

## ИНФЕКЦИЯ *PERKINSUS MARINUS*

---

### 1. Сфера применения<sup>1</sup>

Применительно к настоящей главе, инфекция *Perkinsus marinus* означает инфекцию *P. marinus*. Данный паразит вызывает дерматологическую болезнь у устриц.

### 2. Информация о болезни

#### 2.1. Особенности возбудителя

##### 2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

Этиологический агент представлен всеми штаммами *Perkinsus marinus*.

##### 2.1.2. Выживание вне хозяина

Максимальное время выживания вне хозяина неизвестно.

##### 2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

*Perkinsus marinus* относительно стабилен благодаря толстой клеточной оболочке. Было продемонстрировано, что высушивание, обработка хлором (>0,3 мг/мл = 300 частей на миллион), УФ-излучение (>28 000 мкВт/см<sup>2</sup>) и пресная вода инактивируют клетки *P. marinus* (Bushek *с соавт.*, 1997; Bushek & Howell, 2000). Ультрафиолетовое облучение от 4000 до 14000 мкВт/см<sup>2</sup> препятствует размножению *P. marinus* (Bushek & Howell, 2000).

##### 2.1.4. Жизненный цикл

Жизненный цикл прямой, от хозяина к хозяину, и все стадии развития паразита являются контактозными (Andrews, 1996; Villalba *с соавт.*, 2004).

#### 2.2. Особенности хозяина

##### 2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Американская устрица (*Crassostrea virginica*), тихоокеанская устрица (*C. gigas*), устрицы Suminoe (*C. ariakensis*), мангровая устрица (*C. rhizophorae*), устрица *C. corteziensis* (Andrews, 1996; Calvo *с соавт.*, 1999; Calvo *с соавт.*, 2001; Villalba *с соавт.*, 2004; Cáceres-Martínez *с соавт.*, 2008); песчаная ракушка (*Mya arenaria*); балтийский моллюск (*Macoma balthica*) (Dungan *с соавт.*, 2007).

##### 2.2.2. Стадии развития хозяев, когда они наиболее восприимчивы к инфекции

Все стадии после оседания молоди устриц являются восприимчивыми.

##### 2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

*Crassostrea virginica* - наиболее восприимчивый вид; *C. gigas* и *C. ariakensis* могут инфицироваться, но инфекция обычно протекает в легкой форме (Calvo *с соавт.*, 1999; Calvo *с соавт.*, 2001). Превалентность среди *M. arenaria* и *M. balthica* в природе составляет

---

<sup>1</sup> Примечание: Версия утверждена Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 г.

менее 10% (Reece *с соавт.*, 2008). Инфекция *Perkinsus marinus* у *C. corteziensis* требует дополнительных исследований, но данный хозяин, по-видимому, занимает промежуточное положение по восприимчивости между *C. virginica* и азиатскими видами *C. gigas* и *C. ariakensis* (Cáceres-Martínez *с соавт.*, 2008; Dungan *с соавт.*, 2007).

#### **2.2.4. Органы-мишени и инфицируемые ткани**

Эпителий кишечника, соединительная ткань всех органов и гемоциты (Maskin, 1951).

#### **2.2.5. Персистентная инфекция с пожизненным носительством**

Инфекция *P. marinus* часто является смертельной в зависимости от хозяина и условий окружающей среды (Andrews, 1996; Burreson & Ragone Calvo, 1996). Персистентная инфекция с пожизненным носительством возможна.

#### **2.2.6. Переносчики инфекции**

Переносчиков инфекции не требуется: жизненный цикл прямой.

#### **2.2.7. Известные или потенциальные носители среди диких водных животных**

Неизвестно.

### **2.3. Модель болезни**

#### **2.3.1. Механизмы передачи**

Передача паразита происходит напрямую от хозяина к хозяину. Все стадии жизни контагиозны (Villalba *с соавт.*, 2004). Жизнеспособные клетки выходят с фекалиями хозяина (Bushek *с соавт.*, 2002b) или после смерти хозяина, и заражение ими происходит при заглатывании моллюском пищи.

#### **2.3.2. Превалентность**

Превалентность варьируется в зависимости от солености и особенностей хозяина, но у *C. virginica* она часто достигает 100%. Предполагается, что превалентность выше у особей, подвергавшихся воздействию патогена в течение более 1 года (Andrews, 1996; Burreson & Ragone Calvo, 1996). Превалентность у двустворчатых моллюсков низкая, обычно менее 10%.

#### **2.3.3. Географическое распределение**

Восточное побережье Северной Америки от штата Мэн, США, до Кампече, Мексика. Недавно произошел занос паразита на тихоокеанское побережье Мексики (Cáceres-Martínez *с соавт.*, 2008).

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

Инфекция у *C. virginica* часто бывает смертельной. Гибель обычно наступает через 1-2 года после заражения, во время или вскоре после периода, когда температура воды достигает самых высоких годовых значений (Burreson & Ragone Calvo, 1996). Интенсивность инфекции у двустворчатых моллюсков очень низкая, и признаки смертности отсутствуют.

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

Превалентность и интенсивность инфекций, вызываемых *P. marinus*, достигают максимума при солености выше 12 практических единиц солёности (ПЕС). Передача может

происходить в диапазоне от 9 до 12 ПЕС, но интенсивность инфекции остается низкой. *Perkinsus marinus* может долгое время выживать в хозяине при солености менее 9 ПЕС, но репликация является слабой и гибели хозяина не происходит. Температура влияет на годовой цикл *P. marinus*, при этом максимальная превалентность и интенсивность наблюдаются спустя 1-2 месяца после максимальных летних температур воды, а минимальная превалентность и интенсивность наблюдаются спустя 1-2 месяца после минимальных зимних температур. Таким образом, инфекции, вызываемые *P. marinus*, имеют самый высокий уровень интенсивности осенью и самый низкий уровень интенсивности ранней весной (Bureson & Ragone Calvo, 1996).

