

ИНФЕКЦИЯ *MIKROCYTOS MACKINI*

1. Предмет рассмотрения¹

В целях настоящей главы, инфекция *Mikrocytos mackini* рассматривается в качестве инфекции *Mikrocytos mackini*, возбудителя болезни острова Денман у устриц.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

Простейшие, неизвестной таксономической принадлежности. Филогенетический анализ предполагает, что *M. mackini* может являться основным эукариотом, но с наибольшей вероятностью, не находится в тесной связи с другими известными одноклеточными таксонами (Carnegie с соавт., 2003).

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Штаммы неизвестны (Carnegie с соавт., 2003; Farley с соавт., 1988), а также полностью отсутствует генетическая вариативность в пределах *Mikrocytos mackini* внутри полного ITS1-5.8S-ITS2 фрагмента в рДНК в более чем 70 пробах, отобранных в рамках ее диапазона (Abbott с соавт., 2011).

2.1.2. Выживаемость за пределами хозяина

Неизвестно.

2.1.3. Стабильность возбудителя

Неизвестна. Однако прямая передача между устрицами возникает через толщу воды. (Bower, 1988; Hervio с соавт., 1996; Quayle, 1982).

2.1.4. Жизненный цикл

Жизненный цикл прямой, от хозяина к хозяину.

2.2. Факторы хозяина

Вызывает инфекцию у всех видов устриц, зараженных искусственным способом в лаборатории и естественным способом в природе.

2.2.1. Восприимчивые виды хозяина

Тихоокеанская устрица (*Crassostrea gigas*), Американская устрица (*Crassostrea virginica*), Европейская плоская устрица (*Ostrea edulis*) и устрица Олимпия (*Ostrea lurida*) восприимчивы к инфекции (Bower с соавт., 1997). По крайней мере два вида

¹ NB: Версия, принятая Мировой Ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2013 года. Болезнь больше не включена в список МЭБ.

двустворчатых моллюсков - гуидак (*Panope abrupta*) и манильские клемы (*Venerupis* [= *Tapes*, = *Ruditapes*] *philippinarum*) устойчивы к инфекции (Bower с соавт., 2005; и Meyer с соавт., 2008, соответственно).

2.2.2. Восприимчивые стадии хозяина

Все жизненные стадии устриц после нереста восприимчивы к инфекции (Bower с соавт., 2005). О восприимчивости личинок неизвестно.

2.2.3. Предрасположенность видов и субпопуляции (вероятность обнаружения)

Все восприимчивые виды, содержащиеся при температуре ниже 10°C, как минимум в течение 3 месяцев, подвержены болезни (Bower с соавт., 1997; Hervio с соавт., 1996). *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* и *Ostrea lurida* оказываются наиболее восприимчивы к инфекции и болезни, чем *Crassostrea gigas* (Bower с соавт., 1997).

2.2.4. Органы-мишени и инфицированные ткани

Mikrocytos mackini обычно находится в цитоплазме везикулярных клеток соединительной ткани всех органов и волокон замыкающих мускулов, но также наблюдается в гемоцитах и эпителии пищеварительной железы (Hine с соавт., 2001; Meyer с соавт., 2005).

2.2.5. Персистирующая инфекция с пожизненными носителями

Инфекция может быть фатальной в зависимости от хозяина и условий окружающей среды (Bower, 1988; Bower, 2001; Bower & Meyer, 1999). Субклинические инфекции возникают, но о персистенции инфекции на протяжении нескольких лет и появлении пожизненных носителей ничего неизвестно. (Bower с соавт., 1994a).

2.2.6. Векторы

Для передачи инфекции векторов не требуется.

2.2.7. Известные или предполагаемые переносчики среди водных животных

Не предусмотрено.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача прямая, от хозяина к хозяину (Hervio с соавт., 1996). Жизнеспособную *M. mackini*, высвобожденную после смерти хозяина, вероятно приобретает следующим хозяином через механизмы кормления. *Mikrocytos mackini* в гемоцитах может также сохраняться от своего живого хозяина посредством диапедеза через пищеварительный тракт и жабры.

