

ИНФЕКЦИЯ АЛЬФАВИРУСОМ ЛОСОСЕВЫХ

1. Область применения

Инфекция альфавирусом лососевых (SAV) подразумевает инфицирование любым генотипом патогенного возбудителя альфавируса лососевых (SAV) рода *Alphavirus* семейства *Togaviridae*.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

SAV представляет собой оболочечный, сферический, одноцепочечный РНК вирус с положительной цепью, с примерным диаметром 60-70 нм и геномом ~12 т.н. Геном кодирует 8 протеинов: четыре капсидных гликопротеина (Е1, Е2, Е3 и 6К) и четыре неструктурных белка (nsP1–4). Гликопротеин Е2 считается участком большинства нейтрализующих эпитопов, тогда как Е1 содержит более консервативные, перекрёстно-реагирующие эпитопы (McLoughlin & Graham, 2007). Считается, что SAV относится к роду *Alphavirus* семейства *Togaviridae*. Это основано на исследовании нуклеотидной последовательности изолятов SAV, а также подтверждается биологическими свойствами вируса, включая исследования на перекрестную инфекцию и нейтрализацию. В дополнение к этому, в геноме SAV присутствуют четыре консервативных элемента нуклеотидной последовательности (CSEs) и консервативный мотив (GDD), характерный для альфавирусов (McLoughlin & Graham, 2007).

SAV был разделен на шесть генотипов (SAV1–SAV6) исключительно на основании последовательности нуклеиновой кислоты для белков Е2 и nsP3 (Fringuelli с соавт., 2008). Уровень антигенной вариации среди генотипов считается низким, поскольку моноклональные антитела (MAbs), выращенные к специфичному подтипу SAV, в большинстве случаев вступают в перекрестную реакцию с другими изолятами SAV (Graham с соавт., 2014; Jewhurst с соавт., 2004).

Инфекция SAV может вызывать болезнь поджелудочной железы (PD) или сонную болезнь (SD) у атлантического лосося (*Salmo salar*L.), лиманды обыкновенной (*Limanda limanda*), радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) (McLoughlin & Graham, 2007) и арктического гольца (*Salvelinus alpinus*) (Lewisch с соавт., 2018). Эта болезнь представляет собой системное заболевание, характеризующееся на микроскопическом уровне некрозом и потерей экзокринной панкреатической ткани, а также изменениями в сердечных и скелетных мышцах.

Распределение генотипных групп по восприимчивым видам и окружающей среде представлено в Таблице 2.1.

Таблица 2.1. Генотипы альфавируса лососевых (SAV) по восприимчивым видам и окружающей среде

Генотип SAV	Пресная вода	Морская вода
SAV 1	Радужная форель	Атлантический лосось
SAV 2	Радужная форель Атлантический лосось Арктический голец	Атлантический лосось
SAV 2	Атлантический лосось	
SAV 3		Радужная форель Атлантический лосось
SAV 4		Атлантический лосось
SAV 5		Атлантический лосось Лиманда обыкновенная
SAV 6		Атлантический лосось

2.1.2. Выживаемость за пределами хозяина

Лабораторные исследования предполагают, что SAV может выживать в течение длительного периода времени в водной среде. В этих исследованиях выживание вируса было обратнозависимо от температуры. При наличии органического материала отмечалось отчетливое увеличение периода выживания в морской воде в сравнении с пресной водой (Graham с соавт., 2007с). SAV был обнаружен во время вытекания жира из мертвой рыбы, указывая на то, что это может являться путем передачи. Капельки жира могут скапливаться на поверхности морской воды, способствуя распространению на дальние расстояния (Stene с соавт., 2015).

Период полураспада SAV в сыворотке оказался обратнозависим от температуры, подчеркивая необходимость быстрой отправки образцов в лаборатории при температуре 4°C для выделения вируса. Для долговременного сохранения SAV-положительных образцов и культивируемого вируса, рекомендовано хранение при –80°C (Graham с соавт., 2007с).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

SAV стремительно инактивируется в присутствии высоких уровней органического вещества при 60°C, pH 7.2, и pH 4 и pH 12 при 4°C, что дает основания предполагать, что компостирование, силосование и щелочной гидролиз будут эффективны при инактивации вируса в рыбных отходах (Graham с соавт., 2007а).

2.1.4. Жизненный цикл

Возможные пути передачи – через жабры или кишечник. В острые стадии болезни, может быть обнаружено большое количество SAV, и живой вирус можно выделить из сердца, почек, крови и некоторых других органов, но действительные клетки-мишени для вируса еще не были идентифицированы.

Виремия предшествует как началу гистологических изменений, так и клинических признаков (McLoughlin & Graham, 2007). Путем выделения могут являться естественные экскреции/секреции, что подтверждается обнаружением SAV путем полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в фекалиях и слизи экспериментально зараженного атлантического лосося. Эти матрицы могут, таким образом, играть роль в горизонтальной передаче SAV через воду (Graham с соавт., 2012). Вирус обнаруживался в воде через 4-13 дней после инфекции, указывая на то, что выделение вируса в среду совпадает с виремическим этапом (Andersen с соавт., 2010). Инкубационный период 7– 10 дней при температуре морской воды 12–15°C был установлен на основании анализа продукции антител у рыбы, зараженной внутрибрюшинно и сообитателей в экспериментальном испытании (McLoughlin & Graham, 2007). Некоторые исследования показали, что РНК SAV может определяться в рыбе в течение продолжительного срока после инфицирования (Jansen с соавт., 2010a; McLoughlin & Graham, 2007). Отмечалась слабо выраженная инфекция, предполагающая, что выраженность вспышки может зависеть от ряда факторов окружающей среды (McLoughlin & Graham, 2007), а также сезонные повышения температуры воды могут служить причиной возникновения вспышек болезни (Stene с соавт., 2014).

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяина

Виды, которые соответствуют критериям для внесения в список в качестве восприимчивых к инфекции SAV в соответствии с Главой 1.5. *Ветеринарно-санитарного кодекса водных животных (Водный Кодекс)*, включают: арктический голец (*Salvelinus alpinus*), атлантический лосось (*Salmo salar*), лиманда обыкновенная (*Limanda limanda*) и радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*).

2.2.2. Виды, имеющие неполные данные относительно их восприимчивости

Виды, в отношении которых имеются неполные данные относительно их восприимчивости в соответствии с Главой 1.5. *Водного Кодекса*, включают: камбала-ерш (*Hippoglossoides platessoides*), морская камбала (*Pleuronectes platessa*) и радужный губан (*Labrus bergylta*).

