

## ИНФЕКЦИЯ ГЕРПЕСВИРОЗОМ КАРПА КОИ

---

### 1. Предмет рассмотрения

Инфекция герпесвирозом карпа кои означает заражение патогенным возбудителем – герпесвирусом карпа кои (KHV) рода *Cyprinivirus* и семейства *Alloherpesviridae*.

### 2. Описание болезни

#### 2.1. Факторы о возбудителе

##### 2.1.1. Этиологический агент, штаммы возбудителя

Этиологический агент – герпесвирус карпа кои (KHV), принадлежащий к семейству *Alloherpesviridae* (Haramoto с соавт., 2007; Waltzek с соавт., 2009), но до проведения таксономической классификации он также был известен как вирус интерстициального нефрита и некроза жабр карпа (CNGV) (Pouze с соавт., 2011). Waltzek с соавт. в 2005 году представили доказательства в поддержку классификации вируса в качестве герпесвируса и назвали его герпесвирусом карповых 3 типа (CyHV-3) согласно номенклатуре других герпесвирусов карповых: CyHV-1 (вирус оспы карпа, папилломавирус рыб) и CyHV-2 (вирус гемопозитической ткани серебряного карася). Секвенирование части генома показало, что KHV близкородственен CyHV-1 и CyHV-2, и отдаленно родственен вирусу канального сома (герпесвирус икталуровых: IcHV-1), вирусу лягушек (RaHV-1) (Waltzek с соавт., 2005). Aoki с соавт. в 2007 году описали полноразмерную последовательность генома KHV и выявили 156 уникальных белок-кодирующих генов. Они предположили, что вывод о том, что 15 генов KHV гомологичны генам IcHV-1 подтверждает принадлежность KHV к семейству *Herpesviridae*. В зрелый вирион инкорпорированы 40 вирусных белков и 18 клеточных белков (Michel с соавт., 2010). Недавно был указан видовой тип CyHV-3: новый род *Cyprinivirus* внутри семейства *Alloherpesviridae*, которое также включает CyHV-1 и CyHV-2. Первые оценки размера генома KHV варьируют от не менее 150 тпн до 277 тпн, но сейчас размер подтвержден и составляет 295 тпн. Вирусные нуклеокапсиды имеют 100–110 нм в диаметре и окружены оболочкой (Pouze с соавт., 2011).

Сравнение геномов изолятов KHV, выделенных в различных регионах мира, по результатам анализа рестрикционных фрагментов (Haenen с соавт., 2004) или анализа нуклеотидных последовательностей (Sano с соавт., 2004) показало, что они практически идентичны. Аналогичным образом полипептиды изолятов KHV из различных географических регионов были одинаковыми, хотя у одного изолята из Израиля было два дополнительных полипептида (Gilad с соавт., 2003). Aoki с соавт. в 2007 годы сравнили полноразмерные последовательности геномов трех изолятов KHV, выделенных в Японии, Израиле и Соединенных Штатах Америки (США). Было выявлено, что геномы были очень похожи друг на друга на уровне последовательностей (>99%), причем штаммы из Израиля и США были более близкородственны друг другу, чем штамму из Японии. Эти

три изолята были интерпретированы, как появившиеся в виде двух линий (J и U/I) от родителя дикого типа. Однако дальнейшие исследования, проведенные в Японии, позволяют предположить, что эти линии были занесены в эти регионы независимо друг от друга и вызвали эпизоотии KHV (Pouze с соавт., 2011). Более поздние исследования, проведенные во Франции, выявили промежуточную линию между линиями J и U/I и позволили предположить, что с 2001 года с импортированными карпами кои в Европу было занесено три линии CyHV-3 (Bigarré с соавт., 2009). Позже была выявлена еще одна промежуточная линия, которая могла появиться в Индонезии (Sunarto с соавт., 2011).

### **2.1.2. Выживаемость вне хозяина**

Исследования, проведенные в Израиле, показали, что в воде KHV сохраняет активность в течение не менее 4 часов, но не более 21 часа при температуре воды 23–25°C (Perelberg с соавт., 2003). Исследования, проведенные в Японии, продемонстрировали значительное снижение инфекционного титра в течение 3 дней в природных водах или пробах донных отложений при температуре 15°C. Однако инфекционность сохранялась в течение >7 дней, когда KHV помещали в пробы аналогичных вод, которые стерилизовали автоклавированием или фильтрацией (Shimizu с соавт., 2006). Данное исследование также обеспечило подтверждение присутствия в воде бактериальных штаммов с противовирусным действием. Позже регистрировали выявление ДНК KHV в пробах речной воды при температуре 9–11°C за 4 месяца до вспышки вызванной KHV болезни в реке (Haramoto с соавт., 2007). Однако присутствие вируса могло быть обусловлено наличием животных-векторов, и выявление ДНК не всегда может быть указанием на присутствие инфекционного вируса.

### **2.1.3. Устойчивость возбудителя**

Вирус инактивируется при воздействии УФ-излучения при температурах выше 50°C в течение 1 минуты. Следующие дезинфицирующие средства также эффективны для инактивации: йодофор в разведении 200 мг на литр<sup>-1</sup> в течение 20 минут, бензалконий хлорид в разведении 60 мг на литр<sup>-1</sup> в течение 20 минут, 30% этиловый спирт в течение 20 минут и гипохлорит натрия в разведении 200 мг на литр<sup>-1</sup> в течение 30 секунд; все при температуре 15°C (Kasai с соавт., 2005).

### **2.1.4. Жизненный цикл**

В ранних публикациях исследователи предположили, что у карпов основными воротами инфекции вирусом являются жабры (Dishon с соавт., 2005; Gilad с соавт., 2004; Pikarsky с соавт., 2004). Однако более поздние экспериментальные исследования показали, что основными воротами инфекции KHV являются кожа, покрывающая плавники, и тело карпа (Costes с соавт., 2009). Таким образом, происходит системное распространение вируса от кожи и жабр на внутренние органы, и высокие уровни ДНК KHV выявляли в тканях почек, селезенки и кишечника (Dishon с соавт., 2005; Pikarsky с соавт., 2004). Описано, что накопление и морфогенез KHV в инфицированных клетках такие же как и в случае других герпесвирусов. Ультраструктурное исследование

экспериментально инфицированных карпов обеспечило подтверждение того, что незрелые капсиды и зрелые нуклеокапсиды собираются в ядре, и происходит дальнейшее созревание вириона в цитоплазме инфицированных клеток. Гиперсекреция слизи наблюдается на ранних стадиях заражения КНВ, и высокие уровни ДНК КНВ выявляют в слизи, отобранной от экспериментально зараженных карпов (Gilad с соавт., 2004). Это является дополнительным подтверждением того, что кожа принимает активное участие в патогенезе и является важным участком для выделения вируса. Выделение вируса с мочой и фекалиями также является значимым механизмом распространения вируса. Высокие уровни ДНК КНВ выявляли в тканях кишечника и почек, а также инфекционный вирус обнаруживали в фекалиях, отобранных от инфицированных карпов (Dishon с соавт., 2005; Gilad с соавт., 2004).

## **2.2. Факторы о хозяевах**

### **2.2.1. Восприимчивые виды хозяев**

Виды, отвечающие критериям для перечисления в качестве восприимчивых к инфекции КНВ согласно положениям Главы 1.5. *Кодекса по водным животным (Водный кодекс)*, включают: Все разновидности и подвиды сазана (*Cyprinus carpio*) и гибриды сазана (например, *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*).

### **2.2.2. Виды, в отношении которых недостаточно данных о восприимчивости**

Виды, в отношении которых недостаточно данных о восприимчивости согласно положениям Статьи 1.5. *Водного кодекса*, включают: серебряный карась (*Carassius auratus*), белый амур (*Stenopharyngodon idella*) и золотой карась (*Carassius auratus*).

Кроме того, у следующих видов получены положительные результаты патоген-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР), но не регистрировалась инфекция: остроносый осетр (*Acipenser oxyrinchus*), язь (*Leuciscus idus*), плотва обыкновенная (*Rutilus rutilus*), ерш обыкновенный (*Gymnocephalus cernuus*), речной окунь (*Perca fluviatilis*), гибрид стерляди и белуги (*Acipenser ruthenus* × *Huso huso*), радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*), русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii*), гаммарус (ракообразные) (*Gammarus pulex*), белый толстолобик (*Hypophthalmichthys milirix*), усатый голец (*Barbatula barbatula*), беззубки (*Anodonta cygnea*) и линь (*Tinca tinca*).

### **2.2.3. Стадии восприимчивости хозяина**

Все возрастные группы рыбы, от молоди и старше, вероятно, восприимчивы к герпесвирусу карпа кои (Bretzinger с соавт., 1999; Sano с соавт., 2004), но в экспериментальных условиях рыба массой 2,5–6 г была более восприимчивой, чем рыба массой 230 г (Perelberg с соавт., 2003). Личинка карпа резистентна к инфекции КНВ, но тот же карп был восприимчивым к инфекции после созревания (Ito et al., 2007).

### **2.2.4. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)**

Сазан или его разновидности, например карп кои или карп кои-призрак (карп кои × сазан) являются наиболее восприимчивыми, и им следует отдавать предпочтение при выборе на выявление вируса. За ними следуют все присутствующие на объектах гибриды сазана, такие как серебряный карась × сазан или золотой карась × сазан.

### **2.2.5. Органы-мишени и инфицированные ткани**

Жабры, почки и селезенка – органы, в которых в ходе клинической инфекции КНВ присутствует в наибольших количествах (Gilad с соавт., 2004).

