

ИНФЕКЦИЯ *BONAMIA EXITIOSA*

1. Сфера применения¹

Bonamia exitiosa – это простейший паразит типа *Haplosporidia* (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004), инфицирующий гемоциты нескольких видов устриц и вызывающий физиологические нарушения и, в конечном итоге, гибель животного (Cranfield *с соавт.*, 2005; Dinamani *с соавт.*, 1987). Применительно к настоящей главе, инфекция *Bonamia exitiosa* означает инфекцию *B. exitiosa*, которая ранее называлась *B. exitiosus* (Berthe & Hine, 2003; Hine *с соавт.*, 2001). Это определение исключает инфекцию *B. ostreae* (Pichot *с соавт.*, 1979), *B. roughleyi* (Cochenne *с соавт.*, 2003; Farley *с соавт.*, 1988) и *B. perspora* (Carnegie *с соавт.*, 2006). Разновидности *Bonamia*, которые не идентифицированы до уровня видов (Burgeson *с соавт.*, 2004; Campalans *с соавт.*, 2000; Kroeck & Montes, 2005), следует направлять в соответствующую Справочную лабораторию МЭБ.

2. Информация о болезни

2.1. Особенности возбудителя

2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

Bonamia exitiosa (Berthe & Hine, 2003; Hine *с соавт.*, 2001), штаммы не идентифицированы.

2.1.2. Выживание вне хозяина

В настоящее время неизвестно.

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

В настоящее время неизвестно.

2.1.4. Жизненный цикл

Возможна прямая передача паразита от хозяина к хозяину, и предполагается, что между устричными банками по течению может происходить пассивная передача паразита, находящегося на инфекционных стадиях (Cranfield *с соавт.*, 2005; Hine, 1996).

2.2. Особенности хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Виды устриц *Ostrea chilensis* (= *Tiostrea chilensis* = *T. lutaria*) (Dinamani *с соавт.*, 1987), *O. angasi* (Corbeil *с соавт.*, 2006b; Hine, 1996; Hine & Jones, 1994), *O. edulis* (Abollo *с соавт.*, 2008; Narcisi *с соавт.*, 2010) и *O. stentina* (Hill *с соавт.*, 2010).

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

Известно, что у *O. chilensis* восприимчивы устрицы молодой возрастной группы (устрицы, длина которых составляет не менее 58 мм) (Dinamani *с соавт.*, 1987). У *O. edulis* паразит

¹ Примечание: Версия утверждена Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 г.

был обнаружен в устрицах рыночного размера (> 60 мм) (Abollo *с соавт.*, 2008). Данные относительно других стадий развития устриц, включая молодь устриц, отсутствуют. ДНК *B. exitiosa* недавно была обнаружена у личинок плоских устриц *Ostrea edulis* (Arzul *с соавт.*, 2011).

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Ostrea chilensis и *O. angasi* (Dinamani *с соавт.*, 1987; Hine & Jones, 1994), длина которых составляет не менее 58 мм. У *O. chilensis* средняя интенсивность инфекции *Bonamia* была значительно выше у самок и устриц после икрометания, чем у самцов и устриц-гермафродитов (Hine *с соавт.*, 2002).

2.2.4. Органы-мишени и инфицируемые ткани

Bonamia exitiosa является простейшим паразитом, который проникает в гемоциты, но его можно обнаружить и вне клеток (Dinamani *с соавт.*, 1987). Данный простейший паразит, который проникает в гемоциты, быстро становится системным и может быть обнаружен в различных органах, особенно в соединительных тканях жабр и мантии (Hine, 1991a). У *Ostrea angasi* паразит является эпителиотропным, и, по-видимому, очень легкие инфекции могут вызывать обширную очаговую гемоцитную инфильтрацию с очагами некроза. У *O. edulis* паразит вызывает тяжелую гемоцитную инфильтрацию и наблюдается в соединительной ткани различных органов, в основном внутри гемоцитов, но иногда и за пределами клеток-хозяев (Abollo *с соавт.*, 2008). Что касается *O. stentina*, у животных, инфицированных паразитом, гемоцитоз не наблюдался (Hill *с соавт.*, 2010).

2.2.5. Персистентная инфекция с пожизненным носительством

Инфекция часто является смертельной в зависимости от хозяина и условий окружающей среды.

2.2.6. Переносчики инфекции

Не идентифицированы.

Обнаружение ДНК *B. exitiosa* у *Crassostrea gigas* позволяет предположить, что данный вид может выступать в качестве носителя или резервуара *B. exitiosa* (Lynch *с соавт.*, 2010).

2.2.7. Известные или потенциальные носители среди диких водных животных

Bonamia exitiosa обычно инфицирует дикие популяции восприимчивых видов (см. Раздел 2.2.1).