В дополнение к этому, патоген-специфичные положительные результаты ПЦР отмечались у следующих видов, но без проявления активной инфекции: мерлуза аргентинская (*Merluccius hubbsi*), кумжа (*Salmo trutta*), треска (*Gadus morhua*), европейская речная камбала (*Platichthys flesus*), пикша (*Melanogrammus aeglefinus*), сельдь (*Clupea harengus*), паут (*Trisopterus esmarkii*), сайда (*Pollachius virens*), рогатковые (*Myoxocephalus octodecemspinosus*) и мерланг (*Merlangius merlangus*).

2.2.3. Восприимчивые этапы хозяина

Все жизненные этапы считаются восприимчивыми к инфекции SAV.

Радужная форель, искусственно выращенная в пресной воде, подвергается воздействию на всех этапах производства (Kerhart Boscher с соавт., 2006). Опыт Норвегии показывает, что искусственно выращенная радужная форель и атлантический лосось восприимчивы на всех этапах в морской воде, что, вероятно, свидетельствует о том, что морская вода является резервуаром SAV. Экспериментальное заражение путем инъекции демонстрирует восприимчивость молодого атлантического лосося в пресной воде (McVicar, 1990).

2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность обнаружения)

Предрасположенность у известных видов и субпопуляций отсутствует.

2.2.5. Органы-мишени и зараженная ткань

Инфекция SAV представляет собой системное заболевание с ранней вирусемической фазой. После инфицирования, SAV обнаруживался во всех органах, которые были исследованы: мозг, жабры, псевдобранхия, сердце, поджелудочная железа, почки и скелетные мышцы (Andersen с соавт., 2007; McLoughlin & Graham, 2007), а также в слизи и фекалиях (Graham с соавт., 2012).

2.2.6. Персистирующая инфекция с пожизненными носителями

SAV был выявлен у выжившей рыбы через 6 месяцев после экспериментального заражения (Andersen с соавт., 2007). На уровне фермы, зараженная популяция будет сохранять SAV до момента убоя (Jansen с соавт., 2010a; Jansen с соавт., 2010b). Однако, на индивидуальном уровне, пожизненно персистирующей инфекции задокументировано не было.

2.2.7. Переносчики инфекции

SAV был выявлен методом ОТ-ПЦР у лососевой вши (*Lepeophtheirus salmonis*), собранной во время вспышек острого заболевания у атлантического лосося, но передача восприимчивым видам рыб не изучалась (Pettersen с соавт., 2009). Для распространения SAV переносчики инфекции не нужны.

2.2.8. Предполагаемые водные животные - переносчики

В исследованиях дикой морской рыбы РНК SAV была обнаружена у камбаловых видов: лиманда обыкновенная (*Limanda limanda*), камбала-ерш (*Hippoglossoides platessoides*) и обыкновенная морская камбала (*Pleuronectes platessa*) (McCleary с соавт., 2014; Snow с соавт., 2010). Значимость диких морских или пресноводных видов рыб в качестве переносчиков должна быть установлена.

2.3. Клиническая картина болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача SAV происходит горизонтально. Это подтверждают филогенетические исследования, успешная передача среди рыб при исследовании сообитателей, доказанная передача между местами выращивания, исследования выживаемости SAV в морской воде и распространение через водные потоки (Graham с соавт., 2007с; Graham с соавт., 2011; Jansen с соавт., 2010а; Kristoffersen с соавт., 2009; Viljugrein с соавт., 2009).

Передача на большие расстояния и, следовательно, занос SAV в ранее незараженную зону, с наибольшей вероятностью, обуславливается перемещением зараженной живой рыбы (Kristoffersen с соавт., 2009; Rodger & Mitchell, 2007). Как только произошел занос SAV на территорию, близость фермы по разведению рыбы и водные потоки, становятся факторами, участвующими в местной передаче инфекции (Aldrin с соавт., 2010; Kristoffersen с соавт., 2009; Viljugrein с соавт., 2009). Факторы риска возникновения вспышек на ферме включают предысторию заражения SAV, высокую интенсивность кормления, неблагоприятную ситуацию по заболеваемости морскими вшами, использование осенних серебрянок и предшествующая вспышка инфекционного некроза поджелудочной железы (IPN) (Bang Jensen с соавт., 2012; Kristoffersen с соавт., 2009; Rodger & Mitchell, 2007).

Имелись предположения относительно вертикального пути передачи SAV (Bratland & Nylund, 2009), но доказательства неубедительны (Kongtorp с соавт., 2010; McLoughlin & Graham, 2007). Норвежский научный комитет по пищевой безопасности (2010)¹ провел оценку риска и заключил, что риск вертикальной передачи SAV незначительный.

2.3.2. Уровень распространения заболевания

Распространенность инфекции SAV может варьировать. Во время вспышек болезни, уровень распространения инфекции обычно высокий; в местах выращивания атлантического лосося отмечались уровни распространения 70–100% (Graham с соавт., 2010). При отборе образцов от умирающей или тонкотелой рыбы, или недомерков, вероятность обнаружения SAV выше, чем при рандомном отборе образцов от практически здоровой рыбы (Jansen с соавт., 2010b). Показатели распространенности также могут варьировать в зависимости от используемого метода диагностики.

Распространенность среди дикой рыбы по большей мере неизвестна. РНК SAV определялась у некоторых видов камбаловых в морских водах Шотландии (Snow с соавт., 2010). Серологическое исследование диких лососевых в речных системах с пресной водой в Северной Ирландии не выявило вируснейтрализующих антител к SAV ни в одной из 188 протестированных сывороток, тогда как большинство

¹ Норвежский научный комитет по пищевой безопасности (Vitenskapskomiteen for Mattrygghet) (2010). Risikovurdering stamfiskovervåking og vertikal smitteoverføring. 01, 1-44. Доступно на сайте: <https://vkm.no/download/18.a665c1015c865cc85bdfc47/1500464589864/Vurdering%20av%20sannsynlighet%20for%20og%20risiko%20ved%20vertikal%20overf%C3%B8ring%20av%20smitte.pdf>

сывороток, полученных от лосося, искусственно выращенного в морской воде в этом же районе, имели положительный результат на инфекцию (Graham с соавт., 2003).

