

Раздел 2.4.

БОЛЕЗНИ МОЛЛЮСКОВ

ГЛАВА 2.4.0.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

ВВЕДЕНИЕ¹

Нижеследующая информация и процедуры подходят для патогенов из списка МЭБ и будут служить руководством для патологов, исследующих вспышки болезней моллюсков или проводящих процедуры эпиднадзора за болезнями. Однако следует проконсультироваться с опытными патологами моллюсков, если болезнь сохраняется или распространяется за пределы тех локаций, где она впервые была обнаружена.

1. Оценка состояния здоровья эпизоотологической единицы

1.1. Образцы материала, используемые для испытаний

Образцы материала зависят от вида, стадии жизни и размера животных, а также от цели тестирования (например, диагностика явно выраженной болезни или отбор проб для целевого надзора с целью демонстрации благополучия по определенной болезни). См. главы по отдельным болезням в данном *Руководстве по водным животным* для получения более подробной информации о требованиях к образцам.

1.2. Спецификации в зависимости от размера моллюска

1.2.1. Для перечисленных паразитов

1.2.1.1. Молодые особи размером менее 1 см

Образцом служит все животное целиком, необходимо удалить раковину или провести протокол декальцинации. Срезы должны быть подготовлены таким образом, чтобы включать большую часть органов. Это может означать необходимость приготовления двух срезов из каждого гистологического блока для получения органов из разных областей (например, расположенных вблизи поверхности или глубже в блоке).

1.2.1.2. Молодые и взрослые особи размером 1-6 см.

Образцом служит все животное целиком. Необходимо приготовить один или несколько срезов толщиной 3-5 мм, включающих губные щупальца, жабры и пищеварительную железу.

1.2.1.3. Моллюски размером более 6 см.

¹ NB: версия, принятая Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 года

Подготавливают несколько срезов, содержащих отдельные органы / ткани, включая мантию, жабры, пищеварительную железу, половые железы и почки.

1.2.2. При синдроме увядания морского ушка

Для ушка ≥ 20 мм: делают несколько поперечных срезов толщиной 3-5 мм, содержащих задний пищевод (пост-пищевод), пищеварительную железу и педальную мышцу.

1.2.3. Для герпесвирусных инфекций морского ушка

Приготавливают образец, как описано в разделе 1.2.2 выше, с добавлением дополнительного среза головы для получения церебрального ганглия и удалением нескольких участков ноги и аддукторного мышечного комплекса, включая один участок 0,25-1,0 см (длина зависит от максимальной длины ушка) сзади головы для получения педалных ганглий. Кроме того, следует сделать продольный срез от передней педалной ганглии до задней части педалных мышц. Для получения более подробной информации о пробоотборе, пожалуйста, обратитесь к разделу С общего введения к этому Разделу *Руководства по водным животным*: Часть 2. Рекомендации, применимые к конкретным болезням.

1.3. Спецификации в зависимости от популяций моллюска

Общие рекомендации можно найти в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (2009), а конкретные сведения о требованиях к образцам для конкретной болезни из списка - в главе по отдельным болезням настоящего *Руководства по водным животным*.

1. Обычно аквакультурные популяции моллюсков выращивают полуинтенсивно (в лотках, мешках, сетях или на веревках, кольях и с использованием методов донного выращивания), и они имеют обширное взаимодействие с природной средой;
2. Культивируемые популяции моллюсков часто имеют компоненты своего жизненного цикла, происходящие в диком состоянии (например, сбор дикой молодежи для дальнейшего выращивания), и такие популяции не всегда доступны для наблюдения и отбора проб;
3. В пределах одной юрисдикции может существовать несколько методов культивирования для одного и того же вида и таким образом представлять различные популяции в отношении характеристик риска;
4. Чрезвычайно большие географические районы могут включать в себя множество мелких смежных ферм или производственных единиц с различными формами собственности и управления. Это может создавать проблемы при разработке программ отбора проб на основании доли владения;
5. Моллюски могут быть неподвижными (например, взрослые устрицы) в некоторые моменты своего жизненного цикла и очень подвижными на других стадиях (например, личинки устриц);

6. Популяции моллюсков, особенно диких моллюсков, могут быть труднодоступны из-за их среды обитания (например, моллюски, способные заглубляться или сублитеральные популяции);
7. Географические районы часто включают многие виды и возрастные классы моллюсков, полученных из различных источников, что затрудняет идентификацию отдельных популяций моллюсков, на которые могут быть нацелены программы эпиднадзора;
8. Популяции диких моллюсков очень важны для статуса по болезни страны, но не всегда доступны для отбора проб в определенное время.

1.4. Спецификации в соответствии с клиническим статусом

В случае клинической инфекции, кроме целевых органов и тканей, необходимо также отбирать образцы таких органов, как мантия, щупальца и т. д., на которых видны макроскопические аномалии или повреждения. Для проведения теста(тестов) на патоген необходимо отобрать образцы от десяти больных или умирающих моллюсков. Следует также параллельно отбирать образцы ($n > 10$) от явно здоровых особей в одном и том же производственном регионе.

2. Общая обработка образцов

Все отобранные образцы моллюсков должны быть доставлены живыми в утвержденную диагностическую лабораторию. Лаборатория должна быть проинформирована о предполагаемом времени прибытия образца, чтобы иметь возможность подготовить необходимые материалы для обработки моллюсков до получения образцов.

Образцы моллюсков должны быть упакованы в соответствии с действующими стандартами, чтобы сохранить их живыми. Если место отбора проб находится на большом расстоянии от лаборатории, умирающие животные или животные с дурно пахнущими тканями могут оказаться малопригодными для последующего исследования. Необходимые образцы должны быть отправлены как можно скорее после сбора из воды, чтобы уменьшить накопление воздуха и возможную гибель во время транспортировки, особенно это касается умирающих больных моллюсков. Если не указано иное, умирающие животные должны быть помещены на лед (но не заморожены), чтобы замедлить разложение образца.

