2.1. ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ

2.1.1. Методические указания по идентификации вирусов и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб

МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минсельхозпрод России)

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

107139, Москва, Орликов пер., 1/11
Для телеграмм: Москва, 84
Минсельхозпрод
Телекс: 417738 ЛЕН
Телефоны: 975-58-50; 975-54-23
10.10.97 № 13-4-2/1054

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель начальника
Департамента ветеринарии
В.В.Селиверстов
«10» октября 1997 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по идентификации вирусов и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб

1. Общие положения

1.1. Основным путем распространения вирусов являются перевозки икры и рыбы из мест, расположенных в эпизоотически неблагополучных зонах (очагах инфекций).

1.2. О выявлении вирусных инфекций у рыб следует немедленно информировать органы госветслужбы. Ниже приведен список наиболее опасных и экономически значимых вирусных болезней рыб. В него наряду с уже зарегистрированными в нашей стране включены и болезни, угроза проникновения которых на территорию Российской Федерации вполне реальна:

Весенняя виремия карпа (ВВК, SVC);
Оспа карпа;
Вирусная геморрагическая септицемия (ВГС, VHS) лососевых рыб;
Инфекционный некроз поджелудочной железы (ИНПЖ, IPN) лососевых рыб;
Инфекционный некроз гемопоэтической ткани (ИНГТ, IHN);
Папилломатоз атлантического лосося (семги);
Вирусный некроз эритроцитов (ВНЭ, VEN) лососевых рыб;

gost.e-ecolog.ru

Синдром эритроцитарных телец-включений (СЭТВ, EIBS) лососевых рыб;
Болезнь поджелудочной железы (БПЖ, PD) лососевых рыб;
Инфекционная анемия атлантического лосося (ИААЛ, ISA);
Герпесвирусная болезнь лососевых.

1.3. В настоящих Методических указаний изложены стандартизованные методы отбора, транспортировки и обработки вирусологического материала, выделения и идентификации вирусов и серологического обследования рыбоводных хозяйств, сформулированные с учетом отечественного и зарубежного опыта. Их применение позволяет получать наиболее объективные и надежные данные, касающиеся диагностики вирусных инфекций у рыб. Методы обеспечивают максимальное сохранение жизнеспособности отобранных образцов тканей, инфекционности вирусов и активности сывороточных антител рыб на всех этапах диагностического процесса.

1.4. Основу Методических указаний составляют методы, направленные на прямое обнаружение вируса в тканевом материале от рыб.

Вследствие недостаточности знаний о закономерностях образования в организме рыб антител в ответ на проникновение вирусов непрямые методы диагностики вирусных инфекций рыб (методы серологической диагностики, основанные на поиске антител в сыворотках крови) имеют ограниченную ценность, но в ряде случаев допустимы в качестве вспомогательных.

1.5. Цели отбора и подходы к отбору проб от рыб на вирусологические исследования различаются в зависимости от формы течения инфекции: открытая (заболевание) или скрытая (вирусоносительство). При открытом течении инфекции исследованию подвергают больных рыб и конечной целью исследования является постановка диагноза. О скрытом течении инфекции не всегда можно говорить с абсолютной уверенностью и обычно исходят из допущения, что вирусоносительство в обследуемой популяции рыб может иметь (имеет) место с охватом определенной (обычно незначительной) ее части. В этом случае, при отсутствии заболевания, исследуют клинически здоровых рыб, объем выборки варьирует в зависимости от предполагаемого уровня вирусоносительства. Целью исследования является оценка благополучия популяции (рыбоводного хозяйства) по вирусным инфекциям.

1.6. Патологический материал для исследований направляют в специализированные вирусологические лаборатории рыбохозяйственного или ветеринарного профиля. В отдельных случаях часть ее

(отбор и транспортировка материала) может быть проведена специалистами производственных лабораторий и рыбоводных хозяйств.

2. Отбор рыб на исследование

2.1. *Открытая форма заболевания*

2.1.1. При вспышке болезни в хозяйстве отбор проб для вирусологического исследования проводят в начальный период или в разгар заболевания, когда вероятность выделения вируса наиболее высока. При этом, если клинические, патологоанатомические и эпизоотологические данные позволяют подозревать конкретную вирусную болезнь, на исследование берут не менее 10 живых рыб с выраженными признаками заболевания.