2.3.3. Географическое распределение

Известно, что инфекция SAV присутствует у искусственно выращенной рыбы вида лососевых в Хорватии, Франции, Германии, Ирландии, Италии, Норвегии, Польши, Испании, Швейцарии и Соединенного Королевства (Англия, Шотландия и Северная Ирландия).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Уровни смертности из-за инфекции SAV могут меняться в зависимости от генотипа, сезона, года, использования мер биобезопасности и видов рыб (Bang Jensen с соавт., 2012; Graham с соавт., 2011; Rodger & Mitchell, 2007; Stormoen с соавт., 2013). Кумулятивная смертность на уровне фермы колеблется от незначительных показателей до показателей выше 50% в тяжелых случаях. (Bang Jensen с соавт., 2012; Graham с соавт., 2003; Rodger & Mitchell, 2007; Ruane с соавт., 2008; Stene с соавт., 2014).

Продолжительность вспышек болезни, определяемая как период с повышенной смертностью, варьирует от 1 до 32 недель (Jansen с соавт., 2010a; Jansen с соавт., 2014; Ruane с соавт., 2008).

2.3.5. Факторы окружающей среды

На клинические вспышки и смертность влияет температура и время года (McLoughlin & Graham, 2007; Rodger & Mitchell, 2007; Stene с соавт., 2014; Stormoen с соавт., 2013). Подвергание рыбы стрессу из-за перемещения, скученность или лечение могут спровоцировать вспышки болезни на зараженных фермах.

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Вакцины на основе ДНК и вирус инактивированные вакцины против SAV доступны на рынке.

2.4.2. Химиотерапия

Химиотерапия недоступна.

2.4.3. Иммуностимуляция

Иммуностимуляция недоступна.

2.4.4. Резистентное разведение

Различия в восприимчивости среди разных родственных групп атлантического лосося наблюдались в испытательных экспериментах и в полевых условиях, демонстрируя потенциал резистентного разведения. В Ирландии и Норвегии

предпринимаются попытки разведения рыбы, которая будет более резистентна к инфекции SAV (McLoughlin & Graham, 2007).

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

Некоторые важные виды культур, включая тилапию нильскую, молочную рыбу и китайского карпа, проявили резистентность к EUS и способность к культивированию в эндемичных районах. Рекомендуется введение резистентных местных видов рыб.

2.4.6. Блокирующие агенты

Неприменимо.

2.4.7. Дезинфекция икры и личинок

Процедуры дезинфекции оценивались у оплодотворенных икринок из маточного стада с положительным результатом на SAV 3 генотипа (Kongtorp с соавт., 2010). Несмотря на это необходимо дополнительное исследование.

2.4.8. Общие практики животноводства

Во избежание инфекции SAV, должны применяться общие методы надлежащей гигиенической практики: использование соответствующих участков для выращивания, разделение поколений, формирование поголовья рыбой хорошего качества, удаление мертвой рыбы, регулярная очистка емкостей и садков, контроль паразитов и других патогенов, а также бережное содержание рыбы. Как только участок был инфицирован, смертность может быть снижена за счет наложения общего ограничения на содержание рыбы, а также общего ограничения на кормление рыбы.

3. Отбор образцов

3.1. Выбор индивидуальных образцов

Все производственные объекты (пруды, емкости, сетные садки, и т.п.) должны инспектироваться на наличие мертвой, слабой рыбы или рыбы с аномальным поведением. Крайне слабую (спящую) рыбу можно обнаружить на дне емкости или в сетных садках. Если количество клинически больной рыбы мало, могут быть добавлены образцы от длинной тонкотелой рыбы («недомерки») (Jansen с соавт., 2010b).

3.2. Сохранение образцов для представления

Метод	Сохраняющее средство
Гистология и иммуногистохимия:	Фиксация в нейтральном фосфатно-буферном 10% формалине
Молекулярная биология (ОТ-ПЦР и секвенирование):	Подходящая среда для сохранения РНК
Культура клеток:	Вирусная транспортная среда
Серология:	Плазма или сыворотка крови

3.3. Объединение образцов

Объединение образцов допустимо, однако следует учитывать влияние на чувствительность и превалентность композиции.

3.4. Наиболее подходящие органы и ткани

Сердце и первичная почка – рекомендуемые органы для выявления SAV молекулярно-биологическими методами или с помощью культуры клеток. Во время течения болезни, в сердце обычно содержится больше SAV, чем в других тканях, и от него всегда следует отбирать образцы. После вспышек болезни, жабры и сердце (Graham с соавт., 2010) и пулы сердца и первичной почки (Jansen с соавт., 2010a; Jansen с соавт., 2010b) оставались положительными в ОТ-ПЦР в течение месяцев после первичного обнаружения.

Во время первичной вирусемической фазы образцы сывороток также подходят для обнаружения SAV, либо молекулярно-биологическими методами, либо с помощью культуры клеток. Отбор проб сыворотки может, таким образом, использоваться для скрининг-тестов раннего обнаружения (Graham с соавт., 2010). Примерно начиная с трех недель после заражения SAV, сыворотка крови или плазма применяются для теста вируснейтрализации, который идентифицирует нейтрализующие антитела к SAV в рыбе, подвергнутой воздействию SAV (Graham с соавт., 2003).

Ткани для гистологических исследований должны включать жабры, сердце, пилорические придатки с тканью поджелудочной железы, печень, почки, селезенку и скелетную мышцу, содержащую как красную (аэроб), так и белую (анаэроб) мышцу. Кожу с ассоциированным образцом скелетной мышцы следует отбирать на уровне боковой линии и достаточно глубоко, чтобы включать красную и белую мышцу.

4. Методы диагностики

4.1. Полевые диагностические методы

4.1.1. Клинические признаки

Внезапная потеря аппетита может наблюдаться за 1-2 недели до выявления высокой смертности. Клинически больную рыбу можно наблюдать медленно плавающей на поверхности воды. В некоторых случаях, крайне слабую («спящую») рыбу можно обнаружить на дне емкости или в сетных садках. Также может наблюдаться возрастающее количество фекальных выбросов. Однако важно отметить, что клинические признаки не патогномичны. Внимательное изучение каждой мертвой, умирающей и аномально себя ведущей рыбы необходимо для того, чтобы определить участие SAV и исключить другие патогенные возбудители.

