

Российская академия наук
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД
Российская академия
сельскохозяйственных наук
Отделение ветеринарной медицины
Межведомственная ихтиологическая
комиссия
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И
НАУКИ
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГИЙ И УПРАВЛЕНИЯ

**ПРОБЛЕМЫ ИММУНОЛОГИИ,
ПАТОЛОГИИ И ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ
РЫБ**

**Расширенные материалы
Всероссийской научно-практической конференции**

**МОСКВА
2004**

УДК [597.08:612.017] (063)

Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширенные материалы Всероссийской научно-практической конференции, Борок, 16-18 июля 2003 года. Москва, 2004. 272 с. Под редакцией д.б.н., проф. В.Р.Микрякова, д.б.н. А.М. Наумовой, к.б.н., доцента А.Л. Никифорова-Никишина, к.б.н. Е.А. Заботкиной.

В основу сборника положены доклады, сделанные на Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов», посвященной светлой памяти доктора биологических наук Глеба Дмитриевича Гончарова - основоположника инфекционной патологии и иммунологии рыб. В нем представлены материалы по проблемам общей, частной иммунологии, патологии, связанные с охраной здоровья рыб. Рассматриваются эволюционные, экологические аспекты иммунологии, иммунотоксикологии, иммунопрофилактики, патофизиологии, патоморфологии, паразитологии, оценки влияния стресс-факторов, условий содержания на состояние здоровья молоди осетровых и лососевых рыб и новые подходы борьбы с болезнями объектов аквакультуры.

Материалы сборника представляют интерес для иммунологов, паразитологов, ихтиологов, физиологов, биохимиков, токсикологов, а также практических работников рыбного хозяйства, специалистов в области охраны природы, преподавателей ВУЗов.

Ответственные за выпуск: академик А.М. Смирнов (РАСХН);

д.б.н., проф. В.Р. Микряков (ИБВВ РАН);

д.б.н., проф. С.И. Никоноров (МИК);

д.б.н. А.М. Наумова (МИК, ВНИИР РАСХН);

к.б.н. А.Л. Никифоров-Никишин (МГУТУ);

к.б.н. Е.А. Заботкина (ИБВВ РАН);

За достоверность представленных в сборнике сведений несут ответственность авторы соответствующих материалов.

ISBN

©Институт биологии внутренних вод РАН, 2004

©Межведомственная ихтиологическая комиссия, 2004

©Московский государственный университет технологии и управления, 2004

Problems of immunology, pathology and fish health protection. Enlarged materials of All-Russian scientific and applied research conference, Borok, 16-18 July 2003. Under the editorship of Doctor of Biological Sciences, Prof. V. R. Mikriakov, Doctor of Biological Sciences A. M. Naumova, Candidate of Biological Sciences, Senior Lecturer A. L. Nikiforov-Nikishin, Candidate of Biological Sciences E. A. Zabolkina.

These collected articles are based on presentations made at the All-Russian scientific and applied research conference "Issues of pathology, immunology, health protection of fish and other hydrobionts" dedicated to the memory of Doctor of Biological Sciences Gleb Dmitrievich Goncharov - the founder of fish infectious pathology and immunology. This work considers evolutionary and ecological aspects of immunology, immunotoxicology, immunoprophylaxis, pathophysiology, pathomorphology, parasitology, the effect of stress factors and environmental conditions on state of health of juvenile Acipenseridae and Salmonidae as well as new approaches to fighting against diseases of aquaculture objects.

We hope this collection proves to be useful for immunologists, parasitologists, ichthyologists, physiologists, biochemists, toxicologists as well as fish industry specialists, environmentalists and lecturers.

Editorial Board: Academician A. M. Smirnov (RAAS);

Doctor of Biological Sciences, Prof. V. R. Mikriakov (IBIW RAS);

Doctor of Biological Sciences, Prof. S. I. Nikonorov (DIC);

Doctor of Biological Sciences A.M.Naumova (DIC, VNIIR, RAAS);

Candidate of Biological Sciences, Senior Lecturer A. L. Nikiforov-Nikishin (MSUTM);

Candidate of Biological Sciences E.A.Zabolkina (IBIW RAS)

Authors of the corresponding materials are responsible for reliability of the data presented in these collected articles.

ISBN

©Institute for Biology of Inland Waters RAS, 2004

©Interdepartmental Ichthyological Commission, 2004

©Moscow State University of Technology and Management, 2004

Часть III. БОЛЕЗНИ РЫБ И ОХРАНА ЗДОРОВЬЯ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 597-12: 576.85

ВЕСЕННЯЯ ВИРЕМИЯ И ДРУГИЕ РАБДОВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ РЫБ: ОТ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ К МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДАМ ДИАГНОСТИКИ

И.С. Щелкунов

*ВНИИ пресноводного рыбного хозяйства
п. Рыбное Дмитровского р-на Московской обл., 141821,
vniiprh@dmitrow.ru*

Среди возбудителей вирусных болезней рыб рабдовирусы образуют группу наиболее опасных патогенов. В последнее время ясно прослеживается тенденция к глобализации их распространения. Ответным шагом на экспансию вирусов становится повсеместный переход научно-исследовательских лабораторий от иммунологических к молекулярно-генетическим методам диагностики, основанным на использовании полимеразной цепной реакции. Инструментарий молекулярной генетики демонстрирует непревзойденные возможности в тонком типировании вирусных штаммов и отслеживании их перемещений, изучении эпизоотологии и эволюции рабдовирусов рыб. Символизируя переход к новому этапу инфекционной ихтиопатологии, применяемые методы являются весомым вкладом в развитие международной системы мер по профилактике эпизоотий рыб в аквакультуре.

