CCA-CTG-TGA-GTG-GTT-ATC-TCC-TG-3', и 5'-GAA-GCA-ATA-TTG-TGA-GAT-AAA-GCA-3'.

12. После удаления раковины делают поперечный срез (3 -5 мм) таким образом, чтобы он содержал задний отдел пищевода, пищеварительную железу и мышцу ноги, и помещают в фиксирующий AFA раствор Дэвидсона (глицерин [10%], формалин [20%], 95% этиловый спирт [30%], dH₂O [30%], ледяная уксусная кислота [10%]) на 24–48 часов, затем переносят в 70% этанол до проведения гистологических процедур (этап ii). Пропорция должна быть не более одного объема ткани на 10 объемов фиксирующего раствора.
13. Образцы последовательно заливают в парафин с помощью классических гистологических процедур. Делают 5-6 мкм срезы и помещают на предметные стекла с положительно заряженной поверхностью или стекла, покрытые 3-аминопропил-триэтоксисилоном. Затем гистологические срезы оставляют сушиться на ночь в печи при 40°C.

ПРИМЕЧАНИЕ: этап просушки можно пропустить при использовании предметных стекол с положительно заряженной поверхностью.

14. Срезы депарафинизируют путем погружения в ксилен или другой менее токсичный осветлитель на 10 минут. Растворитель удаляют последовательным погружением в две ванны с абсолютным спиртом на 10 минут каждая и регидратируют погружением в серию разведений спирта. Срезы затем дважды моют в течение 5 минут Трис буфером (pH 7.2; 0.2 M Tris/HCl, 2.0 ммоль CaCl₂).
15. Срезы обрабатывают протеиназой К, 50 мкг мл⁻¹ в Трис буфере при 37°C в течение 45 минут. Реакцию останавливают посредством трехкратного отмывания срезов ФБР в течение 10 минут для каждой из процедур.
16. Срезы предварительно гибридизируют в течение 10 минут – 1 часа при 37°C в буфере предварительной гибридизации (4 × SSC, 50% формамид).

17. Затем раствор для предварительной гибридизации смывают в $2\times$ SSC и недолго просушивают до замены на буфер для предварительной гибридизации, содержащий диоксигенин-меченые зонды (1:373, зонд:буфер [о:о]). Срезы можно денатурировать* поместив их на термостат при 100°C в течение 10 минут и затем закрывают пластиковыми покровными стёклами для ISH. Предметные стекла затем гибридизируют в течение ночи при 53°C в камере влажности. *Этот этап можно пропустить при желании.
18. Аккуратно удаляют покровные стекла со срезов, погрузив предметные стекла на 5 – 10 минут в $2\times$ SSC при комнатной температуре. Срезы моют дважды в течение 15 минут в $1\times$ SSC при 40°C , и один раз в течение 15 минут в $0.5\times$ SSC при 40°C . Срезы затем помещают в Буфер 1 (100 ммоль Tris/HCl, 10 ммоль NaCl, pH 7.5) на 10 минут.
19. Срезы помещают в Буфер 1 (см. этап vii), в который был добавлен 0,3% Triton X-100 и 2% овечьей сыворотки, на один час при комнатной температуре (не позволять предметным слайдам высыхать).
20. Анти-диоксигениновый конъюгат антител с щелочной фосфатазой разбавляют 1:1000 (или в соответствии с рекомендациями производителя) в Буфере 1 с добавлением 0,3% Triton X-100 и 1% овечьей сыворотки и обрабатывают срезы тканей. Срезы покрывают покровными стёклами для ISH и инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре в камере влажности.
21. Предметные стекла промывают дважды в Буфере 1 в течение 10 минут для каждого этапа (см. этап vii) и дважды в Буфере 2 (100 ммоль Tris/HCl, 100 ммоль NaCl, 50 ммоль MgCl_2 , pH 9.5) в течение 10 минут. Раствор для проявления цветной реакции (добавляют 45 мкл нитросинего тетразолия, 35 мкл 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат, р-толуидин соль [BCIP]) в 10 мл Буфера 2 на 30 минут – 1 час в камере влажности в темноте.
22. Затем предметные стекла ополаскивают трижды стерильной дистиллированной водой (dH_2O). Срезы контрастно окрашивают Бисмарком коричневым Y в течение 3 минут, ополаскивают dH_2O , затем 70% этиловым спиртом с последующим кратким ополаскиванием 100% спиртом до этапа просушки на воздухе и покрытия покровными стёклами с помощью заливочной среды. Присутствие патогена демонстрируется фиолетово-черным мечением клеток паразитов.

Этот тест не был официально валидирован и не доступен для приобретения.

4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

До сегодняшнего дня не разработано.

5. 5. Рейтинг исследований на основании цели использования

Методы, доступные на данный момент для надзора, выявления и диагностики *X. californiensis* перечислены в Таблице 5.1. ниже. В таблице используются следующие обозначения: a = метод является рекомендуемым методом по причине доступности, практичности, диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод может применяться в некоторых ситуациях, но затраты, точность или другие

факторы значительно ограничивают диапазон его применения; и d = метод на настоящий момент не рекомендуется для проведения в этих целях. Эти данные неким образом субъективны, так как пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и практичности. Несмотря на то, что не все тесты, перечисленные как категория а или b, прошли формальные процедуры стандартизации и валидации, их рутинная природа и тот факт, что они широко использовались без получения сомнительных результатов, делает их пригодными для использования.

Таблица 5.1. Методы целевого надзора, выявления и диагностики

Метод	Целевой надзор			Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	Молодые	Взрослые		
Макроскопические признаки	d	c	c	c	d
Биопроба	d	d	c	c	c(a) ^{a.}
Отпечатки ткани – окрашивание по Гимза	d	c	c	b	b(c) ^{b.}
Гистопатология	d	b	b	a	a ^{c.}
ТЭМ	d	d	d	b	c
<i>In-situ</i> ДНК зонды	d	c	c	a	a
ПЦР	d	a	a	a	c(a) ^{d.}
SSU рДНК секвенирование	d	d	d	a	a

a. Для ценной маточной популяции возможно использовать полимеразную цепную реакцию (ПЦР) на образцах фекалий в качестве первого скрининг-теста, при отрицательных результатах, можно в последствии использовать биопробу в комбинации с гистологией (см Раздел 6).

b. Отпечатки ткани используют в комбинации с ПЦР и возможным секвенированием для подтверждения возбудителя.

c. В новых случаях, таких как новый географический регион, ПЦР и секвенирование рекомендуются для подтверждения вида бактерии.

d. ПЦР сама по себе не является подтверждающим анализом, но при применении в комбинации с гистологией ее можно считать подтверждающим тестом. ТЭМ = трансмиссионная электронная микроскопия; SSU рДНК = малая субъединичная рибосомная ДНК.

6. Тесты, рекомендуемые для целевого надзора с целью объявления свободы от инфекции *Xenohalotis californiensis*

Метод для целевого надзора с целью объявления свободы от *X. californiensis* это гистология в комбинации с ПЦР и анализом последовательности либо с помощью ISH. Учитывая хронический характер заболевания и влияние температуры, на каждой производственной площадке рекомендуется исследовать животных в инкубаторах и выростных прудах в течение теплого сезона. Морские ушки, содержащиеся в более холодных водах, могут быть хронически инфицированы без демонстрации каких-либо признаков заболевания. Также рекомендуется ПЦР исследование образцов фекалий или биопроба с более мелкими морскими ушками (напр. 1 - 4 см), живущими среди маточного поголовья в течение не менее 6 недель при $>17^{\circ}\text{C}$.

7. Подтверждающие диагностические критерии

В соответствии с *Водным кодексом* все случаи у других видов должны быть немедленно отправлены в Референтную лабораторию МЭБ для подтверждения, неважно связаны ли с этим случаем клинические признаки или нет.