### **2.2.6. Персистентная инфекция с пожизненными носителями**

Имеются доказательства того, что рыбы, выжившие после переболевания герпесвирозом карпа кои, являются персистентно инфицированными вирусом и могут сохранять его в течение длительного времени. Продемонстрировано, что у экспериментально инфицированного сазана вирус персистирует при благоприятной температуре и впоследствии сохраняется при температурах ниже благоприятных (St-Hilaire с соавт., 2005). Позже подтверждающие данные о персистентности у карпа были представлены в ходе исследования, направленного на определение распространения вируса в популяции дикого сазана. В Японии исследователи провели ПЦР и массовое серологическое обследование на озере Бива (Uchii с соавт., 2009), где через 2 года после большой вспышки 2004 года регистрировали эпизодические вспышки. Дальнейший анализ выжившей популяции показал, что 54% взрослых карпов были сероположительными и 31% ПЦР-положительными. Сохранение высоких уровней антител к вирусу позволяет предположить, что латентный вирус может периодически реактивироваться и стимулировать иммунный ответ.

### **2.2.7. Векторы**

Вода является основным абиотическим вектором. Однако живые векторы (например, другие виды рыб, беспозвоночные-паразиты и рыбацкие птицы и млекопитающие) и фомиты могут также участвовать в передаче.

### **2.2.8. Предполагаемые гидробионты-переносчики**

Имеются данные, которые указывают на то, что другие виды рыб и некоторые водные беспозвоночные являются потенциальными векторами КНВ. Вирусную ДНК выявляли в тканях здорового серебряного карася после совместного обитания с карпом кои, экспериментально инфицированного КНВ, а также у серебряного карася, подвергнутого воздействию во время природной эпизоотии КНВ у карпа кои (Pouze с соавт., 2011). В ходе проводимых в Германии исследований КНВ выявляли посредством гнездовой ПЦР у нескольких различных разновидностей серебряного карася (красный, львиноголовый и шубункин), а также у белого амура (*Stenopharyngodon idella*), язя (*Leuciscus idus*) и декоративных сомиков-анцистров (*Ancistrus* sp.) (Bergmann с соавт., 2009). Выявление у серебряного карася и белого амура подтверждали в гибридизации *in situ* с использованием праймеров, отличных от тех, которые

использовались в ПЦР. В ходе недавно проведенного в Польше исследования КНУ также выявляли в ПЦР у русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) и у американского атлантического осетра (*A. oxyrinchus*) с рыбоводческих ферм на севере Польши (Kempter с соавт., 2009). Все пробы от осетров отбирали на фермах, где содержится сазан, у которого ранее регистрировали вспышки болезни, вызванной КНУ. Присутствие белка КНУ и вирусного генома в тканях жабр и почек осетра подтверждали в непрямой реакции флуоресценции и посредством гибридизации *in situ*, соответственно.

Также появляется все больше данных, указывающих на то, что векторами КНУ могут быть водные беспозвоночные. Результаты проведенных в Японии исследований показывают, что ДНК КНУ выявляли в образцах планктона, в частности вида коловратки (Minamoto с соавт., 2010). Образцы планктона отбирали в 2008 году в Ибанаико, мелководной лагуне, соединенной с озером Бива, который является излюбленным местом нереста карпа. Статистический анализ показал значительную положительную корреляцию между уровнем КНУ в планктоне и численностью коловраток, и авторы предположили, что КНУ связывается с и/или концентрируется за счет присущего фильтраторам поведения видов коловраток. Согласно более ранней публикации о небольшом исследовании в Польше КНУ выявляли у беззубок (*Anodonta cygnea*) и пресноводных креветок (*Gammarus pulex*) (Kielpinski с соавт., 2010). Беспозвоночных собирали в прудах на юге Польши, где в последние 5 или 6 лет регистрировали вспышки болезни, вызванной КНУ, в популяциях сазанов. Необходима дополнительная работа для определения того, насколько долго инфекционный вирус персистирует в беспозвоночных в отсутствие видов животных-хозяев, а также остается ли вирус жизнеспособным.

Недавние исследования предоставили дополнительные доказательства того, что серебряный карась (*Carassius auratus*) восприимчив к инфекции КНУ. Транскрипт РНК вирусного гена тимидинкиназы выявляли в тканях жабр, мозга и кишечника серебряного карася, который подвергался воздействию КНУ во время совместного обитания с инфицированным карпом кои. Затем было продемонстрировано, что серебряный карась из этой же популяции передает КНУ интактному сазану, когда перепады температуры использовались в качестве фактора стресса (El-Matbouli и Soliman, 2011). Bergmann с соавт., 2010 также сообщили о репликации КНУ у серебряного карася после экспериментального заражения посредством иммерсии. ДНК и антиген КНУ выявляли в лейкоцитах, выделенных из проб крови серебряного карася, посредством ПЦР (на 45 день после заражения) и в реакции непрямой флуоресценции (на 60 день после заражения).

## 2.3. Паттерн болезни

### 2.3.1. Механизмы передачи

Способ передачи КНУ горизонтальный, но на настоящий момент нельзя исключать «яйцо-ассоциированную» передачу (обычно называемую «вертикальной» передачей). Горизонтальная передача может быть прямой (от рыбы к рыбе) или векторной, при которой основным абиотическим вектором является вода. Резервуары герпесвируса карпа кои – клинически инфицированная рыба и скрытые носители вируса среди культивируемой,

одичавшей или дикой рыбы. Вирулентный вирус распространяется с фекалиями, мочой, слизью жабр и кожи. В экспериментальных условиях инфекционный вирус на более постоянной основе выделялся от инфицированного сазана при температуре 16°C, чем при 23°C или 28°C (Yuasa с соавт., 2008). Болезнь может быть скоротечной, особенно при оптимальных температурах (23–25°C), но менее скоротечной при температурах ниже 23°C. Болезнь может проявиться через 3 дня после введения интактной рыбы в водоем, где содержится больная рыба, но другие исследователи сообщают, что у интактной рыбы болезнь наблюдается через 8-21 день (Bretzinger с соавт., 1999; Hedrick с соавт., 2000).

### **2.3.2. Превалентность**

Существует мало опубликованных данных о превалентности вируса в популяциях дикого или культивируемого карпа. Есть данные экспериментальных исследований персистенции вируса у сазана, инфицированного при перmissive температуре и впоследствии содержащегося при температуре ниже перmissive (St-Hilaire с соавт., 2005; см. Раздел 2.2.6). В ходе данного исследования анализ образцов сыворотки крови показал, что процент карпа (не менее 10–25%), у которого выработались высокие титры антител и иммунологический ответ, выявлялся в течение нескольких месяцев (St-Hilaire с соавт., 2009). В ходе других исследований посредством ПЦР вирусную ДНК выявляли у карпа в отсутствие болезни при температуре 13°C, и существует вероятность, что инфицированная рыба, выживающая при низких температурах, может действовать в качестве резервуара вируса (Gilad с соавт., 2004). В диких популяциях, выживших после вспышки КНВ, есть признаки высокой превалентности сероположительных карпов. По результатам ПЦР и обследования на антитела к КНВ на озере Бива, проведенных в 2006 году, дополнительный анализ популяции выжившего карпа показал, что 54% взрослых карпов были сероположительными и 31% ПЦР-положительными (Uchii с соавт., 2009). В рамках исследования распространения КНВ в Англии и Уэльсе четыре объекта, где в 2006 году наблюдались клинические вспышки КНВ, и на которые с того времени не вводили рыбу, в 2007 году были повторно проинспектированы и протестированы на наличие антител к КНВ в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) (Taylor с соавт., 2010). На трех из объектов выявлены положительные результаты и 85–93% серопревалентность в образцах популяции выжившего карпа. На четвертом объекте результаты были отрицательными.

### **2.3.3. Географическое распределение**

После первых сообщений о болезни, вызванной КНВ в Израиле и Германии в 1998 году, и о выявлении ДНК КНВ в тканевых образцах, отобранных во время массовой гибели карпа в Соединенном Королевстве в 1996 году (Bretzinger с соавт., 1999; Regelberg с соавт., 2003) географический ареал болезни расширился. До появления информации о болезни и средств ее выявления болезнь распространилась на многие страны мира, в основном в результате торговли крапом кои. Сейчас известно, что она появилась или регистрируется у рыбы, ввезенной в не менее 28 разных стран. В Европе КНВ выявляют во многих странах по всему континенту (Bergmann с соавт., 2006; Naenen с соавт.,

2004; Novotny соавт., 2010). О последних вспышках герпесвируса карпа кои в МЭБ сообщали Румыния, Словения, Испания и Швеция. В Азии – Китай (Гонконг), Китайский Тайбэй, Индонезия, Япония, Корея (Республика), Малайзия, Сингапур (у рыбы, импортированной из Малайзии) и Таиланд (Наенен с соавт., 2004; Pouze с соавт., 2011; Pikulkaew с соавт., 2009; Sano соавт., 2004). Повсеместно в ЮАР, Канаде и США (Garver с соавт., 2010; Наенен с соавт., 2004; Hedrick с соавт., 2000) регистрируют возникновение герпесвируса. Вероятно, вирус персистирует во много большем количестве стран, но пока еще не идентифицирован или не зарегистрирован.