Для образцов, которые не могут быть доставлены в диагностическую лабораторию живыми, из-за поздней стадии болезни, большого расстояния или медленного транспортного сообщения и т. д. образцы должны быть зафиксированы на месте, как это рекомендовано в следующих разделах настоящей главы или в отдельных главах настоящего *Руководства по водным животным*. Хотя это подходит, например, для последующего гистологического или просвечивающего электронного микроскопического исследования, другие методы, такие как свежие мазки, отпечатки тканей, рутинная бактериология, микология или жидкая тиогликолатная культура *Perkinsus* spp *Perkinsus* spp. Рэя, не могут быть выполнены. Диагностические потребности и требования к образцу необходимо обсудить с диагностической лабораторией до сбора образца.

Образцы должны сопровождаться справочной информацией, включая причину подачи образца (эпиднадзор, аномальная смертность, аномальный рост и т. д.), макроскопические наблюдения и связанные с ними параметры окружающей среды, приблизительный уровень

распространенности и характер смертности, происхождение и природа моллюсков (вид, возраст, независимо от того, взяты ли образцы из местных популяций моллюсков или запасов, перенесенных с другого места, дата перевозки и местоположение источника и т.д.). Данная информация должна помочь выявить возможные изменения в обращении или условиях окружающей среды, которые могут быть фактором смертности в связи или нет с присутствием возбудителей инфекции.

2.1. Макроскопическое исследование

Макроскопическое наблюдение за моллюсками должно быть направлено, насколько это возможно, на поведение животных, поверхность раковины, внутреннюю оболочку и мягкие ткани.

Часто бывает трудно наблюдать за поведением моллюсков в открытых водах. Однако наблюдение за моллюсками в некоторых местах выращивания, таких как маточное стадо в резервуарах и личинки в инкубаториях, может дать полезные указания на изменения в поведении, связанные с болезнями. Если отмечаются признаки (например, предварительное оседание личинок на дне, накопление пищи в резервуарах, признаки ослабления и т.д.), образцы могут быть исследованы на наличие макроскопических признаков, включая наблюдение под препаровальной лупой для обнаружения аномалий и деформаций, организмов-обрастателей, и зафиксированы для дальнейшей обработки, как это рекомендовано ниже. Для взрослых и молодых особей признаки ослабления могут включать зияние, скопление песка, грязи и мусора в мантии и на жабрах, втягивание мантии от края раковины, снижение активности (плавание гребешка, зарывание моллюска, выпас морского ушка) и т. д. Выпрямляющий рефлекс ушка после переворачивания не возникает у ослабленных животных, и это хороший показатель слабости. Смертность в открытой воде необходимо мониторить на предмет паттерна потерь, а для дальнейшего анализа необходимо отбирать пробы. Необходимо регистрировать факторы окружающей среды до и после смерти.

Даже в условиях культивирования раковины моллюсков могут не быть чистыми, и организмы-обрастатели являются нормальными колонистами поверхности раковин моллюсков. Организмы, такие как усоногие, морские блюдечки, губки, многощетинковые черви, личинки двустворчатых моллюсков, оболочники, мшанки и т. д., как правило, не угрожают здоровью моллюсков. Такие системы культивирования, как суспензия и мелководная культура, могут даже увеличить воздействие организмов-обрастателей, и раковины могут быть покрыты другими животными и растениями. Это может непосредственно влиять на здоровье, препятствуя открытию и закрытию раковин, или косвенно - через конкуренцию за продовольственные ресурсы. Именно признаки ослабления, связанные с сильным обрастанием, а не само обрастание должно быть причиной для беспокойства. Повреждения скорлупы буровыми организмами, такими как губки и многощетинковые черви, обычно являются безопасными, но при определенных условиях могут достигать размеров, которые делают скорлупу хрупкой или пронзают мягкие ткани. Такая степень повреждения скорлупы может ослабить моллюска и сделать его восприимчивым к болезнетворным инфекциям. Необходимо отмечать деформацию оболочки (форма, отверстия на поверхности), хрупкость, поломку или восстановление, однако они не могут свидетельствовать о наличии болезни. Роящиеся эпибионты могут вызывать деформации и ослаблять оболочку(оболочки). Аномальная окраска и запах могут указывать на возможную инфекцию мягких тканей, которую необходимо исследовать в лаборатории.

Моллюсков следует вскрывать осторожно, чтобы не повредить мягкие ткани, в частности мантию, жабры, сердце и пищеварительную железу. Наличие организмов-обрастателей на внутренней поверхности оболочки - явный признак слабости. Внутренняя поверхность раковины обычно гладкая и чистая из-за действия мантии и жабр. Может произойти перфорация внутренней поверхности, но отверстие может быть запечатано благодаря осаждению дополнительного конхиолина и перламутра. Это может привести к образованию пузырей, заполненных грязью или водой. Пузыри могут также образовываться над поверхностными раздражителями, такими как инородные тела. Степень перфорации оболочки можно определить, поднеся оболочку к яркому свету. В тех случаях, когда аномалии, происходящие в матрице оболочки, требуют дальнейшего исследования, свежесобранные образцы могут быть доставлены неповрежденными в лабораторию или зафиксированы для последующей декальцинации, если это необходимо. Внешний вид мягких тканей часто указывает на физиологическое состояние животного. Мягкие ткани необходимо исследовать на наличие абсцессов, гнойничков, обесцвечивания тканей, жемчужин, отеков, общей прозрачности или водянистости, деформаций жабр и т. д. и, когда они обнаруживаются в сочетании со слабыми или умирающими животными, такие аномалии должны быть причиной для беспокойства.