7.1. Определение случая подозрения

Случай подозрения на инфекцию *X. californiensis* и ассоциированное с ней клиническое заболевание (синдром увядания) могут включать макроскопические клинические признаки (слабость, вялость, отказ от приема пищи, атрофия педальной мышцы и пятнистость пищеварительной железы) и смертность в совокупности с тепловодными условиями, в частности внутри известного географического ареала этого заболевания. У аквакультурных морских ушек отказ от пищи может быть первым признаком болезни. Эти клинические признаки в комбинации с обнаружением атрофии мышцы ноги при микроскопии, телец включения в эпителии желудочно-кишечного тракта или ПЦР результаты (без подтверждения секвенированием) также представляют собой случай подозрения.

7.2. Определение подтвержденного случая

Подтверждение инфекции *X. californiensis* зависит от обнаружения возбудителя при гистологии и ПЦР в совокупности с секвенированием, или ISH. Макроскопические признаки и отпечатки ткани сами по себе не могут использоваться для подтверждающей диагностики и должны дополняться гистологией, ISH или ПЦР с секвенированием.

Подтверждение синдрома увядания зависит как от наличия возбудителя, так и от наличия микроскопических признаков болезни. Как минимум метаплазия или дистрофия пищеварительной железы, наблюдаемые при гистологическом исследовании, должны сопровождать инфекцию *X. californiensis* для диагностирования клинического синдрома увядания.

8. Список литературы

ANDREE K.B., FRIEDMAN C.S., MOORE J.D. & HEDRICK R.P. (2000). A polymerase chain reaction for detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with Withering Syndrome in Black Abalone (*Haliotis cracherodii*). *J. Shellfish Res.*, **19**, 213–218

ANTONIO D.B., ANDREE K.B., MOORE J.D., FRIEDMAN C.S. & HEDRICK R.P. (2000). Detection of Rickettsiales-like prokaryotes (RLPs) by *in situ* hybridization in black abalone *Haliotis cracherodii* with withering syndrome. *J. Invertebr. Pathol.*, **75**, 180–182

- BALSEIRO P., ARANGUREN R., GESTAL C., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2006). *Candidatus Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture*, **258**, 63–72
- BRAID B.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., HEDRICK R.P., TJEERDEMA R.S. & FRIEDMAN C.S. (2005). Health and survival of red abalone, *Haliotis rufescens*, under varying temperature, food supply and exposure to the agent of withering syndrome. *J. Invertebr. Pathol.*, **89**, 219–231
- DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P.J., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C., RIKIHISA Y. & RURANGIRWA F.R. (2001). Reorganization of general in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. System. Evol. Microbiol.*, **51**, 2145–2165
- FRIEDMAN C.S., ANDREE K.B., BEAUCHAMP K.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2000). “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*” a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 847–855
- FRIEDMAN C.S., BIGGS W., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2002). Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *J. Shellfish Res.*, **21** (2), 817–824
- FRIEDMAN C.S. & FINLEY C.A. (2003). Evidence for an anthropogenic introduction of “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*”, the etiological agent of withering syndrome, into northern California abalone populations via conservation efforts. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **60**, 1424–1431
- FRIEDMAN C.S., SCOTT B.B., STRENGE R.E. & MCCORMICK T.B. (2007). Oxytetracycline as a tool to manage and prevent losses of the endangered white abalone, *Haliotis sorenseni*, due to withering syndrome. *J. Shellfish Res.*, **26** (3), 877–885
- FRIEDMAN C.S., THOMSON M., CHUN C., HAAKER P.L. & HEDRICK R.P. (1997). Withering syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *J. Shellfish Res.*, **16**, 403–411
- FRIEDMAN C.S., TREVELYAN G., MULDER E.P. & FIELDS R. (2003). Development of an oral administration of oxytetracycline to control losses due to withering syndrome in cultured red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*, **224** (1–4), 1–23
- GARDNER G.R., HARSHBARGER J.C., LAKE J., SAWYER T.K., PRICE K.L., STEPHENSON M.D., HAAKER P.L. & TOGSTAD H.A. (1995). Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *J. Invertebr. Pathol.*, **66**, 111–120
- HAAKER P.L., PARKER D.O., TOGSTAD H., RICHARDS D.V., DAVIS G.E. & FRIEDMAN C.S. (1992). Mass mortality and withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*, in

California. In: Abalone of the World. , Shepard S.A., Tegner M.J. & Guzman del Proo S.A., eds, Blackwell Scientific, Oxford, UK, 214–224

KISMOHANDAKA G., ROBERTS W., HEDRICK R.P. & FRIEDMAN C.S. (1995). Physiological alterations of the black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach, with withering syndrome. *J. Shellfish Res.*, **14** (1), 269–270

MOORE J.D., CHERR G.N. & FRIEDMAN C.S. (2001a). Detection of “*CandidatusXenohaliotis californiensis*” (Rickettsiales-like procaryote) inclusions in tissue squashes of abalone (*Haliotis* spp.) gastrointestinal epithelium using a nucleic acid fluorochrome. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 147–152

MOORE J.D., JUHASZ C.I., ROBBINS T.T. & VILCHIS I. (2009). Green abalone, *Haliotis fulgens*, infected with the agent of withering syndrome do not express disease signs under a temperature regime permissive for red abalone, *Haliotis rufescens*. *Marine Biol.*, **156**, 2325–2330

MOORE J.D., MARSHMAN B.C. & CHUN C.C. (2011). Health and survival of red abalone *Haliotis rufescens* from San Miguel Island, California, USA, in a laboratory simulation of La Niña and El Niño conditions. *J. Aquat. Anim. Health*, **23** (2), 78–84

MOORE J.D., ROBBINS T.T. & FRIEDMAN C.S. (2000). Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with a gastrointestinal rickettsia-like procaryote. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 26–34

MOORE J.D., ROBBINS T.T., HEDRICK R.P. & FRIEDMAN C.S. (2001b). Transmission of the Rickettsiales-like procaryote “*CandidatusXenohaliotis californiensis*” and its role in withering syndrome of California abalone *Haliotis* spp. *J. Shellfish Res.*, **20** (2), 867–874

RAIMONDI P.T., WILSON C.M., AMBROSE R.F., ENGLE J.M. & MINCHINTON T.E. (2002). Continued declines of black abalone along the coast of California: Are mass mortalities related to El Nino events? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **242**, 143–152

ROSENBLUM E.S., JUHASZ C., FRIEDMAN C.S., ROBBINS T.T., CRAIGMILL A., TJEERDEMA R.S. & MOORE J.D. (2008). Oxytetracycline as a treatment for abalone withering syndrome. Part II: Efficacy, pharmacokinetics, and long term resistance to re-infection at elevated sea water temperatures. *Aquaculture*, **277** (3–4), 138–148

STEINBECK J.R., GROFF J.M., FRIEDMAN C.S., MCDOWELL T. & HEDRICK R.P. (1992). Investigations into mortality among populations of the California black abalone, *Haliotis cracherodii*, on the central coast of California, USA. In: Abalone of the World. , Shepard S.A., Tegner M.J. & Guzman del Proo S.A., eds. Blackwell Scientific, Oxford, UK, 203–213

TINAJERO M.D.C.A., CACERES-MARTINEZ J. & AVILES J.G.G. (2002). Histopathological evaluation of the yellow abalone *Haliotis corrugata* and the blue abalone *Haliotis fulgens* from Baja California, Mexico. *J. Shellfish Res.*, **21** (2), 825–830

VAN BLARICOM G.R., FRIEDMAN C.S. & NEUMAN M.J. (2011). Dynamics of endangered black abalone populations at San Nicolas Island, Naval Base Ventura County, California. *Nat. Selections (US Department of Defense, Legacy Natural Resource Management Program)*, (in press).

VAN BLARICOM G.R., RUEDIGER J.L., FRIEDMAN C.S., WOODARD D.D. & HEDRICK R.P. (1993). Discovery withering syndrome among black abalone populations at San Nicolas Island, California. *J. Shellfish Res.*, **12** (2), 185–188

WETCHATENG T. (2008). *Rickettsia*-like organism (RLO) infection in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*: Histopathology, diagnosis and treatment. , PhD. Dissertation, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 49 pp

WETCHATENG T., FRIEDMAN C.S., WIGHT N.A., LEE P.Y., TENG P.H., SRIURAIRATTANA S., WONGPRASERT K. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2010). Withering syndrome in abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Dis. Aquat. Org.*, **90** (1), 69–76

*

* *

NB: В настоящее время нет справочной лаборатории МЭБ по инфицированию *Xenohaliotis californiensis*.

