

ИНФЕКЦИЯ *BONAMIA OSTREAE*

1. Сфера применения¹

Bonamia ostreae – это простейший паразит типа *Haplosporidia* (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004; Lopez-Flores *c соавт.*, 2007), инфицирующий гемоциты плоских устриц, *Ostrea edulis*, и вызывающий физиологические нарушения и, в конечном итоге, гибель животного (Grizel, 1985). Применительно к настоящей главе, инфекция *Bonamia ostreae* означает инфекцию *B. ostreae*. Это определение исключает инфекцию *B. exitiosa* (Hine *c соавт.*, 2001), *B. roughleyi* (Cochenne *c соавт.*, 2003) и *B. perspora* (Carnegie *c соавт.*, 2006). Разновидности *Bonamia*, которые не идентифицированы до уровня видов, следует направлять в соответствующую Справочную лабораторию МЭБ.

2. Информация о болезни

2.1. Особенности возбудителя

2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

Bonamia ostreae (Pichot *c соавт.*, 1979), штаммы не идентифицированы.

2.1.2. Выживание вне хозяина

По-видимому, до 58% паразитов, выделенных из сильно инфицированных устриц, выживают после 1 недели пребывания в воде морского дна при 15°C (Arzul *c соавт.*, 2009).

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

Было продемонстрировано, что ванна с перуксусной кислотой (0,001% и 0,005%) снижает контаминацию устриц *B. ostreae* (Grizel, 1985).

2.1.4. Жизненный цикл

Жизненный цикл вне хозяина неизвестен, но возможна прямая передача паразита от хозяина к хозяину при совместном обитании или путем введения выделенных паразитов (Hervio *c соавт.*, 1995), что позволяет предположить, что промежуточного хозяина не требуется.

2.2. Особенности хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

Естественный хозяин: Европейская плоская устрица, *Ostrea edulis*.

Виды устриц, инфицированные при перемещении в эндемичные по *B. ostreae* зоны: *Ostrea puelchana*, *O. angasi*, *O. chilensis* (= *Tiostrea chilensis*, *T. lutaria*) (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004). Однако у данных хозяев паразит не был идентифицирован до уровня вида. Экспериментальные тесты продемонстрировали низкую инфекционность *B. ostreae* в отношении *Crassostrea ariakensis* (Audemard *c соавт.*, 2005).

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

Было высказано предположение, что *Ostrea conchaphila* (= *O. lurida*) и *Crassostrea angulata* были инфицированы *B. ostreae* (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004), но подтверждающая диагностика не была выполнена.

В результате экспериментальной работы было продемонстрировано, что следующие виды не восприимчивы к *B. ostreae*: *C. gigas*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* (Culloty *с соавт.*, 1999).

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

O. edulis как в возрасте 0+, так и в возрасте старше 1 года восприимчивы к инфекции и у них может наблюдаться высокая превалентность и высокая интенсивность инфекции и даже смертность на протяжении 6 месяцев (Lynch *с соавт.*, 2005). Однако особи старше 2 лет, по-видимому, более восприимчивы к этому заболеванию (Culloty & Mulcahy, 1996; Grizel, 1985; Engelsma *с соавт.*, 2010). Молодь устриц, полученная при оседании в природных источниках, по-видимому, значительно более заражена паразитами, чем молодь устриц из инкубаториев (Conchas *с соавт.*, 2003).

Недавно было продемонстрировано, что личинки могут быть инфицированы *B. ostreae* (Arzul *с соавт.*, 2010).

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Ostrea edulis — это единственный известный естественно восприимчивый вид, и интенсивность инфекции повышается одновременно со смертностью с возрастом и/или с размером устриц (Culloty & Mulcahy, 1996; Grizel, 1985).

2.2.4. Органы-мишени и инфицируемые ткани

Bonamia ostreae является простейшим паразитом, который проникает в гемоциты (Comps *с соавт.*, 1980; Pichot *с соавт.*, 1979), но его можно обнаружить и вне клеток между эпителиальными клетками или интерстициоцитами в жабрах и желудке или в некротизированных областях соединительной ткани. Сообщалось также о внутриэпителиальной локализации в жабрах (Montes *с соавт.*, 1994). Паразит также обнаруживали в ткани яичников (Van Banning, 1990). Запущенные инфекции становятся системными. У личинок паразит обнаруживался в эпителии, окружающем висцеральную полость (Arzul *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

Исследована возможная роль донных макробеспозвоночных и зоопланктона в жизненном цикле *B. ostreae*. Офиотрикс ломкий (*Ophiothrix fragilis*) был идентифицирован как возможный переносчик паразита (Lynch *с соавт.*, 2006).

