

1. Предмет рассмотрения¹

В данной главе инфицирование *Perkinsus olseni* представляет собой заражение *P. olseni*. *Perkinsus atlanticus* является младшим синонимом.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Этиологическим возбудителем является *Perkinsus olseni*.

2.1.2. Выживание вне хозяина

Максимальный период выживания вне хозяина неизвестен, но составляет как минимум несколько месяцев для презооспорангия или для гипноспор (Casas с соавт., 2002b).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Perkinsus olseni – относительно стабилен ввиду толстых стенок своих клеток. Выделенные клетки *P. olseni* погибают в свежей воде в течение 10 минут при комнатной температуре и при обработке хлором, $0,006 \text{ мг мл}^{-1} = 6 \text{ ч/млн}$ (частей на миллион) в течение 30 минут (Goggin с соавт., 1990). Клетки *Perkinsus olseni* в ткани хозяина демонстрируют намного более высокую резистентность к таким обработкам. Выявлено, что ультрафиолетовый свет ($>28,000 \text{ мкWs см}^{-2}$) инактивировал трофозоиты *P. marinus* (Bushek & Howell, 2000), а ультрафиолетовый свет при $60\,000 \text{ мкWs см}^{-2}$, как было выявлено убивает гипноспоры *P. olseni* (Lester & Hayward, 2005).

2.1.4. Жизненный цикл

Жизненный цикл - прямой: от хозяина к хозяину, и все стадии жизни являются инфекционными (Villalba с соавт., 2004).

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды-хозяева

Perkinsus olseni имеет очень широкий круг хозяев. Известные хозяева включают двустворчатых моллюсков *Anadara trapezia*, *Austrovenus stutchburyi*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Tridacna maxima*, *T. crocea*, *Protothaca jedoensis* и *Pitar rostrata* (Goggin & Lester, 1995; Villalba с соавт., 2004; Cremonte с соавт., 2005; Park

¹ NB: Версия, принятая Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2015 г.

с соавт., 2006; Sheppard & Phillips, 2008); устриц *Crassostrea ariakensis*, и *C. sikamea* (Villalba с соавт., 2004); жемчужниц *Pinctada margaritifera*, *P. martensii*, и *P. fucata* (Goggin & Lester, 1995; Sanil с соавт., 2010); абалонов *Haliotis rubra*, *H. laevigata*, *H. scalaris*, и *H. cyclobates* (Goggin & Lester, 1995). К данному паразиту могут быть восприимчивы и другие виды двустворчатых и брюхоногих, особенно в известном географическом ареале. Особенно восприимчивы члены семейств *Arcidae*, *Malleidae*, *Isognomonidae*, *Chamidae* и *Veneridae*, и селективный отбор образцов у них может выявить присутствие *P. olseni*, когда в том же месте обитания у представителей других семейств наблюдаются только слабые инфекции.

2.2.2. Восприимчивые стадии хозяина

Все стадии после стадии оседания являются восприимчивыми.

2.2.3. Предрасположенность видов и субпопуляций (вероятность обнаружения)

Существует широкий круг хозяев и степень восприимчивости варьирует (см 2.2.1. выше); интенсивность инфекции повышается с возрастом хозяина.

2.2.4. Целевые органы и инфицированные ткани

Соединительная ткань всех органов и гемоциты.

2.2.5. Персистентное инфицирование пожизненными носителями

Инфицирование *P. olseni* может быть летальным в зависимости от хозяина и условий окружающей среды. Может происходить персистентное инфицирование пожизненными носителями.

2.2.6. Переносчики

Не требуются, поскольку жизненный цикл - прямой: от хозяина к хозяину.

2.2.7. Известные или подозреваемые дикие водные животные-носители

Известных нет. Lester & Hayward, 2005 исследовали 32 небалоновых вида моллюсков на острове Тейлор, Южная Австралия, методом культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рея (RFTM) и не выявили инфекций. Превалентность *P. olseni* у абалонов (*H. rubra*) в данном месте в трех различных выборках варьировала от 26 до 56%.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача прямая: от хозяина хозяину (Villalba с соавт., 2004), и все стадии жизни являются инфекционными.

2.3.2. Превалентность

Превалентность очень вариабельна, в зависимости от хозяина и условий

окружающей среды, но часто составляет 100%, по результатам исследования методом гистологии или полимеразной цепной реакции (ПЦР). Ожидается, что у отдельных особей, находящихся под воздействием данного патогена в течение более одного года, превалентность будет выше.

2.3.3. Географическое распространение

Данные паразиты широко распространены во всей тропической части Тихого океана, в Австралии, Норт-Айленде Новой Зеландии, Вьетнаме, Республике Корея, Японии, Китайской Народной Республике, Португалии, Испании, Франции, Италии и Уругвае (Goggin & Lester, 1995; Villalba с соавт., 2004; Cremonte с соавт., 2005). Недавно они были выявлены в Индии (Sanil с соавт., 2010). *Perkinsus* sp., зарегистрированные в Таиланде у волнистой пафии, *Raphia undulate*, почти несомненно являются *P. olseni*, исходя из ДНК последовательностей из внутренних транскрибирующихся спейсерных (ITS) областей паразита. *Perkinsus olseni* неизвестны в Северной Америке.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Инфекции у двустворчатых моллюсков-хозяев могут быть летальными в зависимости от условий окружающей среды, гибель может наступать через один или два года после инфицирования. Инфекции у абалонов в Австралии по видимому не приводят к гибели даже при том, что превалентность может быть высокой (Lester & Hayward, 2005).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Годовой цикл *P. olseni* контролируется температурой. У *R. decussatus* в Испании, интенсивность *P. olseni* инфекции достигала пика весной, поскольку температура повышалась до 15°C, оставалась высокой в течение лета и ранней осени, когда температура была 19–21°C, и затем снижалась в течение зимы и ранней весны, что совпадало с температурами в 9–10°C (Villalba с соавт., 2005). Наивысший уровень смертности хозяев наблюдался ранней осенью во время периода максимальных годовых температур. Солеустойчивость *P. olseni* изучена недостаточно. В Испании во время указанного исследования соленость составляла выше 15 единиц практической солености (psu). Результаты лабораторных исследований с использованием *P. olseni* из культуры (La Peyre с соавт., 2006) позволяют предположить, что оптимальный рост *P. olseni* происходит при 25 psu, и они не являются устойчивыми к солености воды ниже 15 psu.

