

ВИРУСНАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ И РЕТИНОПАТИЯ

1. Область применения¹

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 безоболочечеными, 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 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

¹Примечание: Вариант текста принят Всемирной Ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2013 года. Данная болезнь была исключена из списка болезней МЭБ.

DFNNV	С	Холодноводные рыбы: атлантический палтус, атлантическая треска, камбала и т.д.	15-20°C
RGNNV	С	Тепловодные рыбы: азиатский морской окунь, европейский морской окунь, груперы 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 (Mogí с соавт., 2005). За пределами водной среды бетанодавирусы легко теряют свою цитопатогенность. В условиях высыхания после 7-дневного периода при 21°C наблюдалась инактивация >99% бетанодавирусов (Maltese & Vovo, 2007).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Обычные дезинфицирующие средства, такие как гипохлорит натрия, йод, перекись водорода и хлорид бензалкония, эффективны для инактивации 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 (Frerichs 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 (Vovo 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>
Percichthyidae		Обыкновенный лаврак	<i>Dicentrarchus labrax</i>
Rachicentridae		Кобия	<i>Rachycentron canadum</i>
Горбылевые		Красный горбыль	<i>Sciaenops ocellatus</i>
		Светлая умбина	<i>Umbrina cirrosa</i>
		Белый горбыль	<i>Atractoscion nobilis</i>
Скумбриевые		Тихоокеанский голубой тунец	<i>Thunnus orientalis</i>
Серрановые		Краснопятнистый группер	<i>E. akaara</i>
		Желтый группер	<i>E. awoara</i>
		Семиполосный группер	<i>E. septemfasciatus</i>
		Чернопятнистый группер	<i>E. fuscoguttatus</i>
		Коричневопятнистый группер	<i>E. malabaricus</i>
		Темный группер	<i>E. marginatus</i>
		Бурый группер	<i>E. moara</i>
		Группер-таувина	<i>E. tauvina</i>
		Полосатый группер	<i>E. lanceolatus</i>
		Горбатый группер	<i>Chromileptes altivelis</i>
		Белополосый мероу	<i>Epinephelus aeneus</i>
		Оранжевопятнистый группер	<i>E. coioides</i>
Спаровые		дорада	<i>Sparus aurata</i>
Цихлиды		Нильская тиляпия	<i>Oreochromis niloticus niloticus</i>
Иглобрюхообразные	Единороговые	Спинорог	<i>Stephanolepis cirrhifer</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 группер (*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 икрOMETания 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 (ВВ), 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 бетанодавиром, 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 инактивированного 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 инактивированная вакцина RGNNV против ВЭР для семиполосного групера. Одно из исследований показало, что первичная инфекция авирулентным аквабирнавирусом эффективно подавляла вторичную бетанодавиральную 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 неблагополучных 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) Регидририровать 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, рН 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 соляного раствора, рН 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% H₂O₂ 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 (рН 7,3) при температуре 37°C.

v) Инкубировать срезы с помощью 0,1% трипсина и 0,1% CaCl₂ + Tris буфера в течение 30 минут при 37°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 антибетанодавиром), 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 АВComplex/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 в 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 (Fregichs 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 антибиотиками 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 монослой 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 монослой первичными антителами (т.е. кроличьей сывороткой иммунной против бета-нодавируса) в течение 30 минут при температуре 37°C во влажной камере.
- viii) Промыть три раза с ФБРТ.
- ix) Покрыть монослой 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 монослой клеток непосредственно на планшетах или установить покровные стекла с использованием глицеринового солевого раствора, рН 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 переменный регион T4 сегмента РНК2 (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 мигрирующих 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		
F2		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 (PHK1 и PHK2). 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 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

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*.

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 ≥ 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	230	Grove с соавт., 2006
Q-CP-2		CAA-TCG-AAC-ACT-CCA-GCG-ACA		
P1	PHK2	GGT-ATG-TCG-AGA-ATC-GCC-C	194	Hick &
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 &
qR2TR		GTT-CTG-CTT-TCC-CAC-CAT-TTG		

R2probe2		CAA-CGA-CTG-CAC-CAC-GAG-TTG*		Whittington, 2010
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 б, 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 или ПЦР	a	a	d	a	a
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 «б» 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., PUR PARI 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.