2.1.2. В случае, если комплекс вышеуказанных данных не укладывается в рамки какой-либо из известных вирусных болезней, целесообразно увеличить выборку рыб насколько это возможно, вплоть до объемов, рекомендуемых для детектирования вирусоносительства (см п. 2.2.).

2.2. *Скрытое течение инфекции (вирусоносительство)*

2.2.1.Исследование рыбы на вирусоносительство проводят для снятия карантина, при сертификации (паспортизации) хозяйства, для оценки эпизоотической ситуации по вирусным инфекциям.

2.2.2. Материал для исследования отбирают от рыб тех возрастных категорий, которые составляют группы риска, основываясь на эпизоотологических данных для каждой предполагаемой инфекции. Работу выполняют в те сезоны года, когда вероятность обострения инфекции (а следовательно и обнаружения вируса) максимальна. Для большинства вирусных инфекций это весна, начало лета и в меньшей степени осень.

2.2.3. Периодичность и особенности отбора материала от рыб для исследования на вирусоносительство зависят от целей работы, но в любом случае в первый год обследования материал отбирают дважды.

2.2.4. Отбор материала из популяции рыб осуществляют по лотам (партиям). Под лотом (партией рыб) понимают группу рыб в популяции, имеющих одинаковое происхождение (получены от производителей одного маточного стада) и общий источник водоснабжения. Содержащиеся вместе рыбы одного вида, но разного происхождения составляют один лот. При обследовании рыбоводного хозяйства на предмет вирусоносительства пробы материала отбирают от рыб всех лотов.

2.2.5. Объем выборки рыб, отбираемых на исследование из каждого лота, зависит от размера лота и предполагаемого уровня вирусоносительства в нем. Для предполагаемого уровня вирусоносительства не ниже 2% или 5% рыб минимальный объем выборки, при котором достигается 95%-ная вероятность того, что одна или более рыб-вирусоносителей окажутся включенными в состав выборки, указан в таблице 1.

Таблица 1.

Необходимый объем выборки рыб при исследовании на вирусоносительство

Размер лота, экз.	Объем выборки, необходимой для исследования, экз	
	Уровень вирусоносительства 2%	Уровень вирусоносительства 5%
50	48	34
100	77	44
250	112	52
500	128	55
1000	138	57
1500	142	57
2000	143	58
4000	146	58
10000	147	58
100000 и более	150	60

2.2.6. Если в обследуемом лоте рыб встречаются ослабленные или больные особи, их отбирают на исследование в первую очередь, а недостающее количество добирают клинически здоровыми рыбами. Материал от таких рыб в дальнейшем обрабатывают и исследуют отдельно от материала, отобранного от клинически здоровых рыб.

2.2.7. В случае, если рыбы лота содержатся в разных прудах (бассейнах, садках и т.д.), общий объем выборки остается неизменным, но она формируется на репрезентативной основе из рыб, отловленных во всех прудах (бассейнах, садках) в соответствующих пропорциях. Если обеспечение данного условия сопряжено со значительными техническими трудностями (например в хозяйствах с большим количеством прудов), выборку комплектуют, отбирая рыбу из 1-2 прудов, в которых физиологическое состояние рыб наименее удовлетворительное.

3. Взятие и транспортировка материала

3.1. Отловленная для исследования рыба может быть доставлена в лабораторию живой или в охлажденном виде (на льду), либо патологический материал от рыб отбирают непосредственно на месте.

3.2. Живую рыбу перевозят в емкостях с достаточным количеством воды, но лучше в полиэтиленовых пакетах на одну треть заполненных водой и на две трети - кислородом. Ихтиомасса не должна превышать одной третьей части массы воды в пакете. В теплое время года пакет помещается в термоизолирующий контейнер (пенопластовая коробка) и обкладывается льдом или пакетами замороженного бытового хладоагента. Такой способ перевозки пригоден, если время транспортировки не превышает 12 час.

3.3. В охлажденном виде рыбу перевозят в термосе или пенопластовом контейнере со льдом (0°С). При этом больную и здоровую рыбу (см. п. 2.2.6.) помещают в отдельные полиэтиленовые пакеты и перекладывают их льдом (зимой снегом). В процессе транспортировки при необходимости добавляют свежий лед (снег). Таким же способом в стерильных, закрытых резиновыми пробками пенициллиновых флаконах можно транспортировать взятые от рыб на месте пробы органов и тканей (почка, селезенка, мозг, жабры, половые продукты). Время транспортировки охлажденного материала не должно превышать 24 час. В целях лучшего сохранения вирусов замораживание материала недопустимо.