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Нет.

2.4.2. Фармакотерапия

Циклогексамид, пиреметамин, дефероксамин (DFO) и 2, 2-бипиридил ингибирует *P. olseni in vitro*, а дефероксамин (DFO) ингибирует *P. olseni in vivo*. (Elandalloussi с

соавт., 2005). Соединения N-халамин дезинфектанта эффективны против культивированных клеток *P. marinus* в морской воде (Delaney с соавт., 2003), а бацитрацин, как было продемонстрировано, сокращает количество, но не уничтожает *P. marinus* у инфицированных хозяев-устриц (Faisal с соавт., 1999). Эти соединения могут быть эффективными при использовании их против *P. olseni*, но сравнительное исследование не проводилось.

2.4.3. Иммуностимуляция

Нет.

2.4.4. Выведение резистентной популяции

Отсутствует для *P. olseni*, хотя была продемонстрирована некоторая эффективность селективного разведения для *P. marinus*.

2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами

Нет.

2.4.6. Блокирующие агенты

Нет.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Нет сведений о том, что *Perkinsus olseni* инфицируют икриночки или личинки своих хозяев, но клетки паразита могут присутствовать в межклеточном пространстве. Соединения N-халамин дезинфектанта продемонстрировали свою эффективность при их использовании против *P. marinus* без оказания явного воздействия на личинок устриц (Delaney с соавт., 2003), и данные соединения, возможно, также полезно использовать против *P. olseni*.

2.4.8. Общие практики ведения хозяйства General husbandry practices

Низкая плотность заселения может снижать степень передачи патогена.

3. Отбор образцов

3.1. Выбор отдельных образцов

Следует отбирать образцы у живых или только что умерших особей.

3.2. Сохранение образцов для представления для исследования

Для проведения диагностики методом RFTM, образцы должны быть свежими. Для гистологии самым лучшим консервантом является фиксирующий раствор Дэвидсона (уксусная кислота, формальдегид, спирт) (Davidson's AFA), но также допускается использование 10% забуференного формалина или других стандартных фиксирующих растворов. Для проведения ПЦР анализов образцы необходимо сохранять в 95-100% этаноле или в неденатурированном спирте.

3.3. Объединение образцов в пулы

Допускается объединение в пулы очень маленькой молодежи (5-10 в зависимости от размера) для проведения ПЦР анализов.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Для исследования двустворчатых моллюсков методом RFTM обычно используют части жабр, мантию и прямую кишку. У абалонов культивируют срезы тканей, которые включают жабры, мантию и ногу. Для гистологии используют срез в 5 мм толщиной висцеральной массы, которая включает пищеварительную железу, жабры и мантию. Для ПЦР лучшими тканями являются жабры и ткани мантии.

3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

Ректальная ткань не является достоверной для ПЦР анализов из-за присутствия ингибиторов.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Клиническими признаками являются погибшие или «зевающие» моллюски, но данные клинические признаки не являются специфичными для *P. olseni* инфекции.

4.1.2. Изменения в поведении

Некоторые особи двустворчатых моллюсков на поздней стадии заражения могут медленно закрывать свои створки, но данные изменения не являются специфичными для *P. olseni*.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Макроскопические признаки представляют собой тонкую водянистую ткань, бледную пищеварительную железу и узелки в мантии и жабрах некоторых хозяев, но данные признаки не являются специфичными для инфекции *P. olseni*.

4.2.2. Клиническая химия

Данные отсутствуют.

4.2.3. Микроскопическая патология

В зафиксированных срезах наблюдаются крупные многоочаговые поражения в

соединительной ткани, содержащие клетки *P. olseni*. В ходе большинства инфекций наблюдается инфильтрация гемоцитов (гемоцитоз). У двустворчатых моллюсков-хозяев, клетки *P. olseni* часто инкапсулированы в толстый слой эозинофильного материала, образованного в результате дегрануляции гемоцитов (Villalba с соавт., 2004).

4.2.4. Влажные препараты

Не рекомендуются в качестве клинического метода.

4.2.5. Мазки

Не рекомендуются в качестве клинического метода.

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

Ультраструктурные данные показывают, что лизис гемоцитов и слияние метахроматических гранул приводят к образованию узелка, который заключает в себе трофозоиты (Sagrista с соавт., 1995).

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Не рекомендуются.

4.3.1.1.2. Мазки

Использование мазков полезно только при развитой инфекции.

4.3.1.1.2.1. Образцы, которые следует отбирать

Живые хозяева.