Изначально, нутритивный статус обычно нормальный, но в течение месяцев после вспышки или на более поздних стадиях болезни, как правило, наблюдается длинная тощая рыба (недомерок) в плохом физическом состоянии. Появление длинной тощей рыбы может быть вызвано и другими факторами, помимо SAV.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

Желтое мукоидное содержание кишечника является обычной посмертной находкой, поскольку нередко обнаруживается у рыбы, которая не ест. Периодически можно наблюдать признаки нарушения кровообращения, такие как петехиальные кровоизлияния, небольшие асциты или покраснение поджелудочной области между пилорическими придатками. У некоторых больных рыб может наблюдаться бледное сердце или разрыв сердца. Важно отметить, что результаты обследования после смерти не патогномоничны.

4.2.2. Клиническая химия

Не задокументирована для диагностического использования.

4.2.3. Микроскопическая патология

Изменения, которые наиболее часто обнаруживаются у клинически больной рыбы это большая потеря экзокринной поджелудочной ткани, кардиомиоцитный некроз и воспаление, воспаление красной (аэроб) скелетной мышцы и дегенерация или воспаление белой (анаэроб) скелетной мышцы. Другая, менее частая, но подтверждающая находка – обнаружение клеток с множественными цитоплазматическими эозинофильными гранулами вдоль почечных синусоидных капилляров.

По мере прогрессирования болезни, развитие этих изменений происходит не одновременно во всех органах: на очень короткой, первой фазе, единственным присутствующим поражением может быть некроз экзокринной панкреатической ткани и разнообразная воспалительная реакция в перипанкреатической жировой ткани. Вскоре после этого, развивается дегенерация клеток сердечной мышцы и некроз до того, как воспалительный ответ в сердце становится более ярко выражен. Панкреатические некротические омертвевшие ткани на первый взгляд исчезнут и вскоре появится типичная картина большой потери экзокринной панкреатической ткани одновременно с увеличивающимся воспалением в сердце. Несколько позже развивается дегенерация сердечной мышцы, воспаление и фиброз. У части рыб может возникнуть острый фиброз периацинозной ткани, и в этом случае поджелудочная железа не восстанавливается (недомерки) (Christie с соавт., 2007; Kerbart Boscher с соавт., 2006; McLoughlin & Graham, 2007; Taksdal с соавт., 2007).

4.2.4. Влажный препарат

Неприменимо.

4.2.5. Мазки

Неприменимо.

4.2.6. Фиксированные срезы, иммуногистохимия

Иммуногистохимическое исследование (Taksdal с соавт., 2007) рекомендуется исключительно для образцов, отобранных от рыб с острым некрозом экзокринной панкреатической ткани.

4.2.6.1. Подготовка срезов ткани

Ткани фиксируют в забуференном фосфатом нейтральном 10% формалине как минимум на 1 день, дегидрируют в градуированном этаноле, очищают в ксилене и заливают в парафин в соответствии со стандартными протоколами. Срезы толщиной приблизительно 3 мкм (отобранные для иммуногистохимии на покрытых поли-L-лизинном стеклах) нагревают при 56–58°C (максимум 60°C) в течение 20 минут, депарафинируют в ксилене, регидрируют через градуированный этанол, и окрашивают гематоксилином и эозином для гистопатологии и иммуногистохимии, как описано выше.

4.2.6.2. Процедура окрашивания для иммуногистохимии

Все инкубации проводятся при комнатной температуре и все этапы промывания осуществляются с использованием ТРИС-буферизированного физраствора (TBS).

- i) Неспецифичные антителосвязывающие сайты сначала блокируют в 5% альбумине бычьей сыворотки (BSA) в TBS в течение 20 минут. Затем раствор сливают без промывания.
- ii) Срезы инкубируют с первичным антителом (моноклональное антитело мыши 4H1 против гликопротеина E1 SAV [Todd с соавт., 2001]), разведенным 1/3000 в 2,5% БСА в TBS и затем инкубируют в течение ночи, после чего следуют две промывочные ванны, продолжительность которых составляет не менее 5 минут.
- iii) Срезы инкубируют с вторичным антителом (биотинилированные кроличьи антитела к IgG мыши), в разведении 1/300 в течение 30 минут, с последующими промывочными ваннами, как в указанном выше в этапе ii.
- iv) Срезы инкубируют стрептавидином с щелочной фосфатазой 1/500 в течение 30 минут с последующими промывочными ваннами, как в указанном выше в этапе ii.
- v) Для обнаружения связанных антител, срезы инкубируют быстрым красным² (1 мг мл⁻¹) и нафтол AS-MX фосфатом (0.2 мг мл⁻¹) с 1 мМ Левамисоля в 0.1 М TBS (pH 8.2) и оставляют для развития на 20 минут, с одним последующим промыванием в водопроводной воде перед контрастным окрашиванием с гематоксилином Майера и монтировкой в водной монтирующей среде.

SAV-положительные и SAV-отрицательные срезы ткани включены в качестве контролей в каждую постановку реакции (Taksdal с соавт., 2007).

² Ссылка на специфические коммерческие продукты, в качестве примеров, не подразумевает их одобрение МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, упоминаемым в настоящем *Водном Кодексе*.

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология.

Неприменимы для диагностического использования.

4.2.8. Дифференциальные диагнозы

4.2.8.1. Дифференциальные диагнозы, релевантные для микроскопической патологии (Раздел Микроскопическая патология)

Ткани, которые подверглись изменениям из-за инфекции SAV, также изменились из-за воспаления сердечной или скелетной мышц (HSMI), синдрома кардиомиопатии (CMS) и инфекционного панкреатического некроза (IPN). Однако если все основные органы обследованы на гистопатологию, паттерн зараженных органов обычно будет выглядеть иным образом, как проиллюстрировано в Таблице 4.1.

Таблица 4.1. Изменение в тканях, связанные с инфекциями SAV, HSMI, CMS and IPN

	Инфекция SAV	HSMI	CMS	IPN
Сердце*	+	+	+	–
Поджелудочная железа	+	–	–	+
Скелетная мышца	+	+	–	–

*Сердечные изменения при CMS поражают главным образом внутренний губчатый слой миокарда желудочка и предсердия, тогда как при инфекции SAV и HSMI, компактный слой миокарда желудочка поражен более существенно. Несмотря на то что эти три болезни вызывают эпикардит, при HSMI эпикард наиболее сильно воспален.

В очень короткую, раннюю острую стадию инфекции, когда только развился некроз экзорцинной поджелудочной, инфекцию SAV можно ошибочно принять за IPN, вызванный вирусом IPN (IPNV). В таких случаях, вирусологическое обследование уточнит агент-возбудитель заболевания.

Вирусологические и серологические обследования, наряду с гистологическим обследованием 5-10 клинически зараженных рыб, обычно могут прояснить ситуацию. HSMI и CMS были выявлены только у атлантического лосося.