Положительный сигнал, полученный в отношении *Crassostrea gigas* при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяет предположить, что этот вид может выступать в качестве носителя или резервуара *B. ostreae* (Lynch *с соавт.*, 2010).

2.2.7. Известные или потенциальные носители среди диких водных животных

Дикие популяции плоских устриц *Ostrea edulis* также инфицируются *B. ostreae*.

2.3. Модель болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Возможна прямая передача паразита от хозяина к хозяину. Инфекционная форма и способы проникновения и высвобождения остаются неустановленными. Паразит наблюдался 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).

Обычно проходит как минимум 3 месяца, прежде чем паразит будет обнаружен в свободных от болезни партиях, перемещенных в зараженные районы.

2.3.2. Превалентность

Превалентность варьируется (от 0% до 80%). Превалентность выше у особей старше 2 лет. Болезнь возникает и может передаваться в течение всего года, но у инфекции *B. ostreae* есть сезонные колебания. Превалентность инфекции повышается с осени и достигает пика в конце зимы/в начале весны (Arzul *с соавт.*, 2006; Culloty & Mulcahy, 1996; Grizel, 1985; Engelsma *с соавт.*, 2010).

2.3.3. Географическое распределение

Инфекция *B. ostreae* встречается в Европе (Франция, Ирландия, Италия, Нидерланды, Португалия, Испания и Великобритания), Канаде (Британская Колумбия) и Соединенных Штатах Америки (Калифорния, штаты Мэн и Вашингтон) (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Инфекция у диких и культивируемых плоских устриц часто является летальной, и гибель обычно происходит по достижении наивысшего уровня интенсивности инфекции.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Выживаемость паразитов, очищенных и содержащихся в морской воде, ниже при температуре 25°C, чем при 4 или 15°C (Arzul *с соавт.*, 2009). Вода с высоким содержанием солей (35, 40 и 45 епс.), по-видимому, способствует выживанию паразитов (Arzul *с соавт.*, 2009). Превалентность имеет ежегодную модель, которая меняется в зависимости от района. Превалентность инфекции повышается с осени и достигает пика в конце зимы/начале весны. Сообщается о двух пиках, которые обычно происходят зимой/весной и осенью (Arzul *с соавт.*, 2006; Culloty & Mulcahy, 1996). Более низкие летние температуры и более высокая соленость приводят к более высокой превалентности следующей зимой (Arzul *с соавт.*, 2006). *Ostrea edulis*, по-видимому, более восприимчивы к *B. ostreae* в условиях нехватки корма и сниженной солености (Engelsma *с соавт.*, 2010).

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

Было продемонстрировано, что селекционное разведение эффективно снижает восприимчивость и смертность, вызываемые *B. ostreae* (Naciri-Graven *с соавт.*, 1998).

2.4.5. Повторное заселение резистентными видами

Линии *Ostrea edulis*, устойчивые к болезни, полученные путем селекционного разведения, могут выступать в качестве альтернативы в зараженных районах.

2.4.6. Блокирующие агенты

Отсутствуют.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Нет данных.

2.4.8. Общие практики разведения

Смертность в результате бонамиоза можно снизить с помощью суспензионной культуры, более низкой плотности посадки или разведения *Ostrea edulis* вместе с *Crassostrea gigas*, которые не являются естественно восприимчивыми к инфекции (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004). Молодь устриц из инкубаториев является более предпочтительной по сравнению с молодой устриц, полученной при оседании в природе, поскольку природные источники, по-видимому, намного больше заражены паразитами (Conchas *с соавт.*, 2003).

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 конце зимы-начале весны или осенью (Arzul *с соавт.*, 2006; Culloty & Mulcahy, 1996; Engelsma *с соавт.*, 2010).

3.2. Консервирование образцов

Для гистологии лучшим консервантом является фиксатор АФА Дэвидсона, но 10% буферный формалин или другие стандартные гистологические фиксаторы также пригодны для использования. Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) образцы должны консервироваться с использованием 95–100% этанола и неденатурированного спирта.