Весенняя виремия карпа (ВБК, SVC) – остро протекающая высококонтагиозная болезнь, вызываемая рабдовирусом SVCV (Spring viraemia of carp virus). По классификации Международного эпизоотического бюро (МЭБ) ВБК относят к категории особо опасных (декларируемых) болезней рыб. Она широко распространена в европейских странах с развитым карповодством [24] и является основной вирусной болезнью рыб в России. Хотя на сегодня в естественных условиях или в аквакультуре данная инфекция отмечена у рыб семи видов [23, 34], карп, *Cyprinus carpio* L., включая его декоративную форму (кои), выделяется своей повышенной восприимчивостью. Вспышки заболевания обычно происходят весной, спустя 2-3 недели после посадки рыб из зимовальных в нагульные пруды, и сопровождаются массовой гибелью (преимущественно годовиков - двух-

летков), достигающей 30-40%, а иногда и 70% [23, 69].

За последние 15-20 лет частота вспышек ВБК в Европе значительно снизилась [23]. Это обусловлено, по крайней мере, тремя факторами: повышением культуры рыбоводства в целом, введением с 1991 г. в странах Евросоюза более жестких мер борьбы с заразными болезнями в аквакультуре и катастрофическим сокращением объемов производства карпа в государствах бывшего Восточного блока, все еще не оправившихся от затяжного экономического кризиса [63].

В то же время участились случаи обнаружения возбудителя заболевания в новых географических регионах. Так, выделенный в 1991 г. в США (шт. Гавайи) от двух видов креветок рабдовирус в 1999 г. был идентифицирован как первый американский штамм вируса SVC [31]. В 2002 г. массовая эпизоотия (предположительно ВБК) имела место в фермерских хозяйствах Центрального Ирака [52]. Внимание к проблеме SVC усилилось и в связи с расширением международной торговли декоративными карповыми рыбами, которая сегодня стала весьма прибыльным бизнесом. В 2002 г. на территории американских штатов Северная Каролина, Вирджиния и Висконсин были зарегистрированы первые вспышки ВБК, связанные с импортом кои-карпа и золотой рыбки из стран Юго-Восточной Азии. А вскоре в американских архивных гистопатологических материалах 1989 года методами гибридизации *in situ* и RT-PCR был обнаружен генетический материал вируса SVC европейской подгруппы [16, 26, 62]. В Великобритании, начиная с 1998 г., SVCV неоднократно выделяли во время рутинных обследований импортируемых партий декоративных карповых рыб, поступающих из Юго-Восточной Азии. Кроме того, в последнее время от рыб разных видов там было выделено много новых рабдовирусных изолятов, перекрестно реагирующих в серологических реакциях как с SVCV, так и с антигенно-родственным ему рабдовирусом мальков щуки (PFRV) [51, 57]. Английские и американские изоляты SVCV «азиатского» происхождения по своим свойствам отличались от типичных европейских штаммов вируса [57, 66, Goodwin A.E., личное сообщение]. Удивительно, но фактов обнаружения SVCV непосредственно на азиатском континенте до сих пор не зафиксировано, и, по данным МЭБ, Азия по-прежнему считается свободной от этой инфекции [<http://www.oie.int>]. В России вирус ВБК был изолирован недавно от больных производителей карпа в Московской области, где прежде его не обнаруживали [49].

Схожим образом развивались события и с двумя другими МЭБ-декларируемыми рабдовирусными болезнями рыб – инфекционным некрозом гемопоэтической ткани лососевых (IHNV) и вирусной геморрагической септициемией (VHS). Их возбудители были обнаружены далеко за пределами прежних, хорошо известных ареалов. IHNV, до этого широко распространенный на Североамериканском континенте и встречавшийся в Японии, в 1987 г. был впервые выявлен в Европе [6, 13], а считавшийся исключительно европейским эндемиком вирус VHS в 1988 г. был изолирован в США от мигрирующих лососей, а затем и других рыб прибрежных вод Тихого океана [28, 39, 40].

До недавнего времени диагностика вирусных инфекций рыб базировалась исключительно на традиционных серологических методах с использованием поликлональных антител, «золотым стандартом» среди которых по-прежнему остается реакция нейтрализации. Следует признать, что с практической точки зрения эти методы недостаточно информативны. Отвечая своему предназначению – идентификация выделенного агента, они не позволяют устанавливать его происхождение. Данный вопрос всегда находился в компетенции эпизоотологии, но и ее классические подходы весьма часто оставляли его открытым. В то же время решения этой проблемы настоятельно требовала наметившаяся в последнее время тенденция глобального распространения инфекционных болезней, вызванная бурным ростом аквакультуры и расширением международной торговли ее объектами.