2.3. Модель болезни

2.3.1. Механизмы передачи

У *O. chilensis* возможна прямая передача паразита от хозяина к хозяину. Высвобожденные инфекционные частицы проглатываются устрицами и попадают в гемолимфу из кишечника (Hine, 1991a; Hine, 1991b). Инфекционные частицы фагоцитируются агранулярными гемоцитами, но они способны противостоять лизису внутри гемоцита (Hine & Wesley, 1994).

ДНК паразита была обнаружена у личинок, развивающихся в мантийной полости взрослых устриц, что указывает на возможную передачу инфекции между этими двумя возрастными группами. Таким образом, личинки могут способствовать распространению паразита во время планктонной жизни (Arzul *с соавт.*, 2011).

2.3.2. Превалентность

Превалентность у *O. chilensis* варьируется (от 0% до почти 80%) (Cranfield *с соавт.*, 2005; Diggles & Hine, 2002). В южном полушарии инфекция *V. exitiosa* имеет самую высокую превалентность с января по апрель, причем в сентябре и октябре паразита обнаруживают крайне редко (Hine, 1991a). Стресс-факторы, такие как воздействие экстремальных температур (ниже 7°C или выше 26°C), соленость (40%), голод (длительное содержание в отфильтрованной морской воде), манипуляции (интенсивное перемешивание четыре раза в день) или сильное инфицирование простейшими со сложным жизненным циклом (Hine, 2002), может влиять на динамику заболевания *V. exitiosa* у *O. chilensis* (Hine *с соавт.*, 2002). В Галисии (Испания) максимальная зарегистрированная превалентность *V. exitiosa* у *O. edulis* составила 34% в одной партии, собранной в октябре (Abollo *с соавт.*, 2008). Несмотря на некоторые различия в превалентности, наблюдаемые между датами отбора проб, в настоящее время невозможно определить ежегодный сценарий заражения *V. exitiosa* у плоских устриц в Европе.

Превалентность различается у *O. edulis*, коинфицированных *V. ostreae* (Abollo *с соавт.*, 2008).

2.3.3. Географическое распределение

Инфекция *V. exitiosa* встречается у *O. chilensis* в проливе Фово и в других районах вокруг Южного острова, Новая Зеландия (Dinamani *с соавт.*, 1987; Doonan *с соавт.*, 1994); у *O. angasi* в Австралии (Порт-Филлип, Виктория; Georges Bay, Тасмания; и Олбани, Западная Австралия) (Corbeil *с соавт.*, 2006b; Hine, 1996; Hine & Jones, 1994); у *O. edulis* в Галисии (Испания) (Abollo *с соавт.*, 2008), в Адриатическом море в Италии (Narcisi *с соавт.*, 2010), в Средиземном море во Франции и в Корнуолле в Соединенном Королевстве; и у *O. stentina* в Тунисе (Hill *с соавт.*, 2010).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Инфекция часто является летальной. При *O. chilensis* гибель обычно происходит по достижении наивысшего уровня интенсивности инфекции, особенно в сочетании с сильным инфицированием простейшими со сложным жизненным циклом (Hine, 2002; Hine & Wesley, 1994). Болезнь, по-видимому, вызывает гибель более чем у 80% устриц, поскольку волна инфекции проходит через устричные банки в течение 2-3 лет (Cranfield *с соавт.*, 2005). Воздействие *V. exitiosa* на *O. edulis* или *O. stentina* еще не оценивали.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Превалентность была выше у устриц, которые содержались в течение короткого периода (14 дней) в теплой воде (25–26°C) в течение 1 часа в день или в сверхсоленой (39–40%) воде по сравнению с холодной водой (7°C в течение 1 часа в день) и в гипосоленой воде (15%) (Hine *с соавт.*, 2002). Однако в данном исследовании изменение температуры и солености использовалось в качестве стресс-фактора.

У *O. chilensis* превалентность ежегодно характеризуется двумя пиками: в апреле (в начале осени) и августе (зимой) (Hine, 1991a). Эволюция *V. exitiosa* у *O. edulis* или *O. stentina* в зависимости от времени года еще не изучена.

2.4. Профилактика и борьба с болезнью

2.4.1. Вакцинация

Вакцины отсутствуют.

2.4.2. Лекарственное лечение

Отсутствует.

2.4.3. Иммуностимуляция

Отсутствует.

2.4.4. Разведение для получения резистентной популяции

Отсутствует.

2.4.5. Повторное заселение резистентными видами

Отсутствует.

2.4.6. Блокирующие агенты

Отсутствуют.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Нет данных.

2.4.8. Общие практики разведения

Более легкие драги и менее травматичные для животных промысловые стратегии должны снизить вероятность вспышек заболевания за счет снижения стресса (Cranfield *с соавт.*, 2005). Избегание стрессовых факторов, таких как воздействие экстремальных температур (ниже 7 или выше 26°C), соленость (40%), голод, манипуляции или сильное инфицирование другими паразитами, а также снижение плотности посадки, должно способствовать снижению воздействия болезни (Cranfield *с соавт.*, 2005; Hine *с соавт.*, 2002).