### **2.3.4. Смертность и заболеваемость**

Заболеваемость инфицированной популяции может достигать 100%, а смертность – 70-80%, но последняя может достигать 90 или 100% (Bergmann с соавт., 2010а; Наенен с соавт., 2004). Обычно у больного карпа наблюдают вторичные или сопутствующие бактериальные и/или паразитарные инфекции, которые могут влиять на процент смертности или проявление клинических признаков болезни (Наенен с соавт., 2004).

### **2.3.5. Факторы окружающей среды**

На клиническую картину болезни влияют температура воды, вирулентность вируса, возраст и состояние здоровья рыбы, плотность популяции, а также факторы стресса (например, транспортировка, нерест, плохое качество воды). Болезнь зависит от температуры и возникает в диапазоне температур от 16 до 25°C (Наенен с соавт., 2004; Hedrick с соавт., 2000; Perelberg с соавт., 2003; Sano с соавт., 2004). В экспериментальных условиях болезнь вызывала высокую смертность при температуре 28°C, но не при 29 или 30°C, ни при 13°C (Gilad с соавт., 2004; Pouze с соавт., 2011). Однако посредством ПЦР вирусную ДНК выявляли у рыбы при температуре 13°C, и, вероятно, инфицированная рыба, выживающая при низких температурах, может быть резервуаром вируса (Gilad с соавт., 2004).

## **2.4. Контроль и профилактика**

Методы контроля и профилактики герпесвируса карпа кои должны, в первую очередь, основываться на предотвращении контактов с вирусом наряду с надлежащим соблюдением требований гигиены и биозащиты. Это возможно на небольших фермах, на которые вода поставляется из родников или скважин, и на которых применяется надежная система предотвращения попадания на ферму рыбы через сточные воды.

### **2.4.1. Вакцинация**

В настоящий момент отсутствует широко применяемая безопасная и эффективная вакцина. Однако живой аттенуированный вирус используется для вакцинации карпа и защиты рыбы от контрольного заражения вирусом. Вакцинные препараты индуцируют выработку антител против вируса, и длительность защиты составляет не менее 8 месяцев (Pouze с соавт., 2011). Вакцина зарегистрирована для применения в чрезвычайных ситуациях в Израиле, и широко применяется на фермах по разведению карпов по всей

стране. Результаты проведенных в Японии исследований показали, что пероральное введение вакцины на основе липосомов, содержащей инактивированный КНУ, было эффективным для защиты карпа от инфекции КНУ (Pouze с соавт., 2011).

#### **2.4.2. Химиотерапия**

Неприменимо.

#### **2.4.3. Стимуляция иммунитета**

В настоящий момент отсутствует опубликованная информация о применении иммуностимуляторов для контроля герпесвируса у карпов. Однако известно, что они являются областью научного интереса.

#### **2.4.4. Разведение резистентных популяций**

Дифференциальная резистентность к герпесвирусу карпа кои продемонстрирована у разных пород карпа. У потомства кроссов двух пород домашнего карпа и одной породы дикого карпа воспроизводили экспериментальную или естественную инфекцию. Самый низкий процент выживаемости составил около 8%, но процент выживаемости у самой резистентной породы составил 61–64% (Shapira с соавт., 2005). В ходе более недавнего исследования 96 семей, полученных при скрещивании по двухаллельной системе четырех европейских/азиатских пород сазана, экспериментально заражали КНУ. Процент выживаемости пяти самых резистентных кроссов в итоговом исследовании с контрольным заражением вирусом составил от 42,9 до 53,4% (Dixon с соавт., 2009).

#### **2.4.5. Замена на резистентные виды**

Естественные вспышки герпесвируса карпа кои не регистрируют у разводимых традиционным способом травоядных видов карпа, включая белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*), белого амура (*Stenopharyngodon idella*) и пестрого толстолобика (*Aristichthys nobilis*). Травоядные виды карпа обычно разводят в условиях поликультуры с сазаном, но у этих видов не наблюдают признаков болезни или смертности, как в нормальных условиях поликультуры, так и в ходе экспериментального совместного содержания с инфицированной рыбой, или прямого контакта с вирусом (Pouze с соавт., 2011). Гибриды сазана также представляют собой потенциальный метод контроля для предотвращения серьезных убытков вследствие герпесвируса карпа кои. Исследования популяции гибрида самец серебряного карася × самка сазана показало, что они резистентны к герпесвирусу карпа кои (Hedrick с соавт., 2006). Эти гибриды показывают быстрый рост и морфологически очень похожи на родителей по материнской линии. Однако у выживших гибридов в ходе ПЦР выявляли ДНК КНУ, что позволяет предположить, что они являются потенциальными носителями вируса (Hedrick с соавт., 2006). Напротив, польские исследователи зарегистрировали смертность 35–42% гибридов серебряного карася × карпа кои и 91–100% гибридов обыкновенного карася × карпа кои, зараженных КНУ посредством погружения (Bergmann с соавт., 2010b; см. Раздел 2.2.1). Вероятно, существует высокий уровень генетических



вариаций среди гибридов из разных кроссов, и следовательно, вариации резистентности к КНУ. Это в большой степени будет зависеть от породы используемого сазана или карпа кои. Разные породы сазана показали разный уровень резистентности к герпесвирусу карпа кои (Dixon с соавт., 2009; Shapira с соавт., 2005).

#### **2.4.6. Блокирующие агенты**

Неприменимо.

#### **2.4.7. Дезинфекция яиц и личинок**

Дезинфекцию яиц можно проводить посредством обработки йодофором. Доказано, что КНУ инактивируется йодофором в концентрации 200 мг/ литр<sup>-1</sup> в течение 30 секунд при температуре 15°C (Kasai с соавт., 2005).

#### **2.4.8. Общие стратегии содержания**

Меры биозащиты должны включать в себя обеспечение поставок новой рыбы из благополучных по болезни источников, а также введение системы карантина, при котором новая рыба может содержаться с индикаторной рыбой при температурах, пермиссивных для герпесвируса карпа кои. Затем рыба должна содержаться в карантине от 4 недель до 2 месяцев, прежде чем она будет перемещена на основной объект и смешана с интактной рыбой. Меры гигиены на объекте должны быть аналогичными рекомендуемым для SVC и должны включать дезинфекцию яиц, регулярную дезинфекцию прудов, химическую дезинфекцию оборудования фермы, аккуратное обращение с рыбой во избежание стресса, а также безопасное уничтожение мертвой рыбы.

### **3. Пробоотбор**

#### **3.1. Выбор индивидуальных образцов**

Все возрастные группы карпа, по-видимому, восприимчивы к герпесвирусу карпа кои, хотя, в целом, рыба в возрасте до 1 года более восприимчива к клинической болезни и рекомендуется для пробоотбора. Пригодность выбранных образцов рыбы в ходе подозрения на вспышку герпесвируса карпа кои будет зависеть от используемого диагностического теста. Умиравшие или только что погибшие карпы, проявляющие типичные клинические признаки болезни, подходят для исследования в большинстве тестов, описанных в Разделе 4. Тушки рыбы с признаками разложения ткани могут быть пригодны только для исследования методами на основе ПЦР. Аналогичным образом, образцы, отобранные от клинически здоровой рыбы в популяции, где подозревается болезнь, можно исследовать с достоверными результатами только в более чувствительных анализах на основе ПЦР.

#### **3.2. Консервирование образцов для отправки**

Целую рыбу следует отправлять в лабораторию живой или умерщвлять ее и упаковывать по отдельности в герметичные стерильные контейнеры. Однако предпочтительно и рекомендуется отбирать образцы органов рыбы сразу же после

их отбора на производственном объекте. Целую рыбу или отобранные образцы органов следует отправлять в лабораторию в холодильных контейнерах или на льду. Следует избегать замораживания отобранной рыбы или отобранных органов. Тем не менее, при получении замороженной рыбы или органов последние пригодны для тестирования только с использованием методов на основе ПЦР. Небольшие образцы тканей можно также предоставлять законсервированными в спирте (например, 80–100% этанол) для исследования методами на основе ПЦР.

### **3.3. Объединение образцов в пулы**

При исследовании клинически зараженной рыбы методами на основе ПЦР, и особенно при попытках выделения вируса следует избегать объединения образцов в пулы или ограничиваться пулом максимум из двух рыб. При исследовании в целях надзора методами на основе ПЦР объединение в пулы должно ограничиваться максимум пятью особями в одном пуле.

### **3.4. Лучшие органы или ткани**

При исследовании клинически зараженной рыбы методами на основе ПЦР, и особенно при попытках выделения вируса, рекомендуется отбирать образцы тканей жабр, почек и селезенки. Вирус присутствует в наибольшем количестве в этих тканях в ходе клинической инфекции, и высокие уровни вируса также выявляют в тканях мозга и кишечника (Dishon с соавт., 2005; Gilad с соавт., 2004). При исследовании методами на основе ПЦР не проявляющей симптомов рыбы, клинически здоровой рыбы рекомендуется также включить кишечник и мозг.

### **3.5. Образцы/ ткани, которые непригодны**

Тушки рыбы с очень выраженными признаками разложения тканей могут быть непригодны для исследования с использованием всех методов.