4.3. Методы обнаружения и идентификации агента

4.3.1. Прямые методы обнаружения

4.3.1.1. Выделение и идентификация агента

4.3.1.1.1. Культура клеток

Выделение полевых изолятов SAV в культуре клеток может представлять собой сложную задачу (Christie с соавт., 1998; Graham с соавт., 2007с; Petterson с соавт., 2013). CHSE-214 часто используются для первичного выделения SAV, но могут использоваться восприимчивые линии клеток, такие как BF-2, FHM, SHK-1, EPC,

СНН-1 или другие. Сообщалось об изменении восприимчивости линии клеток среди различных полевых изолятов SAV (Graham с соавт., 2008; Herath с соавт., 2009), и поэтому рекомендовано, чтобы несколько линий клеток тестировались на выделение первичной культуры клеток SAV в новой лаборатории или на новый штамм вируса.

Клетки CHSE-214 выращивают при 20°C в минимальной питательной среде Игла (EMEM) с аминокислотами, не относящимися к незаменимым и 0,01 М буфера HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин, N-2- этансульфоновая кислота), или среды для культивирования клеток Лейбовица L-15, с добавлением фетальной бычьей сыворотки (FBS) (5% или 10%) и L-глутамином (4 мМ)

Для выделения вируса, клетки выращивают в колбах для клеточных культур или на многолуночных планшетах для выращивания клеток. SAV-положительные контроли могут быть инокулированы параллельно с образцами ткани, в качестве теста на восприимчивость к SAV. Когда включены положительные контроли, необходимо принимать меры во избежание контаминации.

i) Инокуляция клеточных монослоев

Подготавливают 2% суспензию тканевого гомогената или 10% суспензию сыворотки, используя среду L-15 или EMEM без сыворотки или другую среду с документально подтвержденным соответствием. Удаляют среду для выращивания клеток из активно растущих монослоев (1-2-х дневные культуры или культуры с 70-80% конfluence), выращенных в колбах для тканевых культур или мультилуночных планшетах для культуры клеток (см. выше). Инокулируют монослой малым объемом 2% тканевого гомогената или 10% разведением сыворотки (для 25 см² колб: 1.5 мл.) Доводят уровень до нормы соответствующей используемой площади поверхности. Проводят инкубацию в течение 2-3 часов при 15°C, с последующим удалением инокулята и добавлением свежей среды L-15 или EMEM, обогащенной 2-5% фетальной бычьей сывороткой (для 25 см² колб: 5 мл).

Когда образцы рыб поступают из производственных участков, в которых IPNV считается эндемичным, супернатант тканевого гомогената должен подвергаться инкубации (минимум в течение 1 часа при 15°C) с пулом антисывороток к искомым серотипам IPNV перед инокуляцией.

ii) Мониторинговая инкубация

Инокулированные культуры клеток (содержащиеся при 15°C) проверяют через равные интервалы (как минимум каждые 7 дней) на возникновение цитопатического эффекта (ЦПЭ). Типичный ЦПЭ, вызванный SAV, проявляется бляшками пикнотических вакуолизирующих клеток. Однако, норвежские полевые изоляты SAV (SAV3 и морской SAV2) обычно не дают ЦПЭ в низких пассажах, и это также отмечается у других генотипов SAV (Graham с соавт., 2008; Petterson с соавт., 2013). Если по прошествии 14 дней

не наблюдается цитопатического эффекта, осуществляют пересев в свежие культуры клеток.

iii) Процедура субкультивации

Через 14 дней (или ранее при появлении очевидного ЦПЭ) после инокуляции, культуры подвергаются замораживанию-оттаиванию при температуре -80°C (процедура может повторяться 1-2 раза), чтобы высвободить вирус из зараженных клеток.

После центрифугирования при 3000 g в течение 5 минут, супернатанты инокулируют в свежие культуры клеток, как описано в процедуре для первичной инокуляции: удаляют питательную среду, инокулируют монослои маленьким объемом супернатанта (1/5 и более слабыми разведениями) в течение 2–3 часов перед добавлением свежей среды.

Инокулированные культуры клеток инкубируют минимум в течение 14 дней и проверяют через регулярные интервалы, как описано в процедуре для первичной инокуляции. По окончании периода инкубации или ранее при возникновении выраженного ЦПЭ, среду собирают для идентификации вируса, как описано ниже. Культуры клеток необходимо всегда обследовать на присутствие SAV путем иммунофлюоресценции (непрямая реакция флюоресцирующих антител [IFAT]), поскольку репликация вируса может возникнуть без развития очевидного ЦПЭ.

iv) Верификация роста SAV в культуре клеток на основе антител.

Все инкубации, описанные ниже, выполняют при комнатной температуре, если не указано иное.

- a) Подготавливают монослои клеток в соответствующих планшетах для тканевых культур (например, 96-луночные планшеты), или на покровных стеклах, в зависимости от типа доступного микроскопа (инверсионный микроскоп, оснащенный УФ светом необходим для монослоев, выросших на планшетах для тканевых культур). Должны быть включены необходимые монослои для отрицательных и положительных контролей.
- b) Инокулируют монослои суспензиями вируса для идентификации в десятикратных разведениях, два монослоя на каждое разведение. Добавляют положительный вирус контроль в разведения, который дает хорошую реакцию окрашивания. Инкубируют инокулированные культуры клеток при 15°C в течение 9–11 дней.
- c) Фиксируют в 80% ацетоне в течение 20 минут после удаления среды для культивирования клеток и промывают однократно 80% ацетоном. Удаляют фиксатор и высушивают на воздухе в течение одного часа. При необходимости, фиксированные культуры клеток могут храниться в сухом виде в течение 14 дней при 4°C до окрашивания.

- d) Инкубируют клеточные монослои анти-SAV MAb в соответствующем разведении в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ФБР) на один час и промывают три раза с помощью ФБР с 0.05% Твин 20.
- e) Инкубируют с флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ)-конъюгированным антимышиным иммуноглобулином в течение одного часа (или в случае первичного поликлонального антитела кролика, используют ФИТЦ-конъюгированное антитело к иммуноглобулину кролика), в соответствии с инструкцией поставщика. Чтобы повысить чувствительность теста, ФИТЦ-конъюгированный антимышиный Ig можно заменить антимышиным Ig с биотиновой меткой и ФИТЦ-меченным стрептавидином с промыванием, как на этапе d, в промежутках между этапами. Ядро может быть окрашено йодидом пропидия (100 мкг мл^{-1} в стерильной дистиллированной воде). Добавляют ФБР (без Твин 20) и рассматривают при УФ освещении. Во избежание обесцвечивания, окрашенные планшеты следует оставить в темном месте до исследования. Для долгих периодов хранения (более 2-3 недель) в качестве раствора, препятствующего выгоранию, может добавляться раствор 1,4-дiazобисцикло октана (ДАБЦО 2.5% в ФБР, pH 8.2) или схожий реагент.