3.3. Объединение образцов в пулы

Объединение образцов 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. ostreae* 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. ostreae* и могут указывать на другие инфекции.

4.1.2. Изменение поведения

Раскрытие створок раковины.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Макроскопическая патология включает эпизодическое пожелтение, обширные поражения, включая перфорированные язвы на соединительной ткани жабр, мантии и пищеварительной железы (Comps *с соавт.*, 1980). Данные макроскопические признаки не являются патогномоничными для инфекции *V. ostreae*, и большинство инфицированных устриц выглядят нормальными.

4.2.2. Клиническая химия

Отсутствует.

4.2.3. Микроскопическая патология

На фиксированных срезах можно увидеть плотную инфильтрацию гемоцитами (некоторые из которых содержат паразитов) соединительной ткани жабр и мантии, а также сосудистых пазух вокруг желудка и кишечника, (Comps *с соавт.*, 1980).

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

Не применимо.

4.3.1.1.2. Отпечатки

4.3.1.1.2.1. Подлежащие отбору образцы

Мягкие ткани моллюсков устриц, 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

Специфичность анализа низкая, но чувствительность выше, чем при гистологическом исследовании (Da Silva & Villalba, 2004). Но, по-видимому, метод отпечатков сердца не является надежным для обнаружения латентных инфекций.

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 шире на отпечатках, чем при гистологическом

исследовании. Можно наблюдать многоядерные клетки. Данный метод не определяет вид паразита.

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

4.3.1.1.2.6. Наличие коммерческих тестов

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

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

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

4.3.1.1.3.1.4.2. Золотой стандарт

Гистология является золотым стандартом и является рекомендуемым методом надзора в областях, зараженных только *B. ostreae*. 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. Наличие паразитов часто сопровождается интенсивной воспалительной реакцией. 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. ostreae*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. ostreae* или *B. exitiosa*.
- У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. ostreae*, положительный результат свидетельствует о заражении видами *Bonamia*, 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 контрокрашивают 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) может помочь отличить *B. ostreae* от других близкородственных микробов, таких как *B. exitiosa*.

4.3.1.1.3.2.5. Интерпретация результатов

- Положительным результатом является наличие паразитов в гемоцитах. Сообщалось о различных стадиях развития паразита, включая одноядерные, диплокариотические и плазмодиальные стадии (Montes *с соавт.*, 1994; Pichot *с соавт.*, 1979). Внутриклеточные структуры включают митохондрии, гапლოსпоровы, комплекс Гольджи и устойчивые внутриядерные микротрубочки.
- Плотные формы *B. ostreae* являются более плотными и мелкими (средний диаметр $2,4 \pm 0,5$ мкм (количество паразитов = 64) по сравнению с *B. exitiosa* (средний диаметр $3 \pm 0,3$ мкм (количество паразитов = 61), и имеют меньше гапლოსпоров, митохондриальных профилей и липоидных телец на срез, предназначенный для изучения ультраструктуры, а также более крупные митохондрии с тубуло-везикулярными кристами, по сравнению с *B.*

exitiosa. Кроме того, плотные формы *V. ostreae* не имеют 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

Был разработан иммунофлуоресцентный метод на основе моноклональных антител, который имел чувствительность, сходную с чувствительностью метода отпечатков тканей. Однако данный метод дал сомнительные результаты при обширном тестировании, которое проводилось на устрицах из штата Мэн, США (Carnegie & Cochenne-Laugreau, 2004). Несмотря на то, что прямой сэндвич-иммуноанализ с использованием моноклональных антител для обнаружения *V. ostreae* в образцах гемолимфы *O. edulis* был разработан (Cochenne *с соавт.*, 1992) и продавался на рынке в течение нескольких лет в середине 1990-х годов, в настоящее время он не продается. Специфичность и чувствительность данного метода по сравнению с гистологией составила 76,7% и 106%, соответственно (Cochenne *с соавт.*, 1992).

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 50-55°C и при использовании фенольно-хлороформной экстракции с этаноловой преципитацией

(Carnegie *с соавт.*, 2000; Cochenne *с соавт.*, 2000) или метода спин-колонок с использованием коммерческих наборов (например, QIAGEN) (Carnegie *с соавт.*, 2000).

