

ИНФИЦИРОВАНИЕ HPR-ДЕЛЕТИРОВАННЫМ ИЛИ HPR0 ВАРИАНТАМИ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЛОСОСЕВЫХ

1. Предмет рассмотрения

Инфекция вирусом инфекционной анемии лососевых (ИАЛ) означает инфекцию патогенным вариантом вируса ИАЛ с deletированным высоко-полиморфным регионом (HPR), или непатогенным вариантом вируса ИАЛ с недеletированным HPR (или HPR0) рода *Isavirus* семейства *Orthomyxoviridae*.

ИHPR-делетированный вариант вируса ИАЛ может вызывать заболевание у атлантического лосося (*Salmo salar*) в генерализованной форме; при острой анемии вызывает смерть, кровотечения и некроз ряда внутренних органов. Течение болезни продолжительное при низкой суточной смертности (0,05–0,1%) обычно только в небольшом количестве садков. Кумулятивная смертность может стать очень высокой в течение периода длительностью в несколько месяцев, если не предпринять никаких мер по ограничению распространения болезни ([Rimstad с соавт., 2011](#)).

Выявление HPR0 варианта вируса ИАЛ никогда не было связано с проявлением клинических признаков болезни у атлантического лосося ([Christiansen с соавт., 2011](#)). Этот генотип вируса реплицирует в течение короткого промежутка времени и в основном локализуется в жабрах. Была предположена связь между непатогенным вариантом HPR0 вируса ИАЛ и патогенным HPR–делетированным вирусом ИАЛ, при ряде вспышек, потенциально возникающих в результате появления HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ из варианта HPR0 вируса ИАЛ ([Cárdenas с соавт., 2014](#); [Christiansen с соавт., 2017](#); [Cunningham с соавт., 2002](#); [Gagné & LeBlanc, 2018](#); [Mjaaland с соавт., 2002](#)).

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Вирус ИАЛ – оболочечный вирус, 100 – 130 нм в диаметре с геномом, состоящим из 8 сегментов одноцепочечной РНК с отрицательной полярностью ([Dannevig с соавт., 1995](#)). Вирус обладает гемагглютинирующей, рецептор-разрушающей активностью и способностью к слиянию ([Falk с соавт., 1997](#); [Mjaaland с соавт., 1997](#); [Rimstad с соавт., 2011](#)).

Морфологические, физико-химические и генетические свойства вируса ИАЛ сопоставимы со свойствами всех вирусов семейства *Orthomyxoviridae*, а вирус ИАЛ был классифицирован как типовой представитель рода *Isavirus* ([Kawaoka с соавт., 2005](#)) в пределах семейства этого вируса. Были описаны нуклеотидные последовательности всех восьми сегментов генотипа, кодирующих как минимум десять белков ([Clouthier с соавт., 2002](#); [Rimstad с соавт., 2011](#)), включая 3' и 5' некодирующие последовательности ([Kulshreshtha с соавт., 2010](#)). Были определены четыре основных структурных белка,

включая 68 кДа нуклеопротеин, 22 кДа матричный белок, 42 кДа гемагглютинин-эстеразный (HE) белок, ответственный за связывание с рецептором и рецептор-разрушающую активность, а также 50 кДа поверхностный гликопротеин с предполагаемой способностью к слиянию, кодируемый геномными сегментами 3, 8, 6 и 5 соответственно. Сегменты 1, 2, и 4 кодируют вирусные полимеразы PB2, PB1 и PA. Каждый из двух наименьших геномных сегментов, сегменты 7 и 8, содержит две открытые рамки считывания (ОРС). ОРС1 сегмента 7 кодирует белок с антагонистическими свойствами к интерферону типа I, в то время как ОРС2, как предполагается, кодирует белок ядерного экспорта (NEP). Является ли генный продукт ОРС1 неструктурным или структурным компонентом вириона остается неопределенным. Меньшая ОРС1 сегмента 8 кодирует матричный белок, в то время как более крупная ОРС2 кодирует РНК-связывающий структурный белок, также обладающий антигонистическими свойствами к интерферону типа I.

Анализ последовательности различных сегментов гена открыл различия между изолятами как внутри, так и за пределами определенных географических зон. На основе различий в части последовательности сегмента 6 были определены две группы: одна обозначена как европейская клада, вторая как североамериканская клада ([Gagné & LeBlanc, 2018](#)). В гене HE, был обнаружен небольшой HPR рядом с трансмембранным доменом. Этот регион характеризуется скорее присутствием пробелов, а не заменами единичных нуклеотидов ([Cunningham с соавт., 2002](#); [Mjaaland с соавт., 2002](#)). Было выдвинуто предположение, что полноразмерный ген (HPR0) представляет собой предшественника, от которого происходят все HPR-делетированные (патогенные) варианты вируса ИАЛ. Сообщалось о наличии непатогенного HPR0 генома вируса ИАЛ у клинически здорового дикого и фермерского атлантического лосося, но его не выявляли у рыбы с клинической болезнью и патологическими признаками, сопоставимыми с инфекцией HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ ([Christiansen с соавт., 2011](#); [Cunningham с соавт., 2002](#); [Lyngstad с соавт., 2012](#); [Markussen с соавт., 2008](#); [McBeath с соавт., 2009](#); [Nylund с соавт., 2007](#)). Сообщались случаи смешанной инфекции HPR-делетированным и HPR0 вариантами вируса ИАЛ ([Cárdenas с соавт., 2014](#); [Kibenge с соавт., 2009](#)). Недавние исследования показали, что HPR0 варианты вируса ИАЛ часто встречаются у атлантического лосося, выращиваемого в море. HPR0 вариант вируса ИАЛ является сезонным и скоротечным в природе и демонстрирует тканевый тропизм с высокой превалентностью в жабрах ([Christiansen с соавт., 2011](#); [Lyngstad с соавт., 2008](#)). В настоящий момент не было представлено прямого доказательства связи присутствия HPR0 варианта вируса ИАЛ со вспышкой клинической болезни. Риск возникновения патогенного HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ из резервуара HPR0 варианта считается низким, но не ничтожным ([Cárdenas с соавт., 2014](#); [Christiansen с соавт., 2011](#); [European Food Safety Authority, 2012](#); [Lyngstad с соавт., 2012](#)).

В дополнение к вариациям, наблюдаемым в HPR гена HE, другие сегменты гена также могут иметь значение для развития клинической болезни. Предполагаемый маркер вирулентности был обнаружен в белке слияния (F). Здесь, как обнаружилось, единичная замена нуклеотида или инсерция в последовательность рядом с предполагаемым сайтом расщепления белка, является обязательным условием для вирулентности ([Kibenge с соавт., 2007](#); [Markussen с соавт., 2008](#)). Кроме инсерции/рекомбинации вирус ИАЛ также использует генную реассортацию в своей эволюции, что имеет потенциальную связь с вирулентностью ([Cárdenas с соавт., 2014](#); [Devold с соавт., 2006](#); [Gagné & LeBlanc, 2018](#); [Markussen с соавт., 2008](#); [Mjaaland с соавт., 2005](#)).