## **2.4. Профилактика и борьба с болезнью**

### **2.4.1. Вакцинация**

Вакцины отсутствуют.

### **2.4.2. Лекарственное лечение**

Соединения дезинфектанта N-Halamine убивали культивируемые клетки *P. marinus*, не оказывая негативного воздействия на личинок устриц (Delaney *с соавт.*, 2003). Было продемонстрировано, что бацитрацин, циклогексимид и пресная вода сокращают количество, но не уничтожают *P. marinus* у инфицированных устриц-хозяев (Calvo & Bureson, 1994; Faisal *с соавт.*, 1999; La Peyre *с соавт.*, 2003). Эти методы обработки могут применяться для аквакультуры, но непригодны для использования в естественной среде.

### **2.4.3. Иммуностимуляция**

Отсутствует.

### **2.4.4. Разведение для получения резистентной популяции**

Было продемонстрировано, что селекционное разведение устриц, выживших в результате эпизоотий, эффективно снижает смертность, вызываемую *P. marinus* (Ragone Calvo *с соавт.*, 2003).

### **2.4.5. Повторное заселение резистентными видами**

Линии *C. virginica*, устойчивые к болезни, полученные путем селекционного разведения, используются в аквакультуре в Чесапикском заливе и в других местах (Ragone Calvo *с соавт.*, 2003), но их не рекомендуется использовать для восстановления естественных популяций устриц из-за генетических проблем.

### **2.4.6. Блокирующие агенты**

Отсутствуют.

### **2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок**

Неизвестно случаев заражения икринок или личинок инфекцией *Perkinsus marinus*, но клетки могут встречаться во внеклеточном пространстве. Дезинфекция икринок или личинок возможна с использованием соединений дезинфектанта N-Halamine (Delaney *с соавт.*, 2003).

### **2.4.8. Общие практики разведения**

Разведение в районах, где соленость составляет менее 12 ПЕС, и использование быстрорастущих, устойчивых к болезням линий, имело полезный результат (Andrews, 1996; Burreson & Ragone Calvo, 1996).

### **3. Отбор образцов**

#### **3.1. Отбор отдельных особей**

Следует отбирать живых или недавно погибших особей.

#### **3.2. Консервирование образцов**

Для диагностики с использованием метода культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рэя (RFTM), образцы должны быть свежими. Для гистологии лучшим консервантом является фиксатор АФА Дэвидсона, но 10% буферный формалин или другие стандартные гистологические фиксаторы также пригодны для использования. Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) образцы должны консервироваться с использованием 95–100% этанола и неденатурированного спирта.

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

Объединение образцов, полученных от молодежи устриц и взрослых особей, не рекомендуется, так как это приведет к сокращению массы анализируемой ткани на особь, и, следовательно, снизит чувствительность обнаружения. Для ПЦР-анализа всего организма устрицы допустимо объединение в пулы очень мелкой молодежи устриц (от пяти до десяти особей в зависимости от размера) или личинок, хотя это не позволяет провести точную оценку превалентности патогена.

#### **3.4. Наиболее подходящие органы или ткани**

Для RFTM обычно используются кусочки жабр, мантии и прямой кишки. Для гистологии используется срез тканей внутренних органов толщиной 5 мм, который включает пищеварительную железу, жабры и мантию. Для ПЦР лучше всего подходят ткани жабр или мантии.

#### **3.5. Неподходящие образцы/ткани**

Ткани прямой кишки не подходят для ПЦР из-за присутствия ингибиторов.

### **4. Методы диагностики**

#### **4.1. Полевые методы диагностики**

##### **4.1.1. Клинические признаки**

*Perkinsus marinus* вызывает хроническое истощение. Клиническими признаками могут быть мертвые двустворчатые моллюски или двустворчатые моллюски с раскрытыми створками раковины, с тонкой водянистой тканью, но эти клинические признаки не являются специфичными для инфекции *P. marinus*.

##### **4.1.2. Изменение поведения**

Зараженные хозяева могут медленно смыкать створки при воздействии внешних факторов, но эти поведенческие изменения не являются специфичными для инфекции *P. marinus*.

## **4.2. Клинические методы**

### **4.2.1. Макроскопическая патология**

Макроскопическим признаком является тонкая водянистая ткань, но данный макроскопический признак не является специфичными для инфекции *P. marinus*.

### **4.2.2. Клиническая химия**

Отсутствует.

### **4.2.3. Микроскопическая патология**

На фиксированных срезах имеются обширные многоочаговые поражения в эпителии кишечника или в соединительной ткани любого органа, содержащего клетки *P. marinus* (Maskin, 1951). Инфильтрация гемоцитами и фагоцитоз клеток *P. marinus* происходит при большинстве инфекций. При инфекциях с высоким уровнем интенсивности эпителий кишечника может быть почти полностью разрушен.

### **4.2.4. Влажные препараты**

Не рекомендуется в качестве клинического метода.

### **4.2.5. Мазки**

Не рекомендуется в качестве клинического метода.

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

Нет данных.

## **4.3. Методы обнаружения и идентификации агента**

### **4.3.1. Методы прямого обнаружения**

#### **4.3.1.1. Микроскопические методы**

##### *4.3.1.1.1. Влажные препараты*

Не рекомендуется.

##### *4.3.1.1.2. Мазки*

Мазки целесообразно использовать только при запущенных инфекциях.

##### *4.3.1.1.2.1. Подлежащие отбору образцы*

Живые хозяева.

##### *4.3.1.1.2.2. Техническая процедура*

Хозяина обескровливают с использованием иглы и шприца, введенного в аддуктор. Каплю гемолимфы помещают на предметное стекло и размазывают. Предметные стекла изучают при увеличении  $\times 100$ – $400$  после окрашивания.