3. Отбор образцов

3.1. Отбор отдельных особей

В первую очередь следует отбирать особей с раскрытыми створками раковины или недавно погибших особей (двухлетнего возраста или старше), чтобы увеличить шансы на обнаружение инфицированных устриц. Для гистологии следует отбирать только живых (включая умирающих) устриц.

Отбор образцов должен быть организован один раз в год, когда превалентность достигает максимального значения. Если данные о превалентности в конкретной экосистеме отсутствуют, отбор образцов желательно проводить в период с января по апрель в Южном полушарии (Hine, 1991a).

3.2. Консервирование образцов

Для гистологии лучшим консервантом является фиксатор AFA 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 в пулы может быть целесообразным, но его влияние на диагностическую чувствительность не оценивалось.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Срез ткани толщиной 3–5 мм, включая жабры, мантию, гонады и пищеварительную железу, используется для диагностики *V. exitiosa* с помощью гистологии. Жабры и/или сердце являются предпочтительными органами для проведения некоторых тестов, включая метод отпечатков и полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

3.5. Неподходящие образцы/ткани

Другие ткани, кроме жабр, сердца и мантии, являются менее подходящими.

4. Методы диагностики

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Клинические признаки включают мертвых устриц или устриц с раскрытыми створками раковины, но данные клинические признаки не являются патогномоничными для инфекции *V. exitiosa* и могут указывать на другие инфекции.

4.1.2. Изменение поведения

Раскрытие створок раковины.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Большинство живых инфицированных устриц выглядят нормальными, но иногда в жабрах могут наблюдаться повреждения (Dinamani *с соавт.*, 1987).

4.2.2. Клиническая химия

Отсутствует.

4.2.3. Микроскопическая патология

У *O. chilensis* поражения возникают в соединительной ткани жабр и мантии, а также в сосудистых пазухах вокруг желудка и кишечника. Подэпителиальный слой соединительной ткани мантии, в котором находятся группы гранулярных гемоцитов, пораженных паразитами, выглядит отделившимся (Dinamani *с соавт.*, 1987). При легких инфекциях жаберного и пищеварительного дивертикулярного эпителия у *O. angasi*, слабо окрашивающиеся бледные базофильные внутриклеточные *V. exitiosa* дают в результате обширную эпителиальную гиперплазию. У *O. edulis* паразит был обнаружен в соединительной ткани различных органов в сочетании с тяжелой гемоцитной инфильтрацией (Abollo *с соавт.*, 2008).

4.2.4. Влажные препараты

Отсутствуют.

4.2.5. Отпечатки

Внутри гемоцитов в отпечатках сердца или жабр можно наблюдать сферические или яйцевидные организмы (шириной 2–5 мкм).

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

При запущенной инфекции паразит может наблюдаться в гемоцитах.

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

Нет.

4.3.1.1.2. Отпечатки

4.3.1.1.2.1. Подлежащие отбору образцы

Молодь устриц или желудочек сердца или жабры от живых хозяев в 2-летнем возрасте или старше.

4.3.1.1.2.2. Техническая процедура

После высушивания тканей на абсорбирующей бумаге, на предметном стекле делается несколько отпечатков. Предметные стекла сушат на воздухе, фиксируют в метаноле или в абсолютном этаноле и окрашивают с использованием коммерческого набора для окрашивания мазков крови, в соответствии с инструкциями производителя. После промывания в водопроводной воде и высушивания, на предметные стекла накладывается покровное стекло с использованием соответствующей синтетической смолы. Предметные стекла изучают сначала при увеличении $\times 200$, а затем с использованием масляной иммерсии при увеличении $\times 1000$.

4.3.1.1.2.3. Положительные контроли

Рекомендованы и имеются в наличии в Справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.1.2.4. Уровни валидации

4.3.1.1.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Низкая специфичность, но чувствительность выше, чем при гистологическом исследовании (Diggle *с соавт.*, 2003). При сравнении сочетания ПЦР и гибридизации *in situ* (ISH), отпечатки сердца демонстрируют чувствительность, равную 59,3% и специфичность, равную 100% у *O. chilensis* (Diggle *с соавт.*, 2003).

4.3.1.1.2.4.2. Золотой стандарт

Чувствительность метода отпечатков ткани выше, чем у гистологии, которая является золотым стандартом, хотя данный метод не определяет вид паразита.

4.3.1.1.2.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является наличие в гемоцитах мелких сферических или яйцевидных организмов (шириной 2-5 мкм). Но паразита можно обнаружить и вне клеток. Эти организмы имеют базофильную цитоплазму и эозинофильное ядро (цвета могут варьироваться в зависимости от используемого красителя), и, поскольку их растирают на предметном стекле, они могут казаться больше на отпечатках, чем при гистологическом исследовании.