4.3.1.1.2.2. Техническая процедура

Отбирают кровь у хозяина иглой и шприцем, внедренным в мускул-замыкатель устриц и двустворчатых моллюсков или цефалический синус абалона. Помещают каплю гемолимфы на стеклянное предметное стекло и размазывают. Обследуют при $\times 100$ – 400 после окрашивания по Гимза.

4.3.1.1.2.3. Положительные/отрицательные контроли

Нет.

4.3.1.1.2.4. Уровни валидации

4.3.1.1.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Очень низкая специфичность при неизвестной чувствительности.

4.3.1.1.2.4.2. Золотой стандарт

Степень чувствительности не валидирована по сравнению с культивированием в жидкой тиогликолевой среде (анализ нагрузки во всем организме [Fisher & Oliver, 1996]).

4.3.1.1.2.5. Интерпретация результатов

Наличие сферических, монопонуклеарных клеток 5–15 мкм в диаметре с большой вакуолью и эксцентричным ядром указывает на присутствие *Perkinsus* sp., но данный метод не является видоспецифичным.

4.3.1.1.2.6. Наличие коммерческих тестов

В настоящее время в продаже имеются наборы быстрого окрашивания.

4.3.1.1.3. Зафиксированные срезы

4.3.1.1.3.1. Образцы, которые следует отбирать

Живые или только что погибшие моллюски.

4.3.1.1.3.2. Техническая процедура

Срезы тканей, которые включают пищеварительную железу, жабры и мантию, следует фиксировать в течение 24 часов в фиксирующем АФА растворе Дэвидсона или другом стандартном гистологическом фиксирующем растворе с последующей обычной обработкой для гистологии в парафине и окрашивания гематоксилином и эозином. Обследование осуществляют при возрастающем до $\times 400$ увеличении.

4.3.1.1.3.3. Положительные контроли

Рекомендуется использовать такие контроли, их можно получить из Референтной лаборатории МЭБ в зависимости от хозяина.

4.3.1.1.3.4. Уровни валидации

4.3.1.1.3.4.1. Специфичность и чувствительность

Видовая специфичность очень низкая, а чувствительность – хорошая при умеренной до тяжелой формах инфекции, но низкая – при инфекциях низкой интенсивности.

4.3.1.1.3.4.2. Золотой стандарт

Культивирование в жидкой тиогликолевой среде (анализ нагрузки во всем организме [Fisher & Oliver, 1996]) является золотым стандартом, хотя он не является видоспецифичным. Метод гистологии официально

не валидирован в сравнении с культивированием в жидкой тиогликолевой среде, хотя недавнее исследование показало, что гистология является менее чувствительной (Balseiro с соавт., 2010).

4.3.1.1.3.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является присутствие сферических одноядерных клеток приблизительно от 5 до 15 мкм в диаметре с большой вакуолью и эксцентрически расположенным ядром с выступающим ядрышком. Многоядерные схизонты (делящиеся формы) часто сопровождают одноядерные трофозоиты. Клетки могут быть фагоцитированы гемоцитами хозяина. Клетки *Perkinsus olseni* дают слегка базофильное окрашивание.

У восприимчивых видов-хозяев, в регионе, где, как известно, присутствуют только *P. olseni*, положительный результат представляет собой предварительное свидетельство о наличии *P. olseni* инфекции, но он должен быть подтвержден результатами гибридизации *in-situ* (ISH) или секвенирования ДНК ввиду возможного присутствия других 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 Рея (RFTM)

Обычно для надзора за *P. olseni* используется инкубация в тиогликоле. Данный метод является простым, недорогим и очень чувствительным, но он не является видоспецифичным. Трофозоиты *P. olseni* будут увеличиваться в ткани хозяина при культивировании в течение не менее 5 дней в жидкой тиогликолевой среде, содержащей декстрозу, которая обогащена антибиотиками (пенициллин, стрептомицин) и противогрибковым соединением (нистатин) для уменьшения роста бактерий и грибов. При мацерации ткани после культивирования для обеспечения проникновения водного раствора йода (раствор Люголя), увеличенные трофозоиты (гипноспоры или презооспорангий по старой терминологии) без труда поглощают раствор Люголя и становятся хорошо видимыми при низкой мощности из-за их обычно иссиня-черного окрашивания и сферической формы.

4.3.1.1.4.1. Образцы, которые следует отбирать

Живые или только что погибшие моллюски.

4.3.1.1.4.2. Техническая процедура

4.3.1.1.4.2.1. Анализ тканей (Ray, 1966)

Отсекают образцы тканей размером приблизительно 5–10 мм, отдавая предпочтение ректальным тканям, тканям жабр и мантии у устриц и двустворчатых моллюсков и мышцам аддуктора или ноги или мантии у абалона и помещают в тест-пробирки, содержащие тиогликолевую среду (тиогликолевая среда, содержащая, декстрозу, 14,6 г; NaCl, 10,0 г; стерильная дистиллированная вода (dH₂O), 485 мл). В одноразовые тест-пробирки вносят по 9,5 мл, затем данные пробирки автоклавируют в течение 15 минут при давлении 1,2 кг см⁻². Автоклавируемый раствор можно хранить в пробирках в течение периода до 3 недель. В целях недопущения переноса инструменты для отсечения следует промывать в 95% этаноле и фламбировать после окончания работы с одним хозяином и перед началом работы с другим хозяином. Рекомендуется использовать следующие противогрибковые препараты/антибиотики: 500 Е мл⁻¹ пенициллина G и 500 Е мл⁻¹ дегидрострептомицина в среде (пенициллин, 3,13 г; стрептомицин, 6,55 г; 500 мл dH₂O; заморозить в 50 мл аликвотах, добавить 0,5 мл в каждую пробирку), и 50 мкл микостатина (нистатин) на каждую пробирку. Вместо пенициллина/стрептомицина можно использовать хлоромецитин. Пробирку закрывают пробкой из вспененной резины или пробкой из хлопка. Инкубируют при 22–25°C в течение 5 - 7 дней, в темноте. После инкубации собирают фрагменты ткани и измельчают их лезвием скальпеля на стеклянном предметном стекле, добавляют одну каплю йодного раствора Люголя (исходный йодный раствор Люголя: йодид калия, 6,0 г; йод, 4,0 г; dH₂O, 100 мл. Рабочий йодный раствор Люголя: dH₂O, 30,0 мл; исходный раствор Люголя, 15,0 мл) и данный препарат накрывают покровным стеклом и оставляют для усадки на 10 минут. Препараты исследуют свежими.