##### *4.3.1.1.2.3. Положительные контроли*

Нет.

#### 4.3.1.1.2.4. Уровни валидации

##### 4.3.1.1.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Специфичность анализа очень низкая, чувствительность неизвестна.

##### 4.3.1.1.2.4.2. Золотой стандарт

Чувствительность не валидирована в сопоставлении с методом культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рэя (метод определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме устрицы) [Fisher & Oliver, 1996]).

##### 4.3.1.1.2.5. Интерпретация результатов

Наличие сферических клеток диаметром 2–15 мкм с большой вакуолью и эксцентричным ядром, часто фагоцитированных гемоцитами хозяина, указывает на присутствие *Perkinsus* sp., но данный метод не является видоспецифическим.

##### 4.3.1.1.2.6. Наличие коммерческих тестов

Наборы для быстрого окрашивания имеются в продаже.

#### 4.3.1.1.3. Фиксированные срезы ткани

##### 4.3.1.1.3.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие устрицы.

##### 4.3.1.1.3.2. Техническая процедура

Срезы ткани, которые включают пищеварительную железу, жабры и мантию, следует фиксировать в течение 24 часов в фиксаторе Дэвидсона или в другом подходящем фиксаторе, с последующей обычной обработкой для гистологии с использованием парафина, и окраской гематоксилином и эозином. Исследования производятся при увеличении до  $\times 400$ .

##### 4.3.1.1.3.3. Положительные контроли

Рекомендованы и имеются в наличии в Справочной лаборатории МЭБ.

#### 4.3.1.1.3.4. Уровни валидации

##### 4.3.1.1.3.4.1. Специфичность и чувствительность

Видовая специфичность анализа низкая, но чувствительность является высокой для инфекций средней и высокой интенсивности, и низкой для инфекций низкой интенсивности.

##### 4.3.1.1.3.4.2. Золотой стандарт

Метод культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рэя (метод определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме устрицы) является золотым стандартом, хотя он не является видоспецифическим. Гистология является менее чувствительным методом, хотя не валидирована формально в сопоставлении с методом культивирования в жидкой тиогликолевой среде.

#### 4.3.1.1.3.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является наличие сферических одноядерных клеток диаметром приблизительно 2-5 мкм (иногда до 10 мкм) с большой вакуолью и эксцентрически смещенным ядром. Обычно они наблюдаются в кишечнике хозяина или иногда в эпителии при легких инфекциях; для случаев запущенной инфекции характерна колонизация соединительных тканей. Можно обнаружить двуядерные схизонты *P. marinus* (делящиеся формы), хотя более крупные схизонты с большим числом ядер достоверно не определяются. Клетки часто фагоцитируются гемоцитами хозяина. Клетки *Perkinsus marinus* окрашиваются базофильно.

У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *P. marinus*, положительный результат является косвенным доказательством наличия инфекции *P. marinus*, и он должен быть подтвержден с помощью видоспецифической ПЦР, гибридизации *in situ* (ISH) и/или секвенирования ДНК области ITS1 (внутренний транскрибируемый спейсер), из-за возможного присутствия *P. chesapeaki* или неописанных видов *Perkinsus*.

#### 4.3.1.1.3.6. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тесты отсутствуют.

#### 4.3.1.1.4. Метод культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рэя (RFTM)

Инкубация в жидкой тиогликолевой среде обычно используется для надзора за *P. marinus*. Метод является простым, недорогим и имеет высокую чувствительность, но не является видоспецифическим. Трофозоиты *P. marinus* в тканях устриц увеличиваются в результате культивирования в течение как минимум 5 дней в жидкой тиогликолевой среде, содержащей декстрозу, обогащенную антибиотиками (пенициллин, стрептомицин) и противогрибковой смесью (нистатин) для замедления роста бактерий и грибов. Когда происходит мацерация ткани в результате культивирования, и в нее проникает водный раствор йода (Люголя), увеличенные трофозоиты (гипноспоры или презооспорангии в старой терминологии) легко впитывают раствор Люголя и становятся легко видимыми при малом увеличении из-за их синевато-черной окраски и сферической формы.

##### 4.3.1.1.4.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие моллюски.

##### 4.3.1.1.4.2. Техническая процедура

###### 4.3.1.1.4.2.1. Анализ тканей (Ray (Рэй), 1966)

Образцы ткани размером приблизительно 5–10 мм вырезают, отдавая предпочтение ректальной ткани, ткани жабр и мантии устриц, и помещают в пробирки, содержащие тиогликолевую среду (тиогликолевая среда содержит 14,6 г декстрозы; 10,0 г NaCl; 485 мл стерильной дистиллированной воды (dH<sub>2</sub>O)). Всего 9,5 мл наливают в одноразовые пробирки, которые автоклавируют в течение 15 минут при давлении 1,2 кг/см<sup>2</sup>. Автоклавируемый раствор можно хранить в пробирках до 3 недель. Принадлежности, используемые для препарирования, следует промывать в 95% этаноле и стерилизовать пламенем в промежутке между манипуляциями с образцами от других хозяев, чтобы предотвратить загрязнение проб. Рекомендуются противогрибковые препараты/антибиотики: 500 ед/мл пенициллина G и 500 ед/мл дигидрострептомицина в

среде (3,13 г пенициллина; 6,55 г стрептомицина; 500 мл dH<sub>2</sub>O; заморозить в аликвотах по 50 мл; добавить 0,5 мл в каждую пробирку) и 50 мкл микостатина (нистатина) на пробирку. Хлоромицетин можно использовать вместо пенициллина/стрептомицина. Пробирка закупоривается пробкой из губчатой резины или ваты. Инкубация проводится при 22-25°C в течение 5-7 дней в темноте. После инкубации фрагменты ткани собирают и измельчают лезвием скальпеля на предметном стекле, добавляют каплю раствора Люголя (исходный раствор Люголя: 6,0 г йодида калия; 4,0 г йода; 100 мл dH<sub>2</sub>O. Рабочий раствор Люголя: 30,0 мл dH<sub>2</sub>O; 15,0 мл исходного раствора Люголя), и препарат накрывают покровным стеклом и выдерживают в течение 10 минут. Препараты исследуют в свежем виде.