2.1.2. Выживание вне хозяина

Вирус ИАЛ выявляли с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в морской воде, отобранной в качестве образцов в местах выращивания, где обнаруживали атлантического лосося, положительного на вирус ИАЛ ([Kibenge c соавт., 2004](#)). Трудно оценить точно, насколько долго вирус может оставаться инфекционным в естественной среде по причине ряда факторов, таких как присутствие частиц или веществ, которые могут связывать или инактивировать вирус. Подвержение вируса ИАЛ, выращенного в культуре клеток температуре 15°C в течение 10 дней или 4°C в течение 14 дней не влияло на инфекционность вируса ([Falk c соавт., 1997](#)).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Вирус ИАЛ чувствителен к УФ излучению и озону. Инфекционность вируса ИАЛ снижалась на 3-log в стерильной пресной и морской воде при облучении УФ в дозе приблизительно 35 Дж/м² и 50 Дж/м², соответственно, в то время как соответствующее значение для вируса ИАЛ в сливных водах с рыбоперерабатывающего предприятия составляло приблизительно 72 Дж/м². Озонированная морская вода (4 минуты с использованием 8 мг мл⁻¹, 600–750 мВ кислотно-восстановительный потенциал) может полностью инактивировать вирус ИАЛ. Инкубирование гомогената ткани от больной рыбы при pH 4 или pH 12 в течение 24 часов инактивировало вирус ИАЛ. Инкубирование в присутствии хлора (100 мг мл⁻¹) в течение 15 минут также инактивировало вирус ([Rimstad c соавт., 2011](#)). Вирус ИАЛ, выделенный из культуры клеток, может выживать в течение недель при низких температурах, но инфекционность вируса теряется в течение 30 минут при подвержении его температуре 56°C ([Falk c соавт., 1997](#)).

2.1.4. Жизненный цикл

Основной путь инфекции наиболее вероятно проходит через жабры как для варианта вируса ИАЛ HPR0 так и для HPR-делетированного варианта, но инфицирование посредством кишечника или кожи исключить нельзя. HPR-делетированный вариант вируса ИАЛ использовался в исследованиях, указанных ниже. Эндотелиальные клетки, выстилающие кровеносные сосуды, по-видимому, являются основной целью для вируса ИАЛ, как было продемонстрировано электронной микроскопией, иммуногистохимическим исследованием и гибридизацией *in-situ*. Репликация вируса также была продемонстрирована в лейкоцитах и синусоидальных макрофагах в тканях почек, с положительной окраской по вирусу ИАЛ в гистохимическом анализе (ИГХ). Так как эндотелиальные клетки являются целевыми клетками (См. Раздел 2.2.5), репликация вируса может возникнуть в любом органе ([Aamelfot c соавт., 2012](#); [Rimstad c соавт., 2011](#)).

Молекула гемагглютинин-эстеразы (HE) вируса ИАЛ, подобно гемагглютинину (HA) других ортомиксовирусов (вирусы гриппа типа А, В и С) играет важную роль в связывании вируса с остатками сиаловой кислоты на поверхности клетки. В случае с вирусом ИАЛ, вирусная частица связывается с рецепторами гликопротеина, содержащими остатки 4-О-ацетил сиаловой кислоты, которые также функционируют как субстрат для рецептор-разрушающего фермента. Дальнейшее поглощение и репликация, по видимому, следуют пути, описанному в отношении вирусов гриппа А, что демонстрируется слиянием, зависимым от низкого pH, торможением репликации актиномицином D и альфа-аманитином, ранним скоплением нуклеопротеина, а затем матричного белка в ядре и почкованием вирионов-потомков от клеточной поверхности ([Cottet c соавт., 2011](#); [Rimstad c соавт., 2011](#)).

Выделение вируса ИАЛ в среду инфицированной рыбой может происходить с естественными секретами/выделениями.

Вариант HPR0 вируса ИАЛ не был выделен в культуре клеток, что затрудняет *in-vivo* и *in-vitro* исследования характеристик и жизненного цикла этого варианта.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды, которые отвечают критериям внесения в список как восприимчивые к инфекции вирусом ИАЛ на основании положений Главы 1.5. *Ветеринарно-санитарного кодекса по водным животным (Водный кодекс)*, включают: атлантический лосось (*Salmo salar*), кумжу (*Salmo trutta*) и радужную форель (*Oncorhynchus mykiss*).

2.2.2. Виды с недостаточной доказанностью восприимчивости

Виды, в отношении которых не существует достаточно доказательства выполнения критериев внесения в список видов, восприимчивых к вирусу ИАЛ на основании положений Главы 1.5. *Водного кодекса*, включают: атлантическую сельдь (*Clupea harengus*) и симу (*Oncorhynchus masou*).

К тому же патоген-специфичные положительные результаты ПЦР были получены от следующих организмов, но активной инфекции продемонстрировано не было: кижуч (*Oncorhynchus kisutch*).

2.2.3. Восприимчивые этапы жизни хозяина

Известно, что у атлантического лосося жизненные этапы от предличинки до взрослой особи, являются восприимчивыми. В основном сообщают о вспышках болезни в морских садках, и только несколько случаев были зарегистрированы на пресноводной стадии, включая один случай у предличинок ([Rimstad с соавт., 2011](#)). Инфекция HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ была экспериментально достигнута как у молоди атлантического лосося, так и у пестрятки, содержащихся в пресной воде.

2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Как известно, HPR-делетированный вариант вируса ИАЛ может вызывать клиническую болезнь только у атлантического лосося.

2.2.5. Органы-мишени и инфицированная ткань

У рыбы, которая поражена инфекцией HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ, инфицируются эндотелиальные клетки всех органов (жабры, сердце, печень, почки, селезенка и другие) ([Aamelfot с соавт., 2012](#)). Вариант HPR0 вируса ИАЛ, по-видимому, нацелен в основном на эпителиальные клетки жабр ([Aamelfot с соавт., 2012](#)), но также был выявлен в сердце и почках ([Christiansen с соавт., 2011](#); [Lyngstad с соавт., 2011](#)).

2.2.6. Персистентная инфекция

Персистентная инфекция у пожизненных носителей не была зарегистрирована у атлантического лосося, но на уровне фермы инфекция может персистировать в популяции посредством постоянного заражения новых особей, которые не демонстрируют клинических признаков болезни. Это может включать инфекцию HPR0 вариантами вируса ИАЛ, которые, по-видимому, являются быстротечными по характеру ([Christiansen с](#)

[соавт., 2011](#); [Lyngstad с соавт., 2011](#)). Экспериментальная инфекция радужной форели и кумжи вирусом ИАЛ указывает на то, что персистентная инфекция у этих видов возможна ([Rimstad с соавт., 2011](#)).

2.2.7. Векторы

Передача вируса ИАЛ лососевыми вшами (*Lepeophtheirus salmonis* и *Caligus rogercresseyi* [[Oelckers с соавт., 2014](#)]) была продемонстрирована в экспериментальных условиях. Несмотря на то, что естественные векторы обнаружены не были, ряд различных групп векторов могут быть потенциальными векторами в определенных условиях ([Rimstad с соавт., 2011](#)).

2.2.8. Известные или предполагаемые водные животные-переносчики

Дикие атлантический лосось и кумжа могут быть переносчиками вируса ИАЛ ([Rimstad с соавт., 2011](#)). Важность дикой морской рыбы (См. Раздел 2.2.2) в качестве переносчиков вируса подлежит разъяснению. Результаты исследования с Фарерских островов указывают на потенциальное присутствие неизвестного морского резервуара этого вируса ([Christiansen с соавт., 2011](#)).

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Исследования периодически повторяющихся эпидемий инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ в различных зонах производства лосося приводят к выводу, что вирус распространяется локально между соседними площадками. Близость к площадкам, где зарегистрированы вспышки болезни, является первоочередным риском, и этот риск для восприимчивой фермы увеличивается со снижением расстояния до зараженного объекта. Анализ последовательности вируса ИАЛ, выделенного при вспышках в Норвегии, показывает, что схожесть между вирусами, полученными на соседних пораженных площадках, является еще одним доказательством передачи вируса ИАЛ между близко расположенными производственными площадками. Риск передачи вируса ИАЛ зависит от уровня действующих мер биобезопасности. Предлагаемые пути передачи вируса ИАЛ включают морскую воду, партии живой рыбы, передачу через морских вшей и через диких лососевых ([Aldrin с соавт., 2011](#); [Gustafson с соавт., 2007](#); [Lyngstad с соавт., 2011](#); [Mardones с соавт., 2011](#); [Rimstad с соавт., 2011](#)).