- Для обнаружения *Vonamita ostreae* были разработаны три протокола традиционной ПЦР с тремя разными парами праймеров, нацеленных на малую субъединицу (SSU) рДНК: Первая пара праймеров Vo-Voas (5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' и 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3' соответственно) амплифицирует продукт длиной 300 пар оснований (Cochenne *с соавт.*, 2000). Реакционные смеси для ПЦР содержат буфер (500 mM KCl, 100 mM Трис/HCl [pH 9,0 при 25°C] и 1% Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM смеси dNTP, 1 мкМ прямого и обратного праймера, 0,02 ед./мкл Taq 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), амплифицирует продукт длиной 760 пар оснований (Carnegie *с соавт.*, 2000). Реакционные смеси для ПЦР содержат буфер (200 мМ Трис/НСl [рН 8,4], 500 мМ КСl), 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ смеси dNTP, 0,05 мкМ прямого и обратного праймера, 0,05 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, и 1 нг/мкл ДНК-матрицы в общем объеме 50 мкл. Образцы подвергают 35 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.

Третья пара праймеров BoosF03 и BoosR03 (3'-CAA-TGG-TGC-GTT-CAA-СГА-Т-5' и 3'-GGG-TTC-GCG-GTT-GAA-TTT-TA-5' соответственно), амплифицирует продукт длиной 352 пар оснований (Engelsma *с соавт.*, 2010). Реакционные смеси для ПЦР содержат буфер (1×), 2 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждой смеси dNTP, 0,4 мкМ каждого праймера, 2 ед. Taq ДНК-полимеразы в дистиллированной воде с 0,005% (об/об) Nonidet P-40 и 2 мкл ДНК-матрицы в общем объеме 50 мкл. Образцы денатурируют в термоциклере в течение 2 минут при 94°C, после чего подвергают 40 циклам (94°C в течение 30 секунд, 58°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 45 секунд), со стадией финальной элонгации при 72°C в течение 7 минут.

- Также можно использовать два анализа ПЦР по технологии TaqMan:

ПЦР по технологии TaqMan с использованием праймеров и зонда, нацеленного на область ITS1 (внутренний транскрибируемый спейсер), позволяет обнаружить *Bonamia* spp. (Corbeil *с соавт.*, 2006а). Чувствительность достаточно высокая; данный анализ не амплифицировал *Haplosporidium nelsoni*, *H. costale* или *Mikrocytos mackini*. Однако, он еще не был полностью валидирован.

Другой анализ ПЦР по технологии TaqMan с использованием праймеров и зонда, нацеленного на небольшую область (67 пар оснований) малой субъединицы (SSU) рДНК, также был разработан для обнаружения *B. ostreae* (Marty *с соавт.*, 2006). Праймеры и зонды были разработаны специально для *Bonamia* spp. и не амплифицируют другие *Haplosporidia*. Чувствительность и специфичность выше, чем при гистопатологии. Наконец, был разработан анализ ПЦР в реальном времени на основе SYBR® Green для обнаружения и подсчета *B. ostreae* (Robert *с соавт.*, 2009). Данный анализ нацелен на область длиной 201 пар оснований гена актина 1 паразита. Было продемонстрировано, что данный анализ нацелен только на *B. ostreae*, а не на близкородственных паразитов, включая *B. exitiosa*. Минимальный предел обнаружения оценивался как 50 копий гена, и анализ оказался как минимум в десять раз более чувствительным, чем традиционная ПЦР. Между полуколичественным определением паразита с использованием метода отпечатков сердца и ПЦР в реальном времени наблюдалась хорошая корреляция.

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, первый традиционный анализ (Cochennec *с соавт.*, 2000) должен амплифицировать все микроклеточные гаплоспоридии, а второй (Carnegie *с соавт.*, 2000) должен, по крайней мере, амплифицировать *B. ostreae* и *B. exitiosa* (Carnegie и Cochennec-Laureau, 2004); третий, по-видимому, амплифицирует только *B. ostreae* (Engelsma *с соавт.*, 2010). Чувствительность данных анализов выше, чем у гистологических методов. Два анализа ПЦР по технологии TaqMan выявляют *Bonamia* spp., но не другие *Haplosporidia*. Анализ ПЦР в реальном времени на основе SYBR® Green выявляет только *B. ostreae*.