#### 4.3.1.1.4.2. Метод определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме устрицы (Fisher & Oliver, 1996)

Целую устрицу-хозяина разрезают на кусочки величиной 2–5 мм, помещают в жидкую тиогликолевую культуральную среду и инкубируют, как описано выше в анализе тканей. Раствор центрифугируют при 1500 g в течение 10 минут и надосадочную жидкость сливают. Добавляют 2 М NaOH (20 мл/г ткани) и раствор инкубируют при 60°C в течение 2–6 часов, до расщепления ткани. Раствор центрифугируют при 1500 g в течение 10 минут и надосадочную жидкость сливают. Раствор трижды промывают деионизированной водой, осадок ресуспендируют в 1 мл рабочего раствора Люголя и подсчитывают количество клеток. Может потребоваться серийное разведение для уменьшения общего количества клеток до приемлемого количества.

#### 4.3.1.1.4.3. Уровни валидации

##### 4.3.1.1.4.3.1. Специфичность и чувствительность

Специфичность низкая, так как метод не позволяет различать виды *Perkinsus*. Чувствительность высокая, особенно для метода определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме (Bushek с соавт., 1994).

##### 4.3.1.1.4.3.2. Золотой стандарт

Культивирование в жидкой тиогликолевой среде (метод определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме) является золотым стандартом. Анализ тканей с использованием культивирования в жидкой тиогликолевой среде является рекомендованным методом надзора. Метод был валидирован в сопоставлении с методом определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме (Bushek с соавт., 1994) и оказался менее чувствительным.

##### 4.3.1.1.4.4. Интерпретация результатов

Культивированные паразиты увеличиваются от 2–10 до 20–70 мкм во время инкубации. Клетки *Perkinsus* spp. имеют сферическую форму, а клеточные оболочки окрашиваются в синий или синевато-черный цвет раствором Люголя (Bushek с соавт., 1994; Ray, 1966).

У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *P. marinus*, положительный результат является косвенным доказательством наличия инфекции *P. marinus*, но он должен быть подтвержден с помощью видоспецифической ПЦР, гибридизации *in situ* (ISH) или секвенирования ДНК области ITS1 (внутренний транскрибируемый спейсер), из-за возможного присутствия *P. chesapeaki* или неописанных видов *Perkinsus*.



Если для молекулярной диагностики параллельные пробы не консервировали, ДНК паразита может быть выделена и амплифицирована при помощи ПЦР непосредственно из положительных тиогликолевых препаратов (Audemard *с соавт.*, 2008).

#### 4.3.1.1.4.5. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тесты отсутствуют.

### 4.3.1.2. Выделение и идентификация агента

#### 4.3.1.2.1. Культура клеток /искусственные среды

Клетки *Perkinsus marinus* легко культивируются в различных средах (например, La Peyre *с соавт.*, 1993). Культуральная среда обычно инокулируется тканью сердца, гемолимфы или жабр. Были проведены сравнения коммерческих сред (Dungan & Hamilton, 1995), и рост поддерживался во всех средах, но был максимальным в 1/1 DME (среда Игла в модификации Дульбекко)/среда Хэма F-12.

#### 4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

Для обнаружения *P. marinus* были разработаны моноклональные и поликлональные антитела, но они не являются специфичными для *P. marinus*, и было продемонстрировано, что поликлональные антитела дают перекрестную реакцию с некоторыми видами динофлагеллят (Bushek *с соавт.*, 2002a).

#### 4.3.1.2.3. Молекулярные методы

##### 4.3.1.2.3.1. Родоспецифические анализы для обнаружения *Perkinsus* (ПЦР и ISH)

Для надзора с использованием ПЦР, рекомендуется сначала провести родоспецифические ПЦР-анализы для обнаружения *Perkinsus*, а затем образцы с положительными результатами протестировать с помощью *P. marinus*-специфического анализа. О меж- и внутривидовых вариациях последовательности области ITS (внутренний транскрибируемый спейсер) известно гораздо больше, чем об области NTS (нетранскрибируемый спейсер) генного комплекса рРНК *Perkinsus* sp., с использованием последовательностей, доступных в базе генетических данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (США). Поэтому рекомендуется использовать ПЦР-праймеры, нацеленные на область ITS, поскольку можно быть более уверенным в том, что они обнаружат различные штаммы *P. marinus*. Для ISH были разработаны зонды, нацеленные на ген малой субъединицы (SSU) генного комплекса рРНК (Elston *с соавт.*, 2004). Кроме того, для использования с тканями хозяина была разработана родоспецифическая ПЦР в реальном времени для обнаружения *Perkinsus* (Gauthier *с соавт.*, 2006). Она была протестирована только с *P. marinus*, *P. olsenii* и *P. chesapeaki* и оказалась более специфичной при ограниченной валидации в сопоставлении с анализом RFTM. Данный анализ требует более тщательного тестирования на инклюзивность, но он может быть подходящим для лабораторий, которые имеют необходимое оборудование.

##### 4.3.1.2.3.1.1. Родоспецифическая ПЦР для обнаружения *Perkinsus*

###### 4.3.1.2.3.1.1.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие моллюски. Кусочки ткани размером 2–3 мм<sup>2</sup> асептически вырезают из жабр и мантии и помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл,

содержащие 95–100% этанол. Для предотвращения перекрестной контаминации, принадлежности, используемые для препарирования, следует стерилизовать пламенем в промежутке между манипуляциями с образцами.