Многие вспышки клинической болезни, вызванной HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ в Норвегии, по-видимому, являются изолированными во времени и пространстве от других вспышек с неизвестными источниками инфекции ([Aldrin с соавт., 2011](#)). Предполагаемая гипотеза возникновения болезни это случайный переход варианта HPR0 вируса ИАЛ в HPR-делетированный вариант вируса ИАЛ, вызывающий отдельные вспышки или локальные эпидемии посредством локальной передачи ([Lyngstad с соавт., 2011](#); [Lyngstad с соавт., 2012](#)). Риск возникновения HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ из варианта HPR0 вируса ИАЛ считается низким, но не ничтожным ([European Food Safety Authority, 2012](#)). Прямая связь между HPR0 и HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ все еще нуждается в подтверждении ([Cárdenas с соавт., 2014](#); [Gagné & LeBlanc, 2018](#)).

Так как инфекция вирусом ИАЛ также была зарегистрирована на площадках производства смолта атлантического лосося, передачу вируса ИАЛ от родителей потомству также не

стоит исключать. Даже несмотря на то, что нет доказательства реальной вертикальной передачи, яйца и эмбрионы могут представлять собой риск передачи вируса, если меры биозащиты не принимаются надлежащим образом ([Mardones c соавт., 2014](#); [Marshall c соавт., 2014](#); [Rimstad c соавт., 2011](#)).

2.3.2. Превалентность

В садках с больной рыбой превалентность HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ может широко различаться, в то время как в соседних садках (где нет больной рыбы) вирус ИАЛ может с трудом поддаваться выделению, даже с помощью наиболее чувствительных методов. Поэтому в целях диагностических исследований важно отбирать пробы из садков, содержащих больную рыбу.

Существует все больше подтверждений того, что превалентность непатогенных HPR0 вариантов вируса ИАЛ может быть высокой в зонах производства атлантического лосося. Вариант HPR0 вируса ИАЛ у атлантического лосося, по-видимому, является сезонным и скоротечным ([Christiansen c соавт., 2011](#)). Вариант HPR0 вируса ИАЛ также был выделен от диких лососевых ([Rimstad c соавт., 2011](#)).

2.3.3. Географическое распределение

Первоначально сообщения о вирусе появились в Норвегии в середине 1980-ых ([Thorud & Djupvik, 1988](#)), затем об инфекции вирусом ИАЛ у атлантического лосося сообщили из Канады (Нью-Брунсуик в 1996 г.; [Mullins c соавт., 1998](#)), Соединенного Королевства (Шотландия в 1998 г.), Фарерских островов (2000 г.), США (Мэн в 2001 г.) и Чили (2007 г.) ([Cottet c соавт., 2011](#); [Rimstad c соавт., 2011](#)). О присутствии варианта HPR0 вируса ИАЛ сообщали все страны, где возникала инфекция HPR-делетированным вирусом ИАЛ, за исключением Исландии.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Во время вспышек инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ смертность и заболеваемость могут серьезно различаться как внутри садков, так и между ними на морской ферме, а также между фермами. Заболеваемость и смертность в садке может начинаться с очень низких уровней. Обычно, суточная смертность в пораженных садках варьирует от 0,5 до 1%. Без вмешательства смертность возрастает и часто достигает пика ранним летом и зимой. Уровень кумулятивной смертности во время вспышки варьирует от незначительного до умеренного, но в тяжелых случаях кумулятивная смертность может превышать 90% в течение нескольких месяцев. Изначально вспышка клинической болезни может быть ограничена до одного или двух садков в течение длительного периода. В таких случаях, если садки с рыбами, демонстрирующими клинические признаки болезни, отправляют на немедленный убой, то можно предотвратить дальнейшее развитие клинической инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ на площадке. В случаях, когда смолт был инфицирован на живорыбных судах во время транспортировки, могут возникнуть одновременные вспышки.

Вариант HPR0 вируса ИАЛ не вызывает клинической болезни у атлантического лосося.

2.3.5. Факторы окружающей среды

В основном вспышки инфекции, вызванной HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ, имеют тенденцию быть сезонными, когда большинство вспышек происходят поздней

весной или поздней осенью, однако вспышки могут возникать в любое время года. Манипуляции с рыбой (например, сортировка или обработки, разделение или перемещение садков) могут спровоцировать вспышки болезни на инфицированных фермах, особенно, если проблему не диагностировали в течение длительного периода ([Lyngstad с соавт., 2008](#)).

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Вакцинация против инфекции вирусом ИАЛ проводится в Северной Америке с 1999 г., а на Фарерских островах с 2005 г. В Норвегии вакцинация против инфекции вирусом ИАЛ проводилась в первый раз в 2009 г. в регионе с высоким количеством вспышек инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ. Чили начала вакцинацию против инфекции вирусом ИАЛ в 2010 г.

2.4.2. Фармакотерапия

Противовирусный препарат широкого спектра Рибавирин (1-бета-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) эффективен в торможении репликации вируса ИАЛ как *in vitro*, так и *in vivo* ([Rivas-Aravena с соавт., 2011](#)).

2.4.3. Иммуностимуляция

Не применимо.

2.4.4. Разведение резистентных популяций

Различия в восприимчивости среди различных групп семейства атлантического лосося в пресной воде наблюдались в экспериментах с контрольным заражением и в полевых исследованиях, что предполагает потенциал для разведения резистентных популяций ([Gjøen с соавт., 1997](#)).

2.4.5. Восстановление популяции резистентными особями

Не применимо.

2.4.6. Блокирующие агенты

Не применимо.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Дезинфекция икринок в соответствии со стандартными процедурами предлагается в качестве важной меры контроля (Глава 4.4 *Водного кодекса*).

2.4.8. Общие практики содержания

Инцидентность инфекции вирусом ИАЛ может быть значительно снижена посредством выполнения законодательных мер или практик содержания, касающихся перемещения рыбы, обязательного санитарного контроля, положений по транспортировке и бойням. Специальные меры, включая ограничения, накладываемые на пораженные фермы, фермы

под подозрением или соседние фермы, вынужденный санитарный убой, сегрегация поколений («система пусто/занято»), а также дезинфекция побочных продуктов и сточных вод с рыбных боен и рыбоперерабатывающих предприятий также могут содействовать снижению инцидентности болезни. Опыт Фарерских островов, где превалентность варианта HPR0 вируса ИАЛ высока, демонстрирует, что комбинация надлежащих практик биобезопасности и содержания значительно сокращает риск возникновения вспышек инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ.

3. Отбор проб

3.1. Отбор индивидуальных образцов

С целью выявления HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ, следует отбирать образцы от рыбы, демонстрирующей клинические признаки или макропатологию.

С целью выявления варианта HPR0 вируса ИАЛ следует отбирать образцы от случайно выбранных особей в различные моменты времени на протяжении всего производственного цикла.

3.2. Сохранение проб для последующего направления на исследования

Гематология:	Гепарин или ЭДТА (Этилендиаминтетрауксусная кислота)
Культура клеток:	Транспортировочная среда
Гистология и иммуногистохимия:	Фиксация в 10% нейтральном формалине, забуференном фосфатом
Иммунофлюоресценция (мазки):	Либо направляются в высушенном виде, либо в высушенном и фиксированном в 100% ацетоне
Молекулярная биология (ОТ-ПЦР и секвенирование):	Надлежащая среда для сохранения РНК

3.3. Объединение проб в пулы

Объединение проб в пулы может быть применимо, однако следует учитывать влияние на чувствительность и расчетную превалентность.

