

## ИНФЕКЦИЯ ВИРУСАМИ РОДА RANAVIRUS

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

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 (EHNВ), 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 EHNВ у пелагической рыбы в Австралии в 1986 году, аналогичные системные некротические иридовирусные 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; Nyatt 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.

Вид	Количество изолятов	Примеры	Географический источник
Вирус <i>Ambystoma tigrinum</i>	2	<i>Ambystoma tigrinum</i> virus, Regina ranavirus	Северная Америка
Иридовирус Боле	1	Bohle iridovirus	Австралия
Вирус лягушки 3	12	Frog virus 3 Box turtle virus 3	Европа, Северная и Южная Америка Европа, Северная и Южная Америка

<sup>1</sup> NB: Редакция, принятая на Всемирной ассамблее МЭБ в мае 2011 года

		<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
		Tadpole virus 2	Европа, Северная и Южная Америка
		Tiger frog virus	Европа, Северная и Южная Америка
		Tortoise virus 5	Европа, Северная и Южная Америка
Гипотетические виды	3	<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; EHNВ 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 EHNВ, предполагается, что они обладают аналогичной устойчивостью. Вирус *Ambystoma tigrinum* (АТV) 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<sup>-1</sup> 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). 10<sup>7</sup> бляшкообразующих единиц/мл ранавируса, происходящего от амфибий, инактивировали в течение 1 минуты в растворе хлоргексидина 150 мг/литр<sup>-1</sup> (0,75% Nolvasan<sup>®</sup>), гипохлорида натрия 180 мг/литр<sup>-1</sup> (3% хлорная известь) или пероксимоносульфата калия 200 мг/литр<sup>-1</sup> (1% Виркон<sup>®</sup>) (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 рыбаками-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 отрыгивании 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 рыбаками-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). Иридовирус 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. Иридовирус Wamena (WIV) выделяли у больных зеленых питонов *Chondropython viridis*,

завозимых контрабандой из Западного Папуа (Ириан-Джайя), в то время как иридовиром *Testudo hermanni* (ТНІV) (TV-СН8) выделяли у больных баоканских черепах *Testudo hermanni* в Европе. В исследованных областях МСР как WIV, так и ТНІV 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 (Nagr & 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  $-20^{\circ}\text{C}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$  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 амфотильные 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  $-80^{\circ}\text{C}$  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 [МЕМ] с добавлением 200 международных единиц [МЕ]/мл<sup>-1</sup> пенициллина, 200 мкг/мл<sup>-1</sup> стрептомицина и 4 мкг/мл<sup>-1</sup> 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  $4^{\circ}\text{C}$  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  $-80^{\circ}\text{C}$  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 синезаберного 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  $22^{\circ}\text{C}$  (Crane с соавт., 2005), но Референтная лаборатория предпочитает BF-2, когда как до так и после инокуляции вируса используется температура инкубации  $22^{\circ}\text{C}$ . 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  $25^{\circ}\text{C}$  (Docherty с соавт., 2003). Некоторые используют фибробласты эмбрионов лягушки при температуре  $27^{\circ}\text{C}$  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<sup>-1</sup> пенициллина, 100 мкг/мл<sup>-1</sup> стрептомицина и 2 мкг/мл<sup>-1</sup> амфотерицина Б). Клетки инкубируют до почти полной конfluence при температуре 22°C, на что может потребоваться до 4 дней в зависимости от нормы высева. В день инокуляции среду заменяют на поддерживающую среду (MEM с 2% ФТС и 100 МЕ/мл<sup>-1</sup> пенициллина, 100 мкг/мл<sup>-1</sup> стрептомицина и 2 мкг/мл<sup>-1</sup> амфотерицина Б). Из индивидуальных или объединенных в пулы гомогенатов с помощью среды для гемогенизации 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<sup>-1</sup>. 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 EHNV. 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 иммуноэлектронная микроскопия) перекрестно реагируют со всеми известными ранавирусами (Nuatt с соавт., 2000).

#### *4.3.1.2.2.1. Выявление ранавирусов с использованием иммунопероксидазного окрашивания инфцированных культур клеток*

#### 4.3.1.2.2.1.1. Принцип теста

Ранавирусы реплицируются внутри культивируемых клеток. Добавление мягкого детергента пермеабилзирует 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 [ЕМЕМ], 10% ФТС, 10 мМ N-2-гидроксиэтил пиперазин-N-2-этансульфоновая кислоты [HEPES], 2 мМ глутаминала, 100 МЕ пенициллина и 100 мкг стрептомицина) и инкубируют в 5% CO<sub>2</sub> 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<sup>++</sup> и Mg<sup>++</sup>) 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-ЕННУ 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

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>                                          11,5 г

KCl                                                 2,0 г

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                                          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 ( $156 \text{ мв}/120 \text{ мв} \times 11,5 \text{ г} = 14,95 \text{ г}$ ) 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 ЕННУ 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  $10^4$  ТЦД<sub>50</sub>/мл<sup>-1</sup>. Специфичность достигает 100%, а чувствительность при прямом выявлении в тканях рыб – 60% относительно золотого стандарта выделения вируса в клетках ВР-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 ЕННУ, т.к. нейтрализующие антитела не продуцируются после иммунизации млекопитающих или рыб. Мышиные моноклональные антитела, производимые против ЕННУ, 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-ЕННУ антитела (Hengstberger с соавт., 1993; Nyatt 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 ЕННУ захватываются из образца аффинно-очищенным кроличьим антителом, которым сенсibilизирован планшет. ЕННУ выявляют вторым антителом и меченым пероксидазой конъюгатом с использованием хромогена АВТS (2,2'-азино-ди-[3-этил-бензотиазолин]-6-сульфоукислота). 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-ЕННУ иммуноглобулин и овечья анти-ЕННУ 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  $-20^\circ\text{C}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение не менее 5 лет и не затвердевают при данной температуре.