У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. exitiosa* у *O. chilensis* и *O. angasi*, но что касается *O. edulis*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. exitiosa* или *B. ostreae*.

У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, положительный результат свидетельствует о заражении видами *Bonamia*, что должно быть подтверждено Справочной лабораторией МЭБ.

4.3.1.1.2.6. Наличие коммерческих тестов

Наборы для быстрого окрашивания имеются в продаже (например, Nemacolor®)

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы ткани

4.3.1.1.3.1. Гистология

4.3.1.1.3.1.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие устрицы.

4.3.1.1.3.1.2. Техническая процедура

Срезы ткани, которые включают жабры, пищеварительную железу, мантию и гонаду, следует фиксировать в течение 24 часов в фиксаторе Дэвидсона или в других стандартных гистологических фиксаторах, включая 10% буферный формалин, с последующей обычной обработкой для гистологии с использованием парафина, и окраской, например, гематоксилином и эозином. Исследования производятся при увеличении до $\times 1000$.

4.3.1.1.3.1.3. Положительные контроли

Рекомендованы и имеются в наличии в Справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.1.3.1.4. Уровни валидации

4.3.1.1.3.1.4.1. Специфичность и чувствительность

В отношении *O. chilensis*, специфичность анализа низкая, но чувствительность является высокой для инфекций средней и высокой интенсивности, и низкой для инфекций низкой интенсивности. При сравнении сочетания ПЦР и гибридизации *in situ*, гистология

демонстрирует чувствительность, равную 44% (ниже, чем при использовании отпечатков сердца) и специфичность, равную 100% (Diggle *с соавт.*, 2003).

4.3.1.1.3.1.4.2. Золотой стандарт

Гистология является золотым стандартом и является рекомендуемым методом надзора в областях, зараженных только *B. exitiosa*. Однако в областях, где *B. exitiosa* и *B. ostreae* являются симпатрическими, положительный результат по гистологии должен быть подтвержден молекулярным исследованием.

4.3.1.1.3.1.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является наличие паразитов в виде очень маленьких клеток шириной 2–5 мкм внутри гемоцитов, или в свободном виде в соединительной ткани или эпителиальных синусах жабр, кишечника и мантии у *O. chilensis*. Они часто сопровождаются интенсивной диссеминированной гемоцитной инфильтрацией у *O. chilensis*, а у *O. angasi* - интенсивной очаговой гемоцитной инфильтрацией. Чтобы избежать каких-либо сомнений, для положительного диагноза паразит должен быть обнаружен внутри гемоцита. Метод не является видоспецифическим.

У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. exitiosa* у *O. chilensis* и *O. angasi*, но что касается *O. edulis*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. exitiosa* или *B. ostreae*.

У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, положительный результат свидетельствует о заражении видами *Vonamia*, что должно быть подтверждено Справочной лабораторией МЭБ.

4.3.1.1.3.1.6. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тесты отсутствуют.

4.3.1.1.3.2. Просвечивающая электронная микроскопия

4.3.1.1.3.2.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие устрицы.

4.3.1.1.3.2.2. Техническая процедура

Кусочек ткани небольшого размера (1–2 мм) следует зафиксировать в 3% глутаральдегиде (в 0,22 мкм отфильтрованной морской воды [FSW]) в течение 1 часа, трижды промыть в отфильтрованной морской воде, зафиксировать в 1% осмиевой кислоте и дважды промыть снова в отфильтрованной морской воде. После обезвоживания в последовательной серии растворов этанола, и в двух сериях пропиленоксида, образцы постепенно пропитываются и погружаются в эпоксидную смолу. После полимеризации при 60° С блоки следует сначала нарезать на кусочки размером 0,5–1 мкм для контроля качества, а затем на кусочки размером 80–100 нм для исследования под электронным микроскопом. Ультратонкие срезы помещают на медные сетки и контрастируют с использованием уранилацетата и лимоннокислого свинца.

4.3.1.1.3.2.3. Положительные контроли

Нет.

4.3.1.1.3.2.4. Уровни валидации

4.3.1.1.3.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Более высокая специфичность по сравнению с отпечатками и гистологией. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) позволяет отличать *B. exitiosa* от других близкородственных микрочеток, таких как *B. ostreae*.

4.3.1.1.3.2.5. Интерпретация результатов

Положительным результатом является наличие паразитов в гемоцитах. В отношении *O. chilensis* были описаны четыре стадии развития паразита у инфицированных устриц: плотные формы (стадия 1), промежуточные формы (стадия 2), плазмодиальные формы (стадия 3) и вакуолизованные формы (стадия 4) (Hine, 1991b; Hine *с соавт.*, 2001). Внутриклеточные структуры включают митохондрии, гаплоспоросомы, комплекс Гольджи и устойчивые внутриядерные микротрубочки.