3.4. Наиболее надежным способом транспортировки является транспортировка материала в питательных средах или солевых сбалансированных растворах. При этом пробы органов и тканей отбирают от рыб непосредственно в хозяйстве (см. п. 4 настоящих указаний) и помещают в стерильные флаконы с раствором Хенкса (раствором Эрла) или средой для культивирования клеток (среды Игла основная, Игла МЕМ, 199 и др.), содержащими 10% сыворотки крови эмбрионов коров и антибиотики пенициллин и стрептомицин в концентрации 300-1000 ЕД/мл (мкг/мл соответственно). Для поддержания pH в нейтральном диапазоне отношение объема образца к объему солевого раствора (среды) должно быть примерно 1:10-1:20. Плотно закупоренные флаконы перевозят и сохраняют до обработки в термосе со льдом или контейнере с хладоагентом (0-4°С), не допуская замораживания содержимого флаконов. Продолжительность транспортировки - не более 48 час.

4. Отбор проб и их обработка

4.1. В зависимости от цели работы (диагностика заболевания, ретроспективная диагностика или выявление вирусоносительства) на исследование отбирают пробы разных органов и тканей.

4.1.1. Во время эпизоотии от клинически больных рыб берут:

личинка - целиком, предварительно удалив желточный мешок;

сеголетки длиной до 6 см - все внутренности, включая почку (тушки мелких мальков берут целиком, удалив хвостовой стебель);

рыба длиной более 6 см - селезенку и почку (печень и пилорические придатки обычно не берут в виду риска разрушения вирусов под действием содержащихся в них ферментов).

4.1.2. При исследовании на вирусоносительство к вышеперечисленным материалам добавляют пробы жабр, головного мозга, овариальную и семенную жидкости.

4.1.2.1. Сбор материала от производителей для детектирования вирусоносителей проводят во время нерестовой кампании. При возможности в первую очередь отбирают тканевой материал от забитых рыб, подвергая их вскрытию. Остаток проб для укомплектования требуемого объема выборки (см. п. 2.2.5.) добирают от рыб прижизненно в виде овариальной жидкости. Семенную жидкость от самцов берут только при недостатке самок. Объем пробы половых продуктов от одной рыбы не более 1 мл.

4.1.2.2. Для отбора порции икры сцеживают в стерильную пробирку и после оседания икринок овариальную жидкость отсаживают в стерильный пенициллиновый флакон. Более аккуратно, не загрязнив пробу экскрементами или кровью, половые продукты можно отобрать с помощью автоматической пипетки с наконечником на 1-2 мл. Для этого стерильный наконечник осторожно вводят в урогенитальное отверстие предварительно наркотизированной рыбы под небольшим давлением и, манипулируя пипеткой, отбирают необходимое количество жидкости.

4.1.3. Отбор проб от рыб осуществляют с соблюдением правил асептики. В работе используют стерильные инструменты, которые регулярно фламбируют в пламени горелки.

4.1.4. Перед вскрытием рыбу обездвиживают, куском ваты или марли удаляют с поверхности тела избыток влаги и, поместив на бумажное полотенце, салфетку или лист фильтровальной бумаги, отрезают плавники и снимают чешую на левой стороне тела. Сре-

зают жаберную крышку и вырезают жабры, ножницами вскрывают череп и извлекают мозг. Осторожно, чтобы не повредить кишечник, тремя разрезами (от основания левого грудного плавника вверх к боковой линии, затем - вдоль средней линии тела к анальному отверстию и из достигнутой точки - вверх и вперед вдоль боковой линии) вскрывают полость тела и, удалив вырезанный лоскут брюшной стенки, отбирают пробы внутренних органов.

4.1.5. Отбираемый патологический материал объединяют в пулы. В один пул (объединенную пробу) объединяют материал не более чем от 5 рыб. Пробы жабр, головного мозга и паренхиматозных органов (почка и селезенка) лучше исследовать отдельно друг от друга, но объединение в один пул всего отобранного от 5 рыб материала также допустимо.