3.4. Наиболее подходящие органы и ткани

3.4.1. Выявление HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ

Кровь – предпочтительный материал для отбора проб от живой рыбы. Только внутренние органы, которые не были подвергнуты воздействию окружающей среды, должны использоваться для диагностического исследования.

Вирусологическое обследование (культура клеток и ОТ-ПЦР в реальном времени или ее стандартный вариант): сердце (обязательно должно использоваться) и мезонефрос;

Гистология (следует отдавать приоритет): мезонефрос, печень, сердце, поджелудочная железа/кишечник, селезенка;

Иммунофлюоресценция (мазки): мезонефрос;

Иммуногистохимия: мезонефрос, сердце (включая клапаны и артериальную луковицу (bulbus arteriosus)).

3.4.2. Выявление варианта HPR0 вируса ИАЛ

Ткани жабр.

3.5. Неподходящие пробы/ткани

Неизвестны.

4. Диагностические методы

4.1. Полевые диагностические методы

4.1.1. Клинические признаки

Наиболее явными внешними признаками инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ являются бледный цвет жабр (за исключением случаев гемостаза в жабрах), пучеглазие, вздутое брюхо, кровь в передней камере глаза и иногда кожные кровотечения, особенно в районе брюха, а также отек чешуйного кармана.

В целом атлантический лосось, естественно инфицированный HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ, кажется вялым и может держать ближе к стенке садка.

Больная рыба в целом находится в хорошем состоянии, но корма в пищеварительном тракте у такой рыбы не обнаруживают.

4.2. Патологическая оценка

4.2.1. Макроскопическая патология

Рыба, инфицированная HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ, может демонстрировать ряд патологических изменений, начиная от отсутствия таковых до серьезных, в зависимости от таких факторов, как инфекционная доза, штамм вируса, температура, возраст и иммунный статус рыбы. Отсутствие поражений является патогномоничным симптомом для инфекции HPR-делетированным вариантом вируса, но анемия и нарушение кровообращения присутствуют в любом случае. Следующие признаки были описаны как соответствующие инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ, однако все изменения редко наблюдаются у одной рыбы.

- Желтоватая жидкость возможно с примесью крови в брюшной и перикардиальной полости.
- Отек плавательного пузыря.
- Небольшие кровоизлияния в висцеральной или париетальной брюшине.
- Очаговое или диффузное потемнение печени. На поверхности может присутствовать тонкий фибриновый слой.
- Разбухшая, темно-красная селезенка с закругленными краями.
- Потемнение слизистой кишечной стенки в слепой кишке, в среднем и толстом отделе кишечника, с отсутствием крови в просвете кишечника у исследуемых особей.
- Опухшие, темно-красные почки с кровью и жидкостью, истекающей при надрезе.

- Точечные кровоизлияния скелетных мышц.

4.2.2. Клиническая химия

- Гематокрит <10 в конечных стадиях (25–30, число которое часто наблюдается в менее запущенных случаях болезни).

Гематокрит <10 должен во всех случаях подлежать расследованию на наличие инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ у атлантического лосося, выращенного в морских водах.

- Мазки крови с дегенеративными и вакуолизированными эритроцитами и наличием эритробластов с неправильной формой ядра. Определение лейкоцитарной формулы демонстрирует снижение в соотношении лейкоцитов по отношению к эритроцитам с наибольшим снижением среди лимфоцитов и тромбоцитов.

Патология печени приводит к повышенным уровням содержания почечных ферментов в крови.

4.2.3. Микроскопическая патология

Гистологические изменения у клинически больного атлантического лосося разнообразны, и могут включать следующие из них:

- Многочисленные эритроциты в центральном венозном синусе и ламеллярных капиллярах, при этом в жабрах также формируются эритроцитарные тромбы.
- Многоочаговые, переходящие в сплошные кровоизлияния и/или гепатоцитарный некроз, возникающие на некотором расстоянии от крупных сосудов в печени. Очаговые скопления эритроцитов в расширенных печеночных синусоидах.
- Скопление эритроцитов в кровеносных сосудах собственной пластинки слизистой оболочки кишечника и в конечном итоге кровоизлияние в собственную пластинку.
- Строма селезенки опухшая по причине скопления эритроцитов.
- Легкие многоочаговые до обширных диффузных интерстициальных кровоизлияний с тубулярным некрозом в геморрагических областях, скопление эритроцитов в почечных клубочках.
- Эритрофагоцитоз в селезенке и вторичные кровоизлияния в печени и почках.

4.2.4. Влажные анатомические препараты

Не применимо.

4.2.5. Мазки

См. Разделы [4.3.1.1.2](#)

4.2.6. Фиксированные срезы

См. раздел [4.3.1.1.3](#)

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Вирус обнаруживали в эндотелиальных клетках и лейкоцитах с помощью электронной микроскопии тканевых препаратов, но этот метод не применялся в диагностических целях.

4.3. Обнаружение возбудителя и методы идентификации

4.3.1. Методы прямого обнаружения

За исключением молекулярных методов (см. Раздел [4.3.1.2.3](#)), эти методы прямого обнаружения рекомендуются только в отношении рыбы с клиническими признаками инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ.

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные анатомические препараты

Не применимо.

4.3.1.1.2. Мазки

4.3.1.1.2.1. Непрямой иммунофлюоресцентный анализ

Реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) с использованием валидированных моноклональных антител к гемагглютинин-эстеразе вируса ИАЛ на почечных мазках (отпечатках) или на замороженных тканевых срезах почки, сердца и печени, давал положительные реакции как у экспериментально, так и у естественно-инфицированного атлантического лосося. Подозрительные случаи (см. Раздел 7.1) можно подтвердить с помощью положительного результата в РНИФ.

i. Препараты тканевых мазков (отпечатков)

Небольшой кусочек средней части почки быстрым движением промакивают об абсорбирующую бумагу с целью удаления лишней жидкости, несколько отпечатков в области размером с ноготь большого пальца фиксируют на микроскопических слайдах, покрытых поли-L-лизином. Отпечатки высушивают воздухом, фиксируют в охлажденном 100% ацетоне в течение 10 минут и хранят либо при 4°C в течение нескольких дней или при -80°C до момента использования.

ii. Процедура окрашивания

После блокирования с помощью 5% обезжиренного сухого молока в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР) в течение 30 минут, препараты инкубируют в течение 1 часа с использованием подходящего разведения моноклональных антител к вирусу ИАЛ после трех промываний. Для обнаружения связанных антител, препараты инкубируют с помощью флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ)-конъюгированного антимышиного Ig в течение 1 часа. ЗФР с добавлением 0.1% Твин 20 используют для промывания. Все процессы инкубирования проводят при комнатной температуре.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

4.3.1.1.3.1. Иммуногистохимия (ИГХ)

Поликлональное антитело к нуклеопротеину HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ используют на парафиновых срезах ткани, фиксированных в формалине. Это ИГХ окрашивание демонстрировало положительные реакции как у экспериментально так и естественно инфицированного атлантического лосося. Предпочтительными органами для этого исследования являются средняя часть почки и сердце (переходная часть, включающая все три камеры и клапаны). Подозрительные случаи вследствие патологических признаков проверяют на основе наличия положительных результатов в ИГХ. Гистологические срезы подготавливают в соответствии со стандартными методами.

i. *Подготовка срезов ткани*

Ткани фиксируют в нейтральном забуференном фосфатом 10% формалине в течение минимум 1 дня, дегидратируют в этаноле, очищают ксиленом и парафинируют в соответствии со стандартными протоколами. Срезы, приблизительно 5 мкм толщиной (для проведения ИГХ на слайдах, покрытых поли-L-лизинном) нагревают при 56–58°C (максимум 60°C) в течение 20 минут, удаляют воск ксиленом, регидратируют с помощью этанола и окрашивают гематоксиленом и эозином в целях патоморфологии и ИГХ, как описано ниже.

ii. *Процедура окрашивания для ИГХ*

Все процедуры инкубации осуществляют при комнатной температуре на качающейся платформе, если не указано иное.