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

-
3. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США - Центр ветеринарной медицины.

ИНФЕКЦИЯ *MIKROCYTOS MACKINI*

1. Предмет рассмотрения⁶⁴

В целях настоящей главы, инфекция *Mikrocytos mackini* рассматривается в качестве инфекции *Mikrocytos mackini*, возбудителя болезни острова Денман у устриц.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

Простейшие, неизвестной таксономической принадлежности. Филогенетический анализ предполагает, что *M. mackini* может являться основным эукариотом, но с наибольшей вероятностью, не находится в тесной связи с другими известными одноклеточными таксонами (Carnegie с соавт., 2003).

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Штаммы неизвестны (Carnegie с соавт., 2003; Farley с соавт., 1988), а также полностью отсутствует генетическая вариативность в пределах *Mikrocytos mackini* внутри полного ITS1-5.8S-ITS2 фрагмента в рДНК в более чем 70 пробах, отобранных в рамках ее диапазона (Abbott с соавт., 2011).

2.1.2. Выживаемость за пределами хозяина

Неизвестно.

2.1.3. Стабильность возбудителя

Неизвестна. Однако прямая передача между устрицами возникает через толщу воды. (Bower, 1988; Hervio с соавт., 1996; Quayle, 1982).

2.1.4. Жизненный цикл

Жизненный цикл прямой, от хозяина к хозяину.

2.2. Факторы хозяина

Вызывает инфекцию у всех видов устриц, зараженных искусственным способом в лаборатории и естественным способом в природе.

2.2.1. Восприимчивые виды хозяина

Тихоокеанская устрица (*Crassostrea gigas*), Американская устрица (*Crassostrea virginica*), Европейская плоская устрица (*Ostrea edulis*) и устрица Олимпия (*Ostrea lurida*) восприимчивы к инфекции (Bower с соавт., 1997). По крайней мере два вида двустворчатых моллюсков - гуидак (*Panope abrupta*) и манильские клемы (*Venerupis* [= *Tapes*, = *Ruditapes*] *philippinarum*) устойчивы к инфекции (Bower с соавт., 2005; и Meyer с соавт., 2008, соответственно).

⁶⁴ NB: Версия, принятая Мировой Ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2013 года. Болезнь больше не включена в список МЭБ.

2.2.2. Восприимчивые стадии хозяина

Все жизненные стадии устриц после нереста восприимчивы к инфекции (Bower с соавт., 2005). О восприимчивости личинок неизвестно.

2.2.3. Предрасположенность видов и субпопуляции (вероятность обнаружения)

Все восприимчивые виды, содержащиеся при температуре ниже 10°C, как минимум в течение 3 месяцев, подвержены болезни (Bower с соавт., 1997; Hervio с соавт., 1996). *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* и *Ostrea lurida* оказываются наиболее восприимчивы к инфекции и болезни, чем *Crassostrea gigas* (Bower с соавт., 1997).

2.2.4. Органы-мишени и инфицированные ткани

Mikrocytos mackini обычно находится в цитоплазме везикулярных клеток соединительной ткани всех органов и волокон замыкающих мускулов, но также наблюдается в гемоцитах и эпителии пищеварительной железы (Hine с соавт., 2001; Meyer с соавт., 2005).

2.2.5. Персистирующая инфекция с пожизненными носителями

Инфекция может быть фатальной в зависимости от хозяина и условий окружающей среды (Bower, 1988; Bower, 2001; Bower & Meyer, 1999). Субклинические инфекции возникают, но о персистенции инфекции на протяжении нескольких лет и появлении пожизненных носителей ничего неизвестно. (Bower с соавт., 1994a).

2.2.6. Векторы

Для передачи инфекции векторов не требуется.

2.2.7. Известные или предполагаемые переносчики среди водных животных

Не предусмотрено.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача прямая, от хозяина к хозяину (Hervio с соавт., 1996). Жизнеспособную *M. mackini*, высвобожденную после смерти хозяина, вероятно приобретает следующим хозяином через механизмы кормления. *Mikrocytos mackini* в гемоцитах может также сохраняться от своего живого хозяина посредством диапедеза через пищеварительный тракт и жабры.

2.3.2. Превалентность

В 1960-е гг, смертность до 40% весной (апрель и май) в низких приливно-отливных уровнях среди взрослых особей (старше 3 лет) *C. Gigas*, выращенных на пляжном субстрате, была связана с *M. mackini*. В последнее время, *C. gigas* (в возрасте 2 лет), полученные из места культивирования, деятельность которого временно приостановлена, были подвержены 10% смертности весной из-за тяжелых

инфекций, вызванных *M. tuckersi*. До 35% устриц из этой инфицированной популяции имели симптоматические поражения (желто-зеленые пустулы) и пораженная выращиваемая культура была отбракована рыночным процессором. Это было необычным проявлением, поскольку болезнь не всегда влияет на устриц, которые находятся в интенсивном разведении и которых собирали в течении трех лет. Лабораторные эксперименты по подверженности внешнему воздействию указывали на то, что болезнь усугубляется за счет холодных температур, предполагая, что влияние *M. tuckersi* может быть более тяжелым, если она непреднамеренно отправляется в более прохладные места. Также, в условиях лаборатории молодые устрицы (молодь) восприимчивы к инфекции, что приводит к высокой смертности (Bower с соавт., 2005). О влиянии *M. tuckersi* на молодых особей во время коммерческого культивирования неизвестно, но оно должно быть незначительным, если молодь вводится после окончания периода естественной передачи, который происходит весной (Quayle, 1982).

2.3.3. Географическое распределение

На западном побережье Канады, *M. tuckersi* оказывается широко распространена на всей территории Джорджии и вплоть до других населенных мест в окрестности острова Ванкувер. Этот паразит также был обнаружен в устрицах из прилегающих окрестностей штата Вашингтон, США, без подтверждения ассоциированной смертности (Abbott с соавт., 2011).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Инфекция может быть летальной, если температуры окружающей среды благоприятные, как указано ниже. Однако около половины устриц, подверженных воздействию, оказываются резистентными к инфекции или возникающей из-за нее болезни.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Пониженные температуры $<10^{\circ}\text{C}$ в течение 3-4 месяцев, вероятно, являются условием для развития болезни (Bower & Meyer, 1999; Hervio с соавт., 1996). Устрицы, подвергнутые экспериментальному воздействию, содержащиеся при температуре 15°C в течение 3 месяцев не заболевают, пока их не переносят и не содержат при температуре 10°C в течение дополнительных 4 месяцев. Ежегодное появление болезни исключительно в весеннее время (с марта по июнь) может объясняться необходимостью холодной температуры для развития болезни.

2.4. Контроль и профилактика

Аквакультурная промышленность может применять методы управления во избежание влияния *M. tuckersi* (Bower, 1988).

2.4.1. Вакцинация

Не предусмотрено.

2.4.2. Химиотерапия

Не предусмотрено.

2.4.3. Иммуностимуляция

Не предусмотрено.

2.4.4. Резистентное разведение

Не предусмотрено.

2.4.5. Возобновление поголовья резистентными видами

Не предусмотрено.

2.4.6. Блокирующие агенты

Не предусмотрено.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Не предусмотрено.

2.4.8. Общие практики животноводства

Вылов устриц рыночного размера проводится в течение трех лет после разведения и до февраля третьего года с момента вырастания. Молодые устрицы (молодь) не следует выпускать на уровнях малой воды или рядом с инфицированным стадом в подвешенной культуре до июня (Bower, 1988; Quayle, 1982).

3. Отбор образцов

3.1. Отбор индивидуальных образцов

Следует проводить отбор образцов от свежих или недавно умерших устриц.