4.1.6. Кровь на исследование берут из хвостовой вены стерильным шприцем или пастеровской пипеткой. Для этого удаляют чешуйный покров на хвостовом стебле в месте пересечения боковой линии и линии, мысленно проведенной от заднего края спинного (у лососевых - жирового) плавника к заднему краю анального. Протирают данное место смоченным в спирте ватным тампоном и вводят иглу чуть ниже боковой линии. Достигнув позвоночника, подводят конец иглы под него и несколькими короткими движениями повреждают стенку хвостовой вены. При этом скос иглы направляют навстречу кровотоку, то есть в сторону хвостового плавника. В случае успеха кровь легко поступает в шприц. От одной особи отбирают не менее 0,5 мл крови.

4.1.7. При серологическом обследовании популяции рыб отбор крови производят через 1-2 месяца после имевшей место вспышки заболевания или завершения оптимального для развития предполагаемой инфекции периода (при отсутствии заболевания). Кровь отбирают и обрабатывают далее индивидуально не менее чем от 60 рыб.

4.1.8. Отобранную кровь оставляют для свертывания на 1-2 часа при комнатной температуре, обводят образовавшийся сгусток и помещают пробирки с кровью на несколько часов или на ночь в холодильник для ретракции сгустка. Отделившуюся сыворотку собирают в стерильные пробирки и транспортируют в лабораторию как и патологический материал в охлажденном виде. При невозможности немедленной отправки сыворотки замораживают.

4.2. Всю последующую обработку и исследование собранных материалов проводят в диагностической вирусологической лаборатории в стерильных условиях.

4.2.1. Для экстракции вируса собранные пробы (пулы) органов и тканей тщательно растирают пестиком в ступке с кварцевым пес-

ком и готовят суспензию 1:10 в свежей порции раствора Хенкса, Эрла или любой из вышеупомянутых питательных сред для культур клеток.

4.2.2. Для освобождения от бактерий (деконтаминации) в суспензию добавляют раствор пенициллина и стрептомицина до концентрации 300 ЕД/мл (мкг/мл соответственно) и центрифугируют в течение 10 мин при 2000g. Центрифугирование в таком режиме приводит к осаждению бактерий, грибов и их спор. Верхнюю часть супернатанта осторожно отсасывают и используют для инокуляции культур клеток.

4.2.3. Деконтаминации суспензии от грибов полиеновыми антибиотиками (например, амфотерицином В или нистатином в концентрациях соответственно 20 мкг/мл и 200 МЕ/мл) лучше избегать, т.к. они подавляют репродукцию оболочечных вирусов (рабдо-, герпес-, миксовирусов и др.) существенно снижая вероятность их обнаружения в исследуемом материале. В случае высокой контаминации материала грибами суспензию следует профильтровать через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Для уменьшения потерь вируса в результате сорбции на фильтре через него предварительно пропускают небольшое количество питательной среды с 10% сыворотки крови эмбрионов коров. Фильтратом патматериала инокулируют культуры клеток.

4.2.4. Овариальную жидкость используют для инокуляции клеток неразведенной или разведенной питательной средой в два раза после деконтаминации одним из двух вышеуказанных способов. В отдельных случаях (IHN, IPN) для повышения чувствительности метода перед инокуляцией клеточных культур ее выдерживают в течение нескольких дней при 4°С.

4.2.5. Собранные сыворотки крови рыб разводят в два раза средой Игла МЕМ или солевым сбалансированным раствором и освобождают от термолабильных ингибиторов прогреванием в течение 20 мин при 45°С (лососевые) или 50°С (карповые). Термоинактивированные сыворотки до исследования сохраняют в замороженном состоянии (-20°С и ниже).

5. Культивирование постоянных линий клеток рыб и инокуляция культур

5.1. Для выделения вирусов используют культуры постоянных клеточных линий рыб. В табл.2 указаны основные клеточные линии необходимые для исследования материалов от карповых и лососевых видов рыб.

Таблица 2.