#### 4.3.1.2.3.1.1.2. Техническая процедура

Выделение ДНК осуществляют путем расщепления протеиназой К в течение ночи при 56°C и методом спин-колонки с использованием коммерческих наборов. Рекомендуется использовать праймеры для *Perkinsus*-родоспецифической ПЦР, разработанные Audemard *с соавт.*, 2004. Прямой праймер PerkITS-85 (5'-CCG-СТТ-TGT-TTG-GAT-CCC-3') и обратный праймер PerkITS-750 (5'-ACA-TCA-GGC-СТТ-СТА-АТГ-АТГ-3') нацелены на область ITS генного комплекса рНК. Данные праймеры амплифицируют продукт длиной 703 пар оснований и могут использоваться для обнаружения ДНК любых известных и, возможно, неизвестных видов *Perkinsus*, за исключением *P. qugwadi*. Реакционные смеси для ПЦР содержат: 20 мМ Трис/НСl [рН 8,4], 50 мМ КСl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ каждой смеси dNTP, 0,1 мкМ каждого праймера, 0,025 ед./мкл Таq ДНК-полимеразы, 0,05 мг/мл BSA (альбумина бычьего сывороточного) и 0,5 мкл геномной ДНК (всего 10–50 нг). Условия амплификации:

образцы денатурируют в течение 4 минут при 95°C, после чего подвергают 40 циклам (95°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1 минуты, 72°C в течение 1 минуты), со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 10 минут. После амплификации 4 мкл ПЦР-продукта визуализируют на 2% агарозном геле.

#### 4.3.1.2.3.1.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительным контролем является геномная ДНК, полученная от моллюска, инфицированного любым видом *Perkinsus*, кроме *P. qugwadi*. Отрицательные контроли — это либо анализы без препарата ДНК, либо анализы, проводимые с неинфицированными моллюсками.

#### 4.3.1.2.3.1.1.4. Уровни валидации

##### • Специфичность и чувствительность

Праймеры для *Perkinsus*-родоспецифической ПЦР были протестированы на инклюзивность в отношении всех известных видов *Perkinsus*, и протестированы на специфичность к различным видам гаплоспоридий, а также к паразитарным и непаразитарным видам динофлагеллят (Reese & Dungan, 2005). Чувствительность не сравнивалась с методом RFTM.

#### 4.3.1.2.3.1.1.5. Интерпретация результатов

Положительный результат теста определяется как наличие в агарозном геле полосы (бэнда) подходящего размера (703 пары оснований), причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными.

#### 4.3.1.2.3.1.2. *Perkinsus*-родоспецифическая ISH

##### 4.3.1.2.3.1.2.1. Подлежащие отбору образцы

Следует использовать процедуру для фиксированных срезов тканей (4.3.1.1.3), описанную выше, за исключением того, что срезы ткани необходимо помещать на предметные стекла с положительно заряженной поверхностью, или предметные стекла, покрытые 3-аминопропилтриэтоксисиланом, без окрашивания. Депарафинизирование срезов проводят

в ксилоле в течение 10 минут, а затем повторно регидратируют в серии растворов этанола. Срезы промывают дважды в течение 5 минут в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS).

#### 4.3.1.2.3.1.2.2. Техническая процедура

Для обнаружения рода *Perkinsus* был разработан специфичный ДНК-зонд, нацеленный на ген малой субъединицы (SSU) рРНК (Elston *с соавт.*, 2004): Perks700DIG (5'-CGC-ACA-GTT-AAG-TRC-GTG-RGC-ACG-3'). 5' конец зонда метят дигоксигенином.

Срезы тканей обрабатывают 125 мкг/мл проназы в PBS при 37°C в течение 30 минут. Затем реакцию останавливают, промывая срезы в PBS с 0,2% глицином в течение 5 минут. Затем срезы помещают в 2 × SSC (стандартный цитратно-солевой буфер; 20 × SSC = 3 М NaCl; 0,3 М цитрат Na; pH 7,0) на 10 минут.

Срезы подвергают предварительной гибридизации в течение 1 часа при 42°C в растворе для предварительной гибридизации (4 × SSC, 50% формамид, 5 × раствор Денхардта, 0,5 мг/мл дрожжевой тРНК и 0,5 мг/мл ДНК спермы лосося, подвергнутой термической денатурации) во влажной камере.

Затем раствор для предварительной гибридизации заменяют буфером предварительной гибридизации, содержащим 7 нг/мкл зонда, меченного дигоксигенином, специфичного для рода *Perkinsus*. Срезы покрывают пластиковыми покровными стеклами для гибридизации *in situ* и помещают на нагревательный блок при 90°C на 12 минут. Затем предметные стекла охлаждают на льду в течение 1 минуты перед гибридизацией, которая проводится в течение ночи при 42°C во влажной камере.

Каждый срез дважды промывают в 2 × SSC в течение 5 минут при комнатной температуре, дважды в 1 × SSC в течение 5 минут при комнатной температуре, и дважды в 0,5 × SSC в течение 10 минут при 42°C. Затем срезы помещают в Буфер 1 (100 мМ Трис, pH 7,5, 150 мМ NaCl) на 1-2 минуты.

Срезы помещают в Буфер 1 (см. выше) с добавлением 0,3% Triton X-100 и 2% овечьей сыворотки на 30 минут. Конъюгат антител против дигоксигенина с щелочной фосфатазой разводят 1/500 (или в соответствии с рекомендациями производителя) в Буфере 1 с добавлением 0,3% Triton X-100 и 1% овечьей сыворотки, а затем наносят на срезы тканей. Срезы покрывают покровными стеклами для гибридизации *in situ* и инкубируют в течение 3 часов при комнатной температуре во влажной камере.