Весной отбирают взрослых особей устриц (старше 3 лет) из низких приливно-отливных уровней. Отбор образцов сфокусирован на местах, в которых в настоящее время наблюдается смертность. Устриц вынимают из раковины и выбирают образцы, у которых есть незначительные поражения (язвы, абсцессы, пустулы обычно зеленого цвета, но могут быть желто-коричневыми или бесцветными и достигать до 5 мм в диаметре) в везикулярной соединительной ткани тельца, мантии и нижнегубных щупалец и/или замыкающего мускула (фотографии пораженных участков можно увидеть по ссылке: <http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/mikmacoy-eng.html>).

3.2. Сохранение образцов для представления

Для гистологии наилучшим консервантом является раствор Дэвидсона, но 10% забуференный формалин или другие стандартные гистологические фиксаторы тоже приемлемы. Для анализов полимеразной цепной реакции (ПЦР), образцы должны сохраняться и храниться в 95% неденатурированном этаноле до выделения ДНК с использованием коммерчески доступного набора (например, DNeasy Kit; QIAGEN).

3.3. Объединение образцов

Для ПЦР и гистологии допустимо объединение пораженных участков от одной устрицы.

3.4. Наиболее подходящие органы и ткани

Важно отметить, что любые пораженные участки нижнегубных щупалец, мантии, стенки тела или замыкающего мускула консервируются для гистологии и ПЦР. Рекомендуется, чтобы репрезентативные пораженные участки иссекали и разделяли пополам, половину каждого из них фиксировали для гистологии и ПЦР.

Для гистологии, в отсутствии участков поражения (или в дополнение к ним), используется поперечный разрез (около 3 мм толщиной) через переднюю часть висцеральной массы, которая включает нижнегубные щупальца, мантию, пищеварительную железу и желудок. Везикулярная соединительная ткань (ВСТ) наиболее подходит для визуализации *M. mackini* путем гистопатологии.

Для ПЦР, в отсутствии участков поражения (или в дополнение к ним), поперечный разрез (срез около 3 мм толщиной) делают через среднюю часть висцеральной массы. Из этого участка иссекается маленький участок/маленькие участки ткани (общим весом около 25 мг) около основания жабр, которые включают: ВСТ, пищеварительную железу и жабры.

3.5. Неподходящие образцы/ткани

Mikrocytos mackini ассоциируется с пищеварительным трактом и не выявляется путем рутинного гистологического исследования срезов, окрашенных гематоксилином и эозином. Для того, чтобы увидеть паразитов в этих тканях, обычно требуется *in situ* гибридизация. Также, практически невозможно обнаружить *M. mackini* путем гистопатологии в тканях устриц, зараженных естественным путем, которые не ассоциируются с поражениями, вызванными инфильтрацией гемоцитами.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Небольшие фокальные поражения (язвы, абсцессы, пустулы обычно зеленого цвета, но могут быть желто-коричневыми или бесцветными) до 5 мм в диаметре наблюдаются в мягких тканях и часто имеют коричневые отпечатки на раковине, наряду с абсцессами на поверхности мантии. Помимо поражений, зараженные устрицы обычно прибывают в хорошем состоянии до момента наступления смерти. Эти клинические признаки неспецифичны для инфекции *M. mackini*.

4.1.2. Изменения в поведении

Умирающие, с раскрывающимися створками и слабые устрицы (медленно закрывающие свои створки) появляются среди пораженных стад весной, когда

содержатся в емкостях при температуре $<10^{\circ}\text{C}$. Такие изменения в поведении неспецифичны для инфекции *M. tascini*.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

Фокальные поражения интенсивной инфильтрацией (язвы, абсцессы, пустулы обычно зеленого цвета, но могут быть желто-коричневыми или бесцветными) до 5 мм в диаметре возникают в пределах стенки тела, замыкающего мускула или на поверхностях нижнегубных щупалец или мантии (Bower, 2005). Эти макроскопические признаки неспецифичны для инфекции *M. tascini*.

4.2.2. Клиническая биохимия

Не предусмотрено.

4.2.3. Микроскопическая патология

Аккумуляция (инфильтрация) многочисленных гемоцитов вблизи фокальной инфекции.

4.2.4. Влажные препараты

Не предусмотрено.

4.2.5. Мазки

Тканевые отпечатки пораженных участков, окрашенные красителем Гимза и изученные с помощью световой микроскопии (масляная иммерсия) с 1000-кратным увеличением могут обнаружить *M. Mackini*, высвобожденную из клеток хозяина.

4.2.6. Фиксированные срезы

Очаги инфильтрации гемоцитами в мантии, нижнегубных щупальцах и замыкающем мускуле могут указывать на локализацию *M. tascini* внутри цитоплазмы прилегающих клеток везикулярной соединительной ткани и мышечных волокон. В центре пораженного участка может возникать некроз ткани (Bower с соавт., 1994b). Среди инфекций частой интенсивности, возникающих в лаборатории, инфильтрация гемоцитами может не присутствовать.

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Тесная связь *M. tascini* с органеллами клеток хозяина предполагает, что паразиты могут получать энергию напрямую от митохондрий клетки хозяина (Hine с соавт., 2001).

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

Малый размер *M. tascini* (2-3 мкм в диаметре) исключает возможность обнаружения без помощи сильного увеличения (примерно в 1000 раз).

4.3.1.1. Микроскопические методы

При световой микроскопии, *M. maskini* выглядит морфологически схоже с *Bonamia* sp., за исключением ее возникновения в клетках везикулярной соединительной ткани и миоцитах, где *Bonamia* sp. не появляется. При электронной микроскопии может использоваться морфологическая ультраструктура для того, чтобы отличать *M. maskini* от других известных простейших. Однако для применения этого инструмента требуются очень тяжелые инфекции.

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Не предусмотрено.

4.3.1.1.2. Мазки

4.3.1.1.2.1. Образцы для взятия

Живые хозяева с поражениями.

4.3.1.1.2.2. Техническая процедура

Иссекают пораженный участок и разрезают пополам при помощи скальпеля. Промокают пораженную сторону ткани впитывающей бумагой, чтобы удалить излишнюю жидкость. Делают отпечаток ткани на нескольких участках чистого предметного стекла и высушивают на воздухе. Наблюдения проводятся при 1000-кратном увеличении (масляная иммерсия) после окрашивания красителем Райта-Гимзе или с помощью коммерчески доступного набора для окрашивания кровяных клеток (например, Nemascolor[®], EMD Chemicals Inc.), в соответствии с инструкциями производителя.

4.3.1.1.2.3. Положительные контроли

Отпечатки ткани, полученные от пораженных участков зараженных устриц, доступны в Референтной лаборатории МЭБ. Однако, важно отметить, что *M. maskini* в отпечатках ткани практически невозможно отличить от *Bonamia* sp.

4.3.1.1.2.4. Уровни валидации

Настоящее исследование не было валидировано в официальном порядке.

4.3.1.1.2.5. Специфичность и чувствительность

Очень низкая специфичность, поскольку *M. maskini* напоминает другие микроклетки в отпечатках ткани; чувствительность может быть лучше, чем рутинная гистология, но только в случае, если присутствуют поражения (Carnegie с соавт., 2003).

4.3.1.1.2.6. Интерпретация результатов

Присутствие небольших микроклеток (могут быть искажены примерно до 4 мкм в диаметре), которые обычно наблюдаются за пределами клеток хозяина. Паразит обычно 2-3 мкм в диаметре имеет светло-синюю (базофильную) цитоплазму и небольшое красное (эозинофильное) ядро (цвета могут

варьировать в зависимости от используемого красителя). Технология не является видоспецифичной.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

4.3.1.1.3.1. Образцы для отбора

Живые и недавно умершие устрицы.

4.3.1.1.3.2. Технологическая процедура

Срезы ткани, которые включают пораженные участки, должны быть зафиксированы приблизительно на 24 часа в растворе Дэвидсона или 10% забуференном формалине, с последующей обычной обработкой для парафиновой гистологии и окрашивания гематоксилином и эозином. Наблюдения проводятся при нарастающем увеличении до $\times 1000$.