4.3.1.1.2. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), ОТ-ПЦР в реальном времени и генотипирование посредством секвенирования

Праймеры, описанные выше для ОТ-ПЦР в реальном времени и ОТ-ПЦР с секвенированием, обнаружат все известные генотипы SAV.

ОТ-ПЦР может использоваться для обнаружения SAV из общей РНК (или общих нуклеиновых кислот), полученной из рекомендованных органов или тканей (см. Раздел 3.4). Для обнаружения SAV рекомендуется ОТ-ПЦР в реальном времени, поскольку она увеличивает специфичность и чувствительность теста.

Для генотипирования рекомендуется ОТ-ПЦР с последующим секвенированием фрагментов из гена E2.

Последовательности праймеров и зондов для ОТ-ПЦР в реальном времени из nsP1 гена, а также праймеры для генотипирования, перечислены в Таблице 4.2. При необходимости, E2-праймеры могут также использоваться для стандартного обнаружения SAV при помощи ОТ-ПЦР. Могут применяться различные наборы, созданные для выделения РНК, ОТ-ПЦР и оборудование для кПЦР. Программа ПЦР зависит от набора и оборудования для ПЦР в реальном времени, используемого в лаборатории. Условия для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени в Референтной лаборатории МЭБ следующие: 50°C в течение 10 минут, 95°C в течение 3 минут, и 40 циклов (95°C в течение 10 секунд, 60°C в течение 20 секунд). Для проведения стандартных ОТ-ПЦР (секвенирование), используется следующая программа: 50°C в течение 30 минут, 95°C в течение 15 минут, и 45 циклов (94°C в течение 60 секунд, 55°C в течение 45 секунд, 72°C в течение 60 секунд).

Таблица 4.2. Последовательности праймеров и зондов для ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени

Последовательности праймеров и зондов	Геномный сегмент	Размер продукта	Ссылка
QnsP1F: 5'-CCG-GCC-CTG-AAC-CAG-TT-3' QnsP1R: 5'-GTA-GCC-AAG-TGG-GAG-AAA-GCT-3' QnsP1probe: 5'FAM-CTG-GCC-ACC-ACT-TCG-A-MGB3' (Taqman@probe)	QnsP1	107 нт	1
E2F: 5'-CCG-TTG-CGG-CCA-CAC-TGG-ATG-3' E2R: 5'-CCT-CAT-AGG-TGA-TCG-ACG-GCA-G-3'	E2	516 нт	2

1 = Hodneland и Endresen, 2006. 2 = Fringuelli с соавт., 2008.

4.3.2. Серологические методы

4.3.2.1. Реакция нейтрализации сыворотки на основе иммунопероксидазы (Graham с соавт., 2003)

Экспериментальные исследования показали, что нейтрализующие антитела могут быть впервые обнаружены на 10-16 день после заражения (Graham с соавт., 2003), и реакции нейтрализации сыворотки (SN) могут использоваться в качестве диагностического инструмента для обнаружения антител к SAV. Реакции SN основаны на присутствии или отсутствии обнаруживаемого роста вируса в культивируемых клетках после инкубации сывороткой, которая может содержать нейтрализующие антитела. В дополнение к этому, реакция способствует обнаружению вируса в сыворотке или плазме, при наличии.

Клетки CHSE-214 выращивают, как описано в Разделе 4.3.1.1.1. *Культура клеток.* Суспензию трипсинизированных клеток, разбавленных в соотношении 1/3 в среде для выращивания клеток (10% FBS) подготавливают для реакции SN.

- i) разведения 1/20 и 1/40 каждой тестовой сыворотки подготавливают в поддерживающей среде (2% FBS), и переносят в две sdвоенные лунки (15 мкл на лунку) на микротитрационный планшет для тканевых культур с плоским дном. Равный объем вируса (100 TCID₅₀ [средняя инфекционная доза для культуры ткани]) добавляют на планшет и инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре.
- ii) 70 мкл поддерживающей среды и 50 мкл суспензии клеток CHSE-214 добавляют в каждую лунку, и инкубируют планшеты в течение 3 дней при температуре 15°C.
- iii) Затем клеточный монослой фиксируют и окрашивают, как описано в Разделе 4.3.1.1.1, этап iv «Верификация роста SAV в культуре клеток на основе антител» или используя следующую процедуру: Монослой клеток CHSE-214 фиксируют на 30 минут при комнатной температуре в 10% забуференном нейтральном формалине. После двух промывок с 0,01 М PBS, МАb к SAV добавляют в монослой в соответствующем разведении. Связанные Mab

визуализируются с помощью меченной стрептавидин-биотиновой системы в соответствии с инструкциями производителя.

- iv) Титры SN (ND₅₀) затем вычисляют по методу Карбера (1931), где титры $\geq 1:20$ расцениваются, как положительные. Оба сывороточных контроля (без добавленного вируса) и вирус контроль (без добавленной сыворотки) должны всегда быть включены в анализ, чтобы обеспечивать обоснованные результаты.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели их применения

В качестве примера, методы, доступные в настоящий момент для целевого надзора и диагностики инфекции SAV, перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице, указывают: a = метод является рекомендуемым методом исходя из соображений доступности, функциональности и диагностической чувствительности и специфичности; b = метод представляет собой стандартный метод с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы существенно ограничивают его применение; и d = метод, в настоящее время не рекомендованный для этой цели. Это несколько субъективно, поскольку соответствие метода охватывает вопросы надежности, чувствительности, специфичности и функциональности. Несмотря на это, не все тесты, перечисленные под категориями a или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, установившаяся практика и тот факт, что они широко использовались без неточных результатов, делает их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор			Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Мальки	Молодые особи	Взрослые особи		
Макропатологические признаки	d	d	d	c	d
Гистопатология	c	c	c	b	d
Иммуногистохимия	d	d	d	b	b
Выделение в культуре клеток	d	d	d	c	c
Реакция нейтрализации сыворотки	d	c	b	a	b
ОТ-ПЦР в реальном времени	b	b	b	b	b
ОТ-ПЦР с секвенированием	d	b	b	b	a

ОТ-ПЦР = Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора для признания свободы от инфекции SAV

Тест, рекомендованный к использованию при осуществлении надзора за восприимчивыми популяциями рыб для объявления свободы от SAV это ОТ-ПЦР, как описано в Разделе 4.3.1.1.2 настоящей главы.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Подозрительный случай инфекции SAV определяется следующим образом:

- i) клинические признаки соответствуют инфекции SAV (Раздел 4.1.1), или
- ii) макро- и микроскопическая патология указывает на болезнь (Разделы 4.2.1 и 4.2.3), или
- iii) обнаружены антитела к SAV (Раздел 4.3.2.1) или выявлен SAV (Раздел 4.3.1.1.), или
- iv) в случае появления эпизоотологической информации об инфекционном контакте с подозрительным или подтвержденным случаем(ями).