2.3.2. Превалентность

В 1960-е гг, смертность до 40% весной (апрель и май) в низких приливно-отливных уровнях среди взрослых особей (старше 3 лет) *C. Gigas*, выращенных на пляжном субстрате, была связана с *M. mackini*. В последнее время, *C. gigas* (в возрасте 2 лет), полученные из места культивирования, деятельность которого временно приостановлена, были подвержены 10% смертности весной из-за тяжелых инфекций, вызванных *M. mackini*. До 35% устриц из этой инфицированной популяции имели симптоматические поражения (желто-зеленые пустулы) и пораженная выращиваемая культура была отбракована рыночным процессором. Это было необычным проявлением, поскольку болезнь не всегда влияет на устриц, которые находятся в интенсивном разведении и которых собирали в течении трех лет. Лабораторные эксперименты по подверженности внешнему воздействию указывали на то, что болезнь усугубляется за счет холодных температур, предполагая, что влияние *M. mackini* может быть более тяжелым, если она непреднамеренно отправляется в более прохладные места. Также, в условиях лаборатории молодые устрицы (молодь) восприимчивы к инфекции, что приводит к высокой смертности (Bower с соавт., 2005). О влиянии *M. mackini* на молодых особей во время коммерческого культивирования неизвестно, но оно должно быть незначительным, если молодь вводится после окончания периода естественной передачи, который происходит весной (Quayle, 1982).

2.3.3. Географическое распределение

На западном побережье Канады, *M. mackini* оказывается широко распространена на всей территории Джорджии и вплоть до других населенных мест в окрестности острова Ванкувер. Этот паразит также был обнаружен в устрицах из прилегающих окрестностей штата Вашингтон, США, без подтверждения ассоциированной смертности (Abbott с соавт., 2011).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Инфекция может быть летальной, если температуры окружающей среды благоприятны, как указано ниже. Однако около половины устриц, подверженных воздействию, оказываются резистентными к инфекции или возникающей из-за нее болезни.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Пониженные температуры $<10^{\circ}\text{C}$ в течение 3-4 месяцев, вероятно, являются условием для развития болезни (Bower & Meyer, 1999; Nervio с соавт., 1996). Устрицы, подвергнутые экспериментальному воздействию, содержащиеся при температуре 15°C в течение 3 месяцев не заболевают, пока их не переносят и не содержат при температуре 10°C в течение дополнительных 4 месяцев. Ежегодное появление болезни исключительно в весеннее время (с марта по июнь) может объясняться необходимостью холодной температуры для развития болезни.

2.4. Контроль и профилактика

Аквакультурная промышленность может применять методы управления во избежание влияния *M. mackini* (Bower, 1988).

2.4.1. Вакцинация

Не предусмотрено.

2.4.2. Химиотерапия

Не предусмотрено.

2.4.3. Иммуностимуляция

Не предусмотрено.

2.4.4. Резистентное разведение

Не предусмотрено.

2.4.5. Возобновление поголовья резистентными видами

Не предусмотрено.

2.4.6. Блокирующие агенты

Не предусмотрено.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Не предусмотрено.

2.4.8. Общие практики животноводства

Вылов устриц рыночного размера проводится в течение трех лет после разведения и до февраля третьего года с момента выращивания. Молодые устрицы (молодь) не следует выпускать на уровнях малой воды или рядом с инфицированным стадом в подвешенной культуре до июня (Bower, 1988; Quayle, 1982).

3. Отбор образцов

3.1. Отбор индивидуальных образцов

Следует проводить отбор образцов от свежих или недавно умерших устриц.

Весной отбирают взрослых особей устриц (старше 3 лет) из низких приливно-отливных уровней. Отбор образцов сфокусирован на местах, в которых в настоящее время наблюдается смертность. Устриц вынимают из раковины и выбирают образцы, у которых есть незначительные поражения (язвы, абсцессы, пустулы обычно зеленого цвета, но могут быть желто-коричневыми или бесцветными и достигать до 5 мм в диаметре) в везикулярной соединительной ткани тельца, мантии и нижнегубных

щупалец и/или замыкающего мускула (фотографии пораженных участков можно увидеть по ссылке: <http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/mikmacoy-eng.html>).