4.3.1.1.3.3. Положительные контроли

Гистологические срезы (окрашенные и с покровными стеклами или неокрашенные парафиновые срезы на предметном стекле) доступны в Референтной лаборатории МЭБ. Частая ссылка на предметные стекла с положительными контролями при выполнении исследования *M. Mackini*, рекомендуется в виду скрытой природы и малого размера этого паразита.

4.3.1.1.3.4. Уровни валидации

Настоящее исследование не было валидировано в официальном порядке.

4.3.1.1.3.5. Специфичность и чувствительность

Специфичность видов очень низкая для микроклеток, наблюдаемых в гемоцитах, но высокая при обнаружении микроклеток внутри цитоплазмы клеток везикулярной соединительной ткани; чувствительность хорошая для инфекций средней-высокой интенсивности, в особенности, когда соединительная ткань исследуется непосредственно около поражений, но низкая для ткани, находящейся на расстоянии и для инфекций низкой интенсивности.

4.3.1.1.3.6. Золотой стандарт

В настоящее время гистопатология поражений у устриц считается предпочтительным анализом для обнаружения и диагностики инфекций *M. mackini*.

4.3.1.1.3.7. Интерпретация результатов

Положительный результат представляет собой появление сферических микроклеток около 2-3 мкм в диаметре внутри цитоплазмы клеток везикулярной соединительной ткани и/или миоцитов, обычно внутриклеточно, в клетках хозяина, непосредственно прилегающих к фокальной интенсивной инфильтрации гемоцитами.

У восприимчивых видов хозяев в известном диапазоне *M. mackini*, положительный результат является доказательством инфекции *M. mackini*. За пределами известного диапазона, положительный результат должен быть подтвержден ДНК секвенированием рибосомной РНК малой субъединицы региона гена (SSU рДНК) и сравнением последовательности с 1457 п.о. фрагмента от *M. mackini*, опубликованным в Банке генов⁶⁵. Если последовательность рДНК SSU указывает на *M. mackini*, рекомендуется проводить секвенирование ITS1-5.8S-ITS2 рДНК с использованием методов Abbott с соавт., 2011 для того, чтобы с полной уверенностью определить, если она генетически идентична *M. mackini* в диапазоне, описанном в настоящий момент⁶⁶.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

Чистые изоляты *M. Mackini* не производились. Однако, процедуры идентификации в дополнение к световой микроскопии, находятся в разработке.

4.3.1.2.1. Среда для культивирования клеток/искусственная среда

Не предусмотрено.

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе антител (IFAT, ELISA и т.п.)

Не предусмотрено. Моноклональные антитела продуцировались, но не были сформированы в иммунологический диагностический анализ.

4.3.1.2.3. Молекулярные технологии (ПЦР, ISH, секвенирование и т.п.)

4.3.1.2.3.1. ПЦР анализ SSU региона рДНК

Пары праймеров, которые нацелены на SSU регион, были разработаны для *M. mackini*. Это праймеры 5'-AGA-TGG-TTA-ATG-AGC-CTC-C-3' и 5'-GCG-AGG-TGC-CAC-AAG-GC-3', они амплифицируют продукт с 546 п.о. (Carnegie с соавт., 2003). Образцы должны быть разбавлены либо стерильной ddH₂O (дважды дистиллированная вода), либо стерильным буфером Трис/ЭДТА (TE) (рН 7,0-7,2) до концентрации от 10 до 40 нг/мкл перед проведением анализа. Реакционная смесь для ПЦР содержит следующие ингредиенты в финальных концентрациях: 20 мМ Трис/HCl (рН 8,4), 50 мМ KCl, 1,25 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого dATP, dCTP, dGTP, и dTTP, по 0,05 мкМ каждого праймера и 0,05 ед/мкл и 1,5 мкл ДНК матрицы общим объемом 15 мкл. Циклические параметры начинаются с первичной денатурации при 95°C в течении 10 минут, с последующими 40 циклами при 95°C в течение 1 минуты, 60.5°C в течение 1 минуты и 72°C в течение 1 минуты и завершаются конечной элонгацией при 72°C в течение 10 минут. Продукты могут подвергаться электрофорезу на 1,5% агарозных гелях, содержащих 2,0 мкл 5000X SybrGreen или 0,1 мкг/мл бромид этидия и визуализироваться под воздействием УФ света.

⁶⁵ Учетный номер AF477623, URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=30515676>

⁶⁶ Банк генов # HM563060.1; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM563060.1>

4.3.1.2.3.1.1. Положительные/отрицательные контроли

Являются обязательными. Положительные контроли представляют собой геномную ДНК от сильно инфицированных хозяев, которые могут быть получены из Референтной лаборатории МЭБ. Отрицательные контроли представляют собой либо геномную ДНК от неинфицированных хозяев, либо отсутствие реакций матричной ДНК.

4.3.1.2.3.1.2. Уровни валидации

Настоящее исследование не было валидировано в официальном порядке.

4.3.1.2.3.1.3. Специфичность и чувствительность

Анализ SSU региона рДНК выявил в три - четыре раза больше инфекций *M. tackini* у 1056 диких устриц с острова Денман, Британская Колумбия, чем стандартная гистопатология (Carnegie с соавт., 2003). Однако впоследствии с ним возникли проблемы, поскольку он не дифференцирует *M. tackini* и генетически отличные *Mikrocytos* sp., обнаруженные в многочисленных несопоставимых географических местоположениях (Abbott с соавт., 2011).

4.3.1.2.3.1.4. Интерпретация результатов

Положительный результат ПЦР ампликона подходящего размера, у которого все отрицательные контроли отрицательны, а положительные контроли положительны.

4.3.1.2.3.2. Анализ кПЦР TaqMan в ITS2-28S рДНК

В настоящее время был разработан диагностический анализ кПЦР с использованием праймеров и зонда в ITS2-28S в рДНК у *M. tackini*, который не дает кросс-реакции с *Mikrocytos* sp.. Стеновая валидация этого анализа показала, что он высоко специфичен и чувствителен для обнаружения *M. tackini*. Формальная диагностическая валидация анализа кПЦР в настоящий момент находится в работе.

4.3.1.2.3.3. In situ гибридизация (ISH)

4.3.1.2.3.3.1. Образцы для отбора

Следуйте процедуре для фиксированных срезов (4.3.1.1.3) выше, за исключением того, что срезы тканей должны располагаться на положительно заряженных срезах или срезах, покрытых аминоалкилсиланом.

4.3.1.2.3.3.2. Техническая процедура

Срезы ткани депарафинизируют, регидрируют и затем гибридизируют маркированными олигонуклеотидными зондами. Зонды с маркировкой 5' Oregon Green демонстрируют сильную гибридизацию в отношении *M. tackini* (Carnegie с соавт., 2003). Однако при использовании этого флуоресцентного зонда ориентация ткани хозяина затруднена. Гибридизация с зондом MACKINI-1 (5'-AGC-CCA-CAG-CCT-TCA-C-3') с 3' концевым мечением дигоксигенином и контр-окрашиванием 0,5% Бисмарк коричневым

в 30% этаноле (Meyer с соавт., 2005) отображает место паразита внутри тканей хозяина.

4.3.1.2.3.3.3. Положительные/отрицательные контроли

Являются обязательными. Положительные контроли представляют собой срезы ткани устрицы, инфицированные *M. tashiroi*. Отрицательные контроли представляют собой либо анализы без зондов, либо исследования с незараженными устрицами.

4.3.1.2.3.3.4. Уровни валидации

Эта технология не была валидирована в официальном порядке.

4.3.1.2.3.3.5. Специфичность и чувствительность

Зонд MACKINI-1 демонстрировал сильную гибридизацию в отношении *M. tashiroi*, но не гибридизировал с тканями устриц или с другими паразитами, свойственными ракообразным и исследуемым бактериям: *Bonamia ostreae* у *O. edulis*; *Perkinsus qugwadi* у *Patinopecten yessoensis*; *Trichodina* sp. у *C. gigas*; амeboподобным простейшим у *Protothaca staminea*; *Hematodinium* sp. у *Chionoecetes tanneri*; SPP (простейший паразит неясной таксономической принадлежности) у *Pandalus platyceros*; и *Nocardia crassostreae* у *C. gigas* (Meyer с соавт., 2005). Этот дигоксигенин-меченный зонд был значительно более чувствителен для обнаружения инфекций в сравнении со стандартными гистологическими срезами, окрашенными гематоксилином и эозином. Инфекция может быть обнаружена при более слабом увеличении (100 кратном в сравнении с 1000 кратным) и при базофильном окрашивании тканей, таких как пищеварительная железа, кишечный эпителий и гонада (Meyer с соавт., 2005).