- a. Антиген демаскируют посредством кипячения в 0,1 М цитратного буфера, рН 6,0, дважды в течение 6 минут с последующей блокировкой в 5% обезжиренном сухом молоке и 2% козьей сыворотке в 50 мМ солевого трис-буфера (TBS; Трис/HCl 50 мМ, NaCl 150 мМ, рН 7,6) в течение 20 минут.
- b. Затем срезы инкубируют в течение ночи с первичными антителами (моноспецифичное кроличье антитело к нуклеопротеину вируса ИАЛ), разведенными в TBS с добавлением 1% обезжиренного сухого молока с последующими тремя промывками в TBS с 0,1% Твин 20.
- c. Для обнаружения связанных антител, срезы инкубируют с антителами к кроличьему IgG, конъюгированными щелочной фосфатазой, в течение 60 минут. После последней промывки прочный красный (1 мг мл^{-1}) и нафтол AS-MX фосфат (0.2 мг мл^{-1}) с добавлением 1 мМ левамизола в 0,1 М TBS (рН 8,2) добавляют для развития реакции в течение 20 минут. Срезы затем промывают в водопроводной воде до контрастного окрашивания с помощью гематоксилина Гarrisа и подготавливают в водной заливочной среде. Срезы ткани, положительные и отрицательные на вирус ИАЛ, инкубируют в качестве контролей при каждой постановке.

iii. *Интерпретация*

Отрицательные контрольные срезы не должны демонстрировать значительных цветовых реакций. Положительные контрольные срезы должны показывать четко видимую цитоплазматическую и внутриядерную окраску красным цветом эндотелиальных клеток в кровеносных сосудах или эндокарде сердца. Исследуемый срез считается положительным, если обнаруживается четкое,

внутриядерное окрашивание эндотелиальных клеток. Внутриядерная локализация специфична для нуклеопротеина ортомикровирусов в течение стадии вирусной репликации. Сопутствующее цитоплазматическое окрашивание часто доминирует. Цитоплазматические и другие модели окрашивания без внутриядерной локализации считаются неспецифичными или сомнительными.

Наиболее сильные положительные реакции окрашивания обычно получают в эндотелиальных клетках сердца и почки. Реакции в виде эндотелиального окрашивания внутри обширных геморрагических поражений могут быть слабыми или отсутствовать вовсе, возможно по причине лизиса инфицированных эндотелиальных клеток.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток

Клетки ASK ([Devold с соавт., 2000](#)) рекомендуются к использованию для первичного выделения HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ, но при этом также можно использовать другие восприимчивые клеточные линии, такие как SHK-1 ([Dannevig с соавт., 1995](#)). Однако, следует учитывать вариабельность штаммов и способность к репликации в различных клеточных линиях. Клетки ASK, по-видимому, поддерживают выделение и рост изолятов вируса, известных до настоящего времени. Более явное цитопатическое действие (ЦПД) может демонстрироваться в клетках ASK. Обе клеточные линии SHK-1 и ASK, скорее всего, теряют восприимчивость к HPR-делетированному варианту вируса ИАЛ при увеличении количества пассажей.

Клетки SHK-1 и ASK выращивают при 20°C в культуральной среде Лейбовица L-15, обогащенной фетальной бычьей сывороткой (5% или 10%), L-глутамином (4 мМ), гентамицином (50 мкг мл⁻¹) и 2-меркаптоэтанолом (40 мкМ) (последнее можно не использовать).

В целях выделения вируса можно использовать клетки, выращенные в 25 см² колбах для культур ткани или многолуночных планшетах для культур клеток, которые можно запечатать парапленкой или с помощью устройства для запечатывания планшетов с целью стабилизации рН среды. Клетки, выращенные в 24-луночных планшетах, могут плохо расти в монослоях, но эта особенность может варьировать между лабораториями и в зависимости от типа используемых планшетов для культуры клеток. Серийно разведенные контроли, положительные на HPR-делетированный вариант вируса ИАЛ, следует инокулировать параллельно с образцами ткани в качестве теста на восприимчивость клеток к HPR-делетированному варианту вируса ИАЛ (данную манипуляцию следует осуществлять в месте, отличном от места, где исследуют образцы).

iv. Инокуляция клеточных монослоев

Подготавливают 2% суспензию гомогената ткани с помощью бессывороточной среды L-15 или другой среды с доказанной пригодностью. Ростовую среду удаляют из активно растущих монослоев (1-3 – дневные культуры или культуры 70–80% конfluence), выращенные в 25 см² колбах для культур ткани или многолуночных планшетах для культур клеток (см. выше). Монослой инокулируют (25 см² колбы для культур ткани), содержащих 1,5 мл 2% гомогената ткани. Объем корректируют до полного заполнения используемой площади. Оставляют на 3-4 инкубации при 15°C с последующим удалением инокулума и добавлением свежей среды L-15, обогащенной 2–5% FCS. В качестве

альтернативы можно использовать 1/1000 разведение и прямую инокуляцию без замены среды.

Когда поступают пробы рыбы с производственных площадок, на которых вирус инфекционного панкреонекроза (IPNV) считается эндемичным, следует инкубировать надосадочную жидкость гомогената ткани (в течение минимум 1 часа при 15°C) с объединенной пробой антисыворотки к энзоотическим серотипам IPNV до инкубирования с целью нейтрализации любого IPNV, который может присутствовать в пробах.

v. *Мониторинговое инкубирование*

Инокулированные культуры клеток (хранимые при 15°C) должны исследоваться с регулярной периодичностью (по меньшей мере, каждые 7 дней) на наличие ЦПД. Типичное ЦПД по причине HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ проявляет себя в виде вакуолизированных клеток, которые впоследствии округляются и отделяются от ростовой поверхности. Если возникает ЦПД сопоставимое с ЦПД, описываемым для HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ или IPNV, следует отобрать аликвоту среды для идентификации вируса, как описано ниже. В случае инфекции IPNV следует повторно инокулировать клетки надосадочной жидкостью гомогената ткани, которую инкубировали с более низким разведением антисыворотки IPNV. Если спустя 14 дней не вырабатывается ЦПД, следует провести субкультивирование для освежения культур клеток.

vi. *Процедура субкультивирования*

Аликвоты среды (надосадочная жидкость) от первичных культур собирают через 14 дней (или раньше, если возникает очевидное ЦПД) после инокуляции. Надосадочные жидкости из лунок, инокулированных различными разведениями идентичных проб, могут быть объединены в целях надзора.

Надосадочные жидкости инокулируют в свежие клеточные культуры, как описано для первичной инокуляции: удаляют ростовую среду, инокулируют монослой небольшим объемом разведенной надосадочной жидкости (1/5 и более высокие разведения) в течение 3-4 часов перед добавлением свежей среды. Альтернативным образом, добавляют надосадочные жидкости (конечные разведения 1/10 и выше) непосредственно в культуры клеток с ростовой средой.