4.3.1.2.3.1.4.2. Золотой стандарт

Чувствительность и специфичность первого традиционного ПЦР-анализа (Cochennec *с соавт.*, 2000) были подсчитаны в сопоставлении с гистологическими методами (гистология и отпечатки жабр), и составили 92% и 87% соответственно. Чувствительность и специфичность гистологических методов (гистология и отпечатки жабр) были подсчитаны в сопоставлении с первым традиционным ПЦР-анализом (Cochennec *с соавт.*, 2000) и составили 66% и 97% соответственно (Balseiro *с соавт.*, 2006). Чувствительность и специфичность также оценивали для второго анализа ПЦР по технологии TaqMan, и первоначально они составили 88% и 99% соответственно.

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.
- Ни один из анализов не является видоспецифическим. Последовательность гена малой субъединицы рДНК *B. ostreae* демонстрирует полиморфизм с такой же последовательностью у *B. exitiosa*, *B. roughleyi* или *B. perspora* с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), после расщепления ПЦР-продуктов *Bo-Boas* при помощи *Hae* II и *Bgl* I. Полученные профили различаются в зависимости от вида паразита. *Bonamia ostreae*, *B. perspora* 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*, *B. perspora* и *B. roughleyi* не расщепляются (Cochennec *с соавт.*, 2003; Nine *с соавт.*, 2001).
- У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. ostreae*, ожидаемый результат ПЦР-ПДРФ, ассоциированный с положительным результатом, полученным с помощью гистологии или отпечатков, подтверждает инфекцию *B. ostreae*.
- У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. ostreae*, ожидаемый результат ПЦР-ПДРФ, ассоциированный с положительным результатом, полученным с помощью гистологии или отпечатков, указывает строго на инфекцию *B. ostreae*, 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

Было разработано два протокола гибридизации *in situ* (ISH). В первом анализе (Cochennec *с соавт.*, 2000) используется меченый дигоксигенином зонд из 300 пар оснований, а во втором анализе (Carnegie *с соавт.*, 2003) используются три флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зонда. Все данные зонды нацелены 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 50-60°C в течение ночи. После депарафинирования предметные стекла обрабатывают протеиназой К (100 мкг/мл) в буфере TE (50 мМ Трис, 10 мМ ЭДТА [этилендиаминтетрауксусная кислота]) при температуре 37°C в течение 30 минут в первом протоколе, или в фосфатно-солевом буферном растворе (150 мМ NaCl, 12,5 мМ Na₂HPO₄, 3 мМ KН₂PO₄, рН 7,2) при температуре 37°C в течение 15 минут во втором протоколе.

- В первом протоколе 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, рН 7], 50% формамид, 1 × раствор Денхардта, 250 мкг/мл дрожжевой tРНК, 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.

- Во втором протоколе после обработки протеиназой К, предметные стекла промывают в нескольких растворах, включая фосфатно-солевой буферный раствор плюс 0,2% глицин, в течение 5 минут, проводят ацетилирование с использованием 5% безводной уксусной кислоты в 0,1 М триэтанолламин/HCl (рН 8) в течение 10 минут при комнатной температуре, снова промывают в фосфатно-солевом буферном растворе в течение 10 минут и, наконец, дают отстояться в 5 × SET (750 мМ NaCl, 6,4 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис-основание) в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем предметные стекла покрывают 200 мкл буфера предварительной гибридизации (5 × SET, 0,02% альбумин бычьей сыворотки, 0,025% додецилсульфат натрия [SDS]) в течение 30 минут при температуре 45°C. Буфер предварительной гибридизации заменяют на 10–12 мкл буфера предварительной гибридизации, содержащего 2-10 нг/мкл олигонуклеотидов, и предметные стекла инкубируют в течение ночи во влажной камере при температуре 45°C. Затем предметные стекла трижды промывают в 0,2 × SET в течение 5 минут при 42°C, высушивают на воздухе

и заключают в среду перед исследованием с использованием эпифлуоресцентного микроскопа при увеличении $\times 600-1000$. Зонды состоят из смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, специфичных для *B. ostreae*: UME-BO-1 (5'-CGA-GGC-AGG-GTT-TGT-3'); UME-BO-2 (5'-GGG-TCA-AAC-TCG-TTG-AAC-3') и UME-BO-3 (5'-CGC-TCT-TAT-CCA-CCT-AAT-3').