4.3.1.2.3.3.6. Интерпретация результатов

Положительный результат - это присутствие сине-черного мечения паразитических клеток (соответствующего размера и локализации ткани) с отрицательными показателями всех отрицательных контролей и положительными показателями всех положительных контролей.

4.3.1.2.4. Очищение возбудителя

Изоляты *M. tashiroi*, свободные от контаминации ядрами клеток хозяина, не были получены. Однако была описана технология фильтрации, которая концентрирует этот паразит. (Joly с соавт., 2001).

4.3.2. Серологические методы

Моноклональные антитела были созданы и гибридомы криоконсервированы около 15 лет назад. Специфичность моноклональных антител не была полностью валидирована, и они не были разработаны в качестве диагностического набора.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели их применения

Методы, доступные в настоящее время для целевого надзора и диагностики *Mikrocytos mackini*, перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице, указывают: а = метод является рекомендуемым методом исходя из соображений доступности, функциональности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод представляет собой стандартный метод с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы существенно ограничивают его применение; и d = метод, в настоящее время не рекомендованный для этой цели. Это несколько субъективно, поскольку соответствие метода охватывает вопросы надежности, чувствительности, специфичности и функциональности. Несмотря на это, не все тесты, перечисленные под категориями А или В, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинное применение и тот факт, что они широко использовались без неточных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор		Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Молодые особи	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	c	c	d
Мазки (отпечатки ткани)¹	c	c	c	d
Гистопатология	c	a	b	b
Трансмиссивная ЭМ	d	d	d	b
ДНК зонды <i>in situ</i>	c	c	c	a
ПЦР	b	b	b	b
Секвенирование	d	d	d	a2

1. Технология не является видоспецифичной, но может использоваться у восприимчивых хозяев и в восприимчивых областях, а также весной, когда проявляется болезнь, вызванная *M. mackini*.
2. Используется исключительно в сочетании с положительным анализом ПЦР.

ЭМ = электронная микроскопия; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Тест (ы) рекомендуемые для целевого надзора для признания свободы от инфекции *Mikrocytos mackini*

Гистопатология и анализы ПЦР должны использоваться для целевого надзора для признания свободы от инфекции *M. mackini*. Устрицы старше двух лет из низких приливно-отливных уровней или подвесной культуры следует отбирать в весеннее время года, и любого рода поражения должны быть выявлены.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Дефиниция подозрительного случая

У известных восприимчивых видов в пределах географического распространения *M. tashkini* в весеннее время года, подозрительный случай инфекции *M. tashkini* является макроскопическим признаком болезни в комбинации с положительным результатом отпечатка ткани и поражений.

У других видов хозяев или за пределами известного диапазона *M. tashkini*, подозрительный случай представляет собой положительный результат, полученный путем гистологии или ПЦР.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

У известных восприимчивых видов в пределах географического распространения *M. tashkini* в весеннее время года, подтвержденный случай представляет собой положительный результат одного из следующих методов: гистология, ПЦР или гибридизация *in situ*.

У других видов хозяев или за пределами известного диапазона *M. tashkini*, подтвержденный случай представляет собой положительный результат, полученный путем гистологии или ПЦР, наряду с положительным результатом гибридизации *in situ*, электронной микроскопии или гомологии с опубликованными рДНК последовательностями (Abbott с соавт., 2011; Carnegie с соавт., 2003). Секвенирование SSU и/или ITS1-5.8S-ITS2 регионов рекомендуется в качестве заключительного этапа для подтверждающей диагностики *M. tashkini*.

8. Список литературы

- ABBOTT C.L., GILMORE S.R., LOWE G., MEYER G. & BOWER S. (2011). Sequence homogeneity of internal transcribed spacer rDNA in *Mikrocytos mackini* and detection of *Mikrocytos* sp. in a new location. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 243–250.
- BOWER S.M. (1988). Circumvention of mortalities caused by Denman Island oyster disease during mariculture of Pacific oysters. *Am. Fish. Soc. (Special Publication)*, **18**, 246–248.
- BOWER S.M. (2001). Hazards and risk management of *Mikrocytos mackini* in oysters. In: Proceedings of the OIE International Conference on Risk Analysis in Aquatic Animal Health. Rodgers C.J., ed. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France, 164–166.
- BOWER S.M. (2005). Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Mikrocytos mackini* (Denman Island Disease) of Oysters. <http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/mikmacoy-eng.html>
- BOWER S.M., BATE K. & MEYER G.R. (2005). Susceptibility of juvenile *Crassostrea gigas* and resistance of *Panope abrupta* to *Mikrocytos mackini*. *J. Invertebr. Pathol.*, **88**, 95–99.
- BOWER S.M., CARNEGIE R.B., GOH B., JONES S.R.M., LOWE G.J. & MAK M.W.S. (2004). Preferential PCR amplification of parasitic protistan small subunit rDNA from metazoan tissues. *J. Eukaryotic Microbiol.*, **51**, 325–332.
- BOWER S.M., HERVIO D. & MCGLADDERY S.E. (1994a). Potential for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, to serve as a reservoir host and carrier of oyster pathogens. *ICES Council Meeting Papers*, Copenhagen, Denmark, ICES-CM-1994/F:30.
- BOWER S.M., HERVIO D. & MEYER G.R. (1997). Infectivity of *Mikrocytos mackini*, the causative agent of Denman Island disease in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, to various species of oysters. *Dis. Aquat. Org.*, **29**, 111–116.
- BOWER S.M., MCGLADDERY S.E. & PRICE I.M. (1994b). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **4**, 1–199.
For update see URL: <http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/index-eng.html>
- BOWER S.M. & MEYER G.R. (1999). Effects of cold water on limiting or exacerbating some oyster diseases. *J. Shellfish Res.*, **18**, 296 (Abstract).
- BOWER S.M. & MEYER G.R. (2002). Morphology and ultrastructure of a protistan pathogen in the haemolymph of shrimp (*Pandalus* spp.) in the northeastern Pacific Ocean. *Can. J. Zool.*, **80**, 1055–1068.
- CARNEGIE R.B., MEYER G.R., BLACKBOURN J., COCHENNEC-LAUREAU N., BERTHE F.C.J. & BOWER S.M. (2003). Molecular detection of the oyster parasite *Mikrocytos mackini* and a preliminary phylogenetic analysis. *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 219–227.
- COMMITTEE ON THE STATUS OF ENDANGERED WILDLIFE IN CANADA (2004). Canadian Wildlife Service, Ottawa, Canada.
http://www.cosewic.gc.ca/eng/sct0/sar_2004_11_e.cfm

FARLEY C.A., WOLF P.H. & ELSTON R.A. (1988). A long-term study of 'microcell' disease with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi*(sp. n.). *Fishery Bull.*, **86**, 581–593.

HERVIO D., BOWER S.M. & MEYER G.R. (1996). Detection, isolation and experimental transmission of *Mikrocytos mackini*, a microcell parasite of Pacific oysters *Crassostrea gigas*(Thunberg). *J. Invertebr. Pathol.*, **67**, 72–79. HINE P.M., BOWER S.M., MEYER G.R., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J. (2001). Ultrastructure of *Mikrocytos mackini*, the cause of Denman Island disease in oysters *Crassostrea* spp. and *Ostrea* spp. in British Columbia, Canada. *Dis. Aquat. Org.*, **45**, 215–227.

JOLY J.-P., BOWER S.M. & MEYER G.R. (2001). A simple technique to concentrate the protozoan *Mikrocytos mackini*, causative agent of Denman Island disease in oysters. *J. Parasitol.*, **87**, 432–434.