В отличие от других гаплоспорицидий, включая *B. ostreae*, при *B. exitiosa* наблюдается стадия, содержащая большую вакуоль, полученную в результате увеличения одной или нескольких митохондрий (Hine, 1991b; Hine *с соавт.*, 2001). Плотные формы *B. exitiosa* немного больше по размеру (средний диаметр $3 \pm 0,3$ мкм (количество паразитов = 61) по сравнению с *B. ostreae* (средний диаметр $2,4 \pm 0,5$ мкм (количество паразитов = 64) и имеют больше гаплоспоросом, митохондриальных профилей и липоидных телец на срез, предназначенный для изучения ультраструктуры, а также более мелкие митохондрии с тубуло-везикулярными кристами. Кроме того, плотные, в отличие от неплотных форм *B. ostreae*, лишены ядерных мембраносвязанных комплексов Гольджи/ядерной чаши и вакуолизированной стадии (Hine *с соавт.*, 2001).

4.3.1.1.3.2.6. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тесты отсутствуют.

4.3.1.2. Выделение и идентификация агента

4.3.1.2.1. Культура клеток /искусственные среды

Отсутствуют.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

В настоящее время отсутствуют, но одно из двух моноклональных антител, полученных против клеточной мембраны *B. ostreae*, реагировало с *B. exitiosa* (Mialhe *с соавт.*, 1988).

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

4.3.1.2.3.1.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие устрицы.

4.3.1.2.3.1.2. Техническая процедура

Образцы ткани помещают в 95-100% этанол или замораживают до выделения ДНК. Выделение ДНК осуществляют путем расщепления протеиназой К в течение ночи при 50°C и при использовании фенольно-хлороформной экстракции с этаноловой преципитацией (Cochennec *с соавт.*, 2000).

Было продемонстрировано, что протокол ПЦР, разработанный для обнаружения *B. ostreae*, позволяет обнаруживать *B. exitiosa* (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004; Diggles *с соавт.*, 2003; Hine *с соавт.*, 2001). Пара праймеров Во-Воас (5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' и 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3' соответственно) амплифицирует продукт длиной 304 пар оснований из малой субъединицы (SSU) рДНК (Cochennec *с соавт.*, 2000). Реакционные смеси для ПЦР содержат буфер (500 мМ КСl, 100 мМ Трис/НСl [рН 9,0 при 25°C] и 1% Triton® X-100), 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ смеси dNTP, 1 мкМ прямого и обратного праймера, 0,02 ед./мкл Таq ДНК-полимеразы и 0,2 нг/мкл ДНК-матрицы в общем объеме 50 мкл. Образцы денатурируют в термоциклере в течение 5 минут при 94°C, после чего подвергают 30 циклам (94°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.

Вторая пара праймеров C_F и C_R (5'-CGG-GGG-CAT-AAT-TCA-GGA-AC-3' и 5'-ССА-ТСТ-GCT-GGA-GAC-ACA-G-3' соответственно), также предназначенная для амплификации продукта длиной 760 пар оснований из малой субъединицы рДНК *B. ostreae*, должна амплифицировать *B. exitiosa* (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004). ПЦР по технологии TaqMan с использованием праймеров и зонда, нацеленного на область ITS1 (внутренний транскрибируемый спейсер), также можно использовать для обнаружения *Vonatia* spp. (Corbeil *с соавт.*, 2006а). Чувствительность достаточно высокая; данный анализ не амплифицирует *Haplosporidium nelsoni*, *H. costale* или *Mikrocytos mackini*. Однако, он еще не был полностью валидирован.

4.3.1.2.3.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительными контролями являются: 1) ПЦР со специфическими праймерами к геномной ДНК, полученной от хозяина с инфекцией высокой интенсивности, или ДНК из очищенного паразита; 2) неспецифическая амплификация (актин, SSU и др.). Отрицательные контроли: 3) отсутствие реакции на ДНК-мишень; 4) ПЦР со специфическими праймерами к геномной ДНК, полученной от неинфицированных хозяев. Положительные контроли предоставляются по запросу из Справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3.1.4. Уровни валидации

4.3.1.2.3.1.4.1. Специфичность и чувствительность

Исходя из сходства последовательности ДНК-мишени, пара праймеров Во-Воас должна амплифицировать все гаплоспоридии микроклеток (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004). Чувствительность анализа выше, чем у гистологических методов, но ниже, чем у гибридизации *in situ* (Diggles *с соавт.*, 2003).

4.3.1.2.3.1.4.2. Золотой стандарт

При сравнении сочетания гистологии и отпечатков сердца, и при условии, что данные методы демонстрируют 100% чувствительность и специфичность, ПЦР демонстрирует чувствительность, равную 88,2% (ниже, чем при гибридизации *in situ*) и специфичность, равную 36,4% (Diggles *с соавт.*, 2003).

4.3.1.2.3.1.5. Интерпретация результатов

Положительные результаты теста определяются как наличие ампликонов соответствующего размера, причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными.