## **4. Методы диагностики**

Диагноз герпесвируса карпа кои у больной рыбы может быть поставлен с использованием ряда методов. Выделение КНВ в культуре клеток в настоящее время не считается настолько чувствительной системой, как описанные методы на основе ПЦР для выявления ДНК КНВ. Вирус выделяют только на ограниченном количестве линий клеток, и с этими клетками сложно работать. Поэтому, выделение вируса в культуре клеток не является надежным методом диагностики герпесвируса карпа кои (Naenen с соавт., 2004). Методы иммунодиагностики, аналогичные тем, которые используются для диагностики весенней виремии карпа (SVC) (например, методы иммунофлуоресценции [ИФ] или ИФА), могут быть пригодны для быстрой идентификации и диагностики герпесвируса, но их мало описывают, сравнивают и валидируют. Пока не будут доступны валидированные тесты, диагностика герпесвируса карпа кои должна основываться не на одном тесте, а на комбинации двух или трех тестов (Naenen с соавт., 2004).

### **4.1. Методы диагностики в полевых условиях**

#### **4.1.1. Клинические признаки**

Во время вспышки герпесвируса карпа кои в популяции наблюдается заметный прирост смертности. Все возрастные группы карпа, по-видимому, восприимчивы к герпесвирусу карпа кои, хотя, при экспериментальном заражении рыба в возрасте до 1 года более восприимчива к болезни. При более пристальном исследовании отдельных рыб типичные клинические признаки включают в себя обесцвечивание или покраснение кожи, которая может также приобретать грубую (наждачную) текстуру, очаговую или полную потерю эпидермиса, чрезмерную или недостаточную выработку слизи на коже и жабрах, а также обесцвечивание жабр.

Прочие клинические признаки включают энцефалит (запавшие глаза), геморрагии на коже и в основании плавников, а также эрозии плавников.

#### **4.1.2. Поведенческие изменения**

Рыбы становятся сонными, отбиваются от стаи, собираются у водовпуска и хватают воздух у поверхности воды. Некоторые рыбы могут демонстрировать нарушения равновесия и дезориентацию, но также они могут проявлять признаки гиперактивности.

### **4.2. Клинические методы**

#### **4.2.1. Макроскопические патологические признаки**

Патогномические макропатологические поражения отсутствуют. При постановке окончательного диагноза необходимо дождаться непосредственного выявления вирусной ДНК или выделения и идентификации вируса. Однако наиболее убедительная макропатология наблюдается в жабрах и может варьировать от бледных некротических участков до обширного обесцвечивания, тяжелого некроза и воспаления. Еще один часто наблюдаемый макропатологический признак – бледные, неровные участки на коже, которые ассоциированы с повышенной секрецией слизи, а также с недостаточной выработкой слизи, если участки кожи имеют текстуру, похожую на наждачную бумагу. Также часто регистрируют такие клинические признаки как анорексия, энцефалит (запавшие глаза), а также поверхностные кровоизлияния в основании плавников. Прочие внутренние поражения варьируются частотой проявления и зачастую отсутствуют в случае внезапной гибели. Другие регистрируемые макропатологические признаки включают адгезии в брюшной полости при наличии или отсутствии нарушения цвета внутренних органов (более светлые или более темные). Почки или печень могут быть увеличены, а также на них могут наблюдаться точечные кровоизлияния. Присутствующие макропатологические поражения могут быть также осложнены, т.к. больная рыба, и особенно сазан, также инфицирована эктопаразитами, такими как *Argulus* sp., *Chilodonella* sp., *Cryptobia* sp., *Dactylogyrus* sp., *Gyrodactylus* sp., *Ichthyobodo* sp., *Ichthyophthirius* sp., *Trichodina* sp. и жаберными сосальщиками, а также различными видами бактерий, особенно *Flavobacterium columnare* при теплых температурах воды.

#### **4.2.2. Клиническая химия**

Опубликованная информация отсутствует.

### **4.2.3. Микроскопические патологические признаки**

Дополнительное исследование жабр посредством микроскопии малой мощности могут выявлять эрозии первичных ламелл, слияние вторичных ламелл, а также воспаление вершечек первичных и вторичных ламелл. Гистопатология болезни может быть неспецифичной или разнообразной, но воспаление и некроз жаберных тканей представляют собой постоянный признак. В жабрах также наблюдается гиперплазия и гипертрофия жаберного эпителия, а также слияния вторичных ламелл и адгезия жаберных лепестков. Наблюдается некроз жабр, начиная от небольших участков некротических клеток эпителия вторичных ламелл и до полной потери ламелл. В клетках жаберного эпителия и в лейкоцитах обычно наблюдается значительное увеличение ядра, краевое стояние хроматина, создающее вид «печатки», а также бледные эозонофильные внутриядерные включения. Воспаление, некроз и ядерные включения наблюдают (по отдельности или вместе) в эпителии других органов, особенно почек, но также и селезенки, поджелудочной железы, печени, мозга, кишечника, и в эпителии полости рта.

### **4.2.4. Влажные препараты**

Неприменимо.

### **4.2.5. Мазки**

КНУ идентифицируют посредством иммунофлуоресценции (ИФ) в мазках-отпечатках и в мазках печени, почек и мозга инфицированной рыбы. Самые высокие уровни ИФ-положительных сигналов наблюдали в почках, и посредством ИФ вирус можно выявить в отпечатке почки через 1 день после заражения (Pikarsky с соавт., 2004; Shapira с соавт., 2005).

### **4.2.6. Электронная микроскопия/ цитопатология**

Выявление вирусных частиц посредством трансмиссивной электронной микроскопии (ТЭМ) тканей инфицированного карпа не является надежным методом диагностики. Кусочки ткани жабр и почки, зафиксированные глутаральдегидом, следует отбирать у тяжело инфицированного карпа ( $>10^6$  вирусных частиц). Наилучшие результаты получают при отборе образцов от нескольких карпов в инфицированной популяции на разных стадиях инфицирования. Это позволяет гарантировать, что некоторые образцы ткани получены от тяжело инфицированных особей.

## **4.3. Выявление возбудителя и методы идентификации**

В данном разделе подробно описаны не все методы, так как широкомасштабное сравнение и валидация методов выявления и идентификации КНУ не проводились. По возможности представлено краткое описание опубликованных методов. Рекомендации относительно методов будут основаны на результатах дополнительного тестирования и валидации, а также на дополнительных данных получаемых из разработавших эти методы лабораторий с целью принятия решения об их «пригодности».

### **4.3.1. Методы прямой детекции**

КНУ идентифицируют посредством иммунофлуоресценции (ИФ) в мазках-отпечатках печени, почек и мозга инфицированной рыбы. Самые высокие уровни ИФ-положительных сигналов наблюдали в почках, и посредством ИФ вирус можно выявить в отпечатке почки через 1 день после заражения (Pikarsky с соавт., 2004; Sharira с соавт., 2005). Вирусный антиген также выявляют в инфицированных тканях посредством иммунопероксидазного окрашивания. Вирусный антиген выявляли на второй день после заражения в почке, а также наблюдали в жабрах и печени (Pikarsky с соавт., 2004). Однако выявление КНУ посредством иммунного окрашивания следует интерпретировать с аккуратностью, т.к. положительно-окрашенные клетки могут быть результатом перекрестной реакции с серологически связанным вирусом (например, СуНУ-1) или невирусным белком (Pikarsky с соавт., 2004). Метод прямой детекции КНУ в отпечатках почки посредством непрямого иммунофлуоресцентного анализа (IFAT) описан ниже.

Методы иммунофлуоресценции (ИФ) и гибридизации *in situ* (ISH), проводимые на отделенных лейкоцитах рыбы, используются в научно-исследовательских приложениях для выявления или идентификации КНУ. Несмотря на то, что данные методы подробно не сравнивали с другими методами, они не являются деструктивными методами (нелетальные), и некоторые лаборатории могут признать их полезными для постановки диагноза. Описание методов здесь не приводится, но подробные протоколы отделения лейкоцитов из крови, а также протоколы ИФ и ISH можно найти в опубликованных работах Bergmann с соавт., 2009 и Bergmann с соавт., 2010а.

Методы на основе ИФА для прямой детекции антигена КНУ в инфицированных тканях находятся в стадии разработки в ряде лабораторий по всему миру, но валидированные методы пока не опубликованы. В настоящее время есть один опубликованный метод ИФА, и он разработан в Израиле для выявления КНУ в фекалиях рыбы (Dishon с соавт., 2005). Разработанные методы ИФА будут иметь низкую чувствительность, что может быть пригодно для выявления высоких уровней КНУ в тканях клинически больной рыбы, но они не подходят для надзора за КНУ в популяциях здоровой рыбы.

Наиболее часто используемый метод выявления КНУ непосредственно в рыбе – КНУ-специфичные анализы на основе ПЦР.

#### **4.3.1.1. Методы микроскопического анализа**

##### *4.3.1.1.1. Влажные препараты*

Неприменимо.

##### *4.3.1.1.2. Мазки/отпечатки*

###### *4.3.1.1.2.1. Непрямой иммунофлуоресцентный анализ на отпечатках почек*

- i) Рыбу тщательно обескровить.
- ii) Приготовить отпечатки почек на чистых предметных стеклах или на дне

лунок пластиковых культуральных планшетов.