MEYER G.R., BOWER S.M. & CARNEGIE R.B. (2005). Sensitivity of a digoxigenin-labelled DNA probe in detecting *Mikrocytos mackini*, causative agent of Denman Island disease (mikrocytosis) in oysters. *J. Invertebr. Pathol.*, **88**, 89– 94.

MEYER G.R., BOWER S.M., LOWE G. & DAVIES S. (2008). Resistance of the Manila clam (*Venerupis philippinarum*) to infection with *Mikrocytos mackini*. *J. Invertebr. Pathol.*, **98**, 54–57.

QUAYLE D.B. (1982). Denman Island oyster disease 1960-1980. *British Columbia Shellfish Mariculture Newsletter*, **2**, 1–5 (Victoria, Canada).

*
* *

NB: Существует Референтная лаборатория МЭБ по инфекции *Mikrocytos mackini* (см. Таблицу в конце настоящего *Водного Руководства* или перейдите по ссылке на вебсайт МЭБ для получения более актуального перечня:
<http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>)

Для получения любой дополнительной информации относительно инфекции *Mikrocytos mackini*, пожалуйста, обратитесь в Референтную лабораторию МЭБ.

ЭКСПЕРТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЭБ

РЕФЕРЕНТНЫЕ ЛАБОРАТОРИИ И ЭКСПЕРТЫ ПО БОЛЕЗНЯМ ВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ

Острый гепатопанкреатический некроз

Dr Grace Lo

National Cheng Kung University (NCKU)
Center for Shrimp Disease Control and Genetic Improvement
No. 500, Sec. 3 Anming Road
Annan District Tainan City 709
CHINESE TAIPEI
Tel.: +886-6 384 24 48
Fax: +886-6 208 36 63
Email: gracelow@mail.ncku.edu

Вирусная болезнь канального сома

Dr Larry A. Hanson

Fish Diagnostic Laboratory
College of Veterinary Medicine
Mississippi State University
P.O. Box 6100
Spring Street
Mississippi 39762
UNITED STATES OF AMERICA
Tel.: +1-662 325 12 02
Fax: +1-662 325 10 31
Email: hanson@cvm.msstate.edu

Энтерическая септицемия сома (*Edwardsiella ictaluri*)

Dr Larry A. Hanson

Fish Diagnostic Laboratory
College of Veterinary Medicine
Mississippi State University
P.O. Box 6100, Spring Street
Mississippi 39762
UNITED STATES OF AMERICA
Tel.: +1-662 325 12 02
Fax: +1-662 325 10 31
Email: hanson@cvm.msstate.edu

Герпесвирусная инфекция морских ушек

Dr Mark Crane

Australian Animal Health Laboratory (AAHL)
CSIRO Livestock Industries
5 Portarlington Road
Geelong, Victoria 3220
AUSTRALIA
Tel.: +61-3 52.27.51.18
Fax: +61-3 52.27.55.55
Email: mark.crane@csiro.au

Инфекция *Aphanomyces astaci* (чума ракообразных)

Dr Satu Viljamaa-Dirks

Finnish Food Safety Authority
Evira Kuopio

P.O. Box 92

70701 Kuopio

FINLAND

Tel.: +358 207.72.49.62

Fax: +358 207.72.49.70

Email: satu.viljamaa-dirks@evira.fi

Dr Birgit Oidtmann

The Centre for Environment,
Fisheries & Aquaculture Science (CEFAS)

Weymouth Laboratory

Barrack Road

The Nothe, Weymouth

Dorset DT4 8UB

UNITED KINGDOM

Tel.: +44.1305 20.66.61

Fax: +44.1305 20.66.01

Email: birgit.oidtmann@cefasc.co.uk

Инфекция *Bonamia exitiosa*

Dr Isabelle Arzul

IFREMER

Laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie

BP 133, 17390 La Tremblade

FRANCE

Tel.: +33 5 46.76.26.10

Fax: +33 5 46.76.26.11

Email: Isabelle.Arzul@ifremer.fr

Инфекция *Bonamia ostreae*

Dr Isabelle Arzul

IFREMER

Laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie

BP 133, 17390 La Tremblade

FRANCE

Tel.: +33 5 46.76.26.10

Fax: +33 5 46.76.26.11

Email: Isabelle.Arzul@ifremer.fr

Инфекция вирусом эпизоотического гематопозитического некроза

Dr Nick Moody (1)

Australian Animal Health Laboratory

CSIRO

Private Bag 24 (Ryrie Street)

Geelong

Victoria 3220

AUSTRALIA

Tel.: +61-3 52 27 00 00

Fax: +61-3 52 27 55 55

Email: nick.moody@csiro.au

Dr Paul Hick (2)

University of Sydney
Faculty of Veterinary Science
Private Bag 3
Camden NSW 2570
AUSTRALIA
Tel.: +61-2 93 51 16 19
Fax: +61-2 93 51 16 18
Email: paul.hick@sydney.edu.au

Инфекция *Gyrodactylus salaris*

Dr Haakon Hansen National
Veterinary Institute Section for
Parasitology
P.O. Box 750
Sentrum
0106 Oslo
NORWAY
Tel.: +47 23 21 61 10
Email: haakon.hansen@vetinst.no

Инфекция вирусом инфекционного некроза гемопоэтический ткани

Dr Kyle Garver

Pacific Biological Station - Aquatic Animal Health Laboratory (PBS-AAHL) Fisheries & Oceans Canada
3190 Hammond Bay Road
Nanaimo V9T 6N7 British Columbia
CANADA
Tel.: +1-250 756 73 40
Fax: +1-250 756 70 53
Email: Kyle.Garver@dfo-mpo.gc.ca

Dr Hong Liu

Animal and Plant Inspection and Quarantine Technical Centre
Shenzhen Exit & Entry Inspection and Quarantine Bureau
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine (AQSIQ) of P. R. China
Room 907 of 1011 building, Fuqiang Road
Futian Qu, Shenzhen, Guangdong Province, 518045
CHINA (PEOPLE'S REP. OF)
Tel.: +86-755 25 58 84 10
Fax: +86-755 25 55 56 30
Email: 709274714@qq.com

Инфекция вирусом инфекционного гиподермального и гематопозитического некроза

На стадии принятия решения

Maricultural Organism Disease Control and Molecular Pathology Laboratory, Yellow Sea Fisheries Research Institute (YSFRI),
Chinese Academy of Fishery Sciences
#106 Nanjing Road, Qingdao,
Shandong Province 266071
CHINA (PEOPLE'S REP. OF)
Tel.: +86 532 858 230 62 ext. 802
Fax: +86 532 858 11514
Email: yangbing@ysfri.ac.cn

Инфекция вирусом инфекционной анемии лосося

Dr Sergio H. Marshall González

Aquaculture Pathology Laboratory
Genetic and Molecular Immunology Laboratory
of the Pontifical Catholic University of Valparaíso
Avenida Universidad, 330 Valparaíso
CHILE
Tel.: +56-32 227.48.28
Email: smarshal@ucv.cl

Dr Knut Falk

National Veterinary Institute
P.O. Box 750, Sentrum, 0106 Oslo
NORWAY
Tel.: +47-23 21 60 00
Email: knut.falk@vetinst.no

Инфекция герпесвирусом карпа Кои

Dr Sven Bergmann

German Reference Laboratory for Koi Herpesvirus Disease (KHVD)
Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)
Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Infectology
Südufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems
GERMANY
Tel.: +49-38351 7 1150 / 1103
Fax: +49-38351 7 1226
sven.bergmann@fli.de

На стадии принятия решения

National Research Institute of Aquaculture
Fisheries Research Agency
422-1 Nakatsuhamaura
Minami-ise, Watarai, Mie 516-0193
JAPAN
Tel.: +81-599 66.18.30,
Fax: +81-599 66.19.62
Email: takafumi@affrc.go.jp

Dr David Stone

Centre for Environment, Fisheries
and Aquaculture Science (CEFAS)
Weymouth Laboratory
Barrack Road, The Nothe
Weymouth, Dorset DT4 8UB
UNITED KINGDOM
Tel.: +44-1305 20.66.42
Email: david.stone@cefasc.co.uk