Постепенно обозначилась еще одна проблема: накапливались факты обнаружения «ускользающих от нейтрализации» изолятов VHS-, IHNV-, а затем и SVC-вирусов [2, 32, 43, Щелкунов, Щелкунова, неопубл. данные]. Появление таких изолятов отражало высокую мутационную изменчивость РНК-геномных вирусов [29, 56, 67] и в практическом плане грозило повышением частоты ложно-негативных диагнозов. Ситуация требовала привлечения новых методов для тонкой идентификации и типирования вирусных изолятов. Долго искать не пришлось: к тому времени некоторые из таких методов уже были разработаны и использовались для отбора репрезентативных изолятов с целью создания будущих вакцин.

Д. Леонг с соавторами [37], применив ДСН-ПААГ-электрофорез и радиоавтографию изотопомеченных белков вируса IHNV, показали вариабельность одиннадцати изученных вирусных штаммов по подвижности N- и G-белков, условно

разбив их по этому признаку на 4 группы. Хсу с соавторами [30] расширили эти исследования, разделив 71 североамериканский изолят IHNV на 5 электроферотипов. Авторы впервые отметили, что электроферотипы коррелировали с географией обнаружения изолятов, но не хронологией их выделения или видами рыб-хозяев. Выполненные позднее работы по типированию IHNV с помощью моноклональных антител показали еще более широкую вариабельность его изолятов. При этом антигенные варианты вируса также различались географией своего происхождения [68]. Познание особенностей фенотипической изменчивости вируса открывало путь для лучшего понимания его эпизоотологии. Однако подлинную вариабельность агента можно было оценить лишь в ходе изучения вариабельности его генома. Это стало возможным после введения в 1990-х г.г. в практику ихтиовирусологии методов молекулярно-генетического анализа. Толчком к началу таких исследований послужило неожиданное обнаружение VHS-вируса в США.

После первых работ Бернарда с соавторами [8, 9], показавших путем сравнения последовательностей N-гена, что европейский и американский штаммы VHSV, несмотря на антигенную схожесть, существенно отличаются друг от друга генетически и являются географически обособленными агентами, на обоих континентах развернулись исследования по генетическому типированию изолятов вируса. К тому времени среди них стала возрастать доля морских изолятов. Наступила эпоха «молекулярной эпизоотологии», продолжающаяся и поныне. Предметом ее исследования стало генетическое разнообразие и родство изолятов, базирующиеся на особенностях изменчивости генома вируса. Одним из её ключевых методов постепенно становится метод филогенетического анализа, позволяющий устанавливать географию происхождения вирусных изолятов, отслеживать пути их перемещения и эволюцию вируса. Рабдовирусам как группе наиболее значимых патогенов рыб было уделено основное внимание.

Ошима с соавторами [48] были первыми, кто провел групповой генетический анализ пяти американских и четырех европейских изолятов VHSV. Применяв метод T1-рибонуклеазного фингерпринтинга геномной РНК, авторы установили, что изоляты каждого из двух континентов образуют самостоятельную группу. Результаты работы подтвердили предположения, что американский штамм VHS вируса является эндемичным для региона северо-восточной Пацифики.

Появление автоматических секвенаторов и компьютерных программ для работы с нуклеотидными последовательностями и проведения филогенетического анализа значительно ускорило процесс. Количество изолятов, анализируемых в одном исследовании, стало исчисляться десятками. Серия работ, выполненных во Франции, Великобритании, Японии и США [5, 7, 28, 41, 54, 55, 58, 59], сделала прорыв в эпизоотологии инфекции. В результате филогенетического анализа было установлено существование пяти генотипов (геногрупп) вируса VHS (четыре европейских и один североамериканский), различавшихся географией зон циркуляции. Отмечена достаточно высокая генетическая стабильность вируса внутри зон, не зависимо от вида хозяина и времени выделения. Установлено существование четырех морских резервуаров инфекции, которые предположительно могли стать источником появления вируса в материковых водах.

Успех генетического анализа VHS-вируса был превзойден в работах с вирусом ИHN. Почти все они вышли из стен Западного рыбохозяйственного научно-исследовательского центра США (г. Сиэтл), и в каждой были изучены десятки и сотни изолятов ИHNV разного происхождения. Ошима с соавторами [47], используя упомянутый выше метод фингерпринтинга, исследовали 26 изолятов, собранных на всем протяжении западной части Северной Америки от Аляски до Калифорнии. Результаты показали, что все они образуют единую генетическую группу, состоящую из четырех географически различающихся подгрупп. Курат с соавторами [35] впервые применили для оценки величины генетического разнообразия ИHNV метод зондовой антирибонуклеазной защиты вирусной РНК (RPA). Вскоре с его помощью у ИHNV было обнаружено существование большого числа генетических вариантов (гаплотипов) и установлен факт появления нового штамма, вызвавшего несколько вспышек заболевания [4]. RPA, использованный в качестве базового метода, в тандеме с филогенетическим анализом позволили разбить североамериканские изоляты вируса на гаплотипы и сиквенс-типы, кластеризовавшиеся в три генетические группы (U, M, L). Группа M в свою очередь состояла из четырех подгрупп. Выявленные геногруппы имели ясно выраженную географическую привязанность. Обоиими методами удалось зарегистрировать эволюцию гликопротеинового гена вируса (G-гена) за период в 36 лет. Наиболее быстро этот процесс протекал в зоне с высокоинтенсивной аквакульту-

рой (геногруппа М), хотя в целом скорость эволюции IHNV, по расчетам исследователей, была одной из самых низких при сравнении с другими РНК-геномными вирусами животных. Филогенетический анализ, выполненный на разных генах вируса, давал весьма схожие, если не идентичные, результаты. Корреляции генетических вариантов с видом рыб-хозяев установлено не было. Было показано, что внеамериканские изоляты вируса (японские, западноевропейские и российские) имеют североамериканское происхождение. Выявленная генетическая вариабельность IHNV значительно превосходила таковую, установленную ранее с помощью других использованных методов, включая метод моноклональных антител [19-22, 25, 36, 60, Kurath G., личное сообщение].