- iii) Оставить отпечатки высыхать на 20 минут.
- iv) Смыть однократно 0,01 М фосфатно-буферного раствора (ФБФС), рН 7,2, затем трижды быстро ополоснуть холодным ацетоном (хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ ) на одно предметное стекло, или смесью 30% ацетона/70% этанола, также при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , в случае пластиковых планшетов.
- v) Оставить для воздействия фиксаторов на 15 минут. Объем лунки  $0,25 \text{ мл/см}^2$  достаточно для отпечатков на культуральных планшетах.
- vi) Оставить зафиксированные отпечатки высыхать на воздухе в течение не менее 30 минут и сразу же обработать или заморозить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- vii) Регидратировать высушенные отпечатки посредством четырех этапов промывки 0,01 М раствора ФБР, рН 7,2, содержащего 0,05% Tween 20 (ФБРТ), и полностью удалить буфер после последней промывки.
- viii) Приготовить раствор очищенного анти-KHV антитела или сыворотки в 0,01 М ФБР, рН 7,2, содержащего 0,05% Tween 20 (ФБРТ), в соответствующем разведении (которое установлено заранее или предоставлено поставщиком реактивов).
- ix) Блокировать раствором 5% обезжиренного молока или 1% альбумина бычьей сыворотки в ФБРТ в течение 30 минут при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ .
- x) Четыре раза промыть ФБРТ.
- xi) Обрабатывать отпечатки раствором антитела (приготовлен на этапе viii) в течение 1 часа при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  во влажной камере, избегать появления испарения. Объем  $0,125 \text{ мл/см}^2$  лунки достаточно для культурального планшета.
- xii) Четыре раза промыть ФБРТ.
- xiii) Обрабатывать отпечатки в течение 1 часа при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  раствором флуоресцинизоцианат (FITC)-конъюгированного антитела, используемого первым слоем и приготовленного согласно инструкции поставщика. Чаще всего данные FITC-антитела – это кроличьи или козы антитела.
- xiv) Четыре раза промыть ФБРТ.
- xv) Добавить ФБР в объеме  $0,25 \text{ мл/см}^2$  лунка к обработанным отпечаткам на культуральных планшетах и сразу же исследовать, или перед микроскопией накрыть предметные стекла покровными стеклами с использованием солевого раствора и глицерина при рН 8,5.
- xvi) Исследовать при падающем УФ-излучении через микроскоп с окулярами с  $\times 10$  увеличением и линзами объектива с  $\times 20$ – $40$  увеличением и с числовой апертурой  $>0,65$  и  $>1,3$ , соответственно. Для получения ожидаемых результатов перед началом любого исследования необходимо обеспечить наличие положительных и отрицательных контролей.

#### 4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

Метод, детально описанный в Разделе 4.3.1.1.2 выше, также подходит для выявления антигена в залитых в парафин срезах ткани, зафиксированных нейтрально забуференным 10% формалином (NBF). Однако для обнаружения антигена, который может быть скрыт вследствие чрезмерной фиксации ткани, может возникнуть необходимость дополнительной обработки депарафинизированных срезов, регидратированных в ФБР. Стандартная обработка – инкубирование срезов с 0,1% трипсином в ФБР при температуре 37°C в течение 30 минут. Затем, перед выполнением этапов viii-xvi, описанных в Разделе 4.3.1.1.2 выше, срезы промывают в холодном ФБР.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Для прямой детекции вирусного антигена посредством IFAT или иммуногистохимии ткани следует фиксировать в течение 24–48 часов в 10% NBF, а затем для длительного хранения фиксатор следует заместить 70% этанолом.

#### **4.3.1.2. Выявление, выделение и идентификация возбудителя**

##### *4.3.1.2.1. Культура клеток*

Диагностика герпесвируса карпа кои у клинически инфицированной рыбы можно проводить посредством выделения вируса в культуре клеток. Однако вирус можно выделить только в ограниченном количестве линий клеток, и манипуляции с этими клетками могут быть осложнены. Также, выделение в культуре клеток не настолько чувствительный метод, как описанные методы выявления ДНК КHV на основе ПЦР, и он не считается надежным методом диагностики герпесвируса карпа кои (Наепен с соавт., 2004).

*Рекомендованные к использованию линии клеток:* KF-1 или ССВ

##### *4.3.1.2.1.1. Экстракция вируса*

Используют процедуру, описанную в Главе 2.3.0., Раздел А.2.2.2.

##### *4.3.1.2.1.2. Инокуляция монослоев клеток*

- i) Перед инокуляцией клеток гомогенаты объединенных в пулы органов можно обработать антибиотиками, как описано в Главе 2.3.0., Разделы А.2.2.1 и А.2.2.2.
- ii) Если после инокуляции обработанных антибиотиками гомогенатов наблюдается цитотоксическое действие, не менее 1 мл 1/10 супернатанта гомогената органов отфильтровывают через одноразовый целлюлозоацетатный фильтр с диаметром отверстий 0,45 мкм (или через фильтр с мембраной с аналогичными характеристиками низкого связывания белков).
- iii) Для прямой инокуляции переносят соответствующий объем обработанного антибиотиками или отфильтрованного гомогената на 24-48-часовые монослои клеток в культуральных флаконах или на многолуночных планшетах. На клеточный слой размером менее 5 см<sup>2</sup> вносят 100 мкл отфильтрованного супернатанта. В качестве альтернативы делают дополнительное 10-кратное разведение отфильтрованного супернатанта в среде для культивирования клеток,

буферизируют при рН 7,6, добавляют 2% фетальную бычью сыворотку (ФБС), и оставляют для адсорбции на 0,5–1 час при температуре 18–22°C.

Затем, не удаляя инокулят, добавляют соответствующий объем среды для культивирования клеток (0,2–0,3 мл/см<sup>-2</sup> на каждый культуральный флакон) и инкубируют при температуре от 20°C до 25°C.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** При использовании многолуночных планшетов инкубирование в атмосфере CO<sub>2</sub> или добавление HEPES в среду для культивирования клеток (HEPES = N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновая кислота) обеспечат поддержание соответствующего уровня рН во время инкубации.

#### 4.3.1.2.1.3. *Мониторинг инкубации*

- i) Процесс инфекции положительных контролей и других инокулированных культур клеток отслеживают посредством ежедневной микроскопии при  $\times 40$ –100 увеличении в течение 14 дней. Рекомендуется использовать фазово-контрастный микроскоп.
- ii) Во время инкубирования рН клеточной культуральной среды поддерживают на уровне 7,3 and 7,6. Этого можно достичь посредством добавления в инокулированную клеточную культуральную среду стерильного бикарбонатного буфера в случае плотно закрытых культуральных флаконов или забуференной HEPES среды в случае многолуночных планшетов.
- iii) Если цитопатическое действие (ЦПД) появляется в тех культурах клеток, которые инокулированы разведениями супернатантов исследуемых гомогенатов, процедуры идентификации следует проводить незамедлительно (см. Раздел 4.3.1.2.2 ниже).
- iv) Если в инокулированных культурах не развивается ЦПД (несмотря на нормальное развитие ЦПД в вирусных контролях), инокулированные культуры следует дополнительно субкультивировать в течение 14 дней. Если в вирусных контролях не развивается ЦПД, процесс следует повторить с использованием свежих восприимчивых клеток и новых партий образцов.

#### 4.3.1.2.1.4. *Процедуры субкультивирования*

- i) Аликвоты клеточной культуральной среды переносят из всех монослоев, инокулированных супернатантами гомогенатов органов, на свежие культуры клеток.
- ii) Монослой клеток инокулируют как описано выше в Разделе 4.3.1.2.1; Инокулирование монослоев клеток, этап iii.
- iii) Инкубируют и проводят мониторинг как описано выше в Разделе 4.3.1.2.1. Если ЦПД не развивается, результат теста может быть признан отрицательным.

#### 4.3.1.2.1.5. *Подтверждающая идентификация*

Наиболее надежным методом для подтверждающей идентификации ЦПД



является ПЦР с последующим секвенированием продукта ПЦР. Методы ПЦР, рекомендуемые для идентификации КНУ, те же что и методы, рекомендованные для прямой детекции в тканях рыб (раздел 4.3.1.2.3. ниже). Для итогового подтверждения ПЦР-продукты надлежащего размера следует идентифицировать как КНУ по происхождению посредством секвенирования (см. раздел 4.3.1.2.3 ниже).

#### *4.3.1.2.1.6. Подтверждение результатов ПЦР*

- i) ДНК экстрагируют из супернатанта вирусной культуры с использованием подходящего набора или реагента для экстракции ДНК. Пример экстракции ДНК с использованием метода солевой экстракции (реагент DNAzol®) описан ниже в разделе 4.3.1.2.3.1.
- ii) Экстрагированную ДНК затем амплифицируют с использованием протоколов ПЦР, описанных ниже в разделе 4.3.1.2.3.1

Амплифицированные продукты ПЦР затем можно быстро удалить из геля и секвенировать как описано в разделе 4.3.1.2.3

#### *4.3.1.2.2. Методы выявления антигена на основе антител*

Методы на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) для прямой детекции антигена КНУ в инфицированных тканях находятся в процессе разработки в ряде лабораторий, и эти методы могут также быть пригодными для подтверждающей идентификации КНУ. В настоящее время имеется один опубликованный метод ИФА, и он был разработан в Израиле для выявления КНУ в фекалиях рыб (Dishon с соавт., 2005).

Методы идентификации вируса, основанные на производстве культур клеток, инфицированных КНУ (например, IFAT, иммунопероксидазный метод и реакция сывороточной нейтрализации), не рекомендованы. Это обусловлено тем, что вирус растет медленно и непредсказуем в культурах восприимчивых клеток.

#### *Молекулярные методы*

Из всех опубликованных методов одноэтапной ПЦР протоколы, описанные ниже, в настоящее время считаются наиболее чувствительными для выявления ДНК КНУ в образцах свежей ткани, отобранных от карпа с клиническими проявлениями болезни. Данные протоколы могут также позволить выявление субклинических уровней вируса. В первом используется ТК праймер, разработанный Bergovier с соавт., 2005 в Медицинском колледже Хадасса Иерусалимского университета в Израиле. Второй разработан Yuasa с соавт., 2005 в Национальном научно-исследовательском институте аквакультуры (NRIA), Ватарай, Миэ, Япония, и он усовершенствует опубликованный протокол. Если у ткани есть признаки разложения, может возникнуть необходимость использования наборов праймеров, нацеленных на более короткие области генома.