Анализ нагрузки во всем организме (Fisher & Oliver, 1996): целого хозяина, разрезанного на кусочки по 2–5 мм, помещают в жидкую тиогликолевую культуральную среду и инкубируют в соответствии с процедурой анализа тканей, описанной выше. Если организмы-хозяева слишком большие для того, чтобы использовать целый организм хозяина, то можно использовать выбранную целевую ткань. Данный раствор центрифугируют при 1500 g в течение 10 минут, супернатант удаляют. Добавляют 2 М NaOH (20 мл г⁻¹ ткани) и раствор инкубируют при 60°C в течение 2–6 часов до расщепления ткани. Раствор центрифугируют при 1500 g в течение 10 минут, супернатант удаляют. Раствор промывают три раза в деионизированной воде, осадок ресуспендируют в 1 мл рабочего йодного раствора Люголя и производят подсчет клеток. Возможно понадобится приготовить серийные разведения для снижения общего количества клеток до количества, поддающегося контролю.

4.3.1.1.4.3. Уровни валидации

4.3.1.1.4.3.1. Специфичность и чувствительность

Специфичность является низкой, поскольку данный метод не

позволяет дифференцировать виды *Perkinsus*. Чувствительность является высокой, особенно для анализа нагрузки во всем организме (Bushek с соавт., 1994).

4.3.1.1.4.3.2. Золотой стандарт

В качестве метода для надзора рекомендуется использовать метод культивирования в жидкой тиогликолевой среде (анализ ткани). Анализ ткани не валидирован в сравнении с анализом нагрузки во всем организме в отношении *P. olseni*, но в отношении *P. marinus* анализ ткани, как было выявлено, является менее чувствительным (Bushek с соавт., 1994). Недавнее исследование, в ходе которого производилось сравнение RFTM метода анализа тканей с методом гистологии и недавно разработанным анализом методом ПЦР, показало, что RFTM анализ является наиболее чувствительным из этих трех анализов (Balseiro с соавт., 2010).

4.3.1.1.4.3.4. Интерпретация результатов

Во время инкубации культивируемые паразиты увеличиваются в размерах с 5–15 до 50–70 мкм. Клетки *Perkinsus* spp. являются сферическими и их стенки окрашены обычно в синий или иссиня-черный цвет йодным раствором Люголя (Ray, 1966).

У восприимчивых видов-хозяев из известного круга хозяев *P. olseni*, положительный результат является предполагаемым свидетельством наличия *P. olseni* инфекции, но он должен быть подтвержден результатами видоспецифичной ПЦР, ISH или ДНК секвенирования ITS (внутренней транскрибирующейся спейсерной) области, ввиду возможного присутствия других видов *Perkinsus*. Если не производится сохранение параллельных образцов для проведения молекулярной диагностики, ДНК паразита можно экстрагировать и амплифицировать с помощью ПЦР непосредственно из положительных тиогликолевых препаратов (Audemard с соавт., 2008).

4.3.1.1.4.3.5. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тест-наборы отсутствуют.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культуры клеток/искусственные среды

Клетки *Perkinsus* spp. без труда поддаются культивированию в разнообразных средах (Casas с соавт., 2002a; Dungan & Hamilton, 1995; La Peure с соавт., 1993). Культуральную среду обычно инокулируют тканями сердца, гемолимфой или тканями жабр. Были проведены сравнительные исследования имеющихся в продаже сред для культивирования *P. marinus*, но не *P. olseni* (Dungan & Hamilton, 1995). Изолят *P. marinus* обычно демонстрировал более быструю пролиферацию в 1:1 DME/Ham's F-12 среде.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

Были получены поликлональные антитела на компонент клеточной стенки *P. olsenii* (Montes с соавт., 2002), но они также связываются с *P. marinus*. Диагностический анализ на основе данных антител не разработан.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Анализ на наличие микроорганизмов рода *Perkinsus* (ПЦР или гибридизация *in situ* (ISH))