Прогресс в генетическом типировании вирусов VHS и IHN значительно расширил знания в области молекулярной эпизоотологии этих инфекций. События с весенней виремией, как всегда, развивались с некоторым отставанием. Однако появление вспышек заболевания в США и необычных вирусных изолятов в Великобритании вновь подстегнуло интерес к этой инфекции. Понятно, что основное внимание было обращено на разработку методов молекулярной диагностики и типирования вирусных изолятов.

Традиционно диагностика ВВК базировалась на выделении вируса в культуре клеток и последующей идентификации в реакции нейтрализации. Эта процедура достаточно трудоемка и занимает от одной недели до месяца. Наряду с реакцией нейтрализации, МЭБ и Европейской Комиссией рекомендовано использование экспресс-методов - непрямо́й иммунофлуоресценции (ИФА) и твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) [42]. Реагенты для этих и иммунопероксидазного метода (IPA) на основе поликлональных и моноклональных антител производятся коммерческими фирмами Германии, Чехии и Бельгии. Однако, обладая экспрессностью, все три указанных серологических метода имеют один общий недостаток: они не обеспечивают надежной дифференциации вируса SVC от антигенно родственного ему рабдовируса мальков щуки (PFRV) [64], что безусловно необходимо, т.к. последний не является МЭБ-декларируемым агентом, и его обнаружение не влечет за собой наложения карантина.

В отличие от VHSV и IHNV, относящихся к роду *Novirhabdovirus* семейства *Rhabdoviridae* [65], вирус SVC наиболее близок к роду *Vesiculovirus*. Геном SVCV пред-

ставлен односторонней минус-цепью РНК, кодирующей пять структурных белков: 3'-N-P-M-G-L-5' (соответственно: нуклеопротеин, фосфопротеин, матриксный белок, гликопротеин и РНК-полимераза) [1]. Считается, что вирус имеет один серотип.

Изучение генома SVCV было начато еще четверть века назад [27, 33, 50] и продолжено в сравнительных исследованиях с другими рабдовирусами после весьма длительного перерыва [10, 11]. Ане с соавторами [3] использовали даные Бьёрклунда с соавторами [11] для создания зонда, комплексного мРНК G-гена европейского референтного штамма Fijan вируса SVC и разработки на его основе метода RPA. Метод надежно отличал SVCV от PFRV и выявил существование у первого генетических вариантов (гаплотипов). Опираясь на опубликованные последовательности M- и G-генов SVCV [11, 33, M. Rossius, G-gene sequence, GenBank accession No. Z37505], Орешкова с соавторами [45, 46] предложили первые варианты методов дот-блот гибридизации и RT-PCR для выявления вируса в культуре клеток и патологическом материале от рыб, а Кутна с соавторами [34] разработали высокочувствительный метод детектирования вируса с помощью гнездовой обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-гПЦР). Но основные работы по созданию молекулярно-генетических методов диагностики инфекции велись в референтной лаборатории МЭБ по SVC (г. Веймут, Англия). Сотрудниками лаборатории впервые для данного вируса были разработаны методы полугнездовой ПЦР, гибридизации *in situ* и обратной гибридизации [15, 38, 53, 57]. Однако следует отметить, что, обладая набором важных достоинств, перечисленные выше методы не были свободны от ряда нежелательных элементов, ограничивающих их использование на практике. А именно: работали только в связке с методом культуры клеток, что удлиняло процедуру постановки диагноза (RPA, гибридизация *in situ* и дот-блот), требовали применения радиоактивной метки (RPA) или основывались на детектировании сравнительно высоковариабельных G- и M-генов вируса, что теоретически уменьшало скрининговые возможности методов (ПЦР-методы и обратная гибридизация).

В 2001 г. в GenBank были независимо депонированы две полные геномные последовательности референтного европейского штамма Fijan (синонимы: S 30, ATCC VR 1390) вируса SVC (accession numbers U18101, AJ318079) [1]. Стоун с

соавторами [57] использовали их при выборе праймеров для первого филогенетического исследования группы везикуловирусов рыб из 36 изолятов, включавших 15 изолятов SVCV из государств Европы, Китая и бывшего СССР. Компьютерный анализ ДНК-ампликонов средней части G-гена размером 550 пн позволил разделить исследованные изоляты на четыре геногруппы (I-IV). При этом изоляты SVCV вошли в геногруппу I, которая в свою очередь распадалась на четыре генетические подгруппы. Представителей каждой подгруппы, как правило, связывала общая география происхождения. Корреляции с видами рыб-хозяев установлено не было.