Каждое предметное стекло дважды промывают в Буфере 1 в течение 5 минут, и дважды промывают в Буфере 2 (100 мМ Трис, pH 9,5, 100 мМ NaCl, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>) в течение 5 минут. Затем предметные стекла помещают в окрашивающий раствор (337,5 мкг/мл нитросинего тетразолия, 175 мкг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат п-толуидин соли, 240 мкг/мл левамизола в Буфере 2) на 2 часа в темноте. Реакцию останавливают промыванием в буфере TE (10 мМ Трис, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА [этилендиаминтетрауксусная кислота]).

Затем предметные стекла ополаскивают стерильной дистиллированной водой (dH<sub>2</sub>O). Срезы контрокрашивают с использованием раствора бисмарка коричневого Y, промывают dH<sub>2</sub>O и покрывают покровным стеклом с использованием водной заливочной среды.

#### 4.3.1.2.3.1.2.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительные контроли представляют собой срезы тканей моллюска, инфицированного любым видом *Perkinsus*. Отрицательные контроли — это либо анализы без использования зонда, либо анализы, проводимые с неинфицированными устрицами.

#### 4.3.1.2.3.1.2.4. Уровни валидации

- Специфичность и чувствительность

ДНК-зонд, специфичный для рода *Perkinsus*, был протестирован на специфичность к различным видам *Perkinsus*, гаплоспоридий и паразитарным видам динофлагеллят (Elston *с соавт.*, 2004). Чувствительность оказалась выше по сравнению с гистологией с использованием парафина, но зонд не сравнивали с RFTM.

#### 4.3.1.2.3.1.2.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является наличие клеток паразита фиолетово-чёрного цвета, причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными (Elston *с соавт.*, 2004).

#### 4.3.1.2.3.2. Анализы для обнаружения *Perkinsus* (ПЦР и ISH)

##### 4.3.1.2.3.2.1. *Perkinsus marinus*-специфичная полимеразная цепная реакция

Для обнаружения *P. marinus* были разработаны ПЦР-праймеры, нацеленные на область NTS и область ITS генного комплекса рРНК. Хотя праймеры, нацеленные на область NTS, продемонстрировали высокую видовую специфичность, мало что известно о внутривидовых вариациях последовательности области NTS, и существует риск ложноотрицательных результатов. Вариации последовательности области ITS более широко охарактеризованы (см. базу генетических данных GenBank), а праймеры, нацеленные на область ITS, более тщательно протестированы на специфичность. По этим причинам рекомендуются праймеры, нацеленные на область ITS (Audemard *с соавт.*, 2004). В данной главе представлена самая последняя версия рекомендованного специфичного ITS анализа на *P. marinus*. Для надзора рекомендуется сначала провести родоспецифические анализы для обнаружения *Perkinsus*, а затем специфичный анализ. Кроме того, для обнаружения *P. marinus* в тканях хозяина была разработана ПЦР в реальном времени (Gauthier *с соавт.*, 2006). Она была протестирована только с *P. marinus*, *P. olseni* и *P. chesapeaki* и оказалась более чувствительной при ограниченной валидации в сопоставлении с анализом RFTM. Данный анализ требует более тщательного тестирования на специфичность ко всем известным видам *Perkinsus*, но он может быть подходящим для лабораторий, которые имеют необходимое оборудование.

##### 4.3.1.2.3.2.1.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие моллюски. Кусочки ткани размером 2–3 мм<sup>2</sup> асептически вырезают из жабр и мантии и помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, содержащие 95–100% этанол. Для предотвращения перекрестной контаминации, принадлежности, используемые для препарирования, следует стерилизовать пламенем в промежутке между манипуляциями с образцами.

##### 4.3.1.2.3.2.1.2. Техническая процедура

Выделение ДНК осуществляют путем расщепления протеиназой К в течение ночи при 56°C и методом спин-колонки с использованием коммерческих наборов. Были разработаны ПЦР-праймеры, нацеленные на область ITS генного комплекса рРНК *P. marinus* (Audemard *с соавт.*, 2004): прямой праймер PmarITS-70F (5'-СТТ-ТТГ-УТВ-ГАГ-УГТ-ТГС-ГАГ-АТГ-3') и обратный праймер PmarITS600R (5'-СГА-ГТТ-ТГС-ГАГ-ТАС-СТС-КАГ-АГ-3'). Размер амплифицированного продукта составляет 509 пар оснований. Реакционная смесь для ПЦР содержит ПЦР буфер: 20 мМ Трис/НСl [рН 8,4], 50 мМ КСl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ каждой смеси dNTP, 0,1 мкМ каждого праймера, 0,025 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, 0,05 мг/мл BSA (альбумина бычьего сывороточного) и 0,5 мкл геномной ДНК (10–50 нг) в общем объеме 25 мкл. Условия амплификации: образцы денатурируют в течение 4 минут при 95°C, после чего подвергают 40 циклам (94°C в течение 1 минуты, 57°C в течение 1 минуты, 65°C в течение 3 минут), со стадией финальной элонгации при 65°C в течение 10 минут.

ПЦР-продукты подвергают электрофорезу в 2% агарозном геле (1 × ТАЕ или ТВЕ), окрашивают бромидом этидия и визуализируют в УФ свете.

#### 4.3.1.2.3.2.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительными контролями являются: ДНК из очищенных клеток *P. marinus* или геномная ДНК, полученная от хозяина с инфекцией высокой интенсивности. Отрицательные контроли: отсутствие реакции на ДНК-мишень;

#### 4.3.1.2.3.2.1.4. Уровни валидации

- Специфичность и чувствительность

Праймеры, нацеленные на область ITS, были протестированы на специфичность к *P. olseni*, *P. chesapeakei*, *P. andrewsi* и *P. mediterraneus*, а также к нескольким видам динофлагеллят (Audemard *с соавт.*, 2004). Чувствительность оказалась высокой, продемонстрирована способность обнаружения одной клетки *P. marinus* в 30 мг ткани устрицы, но ошибка при взятии субпробы в случае легких локализованных инфекций может привести к ложноотрицательным результатам.