В целях надзора с помощью ПЦР рекомендуется, сначала проводить ПЦР анализы на наличие микроорганизмов рода *Perkinsus*, а затем образцы, показавшие положительные результаты, следует тестировать с помощью *P. olsenii*-специфичного анализа. Учитывая последовательности, имеющиеся в GenBank базе данных Национального центра (США) по информации в сфере биотехнологии о меж- и внутриспецифичной вариации в последовательности ITS области известно намного больше, чем о таковых нетранскрибирующейся спесейрной (NTS) области генов комплекса рНК *Perkinsus* sp. Поэтому, чтобы быть более уверенным, что будут обнаружены различные штаммы *P. olsenii*, рекомендуется использовать ПЦР праймеры, которые нацелены на ITS область. Для метода ISH были созданы зонды, которые нацелены на небольшую субъединицу (SSU) генов комплекса рНК (Elston с соавт., 2004). Кроме того, был разработан анализ методом ПЦР в реальном времени для выявления микроорганизмов рода *Perkinsus* для использования на тканях хозяина (Gauthier с соавт., 2006). Он был протестирован только с использованием *P. marinus*, *P. olsenii* и *P. chesapeaki*, и продемонстрировал более высокую чувствительность в ходе ограниченной валидации в сравнении с RFTM анализом. Данный анализ необходимо протестировать более тщательно на специфичность, но он может быть полезным для лабораторий, которые имеют необходимое оборудование.

4.3.1.2.3.1.1. Специфичная для рода *Perkinsus* полимеразная цепная реакция

4.3.1.2.3.1.1.1. Образцы, которые следует отбирать

Живые и только что погибшие моллюски, Асептическим образом отсекают кусочки ткани по 2–3 мм² от жабр и мантии и помещают в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки, содержащие 95–100% этанол. Инструменты, используемые для отсекаания, следует фламбировать перед отбором следующего образца для недопущения перекрестной контаминации.

4.3.1.2.3.1.1.2. Техническая процедура

Экстракцию ДНК производят с помощью протеиназы К в течение

ночи при 56°C и методом спин-колонок с применением имеющихся в продаже наборов. Рекомендуется использовать специфичные для рода *Perkinsus* ПЦР праймеры, указанные в работе Audemard с соавт., 2004. Прямой праймер, PerkITS-85 (5'-CCG-CTT-TGT-TTG-GAT-CCC-3'), и обратный праймер, PerkITS-750 (5'-ACA-TCA-GGC-CTT-CTA-ATG-ATG-3'), нацелены на ITS область генов комплекса рРНК. Данные праймеры амплифицируют 703 п.н.-продукт и могут быть использованы для обнаружения ДНК любого известного и возможно неизвестного вида *Perkinsus*, кроме *P. qugwadi*. Каждая ПЦР реакционная смесь содержит: 20 mM Tris/HCl (pH 8.4); 50 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 0,2 mM каждой dNTP, каждого праймера по бычьего сывороточного альбумина (BSA), и 0,5 мкл геномной ДНК (10–50 нг всего). Условия амплификации являются следующими: первоначальная денатурация при 95°C в течение 4 минут с последующими 40 циклами при 95°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1 минуты, 72°C в течение 1 минуты, с конечным удлинением 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

Использование данных контролей является обязательным. Положительный контроль представляет собой геномную ДНК любого моллюска, инфицированного *Perkinsus* sp. (кроме *P. qugwadi*). Отрицательные контроли – это либо анализы без ДНК, либо анализы с использованием неинфицированных моллюсков.

4.3.1.2.3.1.1.4. Уровни валидации

- Специфичность и чувствительность

ПЦР праймеры для рода *Perkinsus* были протестированы на всеохватность против всех известных видов *Perkinsus*, и протестированы на специфичность против разнообразных гаплоспоридий и паразитических и непаразитических динофлагеллятов (Reese с соавт., 2005). Сравнение чувствительности анализа с таковой при анализе RFTM методом не производилось.

4.3.1.2.3.1.1.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является присутствие в агарозном геле полосы надлежащего размера (703 п.н.), при том что все отрицательные контроли дают отрицательные результаты, а все положительные контроли дают положительные результаты.

4.3.1.2.3.1.2. Специфичная для рода *Perkinsus* genus гибридизация *in situ*

4.3.1.2.3.1.2.1. Образцы, которые следует отбирать

Приготовление фиксированных срезов следует производить в соответствии с процедурой (4.3.1.1.3), описанной выше, кроме того, что срезы тканей необходимо помещать на положительно заряженные стеклянные предметные стекла или стекла, с нанесенным на них 3-аминопропил-триэтоксиланом, без окрашивания. Срезы депарафинизируют в ксилене в течение 10 минут, а затем регидратируют в серии спиртов. Срезы промывают дважды в течение 5 минут забуференным фосфатом солевым раствором (ФБР).

4.3.1.2.3.1.2.2. Техническая процедура

Для рода *Perkinsus* был создан специфичный ДНК зонд, который нацелен на ген малой субъединичный рРНК (Elston с соавт., 2004): Perksp700DIG (5'-CGC-ACA-GTT-AAG-TRC-GTG-RGC-ACG-3'). Данный зонд должен быть 5' концевым меченным дигоксигенином.

Срезы тканей обрабатывают 125 мкг мл⁻¹ проназой в ФБР, при 37°C в течение 30 минут. Затем реакцию останавливают посредством промывания срезов в ФБР с 0,2% глицином в течение 5 минут. После этого срезы помещают в 2 × SSC (стандартный цитратно-солевой буфер; 20× SSC = 3 М NaCl; 0,3 М Na-цитрат; pH 7,0) на 10 минут.

Срезы подвергают предгибридизации в течение 1 часа при 42°C в предгибридизационном растворе (4× SSC, 50% формамид, 5× раствора Денхадта, 0,5 мг мл⁻¹ дрожжевая тРНК, и 0,5 мг мл⁻¹ термо-денатурированной ДНК спермы лосося) во влажной камере.