3.2. Сохранение образцов для представления

Для гистологии наилучшим консервантом является раствор Дэвидсона, но 10% забуференный формалин или другие стандартные гистологические фиксаторы тоже приемлемы. Для анализов полимеразной цепной реакции (ПЦР), образцы должны сохраняться и храниться в 95% неденатурированном этаноле до выделения ДНК с использованием коммерчески доступного набора (например, DNeasy Kit; QIAGEN).

3.3. Объединение образцов

Для ПЦР и гистологии допустимо объединение пораженных участков от одной устрицы.

3.4. Наиболее подходящие органы и ткани

Важно отметить, что любые пораженные участки нижнегубных щупалец, мантии, стенки тела или замыкающего мускула консервируются для гистологии и ПЦР. Рекомендуется, чтобы репрезентативные пораженные участки иссекали и разделяли пополам, половину каждого из них фиксировали для гистологии и ПЦР.

Для гистологии, в отсутствие участков поражения (или в дополнение к ним), используется поперечный разрез (около 3 мм толщиной) через переднюю часть висцеральной массы, которая включает нижнегубные щупальца, мантию, пищеварительную железу и желудок. Везикулярная соединительная ткань (ВСТ) наиболее подходит для визуализации *M. mackini* путем гистопатологии.

Для ПЦР, в отсутствие участков поражения (или в дополнение к ним), поперечный разрез (срез около 3 мм толщиной) делают через среднюю часть висцеральной массы. Из этого участка иссекается маленький участок/маленькие участки ткани (общим весом около 25 мг) около основания жабр, которые включают: ВСТ, пищеварительную железу и жабры.

3.5. Неподходящие образцы/ткани

Mikrocytos mackini ассоциируется с пищеварительным трактом и не выявляется путем рутинного гистологического исследования срезов, окрашенных гематоксилином и эозином. Для того, чтобы увидеть паразитов в этих тканях, обычно требуется *in situ* гибридизация. Также, практически невозможно обнаружить *M. mackini* путем гистопатологии в тканях устриц, зараженных естественным путем, которые не ассоциируются с поражениями, вызванными инфильтрацией гемоцитами.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Небольшие фокальные поражения (язвы, абсцессы, пустулы обычно зеленого цвета, но могут быть желто-коричневыми или бесцветными) до 5 мм в диаметре наблюдаются в мягких тканях и часто имеют коричневые отпечатки на раковине, наряду с абсцессами на поверхности мантии. Помимо поражений, зараженные устрицы обычно прибывают в хорошем состоянии до момента наступления смерти. Эти клинические признаки неспецифичны для инфекции *M. mackini*.

4.1.2. Изменения в поведении

Умирающие, с раскрывающимися створками и слабые устрицы (медленно закрывающие свои створки) появляются среди пораженных стад весной, когда содержатся в емкостях при температуре <10°C. Такие изменения в поведении неспецифичны для инфекции *M. mackini*.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

Фокальные поражения интенсивной инфильтрацией (язвы, абсцессы, пустулы обычно зеленого цвета, но могут быть желто-коричневыми или бесцветными) до 5 мм в диаметре возникают в пределах стенки тела, замыкающего мускула или на поверхностях нижнегубных щупалец или мантии (Bower, 2005). Эти макроскопические признаки неспецифичны для инфекции *M. mackini*.

4.2.2. Клиническая биохимия

Не предусмотрено.

4.2.3. Микроскопическая патология

Аккумуляция (инфильтрация) многочисленных гемоцитов вблизи фокальной инфекции.

4.2.4. Влажные препараты

Не предусмотрено.

4.2.5. Мазки

Тканевые отпечатки пораженных участков, окрашенные красителем Гимза и изученные с помощью световой микроскопии (масляная иммерсия) с 1000-кратным увеличением могут обнаружить *M. Mackini*, высвобожденную из клеток хозяина.

4.2.6. Фиксированные срезы

Очаги инфильтрации гемоцитами в мантии, нижнегубных щупальцах и замыкающем мускуле могут указывать на локализацию *M. mackini* внутри цитоплазмы прилегающих клеток везикулярной соединительной ткани и мышечных волокон. В центре пораженного участка может возникать некроз ткани (Bower с соавт., 1994b). Среди инфекций частой интенсивности, возникающих в лаборатории, инфильтрация гемоцитами может не присутствовать.