- Золотой стандарт

ПЦР с использованием праймеров, нацеленных на область ITS, не была валидирована в сопоставлении с методом RFTM.

#### 4.3.1.2.3.2.1.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является продукт ПЦР-амплификации подходящего размера (509 пар оснований), причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными.

#### 4.3.1.2.3.2.1.6. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тесты отсутствуют.

Кроме того, был разработан анализ ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), использование которого может быть целесообразным для специфичной диагностики *P. marinus* (Abollo *с соавт.*, 2006), хотя он не был протестирован на специфичность ко всем известным видам *Perkinsus*.

#### 4.3.1.2.3.2.2. *Perkinsus marinus*-специфическая ISH

##### 4.3.1.2.3.2.2.1. Подлежащие отбору образцы

Следует использовать процедуру для фиксированных срезов тканей (4.3.1.1.3), описанную выше, за исключением того, что срезы ткани необходимо помещать на предметные стекла с положительно заряженной поверхностью, или предметные стекла, покрытые 3-аминопропилтриэтоксисиланом, без окрашивания. Депарафинизирование срезов проводят в ксилоле в течение 10 минут, а затем повторно регидратируют в серии растворов этанола. Срезы промывают дважды в течение 5 минут в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS).

##### 4.3.1.2.3.2.2.2. Техническая процедура

Был разработан ДНК-зонд, нацеленный на LSU гена рРНК *P. marinus* (Moss *с соавт.*, 2006) (PmarLSU-181DIG 5'-GAC-AAA-CGG-CGA-ACG-ACT-C-3'). Конец зонда метят дигоксигенином. Для ISH используются те же процедуры, которые описаны выше для зонда, специфичного для рода *Perkinsus*.

##### 4.3.1.2.3.2.2.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительные контроли представляют собой срезы тканей *S. virginica*, инфицированных *P. marinus*. Отрицательные контроли — это либо анализы без зонда, либо анализы, проводимые с неинфицированными устрицами.

##### 4.3.1.2.3.2.2.4. Уровни валидации

- Специфичность и чувствительность

ДНК-зонд, специфичный для *P. marinus*, был протестирован на специфичность к различным видам *Perkinsus* (Moss *с соавт.*, 2006). Чувствительность оказалась выше, чем у гистологии с использованием парафина, но зонд не сравнивали с RFTM.

##### 4.3.1.2.3.2.2.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является наличие клеток паразита фиолетово-чёрного цвета, причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными.

#### 4.3.1.2.4. Выделение агента

*Perkinsus marinus* можно выделить путем создания клональных культур.

### 4.3.2. Серологические методы

Не применимо.

## 5. Категории тестов в зависимости от их назначения

В качестве примера, методы, имеющиеся в настоящее время для целевого надзора и диагностики инфекции *Perkinsus marinus*, перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице: a = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод может применяться в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы строго ограничивают его применение; и d = метод в настоящее время не рекомендуется для данной цели. Это несколько субъективное

разделение на категории, поскольку пригодность включает в себя надежность, чувствительность, специфичность и полезность. Хотя не все тесты, относящиеся к категории а или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и факт того, что они широко применялись без сомнительных результатов, делает их подходящими.

**Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики**

Метод	Целевой надзор			Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	d	d	d	d
Мазки гемолимфы	d	c	c	c	d
Гистопатология	b	b	b	b	d
RFTM, анализ тканей <sup>1</sup>	d	a	a	b	d
RFTM, метод определения общего содержания клеток <i>P. marinus</i> во всем организме устрицы <sup>1</sup>	d	c	c	c	d
ПЦР	a	b	b	a <sup>2</sup>	b <sup>2</sup>
ДНК зонды <i>in situ</i>	d	b	b	b	a
Секвенирование	d	d	d	d	b <sup>2</sup>

1. Метод не является видоспецифическим, но может эффективно применяться в отношении хозяйев/областей, в которых присутствует или преобладает только один вид *Perkinsus*.

2. Следует использовать только в том случае, если инфекции визуализируются при помощи мазка, RFTM или гистологии.

RFTM = Метод культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рэя; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

## **6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от инфекции *Perkinsus marinus***

Методами, предписанными для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от инфекции *P. marinus*, являются: ПЦР-анализы в сочетании с RFTM (анализ тканей или метод определения общего содержания клеток *P. marinus* во всем организме устрицы).

## **7. Подтверждающие диагностические критерии**

### **7.1. Определение случая подозрения на болезнь**

У известных восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *P. marinus*, случаем подозрения на инфекцию *P. marinus* является положительный результат, полученный при использовании одного из следующих методов: мазки гемолимфы, гистология, культивирование в жидкой тиогликолевой среде или ПЦР.

У других видов хозяйев или за пределами известного ареала распространения инфекции *P. marinus*, случаем подозрения на инфекцию *P. marinus* является положительный результат, полученный при использовании ПЦР. Данные положительные результаты должны быть подтверждены Справочной лабораторией МЭБ.

### **7.2. Определение подтвержденного случая болезни**

Подтвержденным случаем *P. marinus* является положительный результат, полученный при использовании мазков гемолимфы, гистологии или культивирования в жидкой тиогликолевой среде, в сочетании с положительным результатом, полученным с помощью

ПЦР или гибридизации *in situ* (ISH). Секвенирование области ITS рекомендуется в качестве последнего этапа для подтверждающей диагностики.

## 8. Список литературы

ABOLLO E., CASAS S.M., CESCHIA G. & VILLALBA A. (2006). Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Mol. Cell. Probes*, **20**, 323–329.

ANDREWS J.D. (1996). History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *J. Shellfish Res.*, **15**, 13–16.