Затем предгибридизационный раствор заменяют предгибридизационным буфером, содержащие 7 нг мкл⁻¹ меченного дигоксигенином зонда для рода *Perkinsus*. Срезы накрывают ISH пластиковыми покровными стеклами и помещают в термостат при 90°C в течение 12 минут. Затем покровные стекла охлаждают на льду в течение 1 минуты перед гибридизацией в течение ночи при 42°C во влажной камере.

Срезы промывают два раза в течение 5 минут, каждый раз в 2× SSC при комнатной температуре, дважды в течение 5 минут, каждый раз в 1× SSC при комнатной температуре, и дважды в течение 10 минут, каждый раз в 0,5× SSC при 42°C. Затем срезы помещают в Буфер 1 (100 мМ Tris; pH 7,5; 150 мМ NaCl) в течение 1-2 минут.

Срезы помещают в Буфер 1 (см. выше), обогащенный 0,3% Triton X-100 и 2% овечьей сывороткой, на 30 минут. Конъюгат анти-дигоксигенин антитела и щелочной фосфатазы разводят 1/500 (или в соответствии с рекомендациями изготовителя) в Буфере 1, обогащенным 0,3% Triton X-100 и 1% овечьей сывороткой и наносят на срезы тканей. Срезы накрывают

покровными стеклами для гибридизации *in situ* и инкубируют в течение 3 часов при комнатной температуре во влажной камере.

Покровные стекла промывают дважды в Буфере 1 в течение 5 минут, каждый раз, и дважды в Буфере 2 (100 мМ Tris; pH 9,5; 100 мМ NaCl; 50 мМ MgCl₂) в течение 5 минут каждый раз. Затем покровные стекла помещают в раствор для появления окрашивания (337,5 мкг мл⁻¹ нитросинего тетразолия, 175 мкг мл⁻¹ 5-бромо-4-хлоро-3-индолилфосфата р-толуидиновой соли, 240 мкг мл⁻¹ левамизоля в Буфере 2) в течение 2 часов в темноте. Цветовую реакцию останавливают промыванием в ТЕ буфере (10 мМ Tris, pH 8,0; 1 мМ ЭДТА [этилен диамин тетрауксусная кислота]).

Затем предметные стекла ополаскивают в стерильной дистиллированной воде (dH₂O). Срезы подвергают контрастному окрашиванию бисмарк коричневым Y, ополаскивают в dH₂O, и накрывают покровными стеклами с использованием водной заливочной среды.

4.3.1.2.3.1.2.3. Положительные/отрицательные контроли

Включение данных контролей является обязательным. Положительные контроли представляют собой срезы тканей от любого моллюска, инфицированного *Perkinsus* sp. Отрицательные контроли представляют собой либо анализы без зонда, либо анализы с использованием неинфицированных устриц.

4.3.1.2.3.1.2.4. Уровни валидации

- Специфичность и чувствительность

ДНК зонд для рода *Perkinsus* был протестирован на специфичность против разнообразных видов *Perkinsus* species, гаплоспоридий и паразитических динофлагеллятов (Elston с соавт., 2004). Чувствительность выше, чем таковая метода гистологии в парафине, но не было произведено сравнение исследования с помощью данного зонда с RFTM методом.

4.3.1.2.3.1.2.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является присутствие лилово-черного мечения клеток паразита при условии, что все отрицательные контроли дают отрицательные результаты, а все положительные контроли дают положительные результаты.

4.3.1.2.3.2. Анализы на наличие *Perkinsus olseni* (ПЦР и гибридизация *in situ*)

4.3.1.2.3.2.1. *Perkinsus olseni*-специфичная полимеразная цепная реакция

Для *P. olseni* были разработаны ПЦР праймеры, нацеленные на NTS

область и на ITS область генов комплекса рРНК. Хотя праймеры, нацеленные на NTS область продемонстрировали хорошую видовую специфичность, очень мало известно о вариации внутри вида в отношении NTS области, и имеется риск получения ложно положительных результатов. Вариация последовательности внутри ITS области охарактеризована более широко (см. базу данных GenBank), и праймеры, нацеленные на ITS область, более тщательно протестированы на специфичность. Поэтому, рекомендуется использовать праймеры, которые нацелены на ITS область. В данной главе представлена самая последняя версия специфичного для *P. olseni* ITS анализа. Рекомендуется сначала проводить надзор с использованием ITS анализа на наличие микроорганизмов рода *Perkinsus*, а затем проводить специфичный анализ. Разработан анализ методом ПЦР- полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. (RFLP), который может быть полезен для специфичной диагностики *P. olseni* (Abollo с соавт., 2006), хотя он не был протестирован на специфичность по отношению ко всем известным видам *Perkinsus*.

4.3.1.2.3.2.1.1. Образцы, которые следует отбирать

Живые или только что погибшие моллюски. Асептически иссекают кусочки ткани по 2–3 мм² от жабр и мантии и помещают в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки, содержащие 95–100% этанол. Инструменты для отсечения следует фламбировать после отбора предыдущего образца и перед отбором следующего образца для недопущения перекрестной контаминации.