Следует отметить и зафиксировать аномалии и повреждения тканей, а также любые деформации оболочки, наличие организмов-сверлильщиков и заметных обитателей мантии. Необходимо зарегистрировать уровни повреждения тканей, а образцы пораженных и незатронутых животных необходимо как можно скорее собрать для лабораторного исследования.

2.2. Изучение популяций, где происходит аномальная смертность

Смертность моллюсков обычно считается аномальной, если возникает внезапная массовая смертность, которая происходит за короткий промежуток времени между двумя наблюдениями или инспекциями популяций (например, около 15 дней в случае объектов, расположенных в приливной зоне). В инкубатории аномальная смертность приводит к невозможности последовательного производства личинок, происходящих из разных маточных стад. Учитывая широкий спектр видов, окружающей среды и условий культивирования, эти определения должны быть адаптированы, когда и где это необходимо.

Всякий раз, когда происходит аномальная смертность в популяциях моллюсков, необходимо срочно провести исследование для определения болезни.

Пробы должны быть отобраны, сохранены или зафиксированы и должны храниться в соответствии с процедурами, описанными в настоящем *Руководстве по водным ресурсам*.

Там, где и когда это возможно, непораженные или контрольные моллюски также должны быть зафиксированы для гистологического сравнения с аномальными тканями. Каким бы ни был фиксатор, важно, чтобы раковина была удалена, чтобы обеспечить легкий доступ фиксатора. Двустворчатые моллюски и брюхоногие моллюски могут держать раковину закрытой от фиксатора до тех пор, пока не начнется аутолиз.

2.3. Диагностические методы

Методы, применимые к возбудителям болезней моллюсков, ограничены непосредственным выявлением возбудителя. Классические серологические методы не могут быть использованы в диагностических целях, поскольку моллюски не вырабатывают антител. В дополнение к гистологии и цитологии для обнаружения возбудителей болезней из списка можно провести иммуноанализ с использованием моноклональных антител или зондов нуклеиновых кислот. С этой точки зрения разработка методов ДНК-диагностики возбудителей болезней моллюсков, безусловно, является наиболее значительным достижением последних лет. Учитывая развитие и потенциал широкого применения этих диагностических методов, а также проблемы, связанные с их использованием, вопрос валидации имеет первостепенное значение.

В нижеследующих разделах предлагаются три уровня процедур проверки. Гистология рекомендуется в качестве стандартного метода скрининга, поскольку она дает большой объем информации. Это особенно важно, потому что макроскопическое исследование обычно не дает никаких патогномоничных признаков или какой-либо надежной подтверждающей информации. Кроме того, смертность может быть вызвана несколькими возбудителями или физиологическими проблемами, такими как ухудшение состояния после нереста, и это может быть определено только с помощью гистологии. Скрининг (надзор) также регулярно проводится с помощью гистологических методов. Однако в зависимости от конкретной эпидемиологической ситуации и когда это оправдано, целенаправленный эпиднадзор может опираться на другие методы.

При возникновении аномальных вспышек смертности также рекомендуется использовать гистологические методы. В дополнение к гистологии могут быть использованы различные методы предварительной диагностики, при которых могут быть использованы тканевые отпечатки, культура жидкой тиогликолатной среды Рэя (RFTM), или полимеразная цепная реакция (ПЦР), как это рекомендуется в главах по отдельным болезням. Данные методы дают такие преимущества как быстрота и / или дешевизна процедур при подозрении на заражение конкретным возбудителем.

При обнаружении возбудителя болезни во время скрининга или вспышек смертности, в дополнение к электронной микроскопии, все чаще используют молекулярные методы для специфической идентификации. Некоторые из болезней моллюсков, включенных в список МЭБ, вызывают возбудители, принадлежащие к родам, охватывающим близкородственные виды. В следующих главах рекомендуются специальные протоколы, предназначенные для обнаружения определенных возбудителей, включенных в список, которые можно использовать для подтверждения результатов гистологического исследования и/или постановки видоспецифического диагноза.

2.4. Гистологические методы

Поскольку гистология широко используется в диагностических процедурах для определения болезней моллюсков, в этой главе приводится подробное техническое руководство.

Гистология - это метод, который используется для изучения структуры клеток и тканей под световым микроскопом. Подготовка тканей предполагает различные этапы, включая фиксацию тканей, обезвоживание, пропитку и встраивание образцов,

подготовку срезов, окрашивание и нанесение на предметное стекло.

Живые умирающие животные или только что умершие (в течение нескольких минут) животные обеспечивают оптимальные условия для сбора тканей. Следует избегать использования замороженных образцов из-за лизиса тканей, который происходит во время цикла замораживания-оттаивания. В случае задержки между гибелью животных и отбором проб рекомендуется хранить животных нетронутыми на льду или в холодильнике. Необходимо сделать стандартный срез через пищеварительную железу, чтобы включить жабры, мантию и щупальца, где это возможно. В качестве альтернативы для образцов большего размера следует сделать несколько срезов, чтобы включить все важные ткани.

2.4.1. Фиксация тканей

Роль фиксатора заключается в поддержании морфологии тканей как можно ближе к морфологии *in-vivo* и предотвращении некроза после взятия пробы. Рекомендуемыми фиксаторами, используемыми для изучения морских моллюсков, являются раствор Дэвидсона и раствор Карсона для крупных образцов. Для небольших образцов можно использовать глутаральдегидные фиксаторы, совместимые с электронной микроскопией. Соотношение фиксатора к объему ткани должно быть не менее 10:1 для обеспечения хорошей фиксации. Можно использовать не формальдегидные консерванты в соответствии с инструкциями производителя. Их следует использовать с осторожностью до тех пор, пока пользователь не будет удовлетворен результатами. Исследователь должен сам проверить может ли заменитель формальдегида использоваться таким же образом, как и формальдегид.