Основные выводы, вытекающие из результатов первого и пока единственного филогенетического анализа SVCV, в целом согласуются с таковыми, полученными в аналогичных исследованиях для вирусов VHS и IHN. Они подтверждают широкие возможности инструментария молекулярной генетики для тонкого типирования вирусных изолятов, отслеживания их перемещений, изучения эпизоотологии и эволюции рабдовирусов рыб. Особую ценность представляет использование этих возможностей в диагностической работе. Однако оно сдерживается нехваткой простых и надежных методов, доступных для освоения производственными лабораториями. Имеется лишь краткая информация о создании таких методов для типирования изолятов вирусов VHS и SVC [17, 53].

С учетом изложенного нами проведены исследования по разработке технологии ПЦР-детектирования SVC-инфекции и созданию на её основе несложных для практики методов молекулярно-генетического типирования вируса. Для выявления вируса SVC были разработаны методы ОТ-ПЦР и ОТ-пгПЦР с праймерами на консервативные участки гена нуклеопротеина (N-гена). Сравнение ампликонов фрагмента N-гена восемнадцати изолятов вируса показало возможность генетического типирования последних с помощью ПДРФ-анализа. Использование комплекса из пяти эндонуклеаз рестрикции позволило разделить 22 вирусных изолята на две основных (европейская и отечественная) и две промежуточных геногруппы. Типирование изолятов было возможным и с помощью штамм-специфичной ОТ-гПЦР с использованием праймеров, в последовательностях которых были учтены закономерные точковые мутации. Разработанные методы открывают путь для экспрессной молекулярно-генетической идентификации и типирования вируса весенней вире-

мии карпа непосредственно в тканях рыб, без его выделения на культуре клеток [Shchelkunov et al., в печати].

Список литературы

1. Ahne W., Bjurklund H.V., Essbauer S., Fijan N., Kurath G., Winton J.R. Spring viraemia of carp // *Dis. Aquat. Org.* - 2002. - V. 52. - P. 261-272.
2. Ahne W., Jorgensen P.E.V., Olesen N.J., Schafer W., Steinhagen P. Egtved virus: occurrence of strains not clearly identifiable by means of virus neutralization tests // *J. Appl. Ichthyol.* - 1986. V. 2. P. 187-189.
3. Ahne W., Kurath G., Winton J.R. A ribonuclease protection assay can distinguish spring viraemia of carp virus from pike fry rhabdovirus // *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* - 1998. V. 18. - P. 220-224.
4. Anderson E.D., Endelking H.M., Emmenegger E.J., Kurath G. Molecular epidemiology reveals emergence of a virulent infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus strain in wild salmon and its transmission to hatchery fish // *J. Aquat. Anim. Health.* - 2000. - V. 12. - P. 85-99.
5. Basurco B., Vende P., Monnier A.F., Winton J.R., de Kinkelin P., Benmansour A. Genetic diversity and phylogenetic classification of viral hemorrhagic septicemia virus // *Vet. Res.* - 1995. - V. 26. - P. 460-463.
6. Baudin-Laurencin F. IHN in France // *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 1987. V. 7. P. 104.
7. Benmansour A., Basurco B., Monnier A.F., Vende P., Winton J.R., de Kinkelin P. Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus // *J. Gen. Virol.* - 1997. - V. 78. - P. 2837-2846.
8. Bernard J., Bremont M., Winton J. Nucleocapsid gene sequence of a North American isolate of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus // *J. Gen. Virol.* - 1992. - V. 77. - P. 1011-1014.
9. Bernard J., Lecocq-Xhonneux F., Rossius M., Thiry M.E., de Kinkelin P. Cloning and sequencing the messenger RNA of the N gene of viral haemorrhagic septicaemia virus // *J. Gen. Virol.* - 1990. - V. 71. - P. 1669-1674.
10. Bjurklund H.V., Emmenegger E.J., Kurath G. Comparison of the polymerases (L genes) of spring viraemia of carp virus and infectious hematopoietic necrosis virus // *Virus Res.* - 1995. - V. 26. - P. 394-398.

11. Björklund H.V., Higman K.H., Kurath G. The glycoprotein genes and the gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viraemia of carp virus and hirame rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses // *Virus Res.* - 1996. - V. 42. - P. 65-80.

12. Björklund H., Lorenzen N., Vesely T., Shchelkunov I., Oreshkova S. Diagnostic methods and reference panel of reagents for detection and typing of fish viruses. EC FAIR CT-98-4064 Consolidated Report 1999-2001 / European Commission DG XIV. - Brussels, 2002.

13. Bovo G., Giorgetti G., Jorgensen P.E.V., Olesen N.J. Infectious haematopoietic necrosis: first detection in Italy // *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 1987. V. 7. P. 124.

14. Cozien J., Thiery R. Genetic and virulence comparison of French isolates of infectious haematopoietic necrosis virus / / Book of Abstracts of 11th Int. Conference of the EAFP "Diseases of Fish and Shellfish", 21-26 September 2003. - Malta, 2003. - O-2.

15. Dixon, P.F. *In situ* hybridization for the detection of spring viraemia of carp virus in fish tissue sections, using a polymerase chain reaction digoxigenin labeled probe // Workshop on Diagnostic Techniques with Special Emphasis on Carp Diseases. UK, 2-4 June 2003. - CEFAS Weymouth Laboratory, 2003.