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 и чувствительность анализа выше, чем у гистологических методов. Однако зонд Во–Воас также способен выявлять *Haplosporidium nelsoni* у *Crassostrea virginica*, *B. exitiosa* у *O. chilensis*, но не *Mikrocytos mackini* у *C. gigas* (Cochennec *с соавт.*, 2000). Специфичность смеси олигозондов UME-BO-1, -2 и -3 была протестирована, и была продемонстрирована ее способность выявлять *H. nelsoni* (Carnegie *с соавт.*, 2003), но гибридизация *in situ*, по-видимому, обнаруживает другие микроклетки, включая *B. exitiosa* (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004).

4.3.1.2.3.2.4.2. Золотой стандарт

Гибридизация *in situ* еще не была валидирована в сопоставлении с гистологией.

4.3.1.2.3.2.5. Интерпретация результатов

- Положительные результаты теста определяются как наличие меченых паразитов внутри гемоцитов, причем все отрицательные контроли должны быть отрицательными и все положительные контроли должны быть положительными. В первом описанном протоколе они выглядят как темные пятна, тогда как во втором протоколе они представляют собой мелкие зеленые кольца: флуоресценция зеленого цвета окружает неровный темный участок.
- У восприимчивых видов в пределах известного ареала распространения инфекции *B. ostreae*, положительный результат свидетельствует об инфекции *B. ostreae* или *B. exitiosa*.
- У других видов или за пределами известного ареала распространения инфекции *B. ostreae*, 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 этапов 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.

4.3.1.2.3.4. Выделение агента

Bonamia ostreae можно выделить из сильно инфицированных устриц (Mialhe с соавт., 1988). Все органы гомогенизируются, за исключением аддукторов, и паразитов концентрируют с использованием дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, а затем выделяют изопикническим центрифугированием в градиенте перколла.

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. ostreae*, 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	b	c
Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	d	d	d	d	d	a
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
ПЦР в реальном времени на основе SYBR® Green	a	a	a	a	a	c
Секвенирование	d	d	d	d	d	a

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

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

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. ostreae*. 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. ostreae*, подтвержденным случаем *B. ostreae* 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, или ПЦР в реальном времени на основе SYBR® Green.

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

8. Список литературы

ARZUL I., GAGNAIRE B., BOND C., CHOLLET B., MORGA B., FERRAND S., ROBERT M. & RENAULT T. (2009). Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 67–75.

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.

ARZUL I., MIOSSEC L., BLANCHET E., GARCIA C., FRANÇOIS C. & JOLY J.-P. (2006). *Bonamia ostreae* and *Ostrea edulis*: a stable host-parasite system in France? Symposia proceedings, *ISVEE conference XI*, Cairns, Australia, 6– 11 August 2006, 5 pp.

AUDEMARD C., CARNEGIE R., STOKES N.A., BURRESON E. & BISHOP M. (2005). Salinity effects on the susceptibility to and persistence of *Bonamia ostreae* and *Bonamiasp.* in *Crassostrea ariakensis*. *J. Shellfish Res.*, **24**, 639.

BALSEIRO P., CONCHAS R.F., MONTES J., GOMEZ-LEON J., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2006). Comparison of diagnosis techniques for the protozoan parasite *Bonamia ostreae* in flat oyster *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, **261**, 1135–1143.