AUDEMARD C., CARNEGIE R.B. & BURRESON E.M. (2008). Shellfish tissues evaluated for *Perkinsus* spp. using the Ray's fluid thioglycollate medium culture assay can be used for downstream molecular assays. *Dis. Aquat. Org.*, **800**, 235–239.

AUDEMARD C., REECE K.S. & BURRESON E.M. (2004). Real-time PCR for the detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6611–6618.

BURRESON E.M. & RAGONE CALVO L.M. (1996). Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Res.*, **15**, 17–34.

BURRESON E.M., RAGONE CALVO L.M., LA PEYRE J.F., COUNTS F. & PAYNTER K.T. Jr. (1994). Acute osmotic tolerance of cultured cells of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsida). *Comp. Biochem. Physiol.*, **109A**, 575–582.

BUSHEK D., DUNGAN C.F. & LEWITUS A.J. (2002a). Serological affinities of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) with some dinoflagellates (Dinophyceae). *J. Euk. Microbiol.*, **49**, 11–16.

BUSHEK D., FORD S.E. & ALLEN S.K. (1994). Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **4**, 201–217.

BUSHEK D., FORD S.E. & CHINTALA M.M. (2002b). Comparison of in vitro-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. *Dis. Aquat. Org.*, **51**, 217–225.

BUSHEK D., HOLLEY R. & KELLY M. (1997). Treatment of *Perkinsus marinus*-contaminated materials. *J. Shellfish Res.*, **16**, 330.

BUSHEK D. & HOWELL T.L. (2000). The effect of UV irradiation on *Perkinsus marinus* and its potential use to reduce transmission via shellfish effluents. Northeastern Regional Aquaculture Center (NRAC) Publication No. 00-008., North Dartmouth, Massachusetts, USA, 4 pp.



- CÁCERES-MARTÍNEZ J., VÁSQUEZ-YEOMANS R., PADILLA-LARDIZÁBAL G. & DEL RÍO PORTILLA M.A. (2008). *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *J. Invert. Pathol.*, **99**, 66–73.
- CALVO G.W. & BURRESON E.M. (1994). *In vitro* and *in vivo* effects of eight chemotherapeutants on the oyster parasite *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen, and Collier). *J. Shellfish Res.*, **13**, 101–107.
- CALVO G.W., LUCKENBACH M.W., ALLEN S.K. & BURRESON E.M. (1999). A comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *J. Shellfish Res.*, **18**, 465–474.
- CALVO G.W., LUCKENBACH M.W., ALLEN S.K. & BURRESON E.M. (2001). A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *J. Shellfish Res.*, **20**, 221–229.
- CASAS S.M., VILLALBA A. & REECE K.S. (2002). Study of the perkinsosis of the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the etiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 51–65.
- DELANEY M.A., BRADY Y. J., WORLEY S.D. & HUELS K.L. (2003). The effectiveness of N-Halamine disinfectant compounds on *Perkinsus marinus*, a parasite of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.*, **22**, 91–94.
- DUNGAN C.F. & HAMILTON R.M. (1995). Use of a tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of *in vitro* conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexan) proliferation. *J. Euk. Microbiol.*, **42**, 379–388.
- DUNGAN C.F., REECE K.S., HAMILTON R.M., STOKES N.A. & BURRESON E.M. (2007). Experimental cross-infections by *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* in three sympatric species of Chesapeake Bay oysters and clams. *Dis. Aquat. Res.*, **76**, 67–75.
- ELSTON R.A., DUNGAN C.F., MEYERS T.R. & REECE K.S. (2004). *Perkinsus* sp. infection risk for manila clams, *Venerupis philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) on the Pacific coast of North and Central America. *J. Shellfish Res.*, **23**, 101–105.
- FAISAL M., LA PEYRE J.F. & ELSAYED E.E. (1999). Bacitracin inhibits the oyster pathogen *Perkinsus marinus* *in vitro* and *in vivo*. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 130–138.
- FISHER W.S. & OLIVER L.M. (1996). A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *J. Shellfish Res.*, **15**, 109–117.
- GAUTHIER J.D., MILLER C.R. & WILBUR A.E. (2006). TaqMan<sup>®</sup> MGB real-time PCR approach to quantification of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus* spp. in oysters. *J. Shellfish Res.*, **25**, 619–624.
- LA PEYRE J.F., FAISAL M. & BURRESON E.M. (1993). *In vitro* propagation of the protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Euk. Microbiol.*, **40**, 304–310.

LA PEYRE M.K., NICKENS A.D., VOLETY A.K., TOLLEY G.S. & LA PEYRE J.F. (2003). Environmental significance of freshets in reducing *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica*: potential management applications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **248**, 165–176.

MACKIN J.G. (1951). Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* Gmelin by *Dermocystidium marinum* (Mackin, Owen and Collier). *Bull. Marine Sci. Gulf Caribb.*, **1**, 72–87.

MOSS J.A., BURRESON E.M. & REECE K.S. (2006). Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. *J. Shellfish Res.*, **25**, 65–72.

RAGONE CALVO L.M., CALVO G.W. & BURRESON E.M. (2003). Dual disease resistance in a selectively bred eastern oyster, *Crassostrea virginica*, strain tested in Chesapeake Bay. *Aquaculture*, **220**, 69–87.

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

REECE K. & DUNGAN C. (2005). Chapter 5.2. *Perkinsus* sp. infections of marine molluscs. *In: Fish Health Section Blue Book, suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens*. Published in CD format by American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.

REECE K.S., DUNCAN C.F. & BURRESON E.M. (2008). Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 237–248.

VILLALBA A., REECE K.S., ORDAS M.C., CASAS S.M. & FIGUERAS A. (2004). Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 411–432.

\*

\* \*

**NB:** Референтной лаборатории МЭБ по инфекции *Perkinsus marinus* в настоящее время не существует (см. Таблицу в конце данного *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).