ПЦР-анализ не является видоспецифичным. Последовательность гена малой субъединицы рДНК *Bonamia exitiosa* демонстрирует полиморфизм с такой же последовательностью у *B. ostreae* и *B. roughleyi* с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), после расщепления ПЦР-продуктов Во-Воас при помощи *Bgl* I и *Hae* II. *Bonamia ostreae* и *B. exitiosa* демонстрируют одинаковый профиль (два продукта длиной 115 и 189 пар оснований) при расщеплении при помощи *Hae* II, в то время как ПЦР-продукт *B. roughleyi* не расщепляется. Профиль *B. ostreae* состоит из двух полос (бэндов) длиной 120 и 180 пар оснований при расщеплении при помощи *Bgl* I, в то время как ПЦР-продукты *B. exitiosa* и *B. roughleyi* не расщепляются (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004; Nine *с соавт.*, 2001). Однако исходя из результатов секвенирования, метод ПЦР-ПДРФ не позволяет отличить *B. exitiosa* и другие родственные изоляты от *B. perspora*. У *O. chilensis* и *O. angasi* из Новой Зеландии и Австралии, соответственно, ожидаемый результат ПЦР-ПДРФ, ассоциированный с положительным результатом, полученным с помощью гистологии или отпечатков, подтверждает инфекцию *B. exitiosa*.

У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, ожидаемый результат ПЦР-ПДРФ, ассоциированный с положительным результатом, полученным с помощью гистологии или отпечатков, указывает строго на инфекцию *B. exitiosa*, но перед подтверждающей диагностикой необходимо провести секвенирование ПЦР-продукта и, если возможно, просвечивающую электронную микроскопию.

4.3.1.2.3.1.6. Наличие коммерческих тестов

Коммерческие тесты отсутствуют

4.3.1.2.3.2. Гибридизация *in situ* (ISH)

4.3.1.2.3.2.1. Подлежащие отбору образцы

Живые или недавно погибшие устрицы.

4.3.1.2.3.2.2. Техническая процедура

Протокол гибридизации *in situ* (ISH), разработанный для обнаружения *B. ostreae*, позволяет выявить *B. exitiosa* (Cochenne *с соавт.*, 2000; Diggles *с соавт.*, 2003). В данном анализе используется меченый дигоксигенином зонд из 300 пар оснований, нацеленный на ген малой субъединицы рДНК. Образцы тканей помещают в фиксатор Дэвидсона на 24 часа, а затем погружают в парафин. Срезы толщиной 5 мкм нарезают, помещают на предметные стекла, покрытые силаном, а затем нагревают в печи при температуре 60°C в течение ночи. После депарафинирования предметные стекла обрабатывают протеиназой К (100 мкг/мл) в буфере ТЕ (50 мМ Трис, 10 мМ ЭДТА [этилендиаминтетрауксусная кислота]) при температуре 37°C в течение 30 минут. Предметные стекла обезвоживают в серии растворов этанола и высушивают на воздухе. Затем предметные стекла покрывают буфером для гибридизации (4 × SSC [стандартный цитратно-солевой буфер; 60 мМ NaCl, 600 мМ NaCl, pH 7], 50% формамид, 1 × раствор Денхардта, 250 мкг/мл дрожжевой tPHK, 10%

декстрансульфат), который содержит 20 нг меченого дигоксигенином зонда. После денатурации при 95°C в течение 5 минут, проводят гибридизацию путем инкубирования предметных стекол во влажной камере при 42°C в течение ночи. Зонд получают с помощью ПЦР с использованием ранее описанной пары праймеров Во-Воас с включением дигоксигенина. ПЦР проводят способом, описанным в разделе, посвященном ПЦР, за исключением того, что в реакционную смесь добавляют 25 мМ DIG dUTP. Этапы обнаружения выполняются в соответствии с инструкциями производителя. В другом протоколе гибридизации *in situ* (ISH) используется комбинация из трех 5'-меченых дигоксигенином зондов, специфичных для близкородственных представителей группы *B. exitiosa*-*B. roughleyi* (Hill *с соавт.*, 2010). Однако, данный анализ еще не был полностью валидирован.

4.3.1.2.3.2.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны для использования. Положительными контролями являются: 1) гибридизация *in situ* на инфицированном хозяине; 2) неспецифическая гибридизация *in situ* (SSU рДНК) на образцах. Отрицательные контроли: 3) отсутствие реакций зонда при гибридизации *in situ*; 4) гибридизация *in situ* на неинфицированных хозяевах.

Положительные контроли предоставляются по запросу из Справочной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3.2.4. Уровни валидации

4.3.1.2.3.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Специфичность анализа выше, чем у гистологических методов. Однако зонд Во-Воас также способен выявлять *Haplosporidium nelsoni* у *Crassostrea virginica*, *B. ostreae* у *O. edulis*, но не *Mikrocytos mackini* у *C. gigas* (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004; Cochenne *с соавт.*, 2000). Чувствительность анализа выше, чем у гистологических методов и ПЦР (Diggles *с соавт.*, 2003).