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Тесная связь *M. mackini* с органеллами клеток хозяина предполагает, что паразиты могут получать энергию напрямую от митохондрий клетки хозяина (Hine с соавт., 2001).

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

Малый размер *M. mackini* (2-3 мкм в диаметре) исключает возможность обнаружения без помощи сильного увеличения (примерно в 1000 раз).

4.3.1.1. Микроскопические методы

При световой микроскопии, *M. mackini* выглядит морфологически схоже с *Vonamia* sp., за исключением ее возникновения в клетках везикулярной соединительной ткани и миоцитах, где *Vonamia* sp. не появляется. При электронной микроскопии может использоваться морфологическая ультраструктура для того, чтобы отличать *M. mackini* от других известных простейших. Однако для применения этого инструмента требуются очень тяжелые инфекции.

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Не предусмотрено.

4.3.1.1.2. Мазки

4.3.1.1.2.1. Образцы для взятия

Живые хозяева с поражениями.

4.3.1.1.2.2. Техническая процедура

Иссекают пораженный участок и разрезают пополам при помощи скальпеля. Промокают пораженную сторону ткани впитывающей бумагой, чтобы удалить излишнюю жидкость. Делают отпечаток ткани на нескольких участках чистого предметного стекла и высушивают на воздухе. Наблюдения проводятся при 1000-кратном увеличении (масляная иммерсия) после окрашивания красителем Райта-Гимзе или с помощью коммерчески доступного набора для окрашивания

кровяных клеток (например, Hemacolor[®], EMD Chemicals Inc.), в соответствии с инструкциями производителя.

4.3.1.1.2.3. Положительные контроли

Отпечатки ткани, полученные от пораженных участков зараженных устриц, доступны в Референтной лаборатории МЭБ. Однако, важно отметить, что *M. mackini* в отпечатках ткани практически невозможно отличить от *Bonamia* sp.

4.3.1.1.2.4. Уровни валидации

Настоящее исследование не было валидировано в официальном порядке.

4.3.1.1.2.5. Специфичность и чувствительность

Очень низкая специфичность, поскольку *M. mackini* напоминает другие микроклетки в отпечатках ткани; чувствительность может быть лучше, чем рутинная гистология, но только в случае, если присутствуют поражения (Carnegie с соавт., 2003).

4.3.1.1.2.6. Интерпретация результатов

Присутствие небольших микроклеток (могут быть искажены примерно до 4 мкм в диаметре), которые обычно наблюдаются за пределами клеток хозяина. Паразит обычно 2-3 мкм в диаметре имеет светло-синюю (базофильную) цитоплазму и небольшое красное (эозинофильное) ядро (цвета могут варьировать в зависимости от используемого красителя). Технология не является видоспецифичной.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

4.3.1.1.3.1. Образцы для отбора

Живые и недавно умершие устрицы.

4.3.1.1.3.2. Технологическая процедура

Срезы ткани, которые включают пораженные участки, должны быть зафиксированы приблизительно на 24 часа в растворе Дэвидсона или 10% забуференном формалине, с последующей обычной обработкой для парафиновой гистологии и окрашивания гематоксилином и эозином. Наблюдения проводятся при нарастающем увеличении до ×1000.

4.3.1.1.3.3. Положительные контроли

Гистологические срезы (окрашенные и с покровными стеклами или неокрашенные парафиновые срезы на предметном стекле) доступны в Референтной лаборатории МЭБ. Частая ссылка на предметные стекла с положительными контролями при выполнении исследования *M. Mackini*, рекомендуется в виду скрытой природы и малого размера этого паразита.

4.3.1.1.3.4. Уровни валидации

Настоящее исследование не было валидировано в официальном порядке.

4.3.1.1.3.5. Специфичность и чувствительность

Специфичность видов очень низкая для микроклеток, наблюдаемых в гемоцитах, но высокая при обнаружении микроклеток внутри цитоплазмы клеток везикулярной соединительной ткани; чувствительность хорошая для инфекций средней-высокой интенсивности, в особенности, когда соединительная ткань исследуется непосредственно около поражений, но низкая для ткани, находящейся на расстоянии и для инфекций низкой интенсивности.