Инфекция *Marteilia refringens*

Dr Isabelle Arzul

IFREMER
Laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie
BP 133, 17390 La Tremblade
FRANCE
Tel.: +33 5 46.76.26.10
Fax: +33 5 46.76.26.11
Email: Isabelle.Arzul@ifremer.fr

Инфекция *Marteilia sydneyi*

Dr Isabelle Arzul

IFREMER
Laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie s
BP 133, 17390 La Tremblade
FRANCE
Tel.: +33 5 46.76.26.10
Fax: +33 5 46.76.26.11
Email: Isabelle.Arzul@ifremer.fr

Инфекция *Mikrocytos mackini*

Dr Gary Meyer

Department of Fisheries and Oceans
Pacific Biological Station
3190 Hammond Bay Road
Nanaimo
British Columbia V9T 6N7
CANADA
Tel.: +1-250 756 70 34
Fax: +1-250 756 70 53
Email: gary.meyer@dfo-mpo.gc.ca

Инфекция ранавирусом

Dr Nick Moody (1)

Australian Animal Health Laboratory
CSIRO
Private Bag 24 (Ryrie Street)
Geelong, Victoria 3220
AUSTRALIA
Tel.: +61-3 52 27 00 00
Fax: +61-3 52 27 55 55
Email: nick.moody@csiro.au

Dr Paul Hick (2)

University of Sydney
Faculty of Veterinary Science
425 Werombi Road, Private Bag 3
Camden NSW 2570
AUSTRALIA
Tel.: +61-2 93 51 16 19
Fax: +61-2 93 51 16 18
Email: paul.hick@sydney.edu.au

Инфекция иридовirusной болезнью красного морского карася

Dr Yasuh Kawato

National Research Institute of Aquaculture
Fisheries Research Agency
422-1 Nakatsuhamaura
Minami-ise, Watarai
Mie 516-0193
JAPAN
Tel.: +81-599 66.18.30
Fax: +81-599 66.19.62

Email: ykawato@fra.affrc.go.jp

Инфекция альфавирусом лососевых

Dr Hilde Sindre

National Veterinary Institute
Section for Parasitology
P.O. Box 750
Sentrum, 0106 Oslo
NORWAY
Tel.: +47 23.21.60.00
Email: hilde.sindre@vetinst.no

Инфекция вирусом весенней виремии карпа

Dr Hong Liu

Animal and Plant Inspection and Quarantine Technical Centre
Shenzhen Exit & Entry Inspection and Quarantine Bureau
General Administration of Quality Supervision
Inspection and Quarantine (AQSIQ) of P. R. China
Room 907 of 1011 building, Fuqiang Road
Futian Qu, Shenzhen, Guangdong Province, 518045
CHINA (PEOPLE'S REP. OF)
Tel.: +86-755 25 58 84 10
Fax: +86-755 25 55 56 30
Email: 709274714@qq.com

Dr David Stone

The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS)
Weymouth Laboratory
Barrack Road, The Nothe,
Weymouth, Dorset DT4 8UB
UNITED KINGDOM
Tel.: +44-1305 20 66 42
Email: david.stone@cefas.co.uk

Инфекция вирусом синдрома Таура

Dr Arun Dhar

Aquaculture Pathology Laboratory
School of Animal and Comparative Biomedical Sciences
University of Arizona, Tucson, AZ 85721
UNITED STATES OF AMERICA
Tel.: +1-520 621 87 27
Fax: +1-520 626 56 02
Email: adhar@email.arizona.edu

Инфекция вирусом вирусной геморрагической септицемии

Dr Kyle Garver

Pacific Biological Station - Aquatic Animal Health Laboratory (PBS-AAHL) Fisheries & Oceans Canada
3190 Hammond Bay Road
Nanaimo V9T 6N7 British Columbia
CANADA
Tel.: +1-250 756 73 40
Fax: +1-250 756 70 53
Email: Kyle.Garver@dfo-mpo.gc.ca

Dr Niels Jørgen Olesen

National Veterinary Institute
Technical University of Denmark
Kemitorvet, Building 202
2800 Kgs, Lyngby
DENMARK

Tel.: +45 35 88 68 31
Fax: +45 35 88 69 01
Email: njol@vet.dtu.dk

Dr Hyoung Jun Kim

Aquatic Animal Quarantine (AAQ) Laboratory
General Service Division
National Fishery Products Quality Management Service (NFQS)
Ministry of Oceans and Fisheries

337 Haeyang-ro
Yeongdo-gu, Busan, 49111 KOREA (REP. OF)
Tel.: +82-51 400 56 53
Fax: +82-51 400 56 55
Email: hjkim1882@korea.kr

Инфекция вирусом, вызывающим болезнь белых пятен

На стадии принятия решения

Maricultural Organism Disease Control and Molecular Pathology Laboratory, Yellow Sea Fisheries Research Institute (YSFRI),
Chinese Academy of Fishery Sciences
#106 Nanjing Road, Qingdao,
Shandong Province 266071
CHINA (PEOPLE'S REP. OF)
Tel.: +86 532 858 230 62 ext. 802
Fax: +86 532 858 11514
Email: zhangql@ysfri.ac.cn

Dr Grace Lo

National Cheng Kung University (NCKU),
Center for Shrimp Disease Control and Genetic Improvement,
No. 500, Sec. 3 Anming Road,
Annan District Tainan City 709,
CHINESE TAIPEI
Tel.: +886-6 384 24 48
Fax: +886-6 208 36 63
Email: gracelow@mail.ncku.edu

Инфекция вирусом желтой головы, генотип 1

Dr Nick Moody

Australian Animal Health Laboratory (AAHL)
CSIRO
5 Portarlington Road
Private Bag 24
Geelong, VIC 3220
AUSTRALIA
Tel.: +61-3 52 27 54 65
Fax: +61-3 52 27 55 55
Email: nick.moody@csiro.au

Болезнь, вызванная вирусом *Oncorhynchus masou*

Dr Hisae Kasai

Laboratory of Biotechnology and
Microbiology Faculty of Fisheries Science

Hokkaido
University 3-1-1
Minato-Cho
Hakodate

Hokkaido 041-
8611 JAPAN

Tel.: +81-138 40 88 98

Email: hisae@fish.hokudai.ac.jp

Вирусная энцефалопатия и ретинопатия

Dr Anna Toffan

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Fish Virolog Dept

Viale dell'Università, 10
35020 Legnaro (Padova)
ITALY

Tel.: +39-049 808 42 48

Fax: +39-049 808 43 92

Email: atoffan@izsvenezie.it

(x) Joint designation

СПИСОК ЦЕНТРОВ ПО СОТРУДНИЧЕСТУ ПО БОЛЕЗНЯМ ВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ

Эмерджентные болезни водных животных

Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Sciences

The Nothe, Barrack
Road Dorset DT4
8UB

UNITED KINGDOM

Tel.: +44-1305 20
66 25

Fax: +44-1305 20 66 01

Email:

stephen.feist@cefas.co.uk Web:

<http://www.cefas.co.uk/centres-of-excellence/aquatic-animal-health/designation/oie-collaborating-centre-for-emerging-aquatic-animal-disease/>

Эпидемиология и оценка рисков болезней водных животных

Centre for Aquatic Health

Science Atlantic Veterinary
College (AVC) University of
Prince Edward Island
Department of Health
Management 550 University
Avenue Charlottetown, PE C1A
4P3 CANADA

Tel.: +1-902 566 07 28

Fax: +1-902 566 08 23

Email: lhammell@upei.ca

Web:

<http://www.eraaad.org>

Многонациональный Центр по сотрудничеству МЭБ будет включать участие следующих институтов:

National Veterinary Institute

Department for Epidemiology

P.O. Box 750

Sentrum 0106

Oslo

NORWAY

Tel.: +47-91 61 85 87

Fax: +47-23 21 60 01

Email: saraya.tavornpanich@vetinst.no

Web: <http://www.eraaad.org>