Альтернативные методы ПЦР, которым отдают предпочтение многие диагностические лаборатории взамен традиционной ПЦР, включают

количественную ПЦР, например ПЦР в реальном времени. Наиболее часто используемый для выявления КНУ метод количественной ПЦР – ПЦР в реальном времени с использованием зонда Taqman по методу Gilad (Gilad с соавт., 2004). ПЦР в реальном времени с зондами Taqman сейчас являются обычной диагностической процедурой, которая позволяет выявить и провести количественную оценку очень низкого количества копий целевых последовательностей нуклеиновых кислот. Посредством минимизации манипуляций с образцами за счет автоматизации пробоподготовки и процедур термоциклирования ПЦР с зондами Taqman позволяет в значительной степени избежать риска контаминации, присущего методам гнездовой ПЦР.

Протокол пробоподготовки, описанный ниже, использует метод солевой экстракции (реагент DNAzol®) для экстракции ДНК КНУ. Это простой в использовании, быстрый протокол, который также относительно недорогой по сравнению с некоторыми наборами. Лаборатории, которые незнакомы с DNAzol® или аналогичными солевыми реагентами, могут посчитать этот метод менее надежным. Однако в продаже имеется ряд наборов для экстракции ДНК на основе солевых реагентов или силиконовых матриц (от популярных производителей, включая Roche, Qiagen и Invitrogen), которые производят высококачественную ДНК, пригодную для использования при выполнении описанных протоколов ПЦР.

#### *4.3.1.2.2.1. Прямая детекция посредством ПЦР*

##### *4.3.1.2.2.1.1. Пробоподготовка и экстракция ДНК с использованием реагента DNAzol®*

Экстракцию вируса из тканей органов следует проводить с использованием процедуры, описанной в Главе 2.3.0, Раздел А.2.2.2.

- i) 100 мкл гомогената тканей (1/10 [в/о]) добавляют в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку с 1 мл реагента DNAzol®.
- ii) Аккуратно перемешивают, пять раз перевернув пробирку, и оставляют при комнатной температуре на 5 минут, затем центрифугируют в микроцентрифуге при 10 600 g (rcf = относительное центрифужное ускорение) в течение 10 минут.
- iii) 1 мл супернатанта переносят в новую 1,5 мл микроцентрифужную пробирку с 0,5 мл этанола.
- iv) Аккуратно перемешивают, пять раз перевернув пробирку, и оставляют при комнатной температуре на 5 минут, затем центрифугируют в микроцентрифуге при 18 000 g (rcf) в течение 30 минут.
- v) Удаляют супернатант и полученный в результате центрифугирования осадок промывают 250 мкл 70% раствора этанола в воде реагентного качества.
- vi) Образцы центрифугируют в течение 5 минут при 18 000 g (rcf).
- vii) Этанол удаляют при помощи пипетки, и осадок высушивают на воздухе, оставив пробирки открытыми на лабораторном столе на 5 минут.
- viii) Осадок ресуспендируют в 50 мкл воды реагентного качества,

предварительно нагретой до 60°C, и инкубируют при температуре 60°C в течение 5 минут. Образцы можно хранить при температуре –20°C, пока они не потребуются.

#### 4.3.1.2.2.1.2. ПЦР

##### 4.3.1.2.2.1.2.1. Общие примечания

ПЦР зачастую может давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты. Ложноположительные результаты (отрицательные образцы, демонстрирующие положительную реакцию) могут возникать либо в результате примесей в продукте от положительных образцов, либо в результате перекрестной контаминации продуктами ПЦР из предыдущих тестов. Следовательно, каждый анализ и каждая экстракция из тканей должны включать отрицательный контроль для исключения контаминации. Для минимизации риска контаминации на всех этапах пробоподготовки и проведения ПЦР следует использовать наконечники пипеток с противозерозольными фильтрами. Кроме того, подготовку всех ПЦР следует проводить в чистой зоне, которая отделена от зоны, где проводятся амплификация и гель-электрофорез. Запрещается передавать оборудование (например, лабораторные халаты и расходные материалы) между зонами и, по возможности, следует ограничить перемещения между зонами. Контаминация ПЦР-продуктов может происходить через оборудование, одежду и бумагу (например, рабочие журналы). Также необходимо регулярно производить очистку и дезинфекцию УФ-облучением и хлорной известью всех рабочих поверхностей и вытяжных шкафов, используемых при экстракции и постановке ПЦР. Реагенты и расходные материалы следует также систематически дезинфицировать УФ-облучением. Для обеспечения целостности образцов последние всегда следует хранить (например, в морозильнике или в холодильнике) в помещении, отделенном от микробиологической лаборатории или зоны.

##### 4.3.1.2.2.1.2.2. Протокол 1 (с праймерами Bercovier ТК)

і) Для каждого образца готовят мастер-микс, содержащий:

10 мкл реакционного буфера (×5 концентрация)

5 мкл MgCl<sub>2</sub> (25 мМ исходного раствора)

0,5 мкл dNTPs (25 мМ смеси)

0,5 мкл прямого праймера (10 пмоль мкл<sup>-1</sup> исходного раствора)

0,5 мкл обратного праймера (10 пмоль мкл<sup>-1</sup> исходного раствора)

0,25 мкл ДНК-полимеразы 500 мк (5 мк мкл<sup>-1</sup>)

30,75 мкл воды реagentного типа

Праймеры Bercovier ТК:

Прямой = 5'-GGG-TTA-CCT-GTA-CGA-

G-3'

Обратный = 5'-CAC-CCA-GTA-GAT-TAT-

GC-3'

Размер продукта = 409 п.о.

47,5 мкл каждого образца вносят в тонкостенную 0,5 мл-микроцентрифужную пробирку. Накрывают двумя каплями минерального масла.

ii) Добавляют 2,5 мкл экстрагированной ДНК. Оставшуюся ДНК хранят при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

iii) Пробирки помещают в термоциклер и запускают следующую программу:

1 цикл: 5 минут при температуре  $94^{\circ}\text{C}$ ;

40 циклов: 1 минута при температуре  $95^{\circ}\text{C}$

1 минута при температуре  $52^{\circ}\text{C}$  (см. примечание ниже)

1 минута при температуре  $72^{\circ}\text{C}$

Стадия финальной элонгации в течение 10 минут при температуре  $72^{\circ}\text{C}$ .

*Примечание в отношении условий циклов:* Температура отжига  $55^{\circ}\text{C}$  эффективно используется многими лабораториями для амплификации КНУ с праймерами Vercovier ТК.

iv) Визуализируют ПЦР амплификон размером 409 п.о. посредством электрофореза продукта в агарозном геле, окрашенном 2% этидия бромидом, и изучают с использованием УФ-трансиллюминатора. В гель необходимо включить соответствующую лестницу молекулярного веса для определения размера продукта.

v) Продукты надлежащего размера следует подтверждать как КНУ по происхождению посредством секвенирования.

#### 4.3.1.2.2.1.2.3. Протокол 2 (с праймерами Gray Sph/ модификации Yuasa)

i) Для каждого образца готовят мастер-микс, содержащий:

1 мкл реакционного буфера ( $\times 10$  концентрация)

1,6 мкл dNTPs (2,5 мМ смеси)

0,2 мкл прямого праймера (50 пмоль мкл<sup>-1</sup> исходного раствора)

0,2 мкл обратного праймера (50 пмоль мкл<sup>-1</sup> исходного раствора)

0,1 мкл ДНК-полимеразы

14,9 мкл воды реagentного типа

(ПРИМЕЧАНИЕ: итоговая концентрация MgCl<sub>2</sub> в мастер-миксе 2 мМ)

Праймеры Gray Sph:

Прямой = 5'-GAC-ACC-ACA-TCT-GCA-AGG-AG-3'

Обратный = 5'-GAC-ACA-TGT-TAC-AAT-GGT-CGC-3'

Размер продукта = 292 п.о.

19 мкл каждого образца вносят в 0,2 мл тонкостенную микроцентрифужную пробирку. Накрывают двумя каплями минерального масла.

- ii) Добавляют 1 мкл экстрагированной ДНК.
- iii) Пробирки помещают в термоциклер и запускают следующую

программу:

1 цикл: 30 секунд при температуре 94°C;

40 циклов: 30 секунд при температуре 94°C

30 секунд при температуре t 63°C

30 секунд при температуре t 72°C

Стадия финальной элонгации в течение 7 минут при температуре 72°C.

- iv) Добавляют 3 мкл ×6 буфера для внесения к каждому продукту ПЦР и проводят электрофорез 7 мкл на агарозном геле, окрашенном 2% этидия бромидом при 100 V в течение 20 минут. Проводят визуализацию в УФ-свете. В гель необходимо включить соответствующую лестницу молекулярного веса для определения размера продукта.
- v) Продукты надлежащего размера следует подтверждать как КНУ по происхождению посредством секвенирования.