Инокулированные культуры клеток инкубируют в течение минимум 14 дней и исследуют с регулярной периодичностью, как описано в отношении первичной инокуляции. В конце периода инкубации или ранее, если возникает очевидное ЦПД, среду собирают в целях идентификации вируса, как описано ниже. Культуры клеток без признаков ЦПД подлежат постоянному исследованию на предмет присутствия HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ с помощью иммунофлуоресценции (РНИФ), гемадсорбции или ПЦР, так как репликация вируса может возникать без проявления очевидного ЦПД.

Процедура, описанная ниже, успешно применялась для выделения HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ от рыбы с клиническими признаками или от рыбы с подозрением на инфекцию. Вариант HPR0 вируса ИАЛ до настоящего времени не выделяли в культуре клеток.

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе антител

4.3.1.2.2.1. Идентификация вируса с помощью РНИФ

Все процедуры инкубирования проводят при комнатной температуре на качающейся платформе, если не указано иное.

- vii. Подготовить монослой клеток в соответствующих планшетах для культуры ткани (напр. 96-луночные или 24-луночные планшеты) в слайд-флаконах или на покровных стеклах, в зависимости от типа используемого микроскопа (инвертированный микроскоп, оборудованный УФ светом необходим для монослоев, выращенных в планшетах для культуры ткани). Клетки SHK-1 растут довольно плохо на стеклянных покровных стеклах. Должны быть включены необходимые монослои для отрицательных и положительных контролей.
- viii. Монослой инокулируют вирусными суспензиями, подлежащими идентификации в десятикратных разведениях, два монослоя на каждое разведение. Добавляют положительный вирусный контроль в разведениях, которые, как известно, дают хорошую окрашивающую реакцию. Культуры клеток инкубируют при 15°C в течение 7 дней или, если возникает ЦПД, на более ранних сроках.
- ix. Фиксируют в 80% ацетоне в течение 20 минут после удаления среды для клеточного культивирования и ополаскиванием 80% ацетоном. Удалить фиксатор и высушить воздухом в течение 1 часа. Фиксированные культуры клеток могут храниться сухими в течение менее одной недели при 4°C или при -20°C в течение более долгого периода.
- x. Клеточные монослои инкубируют с моноклональными антителами к HPR-делетированному варианту вируса ИАЛ в соответствующем разведении ФБР в течение 1 часа и дважды ополаскивают ФБР/0,05% Твин 20. Если наблюдается неспецифичное связывание, инкубируют с ФБР, содержащим 0,5% сухого обезжиренного молока.
- xi. Инкубируют с ФИТЦ-конъюгированным козьем анти-мышинным иммуноглобулином (или если в качестве первичного антитела используется антитело, выработанное кроликами, используют ФИТЦ-конъюгированное антитело к кроличьему иммуноглобулину), в соответствии с инструкциями поставщика. В целях повышения чувствительности ФИТЦ-конъюгированный козий анти-мышинный Ig может быть заменен биотин-меченым антимышиным Ig и ФИТЦ-меченым стрептавидином и ополаскиванием, проводимым до проведения дополнительного этапа. Ополаскивают один раз с помощью ФБР/0,05% Твин 20, как было описано выше. Ядра могут быть окрашены пропидиум иодидом (100 мкг мл⁻¹ в стерильной дистиллированной воде). Добавляют ФБР (без Твин 20) и исследуют под УФ светом. Во избежание потери цвета, окрашенные планшеты следует хранить в темном месте до проведения исследования. При необходимости более долгого хранения (более 2-3 недель) раствор 1,4-диазабциклооктана (ДАВСО 2,5% в ФБР, рН 8.2) или подобный реагент можно добавить в качестве раствора, снижающего обесцвечивание.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Праймеры, описанные ниже, для ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени будут обнаруживать европейский и североамериканский HPR-делетированный вариант и вариант HPR0 вируса ИАЛ.

ОТ-ПЦР можно применять для обнаружения вируса ИАЛ в тотальной РНК (или тотальной нуклеиновой кислоте), извлеченной из рекомендуемых органов/тканей (см. Раздел 3.4). ОТ-ПЦР в реальном времени рекомендуется для обнаружения вируса ИАЛ, так она повышает специфичность и, возможно, также чувствительность теста. В отношении ОТ-ПЦР на обнаружение вируса ИАЛ сообщалось о нескольких наборах праймеров, но рекомендуемые наборы праймеров представлены в таблице ниже. Наборы праймеров, полученных из геномного сегмента 8 и сегмента 7, использовались несколькими лабораториями и были признаны пригодными для обнаружения вируса ИАЛ во время вспышек болезни и у клинически здоровой рыбы-переносчика вируса.

По причине широкого распространения вариантов HPR0 вируса ИАЛ, важно контролировать все результаты, положительные в ПЦР, основанной на наборах праймеров из геномных сегментов 7 или 8, с помощью секвенирования HPR сегмента 6 с целью определения того, является ли изолят HPR-делетированным вариантом или HPR0 вариантом вируса ИАЛ, или обоими. Надлежащие праймеры, сконструированные и валидированные Справочной лабораторией МЭБ, приведены в таблице ниже. Валидация набора праймеров HPR для североамериканских изолятов варианта HPR0 затруднена по причине ограниченных данных по последовательности в Genbank в отношении 3' конца сегмента 6 вируса ИАЛ.

Праймеры для сегмента 7 и 8, а также праймеры для секвенирования в отношении HPR сегмента 6, перечислены ниже и также, при необходимости, могут быть использованы для проведения стандартной ОТ-ПЦР.

ОТ-ПЦР: в реальном времени и стандартная: Последовательности праймеров	Название	Сегмент генома	Размер продукта	Источник
5'-CAG-GGT-TGT-ATC-CAT-GGT-TGA-AAT-G-3' 5'-GTC-CAG-CCC-TAA-GCT-CAA-CTC-3' 5'-6FAM-CTC-TCT-CAT-TGT-GAT-CCC-MGBNFQ-3'	прямой праймер обратный праймер Taqman®зонд	7	155 нт	Snow с соавт., 2006
5'-CTA-CAC-AGC-AGG-ATG-CAG-ATG-T-3' 5'-CAG-GAT-GCC-GGA-AGT-CGA-T-3' 5'-6FAM-CAT-CGT-CGC-TGC-AGT-TC-MGBNFQ-3'	прямой праймер обратный праймер Taqman®зонд	8	104 нт	Snow с соавт., 2006
5'-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3' 5'-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3'	прямой праймер обратный праймер	6 (HPR)	304 нт если HPR0	Реф. Лаб. МЭБ

4.3.1.2.4. Очистка антигена

Вирус ИАЛ, размноженный в культуре клеток, может быть очищен с помощью центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы (Falk с соавт., 1997) или аффинной очистки с использованием иммуномагнитных бусин, сенсibilизированных моноклональными антителами к вирусу ИАЛ.

4.3.2. Серологические методы

Не опубликованы и не валидированы.

5. Рейтинг исследований на основании цели использования

Методы, доступные на данный момент для целевого надзора HPR-делетированного варианта вируса ИАЛ, и диагностика инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ перечислены в Таблице 5.1. Надзор за HPR0 вариантом вируса ИАЛ ОТ-ПЦР в

реальном времени с последующей стандартной ОТ-ПЦР и секвенированием являются единственным рекомендуемым методом (не указаны в таблице). Обозначения, используемые в Таблице, указывают: a = метод является рекомендуемым методом по причине доступности, практичности, диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод может применяться в некоторых ситуациях, но затраты, точность или другие факторы значительно ограничивают диапазон его применения; и d = метод на настоящий момент не рекомендуется для проведения в этих целях. Эти данные неким образом субъективны, так как пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и практичности. Несмотря на то, что все тесты, перечисленные как категория a или b, прошли формальные процедуры стандартизации и валидации, их рутинная природа и тот факт, что они широко использовались без получения сомнительных результатов, делает их пригодными.