4.3.1.2.3.2.4.2. Золотой стандарт

При сравнении сочетания гистологии и отпечатков сердца, и при условии, что данные методы демонстрируют 100% чувствительность и специфичность, гибридизация *in situ* демонстрирует чувствительность, равную 100% (выше, чем у ПЦР) и специфичность, равную 27,3% (Diggles *с соавт.*, 2003).

4.3.1.2.3.2.5. Интерпретация результатов

Положительные результаты теста определяются как наличие темно-меченых паразитов внутри гемоцитов, причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными.

У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. exitiosa* у *O. chilensis* и *O. angasi*, но что касается *O. edulis*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. exitiosa* или *B. ostreae*.

У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, положительный результат свидетельствует о заражении видами *Vonamia*, что должно быть подтверждено Справочной лабораторией МЭБ.

4.3.1.2.3.2.6. Наличие коммерческих тестов

Набор для обнаружения нуклеиновых кислот DIG nucleic acid detection kit (Boehringer Mannheim).

4.3.1.2.3.3. Секвенирование

Секвенирование рекомендуется в качестве одного из финальных шагов для подтверждающей диагностики. Целевыми областями являются SSU рДНК и ITS1. Несмотря на то, что последовательности имеются в государственных банках генов, рекомендуется обращаться в соответствующую Справочную лабораторию МЭБ.

4.3.1.2.4. Выделение агента

Нет.

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 *B. exitiosa*, 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 a 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	Послеличинки (PL)	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	d	d	c	c	c	d
Отпечатки тканей	d	d	a	a	a	c
Гистопатология	d	d	a	a	a	c
Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	d	d	d	d	d	b
ДНК зонды <i>in situ</i>	d	d	d	d	d	b
ПЦР и ПЦР по технологии TaqMan	a	a	a	a	a	c
ПЦР-ПДРФ	d	d	d	d	d	b
Секвенирование	d	d	d	d	d	a

ПЦР = полимеразная цепная реакция; ПДРФ = полиморфизм длин рестриционных фрагментов.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от инфекции *Bonamia exitiosa*

Методами, предписанными для целевого надзора, в целях провозглашения свободы от инфекции, как указано в *Кодексе по водным животным*, являются отпечатки тканей (сердце или жабры), гистология или ПЦР в областях, зараженных только *B. exitiosa*. Однако в областях, где *B. exitiosa* и *B. ostreae* являются симпатрическими, положительный результат по гистологии должен быть подтвержден молекулярным исследованием.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение случая подозрения на болезнь

Любой положительный результат, полученный при помощи любого метода диагностики, следует считать подозрительным.

7.2. Определение подтвержденного случая болезни

У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, подтвержденным случаем *B. exitiosa* является положительный результат, полученный при использовании метода отпечатков тканей, гистологии или гибридизации *in situ* в сочетании с положительным результатом, полученным с помощью ПЦР-ПДРФ и секвенирования.

Для других видов хозяев или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. exitiosa*, рекомендуется провести подтверждение при помощи просвечивающей электронной микроскопии. Однако этот метод подходит только для образцов, которые характеризуются высокой интенсивностью инфекции.

8. Список литературы

ABOLLO E., RAMILO A., CASAS S.M., COMESAÑA P., CAO A., CARBALLAL M.J. & VILLALBA A. (2008). First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture*, **274**, 201–207.

ARZUL I., LANGLADE A., CHOLLET B., ROBERT M., FERRAND S., OMNES E., LEROND S., COURALEAU Y., JOLY J.-P., FRANÇOIS C. & GARCIA C. (2011). Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Vet. Parasitol.*, **179** (1–3), 69–76.

BERTHE F.C.J. & HINE P.M. (2003). *Bonamia exitiosa* Hine *c. coact.*, 2001 is proposed instead of *B. exitiosus* as the valid name of *Bonamia* sp. infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Dis. Aquat. Org*, **57**, 181.

BURRESON E.M., STOKES N.A., CARNEGIE R.B. & BISHOP M.J. (2004). *Bonamia* sp. (Haplosporidia) found in nonnative oysters *Crassostrea ariakensis* in Bogue Sound, North Carolina. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 1–9.

CAMPALANS M., ROJAS P. & GONZALEZ M. (2000). Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **20**, 31–33.