Клеточные линии рыб

Название	Происхождение
EPC	Эпидермальные новообразования больного оспой карпа
FHM	Хвостовой стебель черного толстоголова Pimephales promelas
ICO	Яичник неполовозрелого карпа (отечественная)
CTF	Хвостовой плавник карпа (отечественная)
BF-2	Хвостовой стебель синежаберного солнечника Lepomis macrochirus
CHSE-214	Эмбрион чавычи
RTG-2	Гонады радужной форели

5.2. Большинство клеточных линий выращивают на питательной среде Игла МЕМ, но лучшие результаты дает среда Игла МЕМ с двойным набором аминокислот и витаминов (2МЕМ). Состав ростовой среды: 90% среды 2МЕМ, 10% сыворотки крови эмбрионов коров (2МЕМ-10). Клетки некоторых линий требуют добавления в среду от 2 до 10% триптозофосфатного бульона (2МЕМ-10-2 и 2МЕМ-10-10). Пенициллин и стрептомицин вносят до конечной концентрации соответственно 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл. Их можно заменить гентамицином (50 мкг/мл).

5.3. При субкультивировании клеток диспергирование монослоя осуществляют смесью растворов трипсина (0,25%) и версена (0,02%) в разных соотношениях.

5.4. Технические данные, касающиеся используемых в ихтиовирусологии линий клеток рыб, приведены в табл. 3.

Таблица 3.

Техническая информация о клеточных линиях рыб

Название	Морфология клеток*	Ростовая среда	Температура,°С		Диспергирующая смесь, Т:В	Коэффициент субкультивирования
			диапазон	оптимум		
EPC	Э	2МЕМ-10	10-33	25	5:7	1:5
FHM	Э	2МЕМ-10	10-37	30	5:7	1:4
ICO	Э	2МЕМ-10-2	10-30	25	5:7	1:4
CTF	Ф	199-10	10-30	25	5:1	1:4
BF-2	Ф	2МЕМ-10-10	15-33	25	1:1	1:5
CHSE-214	Э	2МЕМ-10	4-27	20	2:1	1:4
RTG-2	Ф	2МЕМ-10	4-26	20	2:1	1:4

*Э - эпителиоподобные, Ф - фибробластоподобные

5.5. При культивировании клеток в герметически закрытых флакопах pH среды поддерживается в необходимом диапазоне (7,2-7,8) за счет входящих в ее состав бикарбоната натрия и углекислоты. При использовании сосудов, сообщающихся с атмосферой (чашки Петри, пластиковые микропанели и т.д.), среду дополнительно забуферивают 0,02М Hepes- или 0,016М трис-буфером.

5.6. Для инокуляции клеточных культур готовят серийные 10-кратные разведения исследуемого деконтаминированного материала на питательной среде, используемой для культивирования клеток (2МЕМ или 199), забуференной одним из вышеуказанных органических буферов. При работе в пластиковых микропанелях автоматической пипеткой вносят по 180 мкл среды в 4-8 лунок ряда. Новым наконечником вносят 20 мкл материала в первую лунку, после чего наконечник удаляют. Надев новый наконечник, тщательно перемешивают содержимое лунки, переносят 20 мкл смеси в следующую лунку и меняют наконечник на новый. Так повторяют до конца ряда. Смена наконечников имеет принципиальное значение и обязятельна при работе с инфекционным материалом!

5.7. Использование серийных разведений инокулируемого материала преследует двоякую цель. Во-первых, таким образом удается освободиться от действия неспецифических ингибиторов, присутствующих в тканевых материалах и препятствующих размножению вирусов. Данный феномен особенно выражен при работе с материалом от бессимптомных рыб-вирусоносителей. Во-вторых, инокулируя клетки серийными разведениями, можно сразу при выделении определить титр вируса в тканях рыб и сделать вывод о его эпизоотической значимости. Эпизоотически значимым считают титр вируса не ниже 10^5ТЦД$_{50}$/г.

5.8. Инокуляцию клеточных культур приготовленными разведениями осуществляют одним из двух нижеследующих способов. В обоих случаях культивируют клетки в лунках пластиковой микропанели.

5.8.1. *Инокуляция преформированного монослоя*

В работу берут 1-2-суточные культуры с неплотным монослоем, сформированным на 70-100%. Старые культуры менее чувствительны к вирусам. Последовательность действий:

- удаляют ростовую среду и осторожно вносят в лунки с клетками разведения материала (25 мкл/лунка при работе с 96-луночными микропанелями, 3-4 лунки с культурой на каждое разведение);

- проводят адсорбцию материала на клетках в течение 30 мин при температуре 15-20°С, прикрыв панель крышкой (во избежание

чрезмерного защелачивания среды при работе с более, чем одной панелью этот этап можно опустить);

- добавляют в лунки по 75 мкл среды поддержки (в отличие от ростовой она содержит только 2% эмбриональной сыворотки);

- заклеивают панель прозрачным скотчем и инкубируют при необходимой температуре (температуру инкубации поддерживают в диапазоне, оптимальном для выделения предполагаемого агента).