#### 4.3.1.2.2.1.2.4. Анализ нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР

Продукты ПЦР извлекают из геля и очищают с использованием коммерческого набора для очистки ДНК из геля, например, Geneclean®, Q-BIOgene, СК). Одиночные, выраженные (яркие) продукты ПЦР после очистки секвенируют непосредственно в обоих направлениях посредством праймеров, используемых при финальной амплификации. В качестве альтернативы менее выраженные (бледные) продукты ПЦР клонируют с использованием ТА-клонировующего вектора (например, pGEM T, Promega), а обе цепи ДНК секвенируют с использованием универсальных наборов праймеров M13. Амплификацию, клонирование и секвенирование проводят в двух повторностях, чтобы исключить возможные погрешности вследствие введения Taq-полимеразы. Затем реакции секвенирования анализируют в генетическом анализаторе, и выравнивания и консенсусные последовательности получают при использовании соответствующего программного обеспечения (например, программное обеспечение Sequencher™ 4.0, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, США). Исследовательским лабораториям, в которых отсутствуют возможности для секвенирования, рекомендуется использовать услуги коммерческих компаний, предлагающих услуги секвенирования. При предоставлении образцов исследовательским лабораториям следует использовать инструкции, предоставляемые выбранной компанией, оказывающей услуги секвенирования.

#### 4.3.2. Серологические методы

После воздействия КНУ иммунный статус рыбы является важным фактором, причем как неспецифический (интерферон), так и специфичный иммунитет (сывороточные антитела, клеточный иммунитет) играют важную роль при герпесвирусных инфекциях. Клинические проявления болезни доминируют при температурах воды от 18°C и выше, когда иммунный ответ рыбы оптимален. Инфицированный карп продуцирует антитела к вирусу, и опубликованы описания тестов на основе ИФА, которые достоверно выявляют эти антитела в сыворотках в высоких разведениях (Adkison с соавт., 2005; Pouze с соавт., 2011; St-Hilaire с соавт., 2005). Антитела выявляют в сыворотке через 3 недели после экспериментального заражения и через 1 год после естественного заражения у выжившей рыбы (Adkison с соавт., 2005; Pouze с соавт., 2011; St-Hilaire с соавт., 2005; Taylor с соавт., 2010).

Показано, что сыворотка от карпа кои, содержащая антитела к КНУ, перекрестно реагирует на низком уровне с СуНУ-1, что является дополнительным доказательством того, что эти вирусы близкородственны. Признаки перекрестно-реагирующих антител продемонстрированы в аналогичных ИФА и вестерн-блоттинге сыворотки от карпов кои, инфицированных СуНУ-1 или КНУ (Adkison с соавт., 2005). Вирусологи-диагносты также должны знать, что рыба, недавно вакцинированная против КНУ, может демонстрировать положительные результаты ИФА на выявление антител.

Выявление антител может оказаться ценным методом установления предшествующего воздействия КНУ у внешне здоровой рыбы, и пока не будут разработаны методы на основе ПЦР, которые смогут достоверно выявлять

персистирующий вирус у подвергшейся воздействию вируса рыбы, анализы на выявление антител могут быть единственными имеющимися в распоряжении методами для проведения надзора. Однако вследствие отсутствия достаточных знаний о серологических ответах рыбы на вирусные инфекции, выявление у рыбы антител к вирусам пока не признано рутинным методом скрининга для оценки вирусного статуса в популяции рыбы. Валидация некоторых серологических методов для определенных вирусных инфекций рыб может быть проведена в ближайшем будущем, сделав применение серологии рыб более широко применяемой для санитарных скрининговых исследований.

## 5. Оценка тестов по цели применения

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

*Таблица 5.1. Методы целевого надзора и диагностики*

Метод	Целевой надзор				Предварительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	ПЛ	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические поражения	d	d	c	c	b	d
Световая микроскопия	d	d	c	c	b	d
Гистопатология	d	c	c	c	b	c
Выделение в культуре клеток	d	d	d	d	b	d
Трансмиссионная электронная микроскопия	d	d	d	d	b	c
Анализы на основе антител на выявление вируса	d	d	c	c	b	b
ДНК-зонды <i>in situ</i>	d	d	c	c	b	b
ПЦР	d	b	b	b	a	a
Сиквенс	НП	НП	НП	НП	НП	a
Анализы на выявление антител (серология)	d	d	c	b	b	d
Биопроба	НП	НП	НП	НП	НП	НП

ПЛ = постличиночная стадия; ПЦР = полимеразная цепная реакция; НП = неприменимо.

## **6. Тест(ы), рекомендованные для целевого надзора в целях признания благополучия по герпесвирусу карпа кои**

Целевой надзор должен опираться на регулярный мониторинг объектов, где содержатся восприимчивые виды. Мониторинг объектов следует проводить, когда температура воды достигает значений, способствующих развитию болезни ( $>17^{\circ}\text{C}$ ), и не раньше, чем через 3 недели после установления такой температуры. Образцы следует отбирать от всех выявленных на объекте больных рыб, демонстрирующих аномальное поведение, и эти образцы следует тестировать с использованием наиболее чувствительных тестов, имеющихся в распоряжении (например, ПЦР). В настоящее время отсутствуют рекомендованные валидированные методы для исследования здоровых популяций восприимчивой рыбы для признания благополучия по КНУ. Однако многие лаборатории используют более чувствительные молекулярные методы, такие как ПЦР в реальном времени или гнездовая ПЦР, для достоверного выявления низких уровней ДНК персистирующего вируса. Эти анализы могут продемонстрировать свою пригодность для использования при выполнении программ надзора. Отсутствуют опубликованные данные о широкомасштабной валидации этих более чувствительных анализов, но наиболее широко применяется ПФР в реальном времени с зондом Taqman по методу Gilad (Gilad с соавт., 2004). Общепризнано, что этот анализ является наиболее чувствительным из описанных методов ПЦР, используемых для выявления низких уровней КНУ. В качестве альтернативы выявление антител может быть полезным методом для установления предшествующего воздействия КНУ у внешне здоровой рыбы. Валидация иммуноферментных анализов для выявления антител к КНУ может быть проведена в ближайшем будущем, сделав применение этих анализов более широко приемлемым для санитарных скрининговых исследований.

## **7. Критерии подтверждающей диагностики**

### **7.1. Определение случая подозрения**

КНУ подозревается у восприимчивых видов рыб, если выполнен один из следующих критериев:

- i) Наличие типичных клинических признаков герпесвируса карпа кои в популяции восприимчивой рыбы.
- ii) Демонстрация типичной для герпесвируса карпа кои гистопатологической картины в срезах ткани.
- iii) Типичное ЦПД, наблюдаемое в восприимчивых культурах клеток без идентификации возбудителя.
- iv) Единственный положительный результат одного из диагностических тестов, перечисленных в категории а или b в Таблице 5.1.
- v) Перемещение живой рыбы с объекта, где подтверждено или подозревается присутствие КНУ в связи с наличием клинического проявления болезни, на объекты без подозрения на КНУ.
- vi) Установлены прочие эпизоотологические связи с объектами, где подтвержден КНУ.
- vii) Выявлены антитела к КНУ.



**ПРИМЕЧАНИЕ:** Если объекты указываются как подозрительные согласно критериям v и vi, попытки тестирования на КНУ следует предпринимать, только если температура воды достигает значений, способствующих развитию болезни (>17°C). Если температура воды ниже допустимых значений, тогда живой образец восприимчивой рыбы следует поместить в воду с повышенной температурой (в идеале 20–24°C) и исследовать через 14–21 день.

## **7.2. Определение подтвержденного случая**

Следующие критерии должны быть выполнены для подтверждения КНУ:

i) Смертность, клинические признаки и патологические изменения соответствуют болезни, вызванной КНУ (Раздел 4.2), и выявление КНУ одним или несколькими из следующих методов:

a) Выявление КНУ в ПЦР методами, описанными в Разделе 4.3.1.2.3;

ИЛИ

b) Выявление КНУ в тканевых препаратах с использованием специфичных антител против КНУ (например, IFAT на тканевых отпечатках, как описано в Разделе 4.3.1.1.2);

ИЛИ

c) Выделение и идентификация КНУ на культуре клеток от не менее одного образца рыбы с объекта, как описано в Разделе 4.3.1.2.1

ii) В отсутствие смертности или клинической болезни одним или несколькими из следующих методов:

a) Выявление КНУ в ПЦР методами, описанными в Разделе 4.3.1.2.3;

b) Положительные результаты двух отдельных или различных диагностических методов, перечисленных в категории a или b в Таблице 5.1.

## 8. Список литературы

ADKISON M.A., GILAD O. & HEDRICK R.P. (2005). An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the koi herpesvirus (KHV) in the serum of koi *Cyprinus carpio*. *Fish Pathol.*, **40**, 53–62.

AOKI T., HIRONO I., KUROKAWA K., FUKUDA H., NAHARY R., ELDAR A., DAVISON A.J., WALTZEK T.B., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2007). Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J. Virol.*, **81**, 5058–5065.

BERCOVIER H., FISHMAN Y., NAHARY R., SINAI S., ZLOTKIN A., EYNGOR M., GILAD O., ELDAR A. & HEDRICK R.P. (2005). Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol.*, **5**, 1–9.

BERGMANN S.M., KEMPTER J., SADOWSKI J. & FICHTNER D. (2006). First detection, confirmation and isolation of koi herpesvirus (KHV) in cultured common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Poland. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **26**, 97–104.

BERGMANN S.M., LUTZE P., SCHUTZE H., FISCHER U., DAUBER M., FICHTNER D. & KEMPTER J. (2010a). Goldfish (*Carassius auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV) but not for KHV disease. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **30**, 74–84.