Раствор Дэвидсона:

Морская вода	1200 мл
95% спирт	1200 мл
36-40% формальдегид ²	800 мл
Глицерин	400 мл
Ледяная уксусная кислота	10% (добавить экстенпорально)

Раствор Карсона:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	23,8 г
Гидроксид натрия (NaOH)	5,2 г
Дистиллированная вода	900 мл
40% формальдегид ¹	100 мл
Довести pH до 7,2-7,4	

² Насыщенный 37-39% водный раствор формальдегидного газа

** Исходный раствор 1G4F (может храниться при температуре 4°C до 3 месяцев):*

37-40%-ый буферный раствор формалина**	120 мл
50% глутаровый альдегид	20 мл
Водопроводная вода	360 мл

*** Буферный раствор формалина:*

37-40% формальдегида	1 литр
Динатрийфосфат (Na ₂ HPO ₄)	15 г
NaOH	0,06 г
Феноловый красный (индикатор pH)	0,03 г

Рабочий раствор (должен быть приготовлен непосредственно перед использованием):

Профильтрованная морская вода комнатной температуры	500 мл
Исходный раствор 1G4F*	500 мл

Универсального фиксатора не существует, и выбор необходимо делать с учетом последующего использования зафиксированного материала, а также практических аспектов использования фиксатора (цена, доступность компонентов и т. д.). Раствор Дэвидсона - отличный выбор для сохранения структуры тканей. Кроме того, срезы ткани, зафиксированные в растворе Дэвидсона, могут быть окрашены позже различными гистохимическими методами, а также могут быть использованы для гибридизации *in-situ* с ДНК-зондами. Для этой цели следует избегать чрезмерной фиксации (более 24-48 часов). Раствор Карсона может быть не так хорошо подходит для гистологического анализа, как раствор Дэвидсона. Тем не менее, он позволяет хорошо сохранять ультраструктуру и может быть использован для сохранения образцов для последующего изучения с помощью электронной микроскопии. 1G4F также обеспечивает гибкость при сохранении тканей как для гистологии, так и для электронной микроскопии, но оптимальная толщина ткани составляет 2-3 мм. 1G4F дает высококачественные гистологические слайды и хорошие электронные микрофотографии. Поскольку электронная микроскопия может быть ценным дополнением в диагностике или подтверждении инфекций у моллюсков, можно рассмотреть фиксацию некоторых образцов (особенно небольших образцов) с помощью глутарового альдегида, как описано в разделе 2.5.1 настоящей главы, которая дает высочайшее качество электронных микрофотографий. В противном случае материал, зафиксированный в растворе Карсона и содержащий достаточные уровни целевых агентов болезни или аномалий, можно повторно зафиксировать в глутаровом альдегиде. Для дальнейшего расследования рекомендуется зафиксировать одну часть моллюска в растворе Дэвидсона, а другую - в растворе Карсона или 1G4F. Это должно быть сделано для того, чтобы обеспечить фиксацию всех тканей/органов в двух фиксаторах. Если нет ни того, ни другого, то достаточно 10% формалина, забуференного фильтрованной морской водой. В каждой стране представители индустрии аквакультуры моллюсков должны договориться о наиболее эффективном способе фиксации.

2.4.2 Обезвоживание, пропитка и встраивание образцов

Встраивание образцов в парафин требует нескольких этапов, в течение которых вода, содержащаяся в тканях, постепенно заменяется сначала спиртом, затем ксилолом или

эквивалентным менее токсичным очищающим раствором и, наконец, парафином.

После фиксации образцов в растворе Дэвидсона, Карсона или 1G4F их переносят через серию спиртов повышающейся концентрации (70-95 [об/об]) до окончательного обезвоживания в абсолютном этаноле. Спирт, содержащийся в тканях, затем удаляют путем их погружения в ксилол. Затем ткани пропитывают парафином, который растворяется в ксилоле при температуре 60°C. Все эти этапы могут быть выполнены автоматически с помощью устройства для обработки тканей. В случае задержки обработки сохраненные ткани можно хранить в 70% этаноле.

Блоки производят путем охлаждения тканей в формах, заполненных парафином, на охлаждающем столе; охлаждение и увлажнение необходимы для приготовления срезов.

2.4.3. Приготовление срезов

После охлаждения блоков на холодной пластине, которая позволяет парафину затвердеть, с помощью микротомы делают гистологические срезы толщиной примерно 2-5 мкм. Срезы извлекают на гистологические предметные стекла, отводят влагу и сушат в течение 1 часа при температуре 40-42°C или в течение ночи при комнатной температуре. Сушка образцов позволяет устранить избыточную влагу, и таким образом секции прилипают к предметным стеклам.

2.4.4. Окрашивание и нанесение образца на предметное стекло

Перед окрашиванием парафин удаляют из срезов путем погружения их в ксилол или эквивалентный менее токсичный очищающий раствор на 10-20 минут. Это повторяют один раз, а затем растворитель удаляют путем последовательного погружения в две ванны с абсолютным спиртом (на 10 минут в каждую); затем их регидратируют путем последовательного погружения в ванны с этанолом в нисходящей концентрации (например, 95%, 70%, 50%, 30%, на 10 минут в каждую) с окончательным погружением в ванну с водопроводной водой на 10 минут. Затем можно использовать различные топографические или гистохимические методы окрашивания.

При проведении гематоксилин-эозинового (H&E) окрашивания (гематоксилин или его эквивалент) ядерные и базофильные структуры окрашиваются от синего до темно-фиолетового цвета, эндоплазматический ретикулум окрашивается в синий цвет, а цитоплазма приобретает серый цвет. Кислотный краситель эозин окрашивает другие структуры в розовый цвет. Этот метод окрашивания прост и воспроизводим, и, хотя он дает только ограниченную дифференцировку клеточных структур, можно обнаружить любые аномалии в тканях и клеточной структуре. При необходимости, для демонстрации определенных структур или особенностей (например, трихром для соединительной ткани и цитоплазматических гранул) можно использовать другие методы.