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

- CARNEGIE R.B., BARBER B.J. & DISTEL D.L. (2003). Detection of the oyster parasite *Bonamia ostreae* by fluorescent *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 247–252.
- CARNEGIE R.B. & COCHENNEC-LAUREAU N. (2004). Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 519–528.
- CARNEGIE R.B., BURRESON E.M., HINE P.M., STOKES N.A., AUDEMARD C., BISHOP M.J. & PETERSON C.H. (2006). *Bonamia perspora* n. sp. (*Haplosporidia*), a parasite of the oyster *Ostreaola equestris*, is the first *Bonamia* species known to produce spores. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **53**, 232–245.
- COCHENNEC N., HERVIO D., PANATIER B., BOULO V., MIALHE E., ROGIER H., GRIZEL H. & PAOLUCCI F. (1992). A direct monoclonal antibody sandwich immunoassay for detection of *Bonamia ostreae* (*Ascetospora*) in hemolymph samples of the flat oyster *Ostrea edulis* (*Mollusca: Bivalvia*). *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 129–134.
- COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F. & GERARD A. (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.*, **76**, 26–32.
- 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.
- COMPS M., TIGÉ G. & GRIZEL H. (1980). COMPS M., TIGÉ G. & GRIZEL H. (1980). Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* L. *C. R. Hebd. Acad. Sc. Paris (Sér. D)*, **290**, 383–385.
- CONCHAS R.F., SANTAMARINA J., LAMA A., LONGA M.A. & MONTES J. (2003). Evolution of bonamiosis in Galicia (NW Spain). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **23**, 265–272.
- CORBEIL S., ARZUL I., DIGGLES B., HEASMAN M., CHOLLET B., BERTHE F.C. & CRANE M.S. (2006). Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Bonamia* species. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 75–80.
- CULLOTY S.C. & MULCAHY M.F. (1996). Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiosis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture*, **144**, 53–63.
- CULLOTY S.C., NOVOA B., PERNAS M., LONGSHAW M., MULCAHY M.F., FEIST S.W. & FIGUERAS A. (1999). Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 73–80.
- DA SILVA P.M. & VILLALBA A. (2004). Comparison of light microscopic techniques for the diagnosis of the infection of the European flat oyster *Ostrea edulis* by the protozoan *Bonamia ostreae*. *J. Invertebr. Pathol.*, **85**, 97–104.
- ENGELSMA M.Y., KERKHOFF S., ROOZENBURG I., HAENEN O.L.M., VAN GOOL A., SISTERMANS W., WIJNHOFEN S. & HUMMEL H. (2010). Epidemiology of *Bonamia ostreae*

infecting European flat oyster *Ostrea edulis* from Lake Grevelingen, The Netherlands. *Marine Ecology Progress Series*, **409**, 131–142.

GRIZEL H. (1985). Etudes des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* L. et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques de Languedoc, Montpellier, France

HERVIO D., BACHERE E., BOULO V., COCHENNEC N., VUILLEMIN V., LE COGUIC Y., CAILLETAUX G., MAZURIE J. & MIALHE E. (1995). Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster *Ostrea edulis* with the intrahaemocytic protozoan parasite *Bonamia ostreae*: application in the selection of parasite-resistant oyster. *Aquaculture*, **132**, 183–194.

HINE P.M., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J. (2001). *Bonamia exitiosus* n. sp. (*Haplosporidia*) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi) in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 63–72.

LOPEZ-FLORES I., SUAREZ-SANTIAGO V.N., LONGET D., SAULNIER D., CHOLLET B. & ARZUL I. (2007). Characterization of acting genes in *Bonamia ostreae* and their application to phylogeny of the *Haplosporidia*. *Parasitology*, **134**, 1941–1948.

LYNCH S.A., ARMITAGE D.V., COUGHLAN J., MULCAHY M.F. & CULLOTY S.C. (2006). Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplakton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. *Exp. Parasitol.*, **115** (4), 359–368.

LYNCH S.A., ARMITAGE D.V., WYLDE S., MULCAHY M.F. & CULLOTY S.C. (2005). The susceptibility of young prespawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. *J. Shellfish Res.*, **24**, 1019–1025.

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*. *Parasitol.*, **137**, 1515–1526.

MARTY G., BOWER S., CLARKE K., MEYER G., LOWE G., OSBORN A., CHOW E., HANNAH H., BYRNE S., SOJONKY K. & ROBINSON J. (2006). Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. *Aquaculture*, **261**, 33–42.

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 Resour.*, **1**, 67–69.

MONTES J., ANADON R. & AZEVEDO C. (1994). A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *J. Invertebr. Pathol.*, **63**, 1–6.

NACIRI-GRAVEN Y., MARTIN A.G., BAUD J.P., RENAULT T. & GERARD A. (1998). Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **224**, 91–107.

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.

ROBERT M., GARCIA C., CHOLLET B., LOPEZ-FLORES I., FERRAND S., FRANÇOIS C., JOLY J.-P. & ARZUL I. (2009). Molecular detection and quantification of the protozoan *Bonamia ostreae* in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Molecular Cellular Probes*, **23**, 264–271.

VAN BANNING P. (1990). The life cycle of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* with a presumptive phase in the ovarian tissue of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, **84**, 189–192.

*

* *

NB: Имеется Референтная лаборатория МЭБ по инфекции *Bonamia ostreae* (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 ostreae* свяжитесь со Референтными лабораториями МЭБ.