16. Dixon P.F., Marcquenski S., Le-Deuff R.-M., Denham K.L., Sheppard A.M., Steedman L., Stone D.M., Way K. Use of *in situ* hybridization and the polymerase chain reaction to identify spring viraemia of carp virus and koi herpesvirus in fixed archive material // Book of Abstracts of 11th Int. Conference of the EAFP "Diseases of Fish and Shellfish", 21-26 September 2003. - Malta, 2003. - O-29.

17. Einer-Jensen K., Ahrens P., Lorenzen N. Genotyping of continental and marine VHS virus isolates by restriction fragment length polymorphism (RFLP) // Book of Abstracts of 10th Int. Conference of the EAFP "Diseases of Fish and Shellfish", 9-14 September 2001. - Dublin, Ireland, 2001. - P-269.

18. Einer-Jensen K., Björklund H., Oreshkova S., Shchelkunov I., Vesely T., Lorenzen N. Detection and typing of fish viruses / / *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* - 2002. - V. 22. - P. 158-165.

19. Emmenegger E.J., Kurath G. Genetic characterization of infectious hematopoietic necrosis virus of coastal salmonid stocks in Washington state // *J. Aquat. Anim. Health.* - 2002. - V. 14. - P. 25-34.

20. *Emmenegger E.J., Meyers T.R., Burton T.O., Kurath G.* Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska // *Dis. Aquat. Org.* - 2000. - V. 40. - P. 163-176.

21. *Emmenegger E.J., Troyer R.M., Kurath G.* Characterization of the mutant spectra of a fish RNA virus within individual hosts during natural infections // *Virus Res.* - 2003. - V. 96. - P. 15-25.

22. *Enzmann P.-J., Kurath G., Garver K., Fichtner D., Bergmann S.* Monophyletic origin of European IHNV strains from North American M-genogroup // *Book of Abstracts of 11th Int. Conference of the EAAP "Diseases of Fish and Shellfish"*, 21-26 September 2003. - Malta, 2003. - P. 54.

23. *Fijan N.* Spring viraemia of carp and other viral diseases and agents of warm-water fish. // *Fish Diseases and Disorders. V.3: Viral, Bacterial and Fungal Infections* / Woo P.T.K., Bruno D.W. (Eds.). - Oxon: CAB Intl., 1999. - P. 177-244.

24. *Fijan N., Petrinc Z., Sulimanoviu D., Zwillenberg L.O.* Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp // *Vet. Arh.* - 1971. - V. 41. - P. 125-138.

25. *Garver K.A., Troyer R.M., Kurath G.* Two distinct phylogenetic clades of infectious hematopoietic necrosis virus overlap within the Columbia river basin // *Dis. Aquat. Org.* - 2003. - V. 55. - P. 187-203.

26. *Goodwin A.E.* First report of spring viraemia of carp virus (SVCV) in North America // *J. Aquat. Anim. Health.* - 2002. - V. 14. - P. 161-164.

27. *Gupta K.C., Bishop D.H.L., Roy P.* 5' terminal sequences of spring viraemia of carp virus RNA synthesized in vitro // *J. Virol.* - 1979. - V. 30. - P. 735-745.

28. *Hedrick R.P., Batts W.N., Yun S., Traxler G.S., Kaufman J., Winton J.R.* Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus // *Dis. Aquat. Org.* - 2003. - V. 55. - P. 211-220.

29. *Holland J., Spindler K., Horodyski F., Grabau E., Nichol S., VandePol S.* Rapid evolution of RNA genomes // *Science.* - 1982. - V. 215. - P. 1577-1585.

30. *Hsu Y.L., Endelking H.M., Leong J.C.* Occurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1986. - V. 52. - P. 1353-1361.

31. *Johnson M.C., Maxwell J.M., Loh P.C., Leong J.C.* Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses: snakehead rhabdovirus (SHRV) and

rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)/spring viraemia of carp virus (SVCV) // *Virus Res.* - 1999. - V. 64. - P. 95-106.

32. *Kim C.H., Winton J.R., Leong J.C.* Neutralization resistant variants of infectious hematopoietic necrosis virus have altered virulence and tissue tropism // *J. Virol.* - 1994. - V. 68. - P. 8447-8453.

33. *Kiuchi A., Roy P.* Comparison of the primary sequence of spring viraemia of carp virus M protein with that of vesicular stomatitis virus // *Virology.* - 1984. - V. 134. - P. 238-243.

34. *Koutna M., Vesely T., Psikal I., Hulova J.* Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR // *Dis. Aquat. Org.* - 2003. - V. 55. - P. 229-235.

35. *Kurath G., Higman K.H., Bjurklund H.V.* The NV genes of fish rhabdoviruses: development of RNase protection assay for rapid assessment of genetic variation // *Vet. Res.* - 1995. - V. 26. - P. 477-485.

36. *Kurath G., Troyer R.M., Emmenegger E.J., Einer-Jensen K., Anderson E.D.* Phylogeography of infectious hematopoietic necrosis virus in North America // *J. Gen. Virol.* - 2003. - V. 84. - P. 803-814.