4.3.1.2.3.2.1.2. Техническая процедура

Экстракцию ДНК производят с помощью протеиназы К в течение ночи при 56°C и методом спин-колонок с применением имеющихся в продаже наборов. Были разработаны ПЦР праймеры, нацеленные на ITS область генов комплекса рРНК *P. olseni* (Moss с соавт., 2006): прямой праймер, P_{olsITS}-140F (5'-GAC-CGC-CTT-AAC-GGG-CCG-TGT-T-3'), и обратный праймер, P_{olsITS}-600R (5'-GGR-CTT-GCG-AGC-ATC-CAA-AG-3'). Размер амплифицированного продукта составляет примерно 450 п.н.. ПЦР реакционные смеси содержат ПЦР буфер в концентрации 20 мМ Tris/HCl (pH 8,4); 50 мМ KCl; 1,5 мМ MgCl₂; 0,2 мМ каждой dNTP, каждый праймер по 0,1 мкМ; 0,025 Е мкл⁻¹ *Taq* полимеразы; 0,05 мг мл⁻¹ бычьего сывороточного альбумина и 0,5 мкл геномной ДНК (~10–50 нг) в общем объеме, равном 25 мкл. Амплификации проводят с первоначальной денатурацией при 95°C в течение 4 минут с последующими 40 циклами: при 94°C в течение 1 минуты, 62°C в течение 1 минут, 65°C в течение 3 минут, с этапом итогового удлинения при 65°C в течение 10 минут.

ПЦР продукты подвергают электрофорезу в 2% агарозных (в 1× TAE или TBE) гелях, окрашивают этидиумом бромидом и визуализируют с помощью ультрафиолетового света.

4.3.1.2.3.2.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Использование данных контролей является обязательным. Положительными контролями являются ДНК из очищенных клеток *P. olseni*, или геномная ДНК сильно инфицированных хозяев. Отрицательными контролями является отсутствие реакций целевой ДНК.

4.3.1.2.3.2.1.4. Уровень валидации

- Специфичность и чувствительность

Праймеры к ITS области были протестированы на специфичность против *P. marinus*, *P. chesapeaki*, *P. mediterraneus* и *P. honshuensis* (Moss, 2007; Moss с соавт., 2006). Чувствительность – высокая со способностью выявлять одну клетку *P. olseni* в 30 мг ткани устрицы, но ошибка подвыборки при легких локализованных инфекциях может приводить к получению ложно отрицательных результатов.

- Золотой стандарт

ITS ПЦР анализ на наличие *P. olseni* был подвергнут ограниченной валидации в сравнении с RFTM анализом (анализ ткани) и, как было выявлено, имеет более высокую степень чувствительности (Moss, 2007).

4.3.1.2.3.2.1.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является продукт ПЦР амплификации соответствующего размера (455 п.н.), при условии что все отрицательные контроли дают отрицательные результаты, а все положительные контроли дают положительные результаты.

4.3.1.2.3.2.1.6. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тест-наборы отсутствуют.

4.3.1.2.3.2.2. *Perkinsus olseni*-специфичная гибридизация *in situ* (ISH)

4.3.1.2.3.2.2.1. Образцы, которые следует отбирать

Приготовление фиксированных срезов следует производить в соответствии с процедурой (4.3.1.1.3), описанной выше, кроме того, что срезы ткани должны быть помещены на положительно заряженные стеклянные предметные стекла или предметные стекла, на которые нанесен 3-аминопропил-триэтоксилан без окрашивания. Срезы депарафинизируют в ксилене в течение 10 минут, а затем регидратируют в серии спиртов. Срезы промывают дважды в течение 5 минут в ФБР.

4.3.1.2.3.2.2.2. Технические процедуры

Был создан ДНК зонд, нацеленный на большую субъединицу (LSU) рРНК гена *P. olseni* (Moss с соавт., 2006) (PolsLSU-464DIG 5'-СТС-АСА-АГТ-ГСС-ААА-САА-СТГ-3'). Данный зонд должен быть

меченным на концах дигоксигенином. Процедуры ISH – такие же, как процедуры, используемые для зонда для рода *Perkinsus*, изложенные выше.

4.3.1.2.3.2.2.3. Положительные/отрицательные контроли

Использование данных контролей является обязательным. Положительными контролями являются срезы ткани, отобранные у любого восприимчивого хозяина, инфицированного *P. olseni*. Отрицательными контролями являются либо анализы без зонда, либо анализы с использованием неинфицированных устриц.

4.3.1.2.3.2.2.4. Уровень валидации

- Специфичность и чувствительность

ДНК зонд для *P. olseni* был протестирован против разнообразных видов *Perkinsus species* (Moss, 2007; Moss с соавт., 2006), включая *P. marinus*, *P. chesapeaki*, *P. mediterraneus*, и *P. honshuensis*. Степень чувствительности – выше, чем таковая метода гистологии в парафине, но не было произведено сравнение анализа с использованием данного зонда с RFTM методом.

4.3.1.2.3.2.2.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является присутствие лилово-черного мечения клеток паразита, при условии что все отрицательные контроли дают отрицательные результаты, а все положительные контроли дают положительные результаты.

4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

Очистку *Perkinsus olseni* можно произвести посредством создания клональных культур.

4.3.2. Серологические методы

Не применяются.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для целевого надзора и диагностики *Perkinsus olseni* указаны в таблице 5.1. Используемые в таблице обозначения означают: a = данный метод является рекомендованным методом ввиду его наличия, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = данный метод применяется в некоторых ситуациях, но его стоимость, точность или другие факторы значительно ограничивают его применение; и d = данный метод в настоящее время не рекомендуется использовать для этой цели. Данные рекомендации в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает аспекты достоверности, чувствительности, специфичности и полезности. Хотя не все тесты, обозначенные, как категория a или b,

прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются без получения сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор			Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Личинки	Ювенильная стадия	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 ¹	d	a	a	b	d
RFTM, анализ нагрузки на весь организм ¹	d	c	c	c	d
ПЦР	a	b	b	a ²	b ²
<i>In-situ</i> ДНК зонды	d	b	b	b	a ²
Секвенирование	d	d	d	d	b

1. Данный метод не является видоспецифичным, но может с высокой степенью достоверности использоваться у хозяев/в районах, где присутствует или доминирует только один вид *Perkinsus*.
2. Следует использовать только, когда инфекция визуализирована при исследовании мазков методом RFTM или гистологии.