- CARNEGIE R.B., BURRESON E.M., HINE P.M., STOKES N.A., AUDEMARD C., BISHOP M.J. & PETERSON C.H. (2006). *Bonamia persporan*. sp. (*Haplosporidia*), a parasite of the oyster *Ostreaola equestris*, is the first *Bonamia* species known to produce spores. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **53**, 232–245.
- CARNEGIE R.B. & COCHENNEC-LAUREAU N. (2004). Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. *Aquat. Living Res.*, **17**, 519–528.
- COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F. & GÉRARD A. (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.*, **76**, 26–32.
- COCHENNEC N., REECE K.S., BERTHE F.C.J. & HINE P.M. (2003). Revisiting *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation points to the genus *Bonamia* (*Haplosporidia*). *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 209–217.
- CORBEIL S., ARZUL I., DIGGLES B., HEASMAN M., CHOLLET B., BERTHE F.C. & CRANE M.S. (2006a). Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Bonamia* species. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 75–80.
- CORBEIL S., ARZUL I., ROBERT M., BERTHE F.C.J., BESNARD-COCHENNEC N. & CRANE M.S.J. (2006b). Molecular characterization of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 81–85.
- CRANFIELD H.J., DUNN A., DOONAN I.J. & MICHAEL K.P. (2005). *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES J. Mar. Sci.*, **62**, 3–13.
- DIGGLES B.K., COCHENNEC-LAUREAU N. & HINE P.M. (2003). Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosus* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Aquaculture*, **220**, 145–156.
- DIGGLES B.K. & HINE P.M. (2002). *Bonamia exitiosa* epidemiology in Foveaux Strait oysters. Final research report, OYS1999/01. Ministry of Fisheries, New Zealand, 51 pp. (unpublished report held in NIWA library, Wellington).
- DINAMANI P., HINE P.M. & JONES J.B. (1987). Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 37–44.
- DOONAN I.J., CRANFIELD H.J. & MICHAEL K.P. (1994). Catastrophic reduction of the oyster, *Tiostrea chilensis* (Bivalvia: *Ostreidae*), in Foveaux strait, New Zealand, due to infestation by the protistan *Bonamia* sp. *NZ J. Mar. Freshwater Res.*, **28**, 335–344.
- 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.

- HILL K.M., CARNEGIE R.B., ALOUI-BEJAOUI N., EL GHARSALLI R., WHITE D.M., STOKES N.A. & BURRESON G.M. (2010). Observation of a *Bonamia* sp. infecting the oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, and a consideration of its phylogenetic affinities. *J. Invertebr. Pathol.*, **103**, 179–185.
- HINE P.M. (1991a). The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters. *Tiostrea chilensis*. *Aquaculture*, **93**, 241–251.
- HINE P.M. (1991b). Ultrastructural observations on the annual infection pattern of *Bonamia* sp. in flat oysters *Tiostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.*, **11**, 163–171.
- HINE P.M. (1996). The ecology of *Bonamia* and decline of bivalve molluscs. *NZ J. Ecol.*, **20** (1), 109–116.
- HINE P.M. (2002). Severe apicomplexan infection in the oyster *Ostrea chilensis*: a predisposing factor in bonamiosis. *Dis. Aquat. Org.*, **51**, 49–60.
- HINE P.M., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J. (2001). *Bonamia exitiosus* sp. (*Haplosporidia*) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi) in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 63–72.
- HINE P.M., DIGGLES B.K., PARSONS M.J.D., PRINGLE A. & BULL B. (2002). The effects of stressors on the dynamics of *Bonamia exitiosus* Hine, Cochennecc-Laureau and Berthe, infections in flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi). *J. Fish Dis.*, **25**, 545–554.
- HINE P.M. & JONES J.B. (1994). *Bonamia* and other aquatic parasites of importance to New Zealand. *NZ J. Zool.*, **21**, 49–56.
- HINE P.M. & WESNEY B. (1994). Interaction of phagocytosed *Bonamia* sp. (*Haplosporidia*) with haemocytes of oysters *Tiostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.*, **20**, 219–229.
- KROECK M.A. & MONTES J. (2005). Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 231–235.
- LYNCH S.A., ABOLLO E., RAMILLO A., CAO A., CULLOTY S.C. & VILLALBA A. (2010). Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology*, **137**, 1515–1526.
- MIALHE E., BOULO V., ELSTON R., HILL B., HINE M., MONTES J., VAN BANNING P. & GRIZEL H. (1988). Serological analysis *Bonamia* in *Ostrea edulis* and *Tiostrea lutaria* using polyclonal and monoclonal antibodies. *Aquat. Living Res.*, **1**, 67–69.
- NARCISI V., ARZUL I., CARGINI D., MOSCA F., CALZETTA A., TRAVERSA D., ROBERT M., JOLY J.-P., CHOLLET B., RENAULT T. & TISCAR P.G. (2010). Detection of *Bonamia ostreae* and *Bonamia exitiosa* (*Haplosporidia*) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 79–85.

PICHOT Y., COMPS M., TIGE G., GRIZEL H. & RABOUIN M.A. (1979). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **43**, 131–140.

*

* *

NB: Имеется Референтная лаборатория МЭБ по инфекции *Bonamia existosia* (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/>).

Для получения дальнейшей информации по инфекции *Bonamia existosia* свяжитесь со Референтными лабораториями МЭБ.