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Доказательство присутствия SAV, полученное из двух независимых лабораторных тестов, таких как микроскопическая патология (Раздел 4.2.3), культура клеток (Раздел 4.3.1.1.1), ОТ-ПЦР (Раздел 4.3.1.1.2) или серология (Раздел 4.3.2).

8. Список литературы

ALDRIN M., STORVIK B., FRIGESSI A., VILJUGREIN H. & JANSEN P.A. (2010). A stochastic model for the assessment of the transmission pathways of heart and skeleton muscle inflammation, pancreas disease and infectious salmon anaemia in marine fish farms in Norway. *Prev. Vet. Med.*, **93**, 51–61.

ANDERSEN L., BRATLAND A., HODNELAND K. & NYLUND A. (2007). Tissue tropism of salmonid alphaviruses (subtypes SAV1 and SAV3) in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Arch. Virol.*, **152**, 1871–1883.

ANDERSEN L., HODNELAND H. & NYLUND A. (2010). No influence of oxygen levels on pathogenesis and virus shedding in Salmonid alphavirus (SAV)-challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Virol. J.*, **7**, 198.

BANG JENSEN B., KRISTOFFERSEN A.B., MYR C. & BRUN E. (2012). Cohort study of effect of vaccination on pancreas disease in Norwegian salmon aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, **102**, 23–31.

BRATLAND A. & NYLUND A. (2009). Studies on the possibility of vertical transmission of Norwegian salmonid Alphavirus in production of Atlantic salmon in Norway. *J. Aquat. Anim. Health*, **21**, 73–78.

CHRISTIE K.E., FYRAND K., HOLTET L. & ROWLEY H.M. (1998). Isolation of pancreas disease virus from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. *J. Fish Dis.*, **21**, 391–394.

CHRISTIE K.E., GRAHAM D.A., MCLOUGHLIN M. F., VILLOING S., TODD D. & KNAPPSKOG D. (2007).

Experimental infection of Atlantic salmon *Salmo salar* pre-smolts by i.p. injection of new Irish and Norwegian salmonid alphavirus (SAV) isolates: a comparative study. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 13–22.

FRINGUELLI E., ROWLEY H.M., WILSON J.C., HUNTER R., RODGER H. & GRAHAM D.A. (2008). Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences. *J. Fish Dis.*, **31**, 811–823.

GRAHAM D.A., BROWN A., SAVAGE P. & FROST P. (2012). Detection of salmon pancreas disease in the faeces and mucus of Atlantic salmon *Salmo salar* by real-time RT-PCR and cell culture following experimental challenge. *J. Fish Dis.*, **35**, 949–951.

GRAHAM D.A., CHERRY K., WILSON C.J. & ROWLEY H.M. (2007a). Susceptibility of salmonid alphavirus to a range of chemical disinfectants. *J. Fish Dis.*, **30**, 269–277.

GRAHAM D.A., FROST P., MCLAUGHLIN K., ROWLEY H.M., GABESTAD I., GORDON A. & MCLOUGHLIN M.F. (2011). A comparative study of marine salmonid alphavirus subtypes 1–6 using an experimental cohabitation challenge model. *J. Fish Dis.*, **34**, 273–286.

GRAHAM D.A., FRINGUELLI E., WILSON C., ROWLEY H.M., BROWN, A., RODGER H., MCLOUGHLIN M.F., MCMANUS C., CASEY E., MCCARTHY L.J. & RUANE N.M. (2010). Prospective longitudinal studies of salmonid alphavirus infections on two Atlantic salmon farms in Ireland; evidence for viral persistence. *J. Fish Dis.*, **33**, 123–135.

GRAHAM D.A., JEWURST V.A., ROWLEY H.M., MCLOUGHLIN M.F. & TODD D. (2003). A rapid immunoperoxidase-based neutralization assay for salmonid alphavirus used for a serological survey in Northern Ireland. *J. Fish Dis.*, **26**, 407–413.

GRAHAM D.A., ROWLEY H.M., FRINGUELLI E., BOVO G., MANFRIN A., MCLOUGHLIN M.F., ZARZA C., KHALILI M. & TODD D. (2007b). First laboratory confirmation of salmonid alphavirus infection in Italy and Spain. *J. Fish Dis.*, **30**, 569–572.

GRAHAM D.A., ROWLEY H.M. & FROST P. (2014). Cross-neutralization studies with salmonid alphavirus subtype 1–6 strains: results with sera from experimental studies and natural infections. *J. Fish Dis.*, **37**, 683–691.

GRAHAM D.A., STAPLES V., WILSON C.J., JEWURST H., CHERRY K., GORDON A. & ROWLEY H.M. (2007c).

Biophysical properties of salmonid alphaviruses: influences of temperature and pH on virus survival. *J. Fish Dis.*, **30**, 533–543.