37. *Leong J., Hsu Y.L., Endelking H.M., Mulcahy D.* Strains of infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus may be identified by structural protein differences // *Dev. Biol. Stand.* - 1981. - V. 49. - P. 43-55.

38. *Liu C.T.-Y., Schmidt N.T., Stone D.M.* Detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) in fish tissues by semi-nested RT-PCR // *Book of Abstracts of The Forth International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates, 12-15 May 1998* . - Weymouth, UK, 1998. - PP- 05.

39. *Meyers T.R., Winton J.R.* Viral hemorrhagic septicemia virus in North America // *Annu. Rev. Fish Dis.* - 1995. -V. 5. - P. 3-24.

40. *Meyers T.R., Short S., Lipson K.* Isolation of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality in two new host species of Alaskan marine fish // *Dis. Aquat. Org.* - 1999. - V. 38. - P. 81-86.

41. *Nishizawa T., Iida H., Takano R., Isshiki T., Nakajima K., Muroga K.* Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G and P genes // *Dis. Aquat. Org.* - 2002. - V. 48. - P. 143-148.

42. OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals,

- 4th ed. - Paris: Office International des Épizooties, 2003.
43. Olesen N.J., Lorenzen N., Jorgensen P.E.V. Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies // Dis. Aquat. Org. - 1993. - V. 16. - P. 163-170.
44. Olesen N.J., Skall H.F., Kjaer T.E., Kippasto C., Johansson T., Bjurklund H. Characterization of European perch rhabdoviruses // Book of Abstracts of 10th Int. Conference of the EAAP "Diseases of Fish and Shellfish", 9-14 September 2001. - Dublin, Ireland, 2001. - P-267.
45. Oreshkova S.F., Shchelkunov I.S., Tikunova N.V., Shchelkunova T.I., Puzyrev A.T., Ilyichev, A.A. Detection of spring viraemia of carp virus isolates by hybridization with non-radioactive probes and amplification by polymerase chain reaction // Virus Res. - 1999. V. 63. - P. 3-10.
46. Oreshkova S.F., Tikunova N.V., Shchelkunov I.S., Ilyichev A.A. Detection of spring viraemia of carp virus by hybridization with biotinylated DNA probes // Vet. Res. - 1995. - V. 26. - P. 533-537.
47. Oshima K.H., Arakawa C.K., Higman K.H., Landolt M.L., Nichol S.T., Winton J.R. The genetic diversity and epizootiology of infectious hematopoietic necrosis virus // Virus Res. - 1995. - V. 35. - P. 123-141.
48. Oshima K.H., Higman K.H., Arakawa C.K., de Kinkelin P., Vestergaard Jorgensen P.E., Meyers T.R., Winton J.R. Genetic comparison of viral hemorrhagic septicemia isolates from North America and Europe // Dis. Aquat. Org. - 1993. - V. 17. - P. 73-80.
49. Pichugina T.D., Borisova M.N., Shchelkunova T.I., Shchelkunov I.S., Zavyalova E.A. First report of spring viraemia of carp virus at a fish farm in Moscow Province, Russia // Proceedings of Second Bilateral Conference Between United States and Russia on Aquatic and Marine Animal Health. Clarion Inn and Conference Center Shepherdstown, 21-28 September 2003. - Shepherdstown, West Virginia, 2003. - P. 20.
50. Roy P., Gupta K.C., Kiuchi A. Characterization of spring viraemia of carp virus mRNA species and the 3' sequence of the viral RNA // Virus Res. - 1984. - V. 1. - P. 189-202.
51. Rowley H., Graham D.A., Campbell S., Way K., Stone D.M., Curran W.L., Bryson D.G. Isolation and characterization of rhabdovirus from wild common bream *Abramis brama*, roach *Rutilus rutilus*, farmed brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Northern Ireland // Dis. Aquat. Org. - 2001. - V. 48. - P. 7-15.

52. *Shchelkunov I.S.* Report on results of FAO consultancy mission in Iraq aimed at identification and control of an acute epizootic in fish cultured in the national inland aquaculture, TEMP/INT/859/MSC / FAO. - Rome, 2002. - 12p.

53. *Sheppard A.M., LeDeuff R.-M., Stone D.M.* The use of reverse hybridization to discriminate between piscine vesiculovirus type viruses and to identify spring viraemia of carp virus (SVCV) subgroups // Book of Abstracts of 11th Int. Conference of the EAFF "Diseases of Fish and Shellfish", 21-26 September 2003. - Malta, 2003. - P-60.

54. *Snow M., Cunningham C.O., Melvin W.T., Kurath G.* Analysis of the glycoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within European marine environment // *Virus Res.* - 1999. - V. 63. - P. 35-44.

55. *Snow M., Raynard R.S., King J.A., Skall H.F., Olesen N.J.* Towards an effective management tool for marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) // Book of Abstracts of 10th Int. Conference of the EAFF "Diseases of Fish and Shellfish", 9-14 September 2001. - Dublin, Ireland, 2001. - P-271.

56. *Steinhauer D.A., Holland J.J.* Rapid evolution of RNA viruses // *Ann. Rev. Microbiol.* - 1987. - 41. - P. 409-433.

57. *Stone D.M., Ahne W., Denham K.L., Dixon P. F., Liu C.T.-Y., Sheppard A.M., Taylor G.R., Way K.* Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups // *Dis. Aquat. Org.* - 2003. - V. 53. - P. 203-210.