2.5. Методы просвечивающей электронной микроскопии

Поскольку просвечивающая электронная микроскопия очень часто используется для подтверждения идентификации возбудителей болезней в диагностических процедурах, в этой главе приводятся подробные технические рекомендации.

Фиксация для электронной микроскопии должна быть проведена сразу после того, как животное было убито, до фиксации для гистологии. Только образцы, быстро взятые от живых животных, могут иметь какую-либо пользу. Подготовка образцов для электронной микроскопии включает в себя следующие этапы: фиксацию тканей, декальцинацию образцов (при необходимости), дегидратацию, пропитку и встраивание образцов, подготовку и контрокрашивание срезов.

2.5.1. Фиксация тканей

Для тканей, которые должны быть исследованы с помощью электронной микроскопии, важно, чтобы фиксация была выполнена правильно, чтобы нанести как можно меньше повреждений ультраструктуре. Образцы нарезают таким образом, чтобы их размеры не превышали 1-2 мм. Этот небольшой размер позволяет различным растворам быстро проникать в образец.

Фиксация образцов осуществляется непосредственно в 3% глутаровом альдегиде в течение 1-4 часов. Образцы промывают в буфере три раза, затем фиксируют в 1% - ной осминовой кислоте (водный раствор OsO₄) и снова дважды промывают в буфере. Различные составы глутаральдегидного фиксатора и буферов работают одинаково хорошо.

Чтобы нанести как можно меньше повреждений ультраструктуре, образцы обрабатывают растворами, имеющими осмолярность, близкую к осмолярности тканей. Таким образом, ткани моллюсков обрабатывают растворами с осмолярностью около 1000 миллиосмоль. Осмолярность растворов регулируется искусственными морскими солями или NaCl. Поскольку ткани моллюсков почти изоосмотичны с морской водой, можно сделать глутаровый альдегид с фильтрованной морской водой (0,22 мкм) и использовать фильтрованную морскую воду для последующих промывок.

Какодилат натрия дистиллированной воды	0,4 М: 8,6 г в 100 мл
Хлорид натрия	10% в дистиллированной воде
<i>Какодилатный буфер, рН 7,4:</i>	
1000 миллиосмоль	
Какодилат натрия	50 мл от 0,4 М исходного раствора
NaCl	20 мл из 10% - го исходного раствора
Дистиллированная вода	30 мл
Довести рН до 7,4	
<i>3% глутаральдегид:</i>	
1000 миллиосмоль	
25% глутаральдегид	2.5 мл
0,4 М какодилата натрия	5 мл
10% NaCl	3.5 мл
Дистиллированная вода	9 мл
<i>1% осмиевая кислота:</i>	
1000 миллиосмоль	
4% осмиевая кислота	1 объем
0,4 М какодилата натрия	1 объем

NaCl	1 объем от 10% исходного раствора
Дистиллированная вода	1 объем
<i>5% этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА):</i>	
Динатрий ЭДТА	5 г
Какодилатный буфер	100 мл

ЭДТА растворяется при рН выше 8. Когда раствор становится прозрачным, необходимо довести рН до 7,4, добавив концентрированный HCl.

Если образцы были предварительно зафиксированы и хранились в растворе Карсона, их следует несколько раз промыть в ванне с буфером перед фиксацией 3% - ным глутаровым альдегидом. Ткани хранившиеся в IG4F могут быть непосредственно пост-фиксированы в 1% растворе осмиевой кислоты.

2.5.2. Обезвоживание, пропитка и встраивание образцов

Образцы обезвоживают в последовательных ваннах с этанолом: 70% этанол - один раз, 95% этанол - два раза, абсолютный этанол - три раза. Дегидратация завершается двумя ваннами пропиленоксида, что позволяет проводить последующую пропитку Epon или другой смолой.

Образцы пропитывают постепенно. После первой ванны со смесью полипропиленоксид-Epon (50/50) образцы помещают в ванну с Epon. Чем дольше инкубация, тем лучше происходит пропитка тканей.

Встраивание осуществляется путем помещения образцов в формы, заполненные смолой Epon. Этикетку, идентифицирующую образец, включают в каждый блок, и затем блоки выдерживают при температуре 60°C (температура, при которой полимеризуется смола Epon) в течение 48 часов.

2.5.3. Подготовка секций и контрокрашивание

Блоки разрезают до соответствующих размеров лезвием бритвы, а затем срезы нарезают с помощью ультра-микротом. Полутонкие срезы (0,5-1 мкм) нарезают и помещают на стеклянные предметные стекла. Они будут использоваться для контроля качества образцов с помощью световой микроскопии и поиска интересующих областей на срезе.

Полутонкие срезы окрашивают при температуре 90-100°C помощью 1% - ого раствора толуйдинового синего. После высыхания на предметное стекло накладывают покровное стекло и закрепляют его каплей синтетической смолы, и рассматривают под световым микроскопом.

Ультратонкие срезы толщиной 80-100 Нм помещают на медные сетки для электронно-микроскопического анализа. Для контрокрашивания ультратонких участков используют уранилацетат и цитрат свинца.

2.6. Молекулярные методы

Преимуществом молекулярных методов является их чувствительность, однако, с другой стороны, очень часто возникают технические проблемы. ПЦР особенно зависит от

условий, в которых она выполняется, и может давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты. Всякий раз, когда используются молекулярные методы, они должны выполняться с осторожностью и с особым вниманием к включению подходящего положительного и отрицательного контроля для преодоления возможного недостатка надежности, а также для поддержания адекватной точности. Важно признать, что ПЦР и анализы на основе последовательностей обнаруживают только нуклеиновую кислоту патогена и не указывают на наличие живого паразита или наличие инфекции и болезни. Однако использование ПЦР-анализа на основе РНК может указывать на наличие живого паразита, но все равно не подтвердит наличие инфекции или болезни.