5.8.2. *Инокуляция одновременно с посевом клеток*

Последовательность действий:

- в лунки 96-луночной микропанели вносят суспензию клеток в ростовой среде в объеме 75 мкл/лунка (концентрация клеток должна обеспечивать образование монослоя спустя 1-2 суток инкубации);

- вносят разведения материала (25 мкл/лунка, 3-4 лунки с клетками на разведение);

- заклеивают панель прозрачным скотчем и инкубируют при необходимой температуре.

5.9. Первому способу следует отдавать предпочтение при исследовании небольшого количества материалов. Если материалов много, используют второй способ, как менее трудоемкий.

5.10. При подозрении на конкретный вирус используют клетки наиболее чувствительной к нему линии. В остальных случаях в работу следует брать 2-3 разных клеточных линии. Несколько лунок с клетками оставляют неинокулированными в качестве контроля.

5.11. Инокулированные культуры инкубируют в течение 14-21 суток, подвергая регулярному микроскопированию. При отсутствии в них изменений монослоя, отличных от таковых в контрольных лунках, проводят два "слепых" пассажа материалов. Для этого объединяют содержимое всех лунок каждого материала (механически снимая и забирая при этом клетки), готовят 10-кратные серийные разведения и инокулируют ими свежие культуры клеток, как описано выше в п. 5.8. Результат исследования считают негативным при отсутствии изменений монослоя во втором "слепом" пассаже.

5.12. Появление признаков цитопатического эффекта (ЦПЭ) в инокулированной культуре клеток свидетельствует о выделении цитопатогенного агента. Выделенный агент идентифицируют в реакции нейтрализации, других специфических реакциях и при необходимости подвергают электронной микроскопии.

6. Идентификация вируса в реакции нейтрализации специфическими антителами

6.1. Реакция нейтрализации является традиционным и наиболее распространенным методом идентификации вирусов. В качестве тестируемого материала используют культуральную жидкость клеточных культур с хорошо выраженным ЦПЭ (на 3-4 креста) после осветления её при 2000g в течение 10 мин. При использовании в качестве источника антител гипериммунной сыворотки (обычно кроличьей) последняя должна быть термоинактивирована (56°, 30 мин).

6.2. Порядок постановки реакции:

- питательной средой разводят антитела в 10-100 раз (в зависимости от их титра);
- готовят серийные 10-кратные разведения тестируемого материала в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-8} (см. п. 5.6.);
- смешивают приготовленные серийные разведения материала с разведенными антителами (антисывороткой) в равных объемах;
- инкубируют смеси в течение одного часа при комнатной температуре, периодически легко встряхивая;
- инокулируют смесями чувствительную культуру клеток одним из двух вышеописанных способов (см. п.5.8.);
- в качестве контролей служат клетки, инокулированные:
  а) материалом, обработанным аналогичным образом нормальной сывороткой;
  б) нормальной сывороткой в рабочем разведении;
  в) антисывороткой в рабочем разведении;
  г) гомологичным вирусом, обработанным аналогичным образом антисывороткой,
  а также неинокулированная культура клеток;
- панель заклеивают скотчем и инкубируют при оптимальной для репродукции вируса температуре, регулярно микроскопируя.

6.3. Учет реакции ведут спустя 7-10 дней, когда ЦПЭ перестанет появляться в тех лунках, где он отсутствовал. Для этого рассчитывают титр определяемого вируса по Риду и Менчу в присутствии гипериммунной и нормальной сывороток и находят индекс нейтрализации (ИН) по формуле:

$$\lg ИН = \lg T_1 - \lg T_2 \text{, где}$$

T_1 - титр вируса в присутствии нормальной сыворотки

T_2 - титр вируса в присутствии гипериммунной сыворотки.

Значение ИН находят по таблице антилогарифмов.

6.4. Результат реакции считают отрицательным при ИН от 1 до 9, сомнительным - от 10 до 49 и положительным при ИН, равном 50 и выше. При неудовлетворительном результате идентификации реакцию нейтрализации ставят с другими антисыворотками или используют другие методы исследования.