58. *Stone D. M., Way K., Dixon P.F.* Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) viruses from different geographic areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gadus morhua* L.) // *J. Gen. Virol.* -1997. V. 78. P. 1319-1326.

59. *Thiery R., de Boisseson C., Jeffroy J., Castric J., de Kinkelin P., Benmansour A.* Phylogenetic analysis of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates from France (1971-1999) // *Dis. Aquat. Org.* - 2002. - V. 52. - P. 29-37.

60. *Troyer R.M., LaPatra S.E., Kurath G.* Genetic analysis reveals unusually high diversity of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout aquaculture // *J. Gen. Virol.* - 2000. - V. 81. - P. 2823-2832.

61. *Troyer R.M., Kurath G.* Molecular epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus reveals complex virus traffic and evolution within southern Idaho aquaculture //

63. *Varadi L., Blokhin S., Pekar F., Szucs I., Csavas I.* Aquaculture development trends in the countries of the former USSR area // Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand. 20-25 February 2000 / Subasinghe R.P., Bueno P.B., Phillips M.J., Hough C., McGladdery S.E., Arthur J.R. (Eds.). - Bangkok: NACA and Rome: FAO, 2001. - P. 417-429.

64. *Vestergaard-Jorgensen P.E., Olesen N.J., Ahne W., Lorenzen N.* SVCV and PFR viruses: serological examination of 22 isolates indicates close relationship between the two fish rhabdoviruses // Viruses of Lower Vertebrates / Ahne, W., Kurstak E. (Eds.). - Berlin: Springer-Verlag, 1989. - P. 349-366.

65. *Walker P.J., Benmansour A., Calisher C.H., Dietzgen R., Fang R.X., Jackson A.O., Kurath G., Leong J.C., Nadin-Davies S., Tesh R.B., Tordo N.* Family Rhabdoviridae // The 7th Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses / van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wikner, R.B. (Eds.). - San Diego: Academic Press, 2000. - P. 563-583.

66. *Way K., Denham K.L., Dixon P. F., Longshaw C.B., Sheppard A.M., Stone D.M.* Atypical spring viraemia of carp virus (SVCV) isolated from carp imported into the UK: evidence from phylogenetic analysis of partial gene sequences for a number of distinct sub-groups of SVCV // Book of Abstracts of 11th Int. Conference of the EAAP "Diseases of Fish and Shellfish", 21-26 September 2003. - Malta, 2003. - P-79.

67. *Winton J.R.* Evolution of fish rhabdoviruses // Proceedings of the OJI International Symposium on Salmonid Diseases. - Sapporo, Japan: Hokkaido University Press, 1992. - P. 88-95.

68. *Winton J.R., Einer-Jensen K.* Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis and viral hemorrhagic septicemia // Molecular Diagnosis of Salmonid Disease / Cunningham C.O. (Ed.); Reviews: Methods and Technologies in Fish Biology and Fisheries, Vol.3 / Nielsen J.L.(Series Ed.). - Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. - P. 49-79.

69. *Wolf K.* Fish Viruses and Fish Viral Diseases. - Ithaca, NY: Cornell University Press, 1988. -476 pp.

**SPRING VIREMIA AND OTHERS RHABDOVIRUS FISH
DESEASES: FROM IMMUNOLOGICAL
TO MOLECULAR-GENETIC METHODS OF
DIAGNOSTICS I.S.SHCELKUNOV**

*The All-Russia scientific research institute of a fresh-water
fish facilities*

*Rybnoye, Dmitrow on the Moscow region, 141821,
vniiprh@dmitrow.ru*

Among activators of virus illnesses of fishes the rhabdovirus form group of the most dangerous pathogenes. The tendency to globalization their distributions recently is clearly traced. Reciprocal step on expansion of viruses becomes universal transition of research laboratories from immunological to the molecular-genetic methods of diagnostics based on use of polymerase chain reaction. The toolkit of molecular genetics shows unsurpassed opportunities in thin typing viral strain and observation of their movings, studying epizootology and evolutions of fish rhabdoviruses. Symbolizing transition to a new stage of infectious ichthyopathology, used methods are the powerful contribution to development of the international system of measures on preventive maintenance of fish epizooties in aquaculture.

УДК 597-12:576.85

**ИНФЕКЦИОННЫЙ НЕКРОЗ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ
ТКАНИ (ИHN) В ПОПУЛЯЦИИ НЕРКИ
ONCORHYNCHUS NERKA (WALBAUM)
ОЗЕРА НАЧИКИНСКОЕ (КАМЧАТКА)**

Е.В. Бочкова, С.Л. Рудакова

*Камчатский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии (КамчатНИРО),
683000, Петропавловск-Камчатский, ул. Набережная, 18
E-mail: kamniroe@elizovo.kamchatka.ru*

В июле 2003 г. провели вирусологическое обследование половозрелой нерки *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), отловленной на естественном нерестилище озера Начикинское (бассейн р. Большая). В результате исследований на линии клеток ЕРС выделили вирусный патоген, идентифицированный как вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV). Распространение вируса в пробах достигало 100% в овариальной жидкости и 83,3% во внутренних органах. В начале нояб-