- iii) Конъюгат меченого 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  $-20^{\circ}\text{C}$  в виде неразбавленного раствора. Рабочий раствор готовят посредством добавления 900 мкл TSGM к 100 мкл неразбавленного раствора. Рабочий раствор также хранят при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , 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  $-20^{\circ}\text{C}$ . 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.

#### 4.3.1.2.2.4. Оборудование

Рекомендуется использовать автоматический мойщик планшет, хотя планшеты можно мыть и вручную. Анализ чувствителен к условиям для мытья планшетов. Если ОД 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.

#### 4.3.1.2.2.5. Протокол

- i) 96-луночный ИФА-планшет сенсibiliзируют ( $100 \text{ мкл/ лунка}^{-1}$ ) аффинно-очищенным кроличьим анти-EHNВ антителом, разведенным в пропорции 1/12800 в боратном буфере для сенсibiliзации. Инкубируют в течение ночи при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 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<sup>-1</sup>) (1% [вес/объем] желатина в разбавителе PBSTG [ФБР, 0,05% (объемv/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)*
A	1/5	>2,0
B	1/40	1,90
D	1/200	0,68
F	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<sup>-1</sup>). 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<sup>-1</sup>). 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (100 мкл/ лунка<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup>), 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.

#### 4.3.1.2.2.2.6. *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.

#### 4.3.1.2.2.2.7. *Буферы и другие реактивы*

##### 4.3.1.2.2.2.7.1. *Боратный буфер для сенсibilизации*

Борная кислота	6,18 г
Динатрий тетраборат (Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,50 г
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на аликвоту 22 мл.

4.3.1.2.2.2.7.4. Стоп-раствор ABTS (0,01% NaN<sub>3</sub> 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 #14-23-06<sup>2</sup>

- 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 мМ Tris, 1,5 М NaCl)

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

- 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

<sup>2</sup> 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>

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 осветляют (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.

#### *4.3.1.2.2.3.3.1. 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 (Не

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 DAKO<sup>3</sup>. Первичное аффинно-очищенное кроличье анти-EHNV 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 стеклорезцом 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<sup>-1</sup>) 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:

---

<sup>3</sup> 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>

- Покрывать 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. Накрывать 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

Аmplифицированный продукт ПЦР с МСР-1, расщепленный *Pf*MI I, позволяет дифференцировать австралийские иридовирусы (EHNV и BIV) от неавстралийских иридовирусов (FV3, Северная и Южная Америки; и ECV, Европа). Амплифицированный 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 (МСР-1, 321 п.о.), M153 и M154 (МСР-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 МСР-1 и МСР-2**

ПЦР	Праймер	Последовательность	Размер продукта	Положение гена
МСР-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.	842-1466
	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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,65 мг/мл<sup>-1</sup> BSA, 10 мМ бета-меркаптоэтанола) 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 <sup>-1</sup>
Хлорид магния	1,25 мл	2,5 мМ
Буфер 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 TE.

Реакции с MCP-1 и MCP-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 ENNV 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<sup>-1</sup> BSA (для *Pfl*M 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
МСР-1 (321 п.о.)	<i>Pfl</i> M I	321	EHNВ, BIV
		131, 190	FV3, WIV
МСР-2 (625 п.о.)	<i>Hinc</i> II	100, 138, 387	EHNВ
		100, 525	BIV, FV3
		100, 240, 285	WIV
	<i>Acc</i> I	238, 387	EHNВ
		625	BIV, ESV, ECV, WIV
		164, 461	FV3, GV <sup>1</sup>
	<i>Fnu</i> 4H I	33, 38, 44, 239, 271	EHNВ
		3, 33, 38, 44, 108, 399	BIV
		3, 38, 44, 108, 432	FV3, GV <sup>1</sup>
		3, 9, 38, 44, 108, 151, 272	ESV, ECV
		3, 44, 71, 108, 399	WIV

1. GV: Вирус Gutaro (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-СТТ-GAT-GT-3'. Данную процедуру ПЦР можно использовать для специфической детекции ранавирусов у красноперки, радужной форели, обыкновенного сома, зубатки, гупий (*Poecilia reticulata*), линей (*Labroides dimidatus*) 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 MgCl<sub>2</sub>. 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 EHNВ (Drury с соавт., 1995; Nyatt 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**

Метод	Целевой надзор				Предварительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Яйцеклетки/семенники	Головастики	Метаморфы	Взрослые особи		
Макроскопические поражения	н/п	d	d	d	d	d
Гистопатология	н/п	d	d	d	b	d
Иммунопереоксидазное окрашивание	н/п	c	c	c	b	b
Трансмиссивная ЭМ	н/п	d	d	d	c	c
Иммунная ЭМ	н/п	d	d	d	c	c
Культивирование в клетках	н/п	a	a	a	a	a
ИФА с захватом антигена	н/п	a	a	a	b	b
ИФА с захватом антитела	н/п	d	d	c	c	d
ПЦР-REA	н/п	d	a	d	c	a
ПЦР, секвенирование	н/п	d	d	d	c	a

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 иммунопероксидажном тесте или ИФА с захватом антигена или в ПЦР, или
2. Ткани положительны в ИФА с захватом антигена или иммунопероксидажном 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 redbfin 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/](http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/)

Для получения дальнейшей информации по инфекции ранавирусом обратитесь в  
Референтную лабораторию.