6.5. Нейтрализация гомологичного вируса должна быть в обычных для него пределах. Обе сыворотки не должны быть токсичны для клеток в рабочем разведении.

6.6. В случае исследования патологического материала, отобранного в период эпизоотии, особенности течения которой позволяют подозревать причастность к ней определенного вируса, в качестве тестируемого материала в реакцию нейтрализации следует брать деконтаминированную 10%-ную суспензию патологического материала, приготовленную в соответствии с пп. 4.2.2. или 4.2.3. настоящих указаний. В этом случае идентификация вируса достигается одновременно с его выделением на культуре клеток, и общая продолжительность исследования значительно сокращается.

7. Поиск вируснейтрализующих антител в сыворотках рыб

7.1. Работу по серологическому обследованию рыбоводных хозяйств проводят в летнее время, когда вероятность выделения вирусов незначительна, а в крови перенесших вирусную инфекцию рыб появляются специфические антитела. Работа заключается в выявлении имевшего место контакта рыб с вирусом путем детектирования продуцируемых ими антител и имеет целью предварительную оценку эпизоотической ситуации для последующего проведения прямых вирусологических исследований в хозяйствах, рыбы которых дали серопозитивную реакцию.

7.2. Для исследования используют сыворотки рыб, обработанные согласно п. 4.2.5. настоящих Методических указаний.

7.3. Реакцию ставят по следующей схеме:

- на среде 2Игла МЕМ готовят рабочее разведение референтного вируса (антитела к которому предполагают искать в собранных сыворотках), содержащее 100 $ТЦД_{50}$/25 мкл;
- готовят серийные 2-кратные разведения сывороток рыб от 1:2 до 1:4096 (допускается использование одного наконечника);
- смешивают рабочее разведение вируса с разведениями сыворотки в равных объемах;
- инкубируют смеси в течение 1 часа при 15°С (лососевые) или комнатной температуре (карповые), периодически легко встряхивая;

- высевают в лунки 96-луночной микропанели суспендированные в ростовой среде клетки чувствительной к вирусу клеточной линии по 50 мкл/лунка и затем вносят по 50 мкл смеси вирус-сыворотка в соответствующих разведениях (смеси вносят одним наконечником, начиная с наименьшего разведения сыворотки; используют по 3-4 лунки с клетками на каждое разведение сыворотки);

- панель заклеивают скотчем и инкубируют при оптимальной для вируса температуре, регулярно микроскопируя.

7.4. Учет реакции ведут спустя 7-10 дней, когда ЦПЭ перестанет появляться в тех лунках, где он отсутствовал. Рассчитывают титр сывороток по Риду и Менчу, принимая за одну нейтрализующую единицу (НЕ) наибольшее её разведение, подавляющее цитопатогенное действие вируса в половине инокулированных смесью лунок с клетками.

8. Биологическая проба

8.1. Биологическая проба, или экспериментальное заражение рыб выделенным вирусом, имеет целью: а) установление этиологической роли вируса в заболевании (в случае его выделения от больных рыб в период эпизоотии); б) определение патогенности или вирулентности вируса (при выделении от вирусоносителей).

8.2. К заражению восприимчивы рыбы в возрасте от личинки до двухлетков, реже рыбы более старшего возраста и производители.

8.3. Для установления этиологической роли вируса в заболевании в биопробу берут рыб того же вида и возраста, от которого он был изолирован. В биопробе с вирусом, выделенным от вирусоносителей, при необходимости используют также рыб других видов. Рыбу завозят из благополучного по инфекционным болезням хозяйства.

8.4. Завезенную рыбу размещают в аквариальном помещении в аквариумах с проточной не содержащей хлора водой. Воду в аквариумах аэрируют, рыбу ежедневно подкармливают рыбным гранулированным комбикормом. Температуру воды поддерживают в диапазоне 5-10°С. Адаптацию к аквариумным условиям ведут в течение 1-2 недель. При завозе рыбы в летнее время года для снижения неспецифической резистентности её передерживают в воде с данной температурой не менее трех недель.

8.5. За время адаптации удаляют ослабленных рыб, одновременно проводя микроскопию их жабр и соскобов слизи с поверхности тела. При обнаружении эктопаразитов осуществляют антипаразитарную обработку. Приступать к постановке биопробы можно не ранее, чем через неделю после обработки.