4.3.1.1.3.6. Золотой стандарт

В настоящее время гистопатология поражений у устриц считается предпочтительным анализом для обнаружения и диагностики инфекций *M. mackini*.

4.3.1.1.3.7. Интерпретация результатов

Положительный результат представляет собой появление сферических микроклеток около 2-3 мкм в диаметре внутри цитоплазмы клеток везикулярной соединительной ткани и/или миоцитов, обычно внутриклеточно, в клетках хозяина, непосредственно прилегающих к фокальной интенсивной инфильтрации гемоцитами.

У восприимчивых видов хозяев в известном диапазоне *M. mackini*, положительный результат является доказательством инфекции *M. mackini*. За пределами известного диапазона, положительный результат должен быть подтвержден ДНК секвенированием рибосомной РНК малой субъединицы региона гена (SSU рДНК) и сравнением последовательности с 1457 п.о. фрагмента от *M. mackini*, опубликованным в Банке генов². Если последовательность рДНК SSU указывает на *M. mackini*, рекомендуется проводить секвенирование ITS1-5.8S-ITS2 рДНК с использованием методов Abbott с соавт., 2011 для того, чтобы с полной уверенностью определить, если она генетически идентична *M. mackini* в диапазоне, описанном в настоящий момент³.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

Чистые изоляты *M. Mackini* не производились. Однако, процедуры идентификации в дополнение к световой микроскопии, находятся в разработке.

² Учетный номер AF477623, URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=30515676>

³ Банк генов # HM563060.1; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM563060.1>

4.3.1.2.1. Среда для культивирования клеток/искусственная среда

Не предусмотрено.

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе антител (IFAT, ELISA и т.п.)

Не предусмотрено. Моноклональные антитела продуцировались, но не были сформированы в иммунологический диагностический анализ.

4.3.1.2.3. Молекулярные технологии (ПЦР, ISH, секвенирование и т.п.)

4.3.1.2.3.1. ПЦР анализ SSU региона рДНК

Пары праймеров, которые нацелены на SSU регион, были разработаны для *M. mackini*. Это праймеры 5'-AGA-TGG-TTA-ATG-AGC-CTC-C-3' и 5'-GCG-AGG-TGC-CAC-AAG-GC-3', они амплифицируют продукт с 546 п.о. (Carnegie с соавт., 2003). Образцы должны быть разбавлены либо стерильной ddH₂O (дважды дистиллированная вода), либо стерильным буфером Трис/ЭДТА (TE) (рН 7,0-7,2) до концентрации от 10 до 40 нг/мкл перед проведением анализа. Реакционная смесь для ПЦР содержит следующие ингредиенты в финальных концентрациях: 20 мМ Трис/HCl (рН 8,4), 50 мМ KCl, 1,25 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого dATP, dCTP, dGTP, и dTTP, по 0,05 мкМ каждого праймера и 0,05 ед/мкл и 1,5 мкл ДНК матрицы общим объемом 15 мкл. Циклические параметры начинаются с первичной денатурации при 95°C в течении 10 минут, с последующими 40 циклами при 95°C в течение 1 минуты, 60.5°C в течение 1 минуты и 72°C в течение 1 минуты и завершаются конечной элонгацией при 72°C в течение 10 минут. Продукты могут подвергаться электрофорезу на 1,5% агарозных гелях, содержащих 2,0 мкл 5000X SybrGreen или 0,1 мкг/мл бромида этидия и визуализироваться под воздействием УФ света.

4.3.1.2.3.1.1. Положительные/отрицательные контроли

Являются обязательными. Положительные контроли представляют собой геномную ДНК от сильно инфицированных хозяев, которые могут быть получены из Референтной лаборатории МЭБ. Отрицательные контроли представляют собой либо геномную ДНК от неинфицированных хозяев, либо отсутствие реакций матричной ДНК.

4.3.1.2.3.1.2. Уровни валидации

Настоящее исследование не было валидировано в официальном порядке.