RFTM = Метод культивирования в жидкой тиогликолевой среде Рея;

ПЦР= полимеразная цепная реакция.

6. Тест(-ты), рекомендованные для целевого надзора в целях объявления свободы от *Perkinsus olseni* инфекции

Для целевого надзора с целью объявления свободы от *P. olseni* инфекции следует использовать ПЦР анализы в комбинации с RFTM анализами ткани или, если возможно, анализами нагрузки на весь организм.

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

У известных восприимчивых видов в известном географическом ареале *P. olseni*, подозрительным случаем инфекции *P. olseni* является положительный результат, полученный при исследовании одним из следующих методов: исследование мазков гемолимфы, гистология, культивирование в жидкой тиогликолевой среде или ПЦР. У других видов-хозяев или вне известного ареала *P. olseni*, подозрительным случаем является положительный результат, полученный при исследовании методом ПЦР. Такие подозрительные случаи должны отправляться в Референтную лабораторию МЭБ для подтверждения.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Подтвержденным случаем *P. olseni* является положительный результат при исследовании мазков гемолимфы, методом гистологии или культивирования в жидкой тиогликолевой среде вместе с положительным результатом, полученным при исследовании методом ПЦР или гибридизации *in situ* (ISH). В качестве итогового этапа для проведения подтверждающей диагностики рекомендуется проводить секвенирование ITS области.

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.

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.

BALSEIRO P., MONTES J., FERNÁNDEZ CONCHAS R., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2010). Comparison of diagnostic techniques to detect the clam pathogen *Perkinsus olseni*. *Dis. Aquat. Org.*, **90**, 143–151.

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. & 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.

CASAS S.M., LA PEYRE J.F., REECE K.S., AZEVEDO C. & VILLALBA A. (2002a). Continuous *in vitro* culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 217–231.

CASAS S.M., VILLALBA A. & REECE K.S. (2002b). 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.

CREMONTE F., BALSEIRO P. & FIGUERAS A. (2005). Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 85–90.

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. Eukaryot. Microbiol.*, **42**, 379–388.

ELANDALLOUSSI L.M., LEITE R.B., RODRIGUES P.M., AFONSO R., NUNES P.A. & CANCELA M.L. (2005). Effect of antiprotozoal drugs on the proliferation of the bivalve parasite *Perkinsus olseni*. *Aquaculture*, **243**, 9–17.

ELSTON R.A., DUNGAN C.F., MEYERS T.R. & REECE K.S. (2004). *Perkinsus* spp. 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[®] MGB real-time PCR approach to quantification of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus* spp. in oysters. *J. Shellfish Res.*, **25**, 619–624.

GOGGIN C.L. & LESTER R.J.G. (1995). *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, **46**, 639–646.

GOGGIN C.L., SEWELL K.B. & LESTER R.J.G. (1990). Tolerances of *Perkinsus* spp. (Protozoa, Apicomplexa) to temperature, chlorine and salinity. *J. Shellfish Res.*, **9**, 145–148.

LA PEYRE M., CASAS S. & LA PEYRE J. (2006). Salinity effects on viability, metabolic activity and proliferation of three *Perkinsus* species. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 59–74.

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. Eukaryot. Microbiol.*, **40**, 304–310.

LESTER R.J.G. & HAYWARD C.J. (2005). Control of *Perkinsus* disease in abalone. Fisheries Research and Development Corporation Project 2000/151 Final Report. University of Queensland, Brisbane, Australia, 50 pp.

MONTES J.F., DURFORT M., LLADO A. & GARCIA VALERO J. (2002). Characterization and immunolocalization of a main proteinaceous component of the cell wall of the protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Parasitology*, **124**, 477–484.

MOSS J.A. (2007). Characterization of exotic pathogens associated with the suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. Ph.D. Dissertation. Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary, Gloucester Point, Virginia, USA, 230 pp.

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

PARK K.I., NGO T.T., CHOI S.D., CHO M. & CHOI K.S. (2006). Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jedoensis* in Korean waters. *J. Invertebr. Parasitol.*, **93**, 81–87.

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.

SAGRISTA E., DURFORT M. & AZEVEDO C. (1995). *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructural observations of the cellular response of the host. *Aquaculture*, **132**, 153–160.

SANIL N.K., VIJAYAN K.K., KRIPA V. & MOHAMED K.S. (2010). Occurrence of the protozoan parasite, *Perkinsus olseni* in the wild and farmed pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould) from the Southeast coast of India. *Aquaculture*, **299**, 8–14.

SHEPPARD B.J. & PHILLIPS A.C. (2008). *Perkinsus olseni* detected in Vietnamese aquacultured reef clams *Tridacna crocea* imported to the USA, following a mortality event. *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 229–235.

VILLALBA A., CASAS S.M., LÓPEZ C. & CARBALLAL M.J. (2005). Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 257–267.

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

*

* *

NB: В настоящее время нет Референтной лаборатории МЭБ по инфицированию *Perkinsus olseni*

(см. Таблицу в конце *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).