8.6. Для биопробы формируют две группы рыб - опытную и контрольную - в количестве не менее 25 экз. в каждой. Заражение рыб проводят методами внутрибрюшинной инъекции (в/б) или ванн. Выбор метода заражения зависит от размеров (возраста) рыб. В/б введение вируса обычно вызывает более высокую гибель рыб, чем заражение методом ванн.

8.7. В качестве источника вируса используют свежую вируссодержащую жидкость зараженной вирусом культуры клеток рыб, имеющей признаки ярко выраженного цитопатического эффекта (поражение 75-100% монослоя). Вирус должен иметь минимальное число пассажей in vitro.

8.8. Для в/б введения разводят вирус питательной средой, раствором Хенкса или Эрла в 10 раз и вводят шприцем в области ямки позади брюшного плавника у его основания, удерживая рыбу брюшком кверху. Доза введения - от 0,05 мл (для рыб меньше 1 г) до 1 мл (для рыб массой 30-50 г). Контрольным рыбам вводят такое же количество растворителя или культуральной жидкости, не зараженной вирусом культуры клеток.

8.9. Для заражения методом ванн рыбу помещают в емкость с водой (отношение массы рыбы к массе воды около 1:10), куда затем добавляют вируссодержащую культуральную жидкость в количестве 1/100 от объема воды (конечная концентрация вируса в воде 10^3-10^6 $ТЦД_{50}/мл$). Заражение ведут в течение 3 часов, аэрируя воду микрокомпрессором и поддерживая температуру на уровне 5-10°С, после чего высаживают рыбу в аквариум. Контрольную рыбу обрабатывают аналогичным образом, используя культуральную жидкость незараженной культуры клеток.

8.10. В отдельных случаях для определения контагиозности выявленного заболевания (предположительно вирусной природы) допускается заражение рыб непосредственно суспензией патологического материала от больных рыб, приготовленной как указано в пп. 4.2.1.-4.2.3. настоящих Методических указаний.

8.11. После заражения температуру воды постепенно поднимают в течение суток до оптимальных для изучаемого заболевания значений и ведут наблюдение за рыбой до полного прекращения заболевания в группе зараженных рыб (не менее 30 дней при отсутствии заболевания). Ежедневно регистрируют в журнале отклонения в поведении рыб, а в случае развития заболевания - клинические, патологоанатомические изменения и штучную суточную гибель рыб.

8.12. Вытекающую из аквариумов воду перед сбрасыванием в канализацию дезинфицируют ультрафиолетовым облучением, озонированием или содержащими активный хлор препаратами.

8.13. От зараженных рыб с выраженными признаками развившегося заболевания отбирают патологический материал и проводят реизоляцию вируса в соответствии с пп. 4 и 5 настоящих указаний. При отсутствии заболевания рыб в биопробе спустя 30 суток после заражения на реизоляцию вируса направляют всех рыб опытной группы.

8.14. По окончании биопробы оставшуюся рыбу уничтожают, аквариумы и инвентарь дезинфицируют 2%-ным раствором хлорамина и моют.

8.15. Гибель зараженных рыб в биопробе зависит от вирулентности вируса, восприимчивости хозяина и условий эксперимента и может колебаться в диапазоне от 0 до 100%. Результаты биопробы оценивают, как указано ниже.

Положительный результат

Заболевание воспроизведено с типичными для него клиническими, патолого-анатомическими признаками и гибелью зараженных рыб, от заболевших рыб вирус реизолирован в эпизоотически значимых титрах (не ниже 10^5 $ТЦД_{50}$/г ткани).

Выделен вирулентный вирус

Зараженные вирусом рыбы погибали с иными признаками или без видимых признаков, а от заболевших рыб вирус реизолирован в эпизоотически значимых титрах, что означает, что изучаемый вирус является вирулентным, но не является причиной заболевания, если таковое имело место в хозяйстве.

Выделен авирулентный персистирующий вирус

Гибель в обеих группах рыб отсутствовала или была одинаковой, но реизоляция вируса говорит о его способности к персистенции в организме рыб.

Выделен авирулентный неперсистирующий вирус

Гибель в обеих группах рыб отсутствовала или была одинаковой, вирус не реизолирован (элиминировался в организме рыб).

С утверждением настоящих методических указаний утрачивают силу "Методические указания по идентификации вирусов и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб", утвержденные ГУВ Госагропрома СССР 14.05.87, № 432-5.

gost.e-ecolog.ru