4.3.1.2.3.1.3. Специфичность и чувствительность

Анализ SSU региона рДНК выявил в три - четыре раза больше инфекций *M. mackini* у 1056 диких устриц с острова Денман, Британская Колумбия, чем стандартная гистопатология (Carnegie с соавт., 2003). Однако впоследствии с ним возникли проблемы, поскольку он не дифференцирует *M. mackini* и

генетически отличные *Mikrocytos* sp., обнаруженные в многочисленных несопоставимых географических местоположениях (Abbott с соавт., 2011).

4.3.1.2.3.1.4. Интерпретация результатов

Положительный результат ПЦР ампликона подходящего размера, у которого все отрицательные контроли отрицательны, а положительные контроли положительны.

4.3.1.2.3.2. Анализ кПЦР TaqMan в ITS2-28S рДНК

В настоящее время был разработан диагностический анализ кПЦР с использованием праймеров и зонда в ITS2-28S в рДНК у *M. mackini*, который не дает кросс-реакции с *Mikrocytos* sp.. Стендовая валидация этого анализа показала, что он высоко специфичен и чувствителен для обнаружения *M. mackini*. Формальная диагностическая валидация анализа кПЦР в настоящий момент находится в работе.

4.3.1.2.3.3. In situ гибридизация (ISH)

4.3.1.2.3.3.1. Образцы для отбора

Следуйте процедуре для фиксированных срезов (4.3.1.1.3) выше, за исключением того, что срезы тканей должны располагаться на положительно заряженных срезах или срезах, покрытых аминоалкилсиланом.

4.3.1.2.3.3.2. Техническая процедура

Срезы ткани депарафинизируют, регидрируют и затем гибридизируют маркированными олигонуклеотидными зондами. Зонды с маркировкой 5' Oregon Green демонстрируют сильную гибридизацию в отношении *M. mackini* (Carnegie с соавт., 2003). Однако при использовании этого флуоресцентного зонда ориентация ткани хозяина затруднена. Гибридизация с зондом MASKINI-1 (5'-AGC-ССА-СAG-ССТ-ТСА-С-3') с 3' концевым мечением дигоксигенином и контр-окрашиванием 0,5% Бисмарк коричневым в 30% этаноле (Meuer с соавт., 2005) отображает место паразита внутри тканей хозяина.

4.3.1.2.3.3.3. Положительные/отрицательные контроли

Являются обязательными. Положительные контроли представляют собой срезы ткани устрицы, инфицированные *M. mackini*. Отрицательные контроли представляют собой либо анализы без зондов, либо исследования с незараженными устрицами.

4.3.1.2.3.3.4. Уровни валидации

Эта технология не была валидирована в официальном порядке.

4.3.1.2.3.3.5. Специфичность и чувствительность

Зонд MACKINI-1 демонстрировал сильную гибридизацию в отношении *M. mackini*, но не гибридизировал с тканями устриц или с другими паразитами, свойственными ракообразным и исследуемым бактериям: *Bonamia ostreae* у *O. edulis*; *Perkinsus qugwadi* у *Patinopectin yessoensis*; *Trichodina* sp. у *C. gigas*; амeboподобным простейшим у *Protothaca staminea*; *Hematodinium* sp. у *Chionoecetes tanneri*; SPP (простейший паразит неясной таксономической принадлежности) у *Pandalus platyceros*; и *Nocardia crassostreae* у *C. gigas* (Meyer с соавт., 2005). Этот дигоксигенин-меченный зонд был значительно более чувствителен для обнаружения инфекций в сравнении со стандартными гистологическими срезами, окрашенными гематоксилином и эозином. Инфекция может быть обнаружена при более слабом увеличении (100 кратном в сравнении с 1000 кратным) и при базофильном окрашивании тканей, таких как пищеварительная железа, кишечный эпителий и гонада (Meyer с соавт., 2005).

4.3.1.2.3.3.6. Интерпретация результатов

Положительный результат - это присутствие сине-черного мечения паразитических клеток (соответствующего размера и локализации ткани) с отрицательными показателями всех отрицательных контролей и положительными показателями всех положительных контролей.