Для подтверждения идентификации возбудителей болезни все чаще используют ПЦР, ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), секвенирование, гибридизацию *in-situ* и иммуногистохимию. Для этих методов образцы должны быть подготовлены таким образом, чтобы сохранить ДНК патогена. Аналогичным образом должны быть сохранены образцы, предназначенные для тестирования методами, основанными на антителах, чтобы сохранить реактивные антигенные участки для используемых антител.

2.6.1. Подготовка образцов

Образцы, отобранные для диагностических тестов на основе ДНК или антител, должны быть обработаны и упакованы с максимальной осторожностью, чтобы свести к минимуму вероятность перекрестной контаминации между образцами или разрушения до проведения анализа. Для предотвращения контаминации следует использовать новые контейнеры (пластиковые пакеты для образцов или флаконы). Внутри каждой упаковки или контейнера для каждого набора образцов должна быть помещена водостойкая этикетка с заполненными соответствующими данными. Необходимо избегать использования бытовых перманентных маркеров (например, Sharpies), так как их чернила растворяются в этаноле, который используется в молекулярных методах, что может привести к порче этикетки. Карандаш или гистологические ручки можно использовать только для маркировки флаконов или банок.

Некоторые подходящие методы сохранения и транспортировки образцов для проведения тестов на основе молекулярных методов или антител включают:

2.6.1.1. Живые замороженные образцы или охлажденные образцы

Что касается образцов, которые можно быстро транспортировать в лабораторию для тестирования в течение 24 часов - их необходимо упаковать в пакеты для образцов; упакованные образцы необходимо обложить достаточным количеством влажного льда в термоизолированном контейнере, и отправить в лабораторию.

2.6.1.2. Целые замороженные образцы

Живые образцы отбирают в соответствии с целью отбора проб, подвергают быстрой заморозке с помощью дробленого сухого льда (в полевых условиях) или в механической морозильной камере (в полевых лабораториях) при температуре -20°C или ниже. В контейнер с образцами вставляют заранее подготовленную этикетку, образцы упаковывают с достаточным количеством сухого льда в термоизолированный контейнер и отправляют в лабораторию.

2.6.1.3. Образцы, консервированные спиртом

В регионах, где хранение и транспортировка замороженных образцов проблематичны, для консервации, хранения и транспортировки определенных типов образцов можно использовать 90-100% неденатурированный этанол (т.е. этанол без метанола). Например, целые моллюски (когда образец маленький) и ткани от более крупных моллюсков. Упаковка для отправки осуществляется в соответствии с описанными выше способами.

2.6.1.4. Фиксированные ткани для гибридизации *in-situ* и иммуногистохимии

Для этого достаточно классических методов сохранения тканей. Раствор Дэвидсона обычно является хорошим выбором для последующего использования молекулярных зондов. В частности, что касается ДНК - следует избегать чрезмерной фиксации (в течение 24-48 часов).

2.7. Выделение ДНК

Для экстрагирования ДНК в ткани, гомогенизированные в 9 объемах экстракционного буфера (NaCl [100 ммоль], ЭДТА [25 ммоль], pH 8, додецилсульфат натрия [SDS, 0,5%]), добавляют протеиназу К (100 мкг мл⁻¹). После инкубации в течение ночи при температуре 50°C ДНК экстрагируют по стандартному протоколу фенол / хлороформ и осаждают этанолом.

Учитывая временные ограничения и риски для сотрудников лабораторий, имеющиеся в продаже наборы могут служить удовлетворительной технической альтернативой. Использование коммерческих наборов должно быть валидировано путем сравнения со стандартным протоколом фенол / хлороформ до их рутинного использования в диагностических лабораториях.

Для извлечения РНК используют 1 мл Tri Reagent (Trizol) на 50 мг ткани, 5-10 × 10⁶ клеток или 10 см² культуральный планшет. Образцы гомогенизируют и оставляют при комнатной температуре на 5 минут, чтобы обеспечить диссоциацию нуклеопротеиновых комплексов. Добавляют 200 мкл хлороформа, энергично встряхивают и оставляют на 15 минут при комнатной температуре. Центрифугируют при 12000 g в течение 15 минут при 4°C. Водную фазу переносят в свежую пробирку и осаждают РНК из водной фазы, осторожно смешивая с 0,5 мл изопропанола на 1 мл Tri Reagent. Образцы хранят при комнатной температуре в течение 10 минут и центрифугируют при 12000 g в течение 8 минут при 4°C. Удаляют супернатант и промывают осажденную РНК 75%-ым этанолом с последующим центрифугированием при 7500 g в течение 5 минут при 4°C. РНК можно растворить в воде или другом соответствующем растворе.

2.8. Подготовка слайдов для гибридизации *in-situ*

Для гибридизации *in situ* моллюски фиксируют в фиксаторе Дэвидсона примерно на 24 часа, а затем погружают в парафин в соответствии с описанными выше методами гистологии. Делают срезы толщиной 5 мкм и помещают на покрытые аминоалкилсиланом предметные стекла, которые затем сушат в течение ночи при

комнатной температуре или в духовке при температуре 40°C. Срезы депарафинизируют путем погружения в ксилол на 10 минут. Эту стадию повторяют один раз, а затем растворитель удаляют путем погружения в две последовательные ванны с абсолютным этанолом на 10 минут в каждую. Затем секции регидратируют путем последовательного погружения в ванны с этанолом в нисходящей концентрации. Протокол может потребовать проведения мембранной пермеабилзации, позволяющей получить доступ к целевой ДНК. Для этого срезы обрабатывают протеиназой К (100 мкг мл⁻¹) в ТЕ-буфере (Трис [50 ммоль], ЭДТА [10 ммоль]) при 37°C в течение 10-30 минут.