BERGMANN S.M., SCHUTZE H., FISCHER U., FICHTNER D., RIECHARDT M., MEYER K., SCHRUDDE D. & KEMPTER J. (2009). Detection of koi herpes-virus (KHV) genome in apparently healthy fish. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **29**, 145–152.

BERGMANN S.M., SADOWSKI J., KIELPINSKI M., BARTLOMIEJCZYK M., FICHTNER D., RIEBE R., LENK M. & KEMPTER J. (2010b). Susceptibility of koi x crucian carp and koi x goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD). *J. Fish Dis.*, **33**, 267–272.

BIGARRÉ L., BAUD M., CABON J., ANTYCHOWICZ J., BERGMANN S.M., ENGELSMA M., POZET F., REICHERT M. & CASTRIC J. (2009). Differentiation between Cyprinid herpesvirus type-3 lineages using duplex PCR. *J. Virol. Methods*, **158**, 51–57.

BRETZINGER A., FISCHER-SCHERL T., OUMOUNA M., HOFFMANN R. & TRUYEN U. (1999). Mass mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **19**, 182–185.

COSTES B., STALIN RAJ V., MICHEL B., FOURNIER G., THIRION M., GILLET L., MAST J., LIEFFRIG F., BREMONT M. & VANDERPLASSCHEN A. (2009). The major portal of entry of koi herpes virus in *Cyprinus carpio* is the skin. *J. Virol.*, **83**, 2819–2830.

DISHON A., PERELBERG A., BISHARA-SHIEBAN J., ILOUZE M., DAVIDOVICH M.,

- WERKER S. & KOTLER M. (2005). Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7285-7291..
- DIXON P.F., JOINER C.L., WAY K., REESE R.A., JENEY G. & JENEY Z. (2009). Comparison of the resistance of selected families of common carp, *Cyprinus carpio* L., to koi herpesvirus: preliminary study. *J. Fish Dis.*, **32**, 1035– 1039.
- EL-MATBOULI M. & SOLIMAN H. (2011). Transmission of cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) from goldfish to naïve common carp by cohabitation. *Res. Vet. Sci.*, **90**, 536–539.
- GARVER K.A., AL-HUSSINEE L., HAWLEY L.M., SCHROEDER T., EDES S., LEPAGE V., CONTADOR E., RUSSELL S., LORD S., STEVENSON R.M.W., SOUTER B., WRIGHT E. & LUMSDEN J.S. (2010). Mass mortality associated with koi herpesvirus in wild common carp in Canada. *J. Wildl. Dis.*, **46**, 1242–1251.
- GILAD O., YUN S., ADKISON M.A., WAY K., WILLITS N.H., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2003). Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J. Gen. Virol.*, **84**, 2661–2667.
- GILAD O., YUN S., ZAGMUTT-VERGARA F.J., LEUTENEGGER C.M., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2004). Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 179–187.
- HAENEN O.L.M., WAY K., BERGMANN S.M. & ARIEL E. (2004). The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **24**, 293–307.
- HARAMOTO E., KITAJIMA M., KATAYAMA H. & OHGAKI S. (2007). Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan. *J. Fish Dis.*, **30**, 59–61.
- HEDRICK R.P., GILAD O., YUN S., SPANGENBERG J.V., MARTY G.D., NORDHAUSEN R.W., KEBUS M.J., BERCOVIER H. & EL DAR A. (2000). A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 44–57.
- HEDRICK R.P., WALTZEK T.B. & MCDOWELL T.S. (2006). Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish and goldfish x common carp hybrids to cyprinid herpesvirus-2 and herpesvirus-3. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 26–34.
- ILOUZE M., DAVIDOVICH M., DIAMANT A., KOTLER M. & DISHON A. (2011). The outbreak of carp disease caused by CyHV-3 as a model for new emerging viral diseases in aquaculture: a review. *Ecol. Res.*, **26**, 885–892.
- ITO T., SANO M., KURITA J., YUASA K. & IIDA T. (2007). Carp larvae are not susceptible to koi herpesvirus. *Fish Pathol.*, **42**, 107–109.
- KASAI H., MUTO Y. & YOSHIMIZU M. (2005). Virucidal effects of ultraviolet, heat treatment and disinfectants against koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.*, **40**, 137–138.
- KEMPTER J., SADOWSKI J., SCHUTZE H., FISCHER U., DAUBER M., FICHTNER D., PANICZ R. & BERGMANN

S.M. (2009). Koi herpesvirus: Do Acipenserid restitutions pose a threat to carp farms in the disease free zones? *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **39**, 119–126.

KIELPINSKI M., KEMPTER J., PANICZ R., SADOWSKI J., SCHUTZE H., OHLEMEYER S. & BERGMANN S.M.

(2010). Detection of KHV in freshwater mussels and crustaceans from ponds with KHV history in common carp (*Cyprinus carpio*). *Israeli J. Aquaculture (Bamidgeh)*, **62**, 28–37.

MINAMOTO T., HONJO M.N., YAMANAKA H., TANAKA N., ITAYAMA T. & KAWABATA Z. (2010). Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. *Res. Vet. Sci.*, **90**, 530–532.

MICHEL B., LEROY B., STALIN RAJ V., LIEFFRIG F., MAST J., WATTIEZ R., VANDERPLASSCHEN A.F. & COSTES

B. (2010). The genome of cyprinid herpesvirus-3 encodes 40 proteins incorporated in mature virions. *J. Gen. Virol.*, **91**, 452–462.

NOVOTNY L., POKOROVA D., RESCHOVA S., VICENOVA M., AXMANN R., VESELY T. & MIKLER J.R. (2010). First clinically apparent koi herpesvirus infection in the Czech Republic. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **30**, 85–91.

PERELBERG A., SMIRNOV M., HUTORAN M., DIAMANT A., BEJERANO Y. & KOTLER M. (2003). Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *Israeli J. Aquaculture*, **55**, 5–12.

PIKARSKY E., RONEN A., ABRAMOWITZ J., LEVAVI-SIVAN B., HUTORAN M., SHAPIRA Y., STEINITZ M.,

PERELBERG A., SOFFER D. & KOTLER M. (2004). Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J. Virol.*, **78**, 9544–9551.

PIKULKAEW S., MEEYAM T. & BANLUNARA W. (2009). The outbreak of Koi herpesvirus (KHV) in Koi (*Cyprinus carpio koi*) from Chiang Mai Province, Thailand. *Thai J. Vet. Med.*, **39**, 53–58.

SANO M., ITO T., KURITA J., YANAI T., WATANABE N., MIWA S. & IIDA T. (2004). First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol.*, **39**, 165–167.

SHAPIRA Y., MAGEN Y., ZAK T., KOTLER M., HULATA G. & EVAVI-SIVAN B. (2005). Differential resistance to koi herpesvirus (KHV)/carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains and crossbreds. *Aquaculture*, **245**, 1–11.

SHIMIZU T., YOSHIDA N., KASAI H. & YOSHIMIZU M. (2006). Survival of koi herpesvirus (KHV) in environmental water. *Fish Pathol.*, **41**, 153–157.

ST-HILAIRE S., BEEVERS N., JOINER C., HEDRICK R.P. & WAY K. (2009). Antibody response of two populations of common carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to koi herpesvirus. *J. Fish Dis.*, **32**, 311–320.

ST-HILAIRE S., BEEVERS N., WAY K., LE DEUFF R.M., MARTIN P. & JOINER C.

(2005). Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 15–23.

SUNARTO A., MCCOLL K.A., CRANE M.S., SUMIATI T., HYATT A.D., BARNES A.C. & WALKER P.J. (2011).

Isolation and characterization of koi herpesvirus (KHV) from Indonesia: identification of a new genetic lineage. *J. Fish Dis.*, **34**, 87–101.

TAYLOR N., WAY K., DIXON P.F., PEELER E.J., JEFFREY K. & DENHAM K.L. (2010). Koi herpesvirus (KHV): distribution and prospects for control in England and Wales. *J. Fish Dis.*, **33**, 221–230.

UCHII K., MATSUI K., IIDA T. & KAWABATA Z. (2009). Distribution of the introduced cyprinid herpesvirus-3 in a wild population of common carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.*, **32**, 857–864.

WALTZEK T.B., KELLEY G.O., STONE D.M., WAY K., HANSON L., FUKUDA H., HIRONO I., AOKI T., DAVISON A.J.

& HEDRICK R.P. (2005). Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae*. *J. Gen. Virol.*, **86**, 1659–1667.

WALTZEK T.B., KELLEY G.O., ALFARO M.E., KUROBE T., DAVISON A.J. & HEDRICK R.P. (2009). Phylogenetic relationships in the family *Alloherpesviridae*. *Dis. Aquat. Org.*, **84**, 179–194.

YUASA K., ITO T. & SANO M. (2008). Effect of water temperature on mortality and virus shedding in carp experimentally infected with koi herpesvirus. *Fish Pathol.*, **43**, 83–85.

YUASA K., SANO M., KURITA J., ITO T. & IIDA T. (2005). Improvement of a PCR method with the Sph 1–5 primer set for the detection of koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.*, **40**, 37–39.

\*

\* \*

**NB:** Имеются Референтные лаборатории МЭБ по герпесвирусу карпа кои (см. таблицу в конце данного Руководства по водным животным или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Просим обращаться в Референтные лаборатории МЭБ для получения любой дополнительной информации по герпесвирусу карпа кои)

**NB:** ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2006 г.; ПОСЛЕДНЕЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2019 г.