Таблица 5.1. Методы, используемые для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор инфекции HPR- делетированным вариантом вируса ИАЛ				Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	М	П	С	В		
Макропатологические признаки	d	d	d	d	c	b
Гистопатология	d	d	d	d	b	b
РНИФ на отпечатках почек	d	d	d	d	b	a
Иммуногистохимия	d	d	d	d	b	a
Выделение в культуре клеток с идентификацией вируса	b	b	b	b	b	a
ОТ-ПЦР	c	c	c	c	b	c
ОТ-ПЦР в реальном времени	a	a	a	a	a	b
Секвенирование	d	d	d	d	d	a

М – молодежь

П- пестрятка

С – смолт

В – взрослые особи

*Так как диагностика инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ не основывается на результатах одного метода, информация в этой Таблице должна использоваться с осторожностью. См. Раздел 7 в отношении критериев диагностики инфекции HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ.

РНИФ = реакция непрямой иммунофлюоресценции; ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

6. Тесты, рекомендуемые для целевого надзора с целью объявления свободы от инфекции вирусом инфекционной анемии лососевых

В отношении инфекции вирусом ИАЛ, рекомендуемым тестом для надзора является ОТ-ПЦР.

7. Подтверждающие диагностические критерии

Разумные основания для подозрения рыбы в инфицировании вирусом ИАЛ (HPR-делетированным вариантом или вариантом HPR0) приведены ниже. Компетентный орган должен обеспечить, чтобы после подозрения рыбы в инфекции вирусом ИАЛ на ферме, как можно быстрее было проведено официальное расследование в целях подтверждения или исключения присутствия болезни, применяя инспектирование и клинические исследования, а также сбор и отбор проб и применение методов лабораторного анализа, как описано в Разделе 4.

7.1. Определение случая подозрения

Наличие инфекции HPR0 или HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ подозревают, если есть соответствие следующим критериям:

- i. Положительный результат в ОТ-ПЦР или в ОТ-ПЦР в реальном времени.

Кроме того инфекция HPR-делетированным вариантом вируса ИАЛ подозревают, если есть соответствие хотя бы одному критерию:

- i. Клинические признаки или патологические изменения, сопоставимые с ИАЛ;
- ii. ЦПД, типичное для вируса ИАЛ в культурах клеток;
- iii. Положительный результат в РНИФ на отпечатках тканей.

7.2. Определение подтвержденного случая (HPR-делетированный вариант вируса ИАЛ)

Наличие вируса ИАЛ считается подтвержденным, если, кроме критериев, указанных в Разделе 7.1, есть соответствие одному или более критериев, указанных ниже:

- i. Выделение вируса ИАЛ проводится на культуре клеток с последующей идентификацией на культуре клеток либо посредством исследований на основе антител (РНИФ) и/или традиционной ПЦР с последующим секвенированием ампликона;
- ii. Вирус ИАЛ выявляют в гистологических срезах с помощью иммуноанализа с использованием антител к вирусу ИАЛ;
- iii. Выявление вируса ИАЛ в препаратах ткани с помощью традиционной ПЦР с последующим секвенированием ампликона.

7.3. Определение подтвержденной инфекции HPR0 вариантом вируса ИАЛ

Критерии, указанные в пункте i), должны быть выполнены, чтобы подтвердить инфекцию HPR0 вариантом вируса ИАЛ.

- i. Выявление вируса ИАЛ посредством ОТ-ПЦР с последующей амплификацией и секвенированием региона HPR сегмента 6 с целью подтверждения наличия только варианта HPR0.

8. Литературные источники

Aamelfot M., Dale O.B., Weli S., Koppang E.O. & Falk K. (2012). Expression of 4-O-acetylated sialic acids on Atlantic salmon endothelial cells correlates with cell tropism of Infectious salmon anemia virus. *J. Virol.*, 86, 10571–10578

Aldrin M., Lyngstad T.M., Kristoffersen A.B., Storvik B., Borgan O. & Jansen P.A. (2011). Modelling the spread of infectious salmon anaemia among salmon farms based on seaway distances between farms and genetic relationships between infectious salmon anaemia virus isolates. *J.R. Soc. Interface*, 8, 1346–1356

Biacchesi S., Le Berre M., Le Guillou S., Benmansour A., Brémont M., Quillet E. & Boudinot P. (2007). Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. *J. Fish Dis.*, 30, 631–636

Cárdenas C., Carmona M., Gallardo A., Labra A. & Marshall S.H. (2014). Coexistence in field samples of two variants of the infectious salmon anemia virus: a putative shift to pathogenicity. *PLoS One*, 9, e87832. doi: 10.1371/journal.pone.0087832

Christiansen D.B., McBeath A.J.A., Aamelfot M., Matejusova I., Fourrier M., White P., Petersen P.E. & Falk K. (2017). First field evidence of the evolution from a non-virulent HPR0 to a virulent HPR-deleted infectious salmon anaemia virus. *J. Gen. Virol.*, 98, 595–606

Christiansen D.H., Østergaard P.S., Snow M., Dale O.B. & Falk K. (2011). A low-pathogenic variant of infectious salmon anemia virus (ISAV1 - HPR0) is highly prevalent and causes a non-clinical transient infection in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the Faroe Islands. *J. Gen. Virol.*, 92, 909–918

Cottet L., Rivas-Aravena A., Cortez-San Martin M., Sandino A.M. & Spencer E. (2011). Infectious salmon anemia virus – genetics and pathogenesis. *Virus Res.*, 155, 10–19

Clouthier S.C., Rector T., Brown N.E.C. & Anderson E.D. (2002). Genomic organization of infectious salmon anaemia virus. *J. Gen. Virol.*, 83, 421–428

Cunningham C.O., Gregory A., Black J., Simpsons I. & Raynard R.S. (2002). A novel variant of the infectious salmon anaemia virus (ISAV) haemagglutinin gene suggests mechanisms for virus diversity. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 22, 366–374

Dannevig B.H., Falk K. & Namork E. (1995). Isolation of the causal virus of infectious salmon anemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *J. Gen. Virol.*, 76, 1353–1359

Devold M., Karlsen M. & Nylund A. (2006). Sequence analysis of the fusion protein gene from infectious salmon anemia virus isolates: evidence of recombination and reassortment. *J. Gen. Virol.*, 87, 2031–2040

Devold M., Krossoy B., Aspehaug V. & Nylund A. (2000). Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Dis. Aquat. Org.*, 40, 9–18

European Food Safety Authority (EFSA) (2012). EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on infectious salmon anaemia. *EFSA Journal*, 10, 2971

Falk K., Namork E., Rimstad E., Mjaaland S. & Dannevig B.H. (1997). Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *J. Virol.*, 71, 9016–9023

Gagné N. & LeBlanc F. (2018). Overview of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic Canada and first report of an ISAV North American-HPR0 subtype. *J. Fish Dis.*, 41, 421–430; DOI: 10.1111/jfd.12670

Gjøen H.M., Refstie T., Ulla O. & Gjerde B. (1997). Genetic correlations between survival of Atlantic salmon in challenge and field tests. *Aquaculture*, 158, 277–288

Gustafson L.L., Ellis S.K., Beattie M.J., Chang B.D., Dickey D.A., Robinson T.L., Marengi F.P., Moffett P.J. & Page F.H. (2007). Hydrographics and the timing of infectious salmon anemia outbreaks among Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) farms in the Quoddy region of Maine, USA and New Brunswick, Canada. *Prev. Vet. Med.*, 78, 35–56