3. КЛЮЧЕВЫЕ ССЫЛКИ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ЧТЕНИЯ

ALMEIDA M., BERTHE F., THEBAULT A. & DINIS M.T. (1999). Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture*, **177**, 325–332.

ANDERSON T.J., MCCAUL T.F., BOULO V., ROBLEDO J.A.F. & LESTER R.J.G. (1994). Light and electron immunohistochemical assays on paramyxean parasites. *Aquat. Living Resour.*, **7**, 47–52.

ANDREE K.B., FRIEDMAN C.S., MOORE J.D. & HEDRICK R.P. (2000). A polymerase chain reaction for detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with Withering Syndrome in Black Abalone (*Haliotis cracherodii*). *J. Shellfish Res.*, **19**, 213–218.

AZEVEDO C., CORRAL L. & CACHOLA R. (1990). Fine structure of zoosporulation in *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa: Perkinsea). *Parasitology*, **100**, 351–358.

BALSEIRO P., ARANGUREN R., GESTAL C., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2006). *Candidatus Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture*, **258**, 63–72.

BERTHE F.C.J., BURRESON E. & HINE M. (1999). Use of molecular tools for mollusc disease diagnosis. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **19** (6), 277–278.

BERTHE F.C.J., LE ROUX F., ADLARD R.D. & FIGUERAS A.J. (2004). Marteiliosis of molluscs: a review. *Aquat. Living Resour.*, **17** (4), 433–448.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Asian Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, No. 402, supplement 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 240 pp.

BOULO V., MIALHE E., ROGIER H., PAOLUCCI F. & GRIZEL H. (1989). Immunodiagnosis of *Bonamia ostreae* (Ascetospora) infection of *Ostrea edulis* L. and subcellular identification of epitopes by monoclonal antibodies. *J. Fish Dis.*, **12**, 257–262.

BOWER S.M., MCGLADDERY S.E. & PRICE I.M. (1994). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **4**, 1–199.

BURRESON E.M. & FORD S.E. (2004). A review of recent information on the *Haplosporidia*, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquat. Living Resour.*, **17** (4), 499–517.

BUSHEK D., FORD S.E. & ALLEN SK (1994). Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Ann. Rev. Fish Dis*, **4**, 201–207.

CARNEGIE R.B., BARBER B.J., CULLOTY S.C., FIGUERAS A.J. & DISTEL D.L. (2000). Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the *Haplosporidia*. *Dis. Aquat. Org*, **42**, 199–206.

CARNEGIE R.B. & COCHENNEC-LAUREAU N. (2004). Microcell parasites of oysters: recent insights and future trends. *Aquat. Living Resour*, **17** (4), 519–528.

CHANG P.H., KUO S.T., LAI S.H., YANG H.S., TING Y.Y., HSU C.L. & CHEN H.C. (2005). Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Halitotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 23–27.

COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F. & GERARD A. (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.*, **76**, 26–32.

CORBEIL S., COLLING A., WILLIAMS L.M., WONG F.Y.K., SAVIN K., WARNER S., MURDOCH B., COGAN N.O.I., SAWBRIDGE T.I., FEGAN M., MOHAMMAD I., SUNARTO A., HANDLINGER J., PYECROFT S., DOUGLAS M., CHANG P.H. & CRANE M.St.J. (2010). Development and validation of a TaqMan® PCR assay for the Australian abalone herpes-like virus. *Dis. Aquat. Org*, **92**, 1–10.

CRANFIELD H.J., DUNN A., DOONAN I.J. & MICHAEL K.P. (2005). *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES J. Mar. Sci.*, **62** (1), 3–13.

DAVISON A.J., TRUS B.L., CHENG N., STEVEN A.C., WATSON M.S., CUNNINGHAM C., LE DEUFF R.M. & RENAULT T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.*, **86**, 41–53.

DIGGLES B.K., COCHENNEC-LAUREAU N. & HINE P.M. (2003). Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosus* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Aquaculture*, **220**, 145–156.

DINAMANI P., HINE P.M. & JONES J.B. (1987). Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 37–44.

DUNGAN C.F. & ROBERSON B.S. (1993). Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 9–22.

ELSTON R.A. (1999). Health Management, Development and Histology of Seed Oysters. World Aquaculture Society., Baton Rouge, Louisiana, USA, 110 pp.

FARLEY C.A., WOLF P.H. & ELSTON R.A. (1988). A long-term study of 'microcell' disease in oysters with a description of new genus *Mikrocytos* (g.n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp.n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fish. Bull.*, **86**, 581–593.

FONG D., RODRIGUEZ R., KOO K., SUN J., SOGIN M.L., BUSHEK D., LITTLEWOOD D.T.J. & FORD S.E. (1993).

Small subunit ribosomal RNA gene sequence of the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **2**, 346–350.

FORD S.E. (1992). Avoiding the transmission of disease in commercial culture of molluscs, with special reference to

Perkinsus marinus(Dermo) and *Haplosporidium nelsoni*(MSX). *J. Shellfish Res.*, **11**, 539–546.

FRIEDMAN C.S., ANDREE K.B., BEAUCHAMP K.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P.

(2000). “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*” a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 847–855.

FRIEDMAN C.S., BIGGS W., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2002). Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *J. Shellfish Res.*, **21** (2), 817–824.

GALTSOFF P.S. (1964). The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bull.*, **64**, 480 pp.

GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J-R, COUSSERANS F., DUTHOIT J.L. & LE PENNEC M.A. (1974). Recherche sur

l’agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *science et Pêche. Bull Inst. Pêches marit.*, **240**, 7– 30.

GRIZEL H., MIALHE E., CHAGOT D., BOULO V. & BACHÈRE E. (1988). Bonamiasis: a model study of diseases in marine molluscs. *In: Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs*, Fisher W.S., ed. American Fisheries Society Special Publication 18. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA, 1–4.

HERVIO D., BOWER S.M. & MEYER G.R. (1996). Detection, isolation, and experimental transmission of *Mikrocytos mackini*, a microcell parasite of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Invertebr. Pathol.*, **67**, 72–79.

HINE P.M., BOWER S.M., MEYER G.R., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J.

(2001). The ultrastructure of *Mikrocytos mackini*, the cause of Denman Island disease in oysters *Crassostrea* spp. and *Ostrea* spp. in British Columbia, Canada. *Dis. Aquat. Org.*, **45**, 215–227.

HINE P.M. & THORNE T. (2000). A survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **40**, 67–78.

HOOPER C., HARDY-SMITH P. & HANDLINGER J. (2007). Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevigata* and *Haliotis rubra*). *Aus. Vet. J.*, **85**, 188–193.

HOWARD D.W. LEWIS E.J., KELLER J. & SMITH C.S. (2004). Histological techniques for marine bivalve molluscs and crustaceans. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5. National Oceanic and Atmospheric Administration, Honolulu, HI, USA, 218 pp.

KLEEMAN S.N., LE ROUX F., BERTHE F. & ADLARD R.D. (2002). Specificity of PCR and

in situ hybridization assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*. *Parasitology*, **125**, 131–141.

KOTOB S., MCLAUGHLIN S.M., VAN BERKUM P. & FAISAL M. (1999). Discrimination between two *Perkinsus* spp. isolated from the softshell clam, *Mya arenaria*, by sequence analysis of two internal transcribed spacer regions and the 5.8S ribosomal RNA gene. *Parasitology*, **119**, 363–368.

LE DEUFF R.-M. & RENAULT T. (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Gen. Virol.*, **80**, 1317–1322.

LE ROUX F., AUDEMARD C., BARNAUD A. & BERTHE F. (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Mar. Biotechnol.*, **1**, 588–597.

LE ROUX F., LORENZO G., PEYRET P., AUDEMARD C., FIGUERAS A., VIVARES C., GOUY M. & BERTHE F. (2001). Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **48**, 449–454.

LESTER R.J.G. & DAVIS G.H.G. (1981). A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.*, **37**, 181–187.

LONGSHAW M., FEIST S.W., MATTHEWS R.A. & FIGUERAS A. (2001). Ultrastructural characterization of *Marteilia* species (Paramyxia) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 137–142.

MCDOWELL E. & TRUMP B.F. (1976). Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **100**, 405–414.

MIALHE E., BACHERE E., BOULO V., CADORET J.P., ROUSSEAU C., CEDENO V., SARAIVA E., CARRERA L., CALDERON J. & COLWELL R.R. (1995). Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. *Molec. Mar. Biol. Biotechnol.*, **4**, 275–283.

MURRELL A., KLEEMAN S.N., BARKER S.C. & LESTER R.J.G. (2002). Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester & Davis, 1981 and *P. atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **22**, 258–265.

OSSIANDER F.J. & WEDEMEYER G. (1973). Computer program for sample size required to determine disease incidence in fish populations. *J. Fish. Res. Board Can.*, **30**, 1383–1384.

PÉPIN J. F., RIOU A. & RENAULT T. (2008). Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J. Virol. Methods*, **149**, 269–276.

RAY S.M. (1966). A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications. *Proc. Natl Shellfish Assoc.*, **54**, 55–69.

REECE K., SIDDALL M.E., BURRESON E.M. & GRAVES J.E. (1997). Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *J. Parasitol.*, **83**, 417–423.

- RENAULT T., LE DEUFF R.-M., COCHENNEC N. & MAFFART P. (1994). Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France – comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **145**, 735–742.
- RENAULT T., LE DEUFF R.-M., LIPART C. & DELSERT C. (2000). Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Methods*, **88**, 41–50.
- RODRIGUEZ F. & NAVAS J.L. (1995). A comparison of gill and haemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Aquaculture*, **132**, 145–152.
- SAVIN K.W., COCKS B.G., WONG F., SAWBRIDGE T., COGAN N., SAVAGE D. & WARNER S. (2010). A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Virol. J.*, **7**, 308.
- SEGARRA A., PEPIN J.F., ARZUL I., MORGA B., FAURY N. & RENAULT T. (2010). Detection and description of a particular *Ostreid herpesvirus 1* genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.*, **153**, 92–99.
- STOKES N.A. & BURRESON EM (1995). A sensitive and specific DNA probe for the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **42**, 350–357.
- TAN J., LANCASTER M., HYATT A., VAN DRIEL R., WONG F. & WARNER S. (2008). Purification of a herpes-like virus from abalone (*Haliotis* spp.) with ganglioneuritis and detection by transmission electron microscopy. *J. Virol. Methods*, **149**, 338–341.
- THOESON J.C. (1994). Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens, Fifth Edition. Bluebook, American Fisheries Society, Bethesda, USA.
- VILLALBA A., REECE K.S., ORDÁS M.C., CASAS S.M. & FIGUERAS A. J. (2004). Perkinsosis in molluscs. *Aquat. Living Resour.*, **17** (4), 411–432.
- WALKER P. & SUBASINGHE R.P. (2000). DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, n°395, 93 pp.
- YARNALL H.A., REECE K.S., STOKES N.A. & BURRESON E.M. (2000). A quantitative competitive polymerase chain reaction assay for the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *J. Parasitol.*, **86**, 827–837.

*

* *