4.3.1.2.4. Очищение возбудителя

Изоляты *M. mackini*, свободные от контаминации ядрами клеток хозяина, не были получены. Однако была описана технология фильтрации, которая концентрирует этот паразит. (Joly с соавт., 2001).

4.3.2. Серологические методы

Моноклональные антитела были созданы и гибридомы криоконсервированы около 15 лет назад. Специфичность моноклональных антител не была полностью валидирована, и они не были разработаны в качестве диагностического набора.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели их применения

Методы, доступные в настоящее время для целевого надзора и диагностики *Mikrocytos mackini*, перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице, указывают: a = метод является рекомендуемым методом исходя из соображений доступности, функциональности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод представляет собой стандартный метод с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод применяется в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы существенно ограничивают его применение; и d = метод, в настоящее время не рекомендованный для этой цели. Это несколько субъективно, поскольку соответствие метода охватывает вопросы надежности, чувствительности, специфичности и функциональности. Несмотря на это, не все тесты, перечисленные под категориями А или

В, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинное применение и тот факт, что они широко использовались без неточных результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор		Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Молодые особи	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	c	c	d
Мазки (отпечатки ткани) ¹	c	c	c	d
Гистопатология	c	a	b	b
Трансмиссивная ЭМ	d	d	d	b
ДНК зонды <i>in situ</i>	c	c	c	a
ПЦР	b	b	b	b
Секвенирование	d	d	d	a2

1. Технология не является видоспецифичной, но может использоваться у восприимчивых хозяев и в восприимчивых областях, а также весной, когда проявляется болезнь, вызванная *M. mackini*.
2. Используется исключительно в сочетании с положительным анализом ПЦР.

ЭМ = электронная микроскопия; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

6. Тест (ы) рекомендуемые для целевого надзора для признания свободы от инфекции *Mikrocytos mackini*

Гистопатология и анализы ПЦР должны использоваться для целевого надзора для признания свободы от инфекции *M. mackini*. Устрицы старше двух лет из низких приливно-отливных уровней или подвесной культуры следует отбирать в весеннее время года, и любого рода поражения должны быть выявлены.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Дефиниция подозрительного случая

У известных восприимчивых видов в пределах географического распространения *M. mackini* в весеннее время года, подозрительный случай инфекции *M. mackini* является макроскопическим признаком болезни в комбинации с положительным результатом отпечатка ткани и поражений.

У других видов хозяев или за пределами известного диапазона *M. mackini*, подозрительный случай представляет собой положительный результат, полученный путем гистологии или ПЦР.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

У известных восприимчивых видов в пределах географического распространения *M. mackini* в весеннее время года, подтвержденный случай представляет собой положительный результат одного из следующих методов: гистология, ПЦР или гибридизация *in situ*.

У других видов хозяев или за пределами известного диапазона *M. mackini*, подтвержденный случай представляет собой положительный результат, полученный путем гистологии или ПЦР, наряду с положительным результатом гибридизации *in situ*, электронной микроскопии или гомологии с опубликованными рДНК последовательностями (Abbott с соавт., 2011; Carnegie с соавт., 2003). Секвенирование SSU и/или ITS1-5.8S-ITS2 регионов рекомендуется в качестве заключительного этапа для подтверждающей диагностики *M. mackini*.