- GRAHAM D.A., WILSON C., JEWHRST H. & ROWLEY H. (2008). Cultural characteristics of salmonid alphaviruses – influences of cell line and temperature. *J. Fish Dis.*, **31**, 859–868.
- HERATH T., COSTA J., THOMPSON K., ADAMS A. & RICHARDS R. (2009). Alternative cell line for the isolation of salmonid alphavirus-1. *Icelandic Agricultural Sci.*, **22**, 19–27.
- HODNELAND K. & ENDRESEN C. (2006). Sensitive and specific detection of salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan). *J. Virol. Methods*, **131**, 184–192.
- JANSEN M.D., BANG JENSEN B. & BRUN E. (2014). Clinical manifestations of pancreas disease outbreaks in Norwegian marine salmon farming – variations due to salmonid alphavirus (SAV) subtype. *J. Fish Dis.*, **doi**, 10.1111/jfd.12238.
- JANSEN M.D., TAKSDAL T., WASMUTH M.A., GJERSET B., BRUN E., OLSEN A.B., BRECK O. & SANDBERG M. (2010a). Salmonid alphavirus (SAV) and pancreas disease (PD) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in freshwater and seawater sites in Norway from 2006 to 2008. *J. Fish Dis.*, **33**, 391–402.
- JANSEN M.D., WASWUTH M.A., OLSEN A.B., GJERSET B., MODAHL I., BRECK O., HALDORSEN R.N., HJELMELAND R. & TAKSDAL T. (2010b). Pancreas disease (PD) in sea-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway; a prospective, longitudinal study of disease development and agreement between diagnostic test results. *J. Fish Dis.*, **33**, 723–736.
- JEWHRST V.A., TODD D., ROWLEY H.M., WALKER I.W., WESTON J.H. MCLOUGHLIN M.F & GRAHAM D.A. (2004). Detection and antigenic characterization of salmonid alphavirus isolates from sera obtained from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **27**, 143–149.
- KERBART BOSCHER S., MCLOUGHLIN M., LE VEN A., CABON J., BAUD M. & CASTRIC J. (2006). Experimental transmission of sleeping disease in one-year-old rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), induced by sleeping disease virus. *J. Fish Dis.*, **29**, 263–273.
- KONGTORP R.T., STENE A., ANDREASSEN P.A., ASPEHAUG V., GRAHAM D.A., LYGSTAD T.M., OLSEN A.B., OLSEN R.S., SANDBERG M., SANTI N., WALLACE C. & BRECK O. (2010). Lack of evidence for vertical transmission of SAV 3 using gametes of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., exposed by natural and experimental routes. *J. Fish Dis.*, **33**, 879–888.
- KRISTOFFERSEN A.B., VILJUGREIN H., KONGTORP R.T., BRUN E. & JANSEN P.A. (2009). Risk factors for pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon and rainbow trout in Norway during 2003–2007. *Prev. Vet. Med.*, **90**, 127–136.
- LEWISCH E., FRANK T., SOLIMAN H., SCHACHNER O., FRIEDL A. & EL-MATBOULI M. (2018). First confirmation of salmonid alphavirus infection in Arctic char *Salvelinus alpinus* and in Austria. *Dis. Aquat. Org.*, **130**, 71–76.
- MCCLEARY S.J., GILTRAP M., HENSHILWOOD K. & RUANE N.M. (2014). Detection of salmonid alphavirus RNA in Celtic and Irish Sea flatfish. *Dis. Aquat. Org.*, **109**, 1–7.

- MCCLOUGHLIN M.F. & GRAHAM D.A. (2007). Alphavirus infections in salmonids – a review. *J. Fish Dis.*, **30**, 511–531.
- MCVICAR A.H. (1990). Infection as a primary cause of pancreas disease in farmed Atlantic salmon. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **10**, 84–87.
- PETTERSON E., SANDBERG M. & SANTI N. (2009). Salmonid alphavirus associated with *Lepeoptheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, **30**, 511–531.
- PETTERSON E., STORMOEN, M., EVENSEN O., MIKALSEN A.B. & HAUGLAND O. (2013). Natural infection of Atlantic salmon (*Salmo salar*) with salmonid alphavirus 3 generates numerous viral deletion mutants. *J. Gen. Virol.*, **94**, 1945–1954.
- RODGER H. & MITCHELL S. (2007). Epidemiological observations of pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. *J. Fish Dis.*, **32**, 477–479.
- RUANE N., GRAHAM D. & RODGER H. (2008). Pancreas disease in farmed salmon – health management and investigations at Irish farm sites 2005–2008. Marine Environments and Health Series, No. 34, Marine Institute, Oranmore, Co. Galway, Ireland, Available at <http://oar.marine.ie/handle/10793/267>.
- SNOW M., BLACK I., MCINTOSH R., BARETTO E., WALLACE I.S. & BRUNO D.W. (2010). Detection of salmonid alphavirus RNA in wild marine fish: implications for the origin of salmon pancreas disease in aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, **91**, 177–188.
- STENE A., BANG JENSEN B., KNUTSEN Ø., OLSEN A. & VILJUGREIN H. (2014). Seasonal increase in sea temperature triggers pancreas disease in Norwegian salmon farms. *J. Fish Dis.*, **37**, 739–751.
- STENE A., HELLEBØ A., VILJUGREIN H., SOLEVÅG S.E., DEVOLD M. & ASPEHAUG V. (2016). Liquid fat, a potential abiotic vector for horizontal transmission of salmonid alphavirus? *J. Fish Dis.*, **39**, 531–537.
- STENE A., VILJUGREIN H., YNDESTAD H., TAVORNPANICH H. & SKJERVE E. (2014). Transmission dynamics of pancreas disease (PD) in a Norwegian fjord: aspects of water transport, contact networks and infection pressure among salmon farms. *J. Fish Dis.*, **37**, 123–134.
- STORMOEN M., KRISTOFFERSEN A.B. & JANSEN P.A. (2013). Mortality related to pancreas disease in Norwegian farmed salmonid fish, *Salmo salar* L. and *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **36**, 639–645.
- TAKSDAL T., OLSEN A.B., BJERKAAS I., HJORTAAS M.J., DANNEVIG B.H., GRAHAM D.A. & MCCLOUGHLIN M.F. (2007). Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *J. Fish Dis.*, **30**, 545–558.
- TODD D., JEWURST V.A., WELSH M.D., BORGHMANS B.J., WESTON J.H., ROWLEY H.M., MACKIE D.P. & MCCLOUGHLIN M.F. (2001). Production and characterisation of monoclonal antibodies to salmon pancreas disease virus. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 101–108.

VILJUGREIN H., STAALSTRØM A., MOLVÆR J., URKE H.A. & JANSEN P.A. (2009). Integration of hydrodynamics into a statistical mode on the spread of pancreas disease (PD) in salmon farming. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 35–44.

*
* *

NB: Существует Референтная лаборатория МЭБ по инфекции альфавирусом лососевых (см. Таблицу в конце или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ:

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

Для получения любой дополнительной информации относительно инфекции альфавирусом лососевых, пожалуйста, обратитесь в Референтную лабораторию МЭБ.

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2014 г.; ПОСЛЕДНИЕ ОБНОВЛЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2019 г.