Kawaoka Y., Cox N.J., Haller O., Hongo S., Kaverin N., Klenk H.D., Lamb R.A., McCauley J., Palese P., Rimstad E. & Webster R.G. (2005). Infectious Salmon Anaemia Virus. *In: Virus Taxonomy – Eight Report of the International Committee on Taxonomy Viruses*, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., eds. Elsevier Academic Press, New York, USA, 681–693

Kibenge F.S.B., Garate o.n. Johnson G., Arriagada K., Kibenge M.J.T. & Wadowaka D. (2001). Isolation and identification of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. *Dis. Aquat. Org.*, 45, 9–18

Kibenge F.S.B., Godoy M.G., Wang Y., Kibenge M.J.T., Gherardelli V., Mansilla S., Lisperger A., Jarpa M., Larroquete G., Avendaño F., Lara M. & Gallardo A. (2009). Infectious salmon anaemia virus (ISAV) isolated from the ISA disease outbreaks in Chile diverged from ISAV isolates from Norway around 1996 and was disseminated around 2005, based on surface glycoprotein gene sequences. *Virol. J.*, 6, 88

Kibenge F.S.B., Kibenge M.J.T., Wang Y., Qian B., Hariharan S. & McGeachy S. (2007). Mapping of putative virulence motifs on infectious salmon anaemia virus surface glycoprotein genes. *J. Gen. Virol.*, 88, 3100–3111

Kibenge F.S.B., Munir K., Kibenge M.J.T., Moneke T.J. & Moneke E. (2004). Infectious salmon anemia virus: causative agent, pathogenesis and immunity. *Anim. Health Res. Rev.*, 5, 65–78

Kulshreshtha V., Kibenge M., Salenius K., Simard N., Riveroll A. & Kibenge F. (2010). Identification of the 3' and 5' terminal sequences of the 8 RNA genome segments of European and North American genotypes of infectious salmon anaemia virus (an orthomyxovirus) and evidence for quasispecies based on the non-coding sequences of transcripts. *Virol. J.*, 7, 338

- Lyngstad T.M., Hjortaa M.J, Kristoffersen A.B, Markussen T., Karlsen E.T., Jonassen C.M. & Jansen P.A. (2011). Use of molecular epidemiology to trace transmission pathways for infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Norwegian salmon farming. *Epidemics*, 3, 1–11
- Lyngstad T.M., Jansen P.A., Sindre H., Jonassen C.M., Hjortaa M.J., Johnsen S. & Brun E. (2008). Epidemiological investigation of infectious salmon anaemia (ISA) outbreaks in Norway 2003–2005. *Prev. Vet. Med.*, 84, 213–227
- Lyngstad T.M., Kristoffersen A. B., Hjortaa M. J., Devold, M., Aspehaug, V., Larssen, R. B. & Jansen & P. A. (2012). Low virulent infectious salmon anaemia virus (ISAV-HPR0) is prevalent and geographically structured in Norwegian salmon farming. *Dis. Aquat. Org.*, 101, 197–206
- MacLean S.A., Bouchard D.A. & Ellis S.K. (2003). Survey of non-salmonid marine fishes for detection of infectious salmon anemia virus and other salmonid pathogens. *In: Technical Bulletin 1902. International Response to Infectious Salmon Anemia: Prevention, Control and Eradication*, Miller O. & Cipriano R.C., eds. , USDA, APHIS; US Dept Interior, US Geological Survey; US Dept Commerce, National Marine Fisheries Service, Washington DC, USA, 135–143
- Mardones F.O., Martinez-Lopez B., Valdes-Donoso P., Carpenter T.E. & Perez A.M. (2014). The role of fish movements and the spread of infectious salmon anemia virus (ISAV) in Chile, 2007–2009. *Prev. Vet. Med.*, 114, 37–46
- Mardones F.O., Perez A.M., Valdes-Donoso P. & Carpenter T.E. (2011). Farm-level reproduction number during an epidemic of infectious salmon anaemia virus in southern Chile in 2007–2009. *Prev. Vet. Med.*, 102, 175–184
- Markussen T., Jonassen C.M., Numanovic S., Braaen S., Hjortaa M., Nilsen H. & Mjaaland S. (2008). Evolutionary mechanisms involved in the virulence of infectious salmon anaemia virus (ISAV), a piscine orthomyxovirus. *Virology*, 374, 515–527
- Marshall S.H., Ramírez R., Labra A., Carmona M. & Muñoz C. (2014). Bona Fide Evidence for Natural Vertical Transmission of Infectious Salmon Anemia Virus in Freshwater Brood Stocks of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in Southern Chile. *J. Virol.*, 88, 6012–6018; doi: 10.1128/JVI.03670-13
- McBeath A.J., Bain N. & Snow M. (2009). Surveillance for infectious salmon anaemia virus HPR0 in marine Atlantic salmon farms across Scotland. *Dis. Aquat. Org.*, 87, 161–169
- Mjaaland S., Hungnes O., Teig A., Dannevig B.H., Thorud K. & Rimstad E. (2002). Polymorphism in the infectious salmon anemia virus hemagglutinin gene; importance and possible implications for evolution and ecology of infectious salmon anemia disease. *Virology*, 302, 379–391
- Mjaaland S., Markussen T., Sindre H., Kjøglum S., Dannevig B.H., Larsen S. & Grimholt U. (2005). Susceptibility and immune responses following experimental infection of MHC compatible Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with different infectious salmon anaemia virus isolates. *Arch. Virol.*, 150, 2195–2216
- Mjaaland S., Rimstad E., Falk K. & Dannevig B.H. (1997). Genomic characterisation of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo-like virus in a teleost. *J. Virol.*, 71, 7681–7686

Mullins J.E., Groman D.B & Wadowska D. (1998). Infectious salmon anaemia in salt water Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in New Brunswick, Canada. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 18, 110–114

Nylund A., Plarre H., Karlsen M., Fridell F., Ottem K.F., Bratland A. & Saether P.A. (2007). Transmission of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in farmed populations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Arch. Virol.*, 152, 151–179

Oelckers K., Vike S., Duesund H., Gonzalez J., Wadsworth S. & Nylund A. (2014). *Caligus rogercresseyi* as a potential vector for transmission of Infectious Salmon Anaemia (ISA) virus in Chile. *Aquaculture*, 420–421, 126–132

Plarre H., Devold M., Snow M. & Nylund A. (2005). Prevalence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in wild salmonids in western Norway. *Dis. Aquat. Org.*, 66, 71–79

Rimstad E., Dale O.B., Dannevig B.H. & Falk K. (2011). Infectious Salmon Anaemia. *In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, Woo P.T.K. & Bruno D., eds., CAB International, Oxfordshire, UK, 143–165

Rivas-Aravena A., Vallejos-Vidal E., Martin M.C., Reyes-Lopez F., Tello M., Mora P., Sandino A.M. & Spencer E. (2011). Inhibitory effect of a nucleotide analog on ISAV infection. *J. Virol.*, 85, 8037–8045

Snow M., McKay P., McBeath A.J.A., Black J., Doig F., Kerr R., Cunningham C.O., Nylund A. & Devold M. (2006). Development, application and validation of a taqman® real-time RT-PCR assay for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), Vannier P. & Espeseth D., eds. *New Diagnostic Technology: Applications in Animal Health and Biologics Controls*. Dev. Biol., Basel, Karger, 126, 133–145

Thorud K.E. & Djupvik H.O. (1988). Infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 8, 109–111

*

**

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по инфекции вирусом инфекционной анемии лососевых (см. Таблицу в конце этого Водного Руководства или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ:

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

Пожалуйста обратитесь в Референтные лаборатории МЭБ для получения дальнейшей информации по инфекции вирусом инфекционной анемии лососевых