8. Список литературы

- ABBOTT C.L., GILMORE S.R., LOWE G., MEYER G. & BOWER S. (2011). Sequence homogeneity of internal transcribed spacer rDNA in *Mikrocytos mackini* and detection of *Mikrocytos* sp. in a new location. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 243–250.
- BOWER S.M. (1988). Circumvention of mortalities caused by Denman Island oyster disease during mariculture of Pacific oysters. *Am. Fish. Soc. (Special Publication)*, **18**, 246–248.
- BOWER S.M. (2001). Hazards and risk management of *Mikrocytos mackini* in oysters. In: Proceedings of the OIE International Conference on Risk Analysis in Aquatic Animal Health. Rodgers C.J., ed. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France, 164–166.
- BOWER S.M. (2005). Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Mikrocytos mackini* (Denman Island Disease) of Oysters. <http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/mikmacoy-eng.html>
- BOWER S.M., BATE K. & MEYER G.R. (2005). Susceptibility of juvenile *Crassostrea gigas* and resistance of *Panope abrupta* to *Mikrocytos mackini*. *J. Invertebr. Pathol.*, **88**, 95–99.
- BOWER S.M., CARNEGIE R.B., GOH B., JONES S.R.M., LOWE G.J. & MAK M.W.S. (2004). Preferential PCR amplification of parasitic protistan small subunit rDNA from metazoan tissues. *J. Eukaryotic Microbiol.*, **51**, 325–332.
- BOWER S.M., HERVIO D. & MCGLADDERY S.E. (1994a). Potential for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, to serve as a reservoir host and carrier of oyster pathogens. *ICES Council Meeting Papers*, Copenhagen, Denmark, ICES-CM-1994/F:30.
- BOWER S.M., HERVIO D. & MEYER G.R. (1997). Infectivity of *Mikrocytos mackini*, the causative agent of Denman Island disease in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, to various species of oysters. *Dis. Aquat. Org.*, **29**, 111–116.
- BOWER S.M., MCGLADDERY S.E. & PRICE I.M. (1994b). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **4**, 1–199.
For update see URL: <http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/index-eng.html>
- BOWER S.M. & MEYER G.R. (1999). Effects of cold water on limiting or exacerbating some oyster diseases. *J. Shellfish Res.*, **18**, 296 (Abstract).
- BOWER S.M. & MEYER G.R. (2002). Morphology and ultrastructure of a protistan pathogen in the haemolymph of shrimp (*Pandalus* spp.) in the northeastern Pacific Ocean. *Can. J. Zool.*, **80**, 1055–1068.

CARNEGIE R.B., MEYER G.R., BLACKBOURN J., COCHENNEC-LAUREAU N., BERTHE F.C.J. & BOWER S.M. (2003). Molecular detection of the oyster parasite *Mikrocytos mackini* and a preliminary phylogenetic analysis. *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 219–227.

COMMITTEE ON THE STATUS OF ENDANGERED WILDLIFE IN CANADA (2004). Canadian Wildlife Service, Ottawa, Canada. http://www.cosewic.gc.ca/eng/sct0/sar_2004_11_e.cfm

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

HERVIO D., BOWER S.M. & MEYER G.R. (1996). Detection, isolation and experimental transmission of *Mikrocytos mackini*, a microcell parasite of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Invertebr. Pathol.*, **67**, 72–79. HINE P.M., BOWER S.M., MEYER G.R., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J. (2001). Ultrastructure of *Mikrocytos mackini*, the cause of Denman Island disease in oysters *Crassostrea* spp. and *Ostrea* spp. in British Columbia, Canada. *Dis. Aquat. Org.*, **45**, 215–227.

JOLY J.-P., BOWER S.M. & MEYER G.R. (2001). A simple technique to concentrate the protozoan *Mikrocytos mackini*, causative agent of Denman Island disease in oysters. *J. Parasitol.*, **87**, 432–434.

MEYER G.R., BOWER S.M. & CARNEGIE R.B. (2005). Sensitivity of a digoxigenin-labelled DNA probe in detecting *Mikrocytos mackini*, causative agent of Denman Island disease (mikrocytosis) in oysters. *J. Invertebr. Pathol.*, **88**, 89–94.

MEYER G.R., BOWER S.M., LOWE G. & DAVIES S. (2008). Resistance of the Manila clam (*Venerupis philippinarum*) to infection with *Mikrocytos mackini*. *J. Invertebr. Pathol.*, **98**, 54–57.

QUAYLE D.B. (1982). Denman Island oyster disease 1960-1980. *British Columbia Shellfish Mariculture Newsletter*, **2**, 1–5 (Victoria, Canada).

*
* *

NB: Существует Референтная лаборатория МЭБ по инфекции *Mikrocytos mackini* (см. Таблицу в конце настоящего *Водного Руководства* или перейдите по ссылке на вебсайт МЭБ для получения более актуального перечня:

<http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>)

Для получения любой дополнительной информации относительно инфекции *Mikrocytos mackini*, пожалуйста, обратитесь в Референтную лабораторию МЭБ.