

ИНФЕКЦИЯ *MARTEILIA REFRINGENS*

1. Предмет рассмотрения¹

Marteilia refringens – это простейший паразит типа Cercozoa класса Paramyxida (Cavalier-Smith & Chao, 2003; Feist с соавт., 2009), инфицирующий пищеварительную систему разных видов двустворчатых и вызывающий физиологические нарушения, а в некоторых случаях смерть животного (Alderman, 1979; Grizel с соавт., 1974). В целях настоящей главы, инфекция *Marteilia refringens* означает инфекцию *M. refringens*, согласно определению López-Flores с соавт., 2004, включая виды М и О согласно определению Le Roux с соавт., 2001. Эта дефиниция исключает инфекции *M. sydneyi* (Perkins & Wolf, 1976), *M. lenghei* (Comps, 1976) и *M. christenseni* (Comps, 1983). *Marteilia* spp., которые не определены на уровне видов (Berthe с соавт., 2004; Moyер с соавт., 1993; Norton с соавт., 1993), должны сообщаться в Референтную лабораторию МЭБ.

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Marteilia refringens (Grizel с соавт., 1974) двух типов, типа О и М, была определена Le Roux с соавт., 2001.

2.1.2. Выживаемость за пределами хозяина

В зависимости от условий окружающей среды, *M. refringens* может выживать от нескольких дней до 2-3 недель за пределами хозяина (Grizel, 1985).

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Нет информации.

2.1.4. Жизненный цикл

Предполагается, что жизненный цикл *M. refringens* непрямой и может включать *Paracartia grani* (Audemard с соавт., 2001; Audemard с соавт., 2002), по крайней мере в прудовых системах. У других видов, включая иные виды *Acartia* spp., циклопов *Oithona* sp. и неопределенные виды гарпактикоидов, паразит определялся с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в природном устье Дельта дель Эбро (Испания), но их роль в жизненном цикле не была продемонстрирована (Carrasco с соавт., 2007).

¹ NB: Версия, принятая Мировой Ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2012 г.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяина

Устрицы видов: *Ostrea edulis* (Grizel с соавт., 1974); мидии видов: *Mytilus* sp., включая *M. edulis* (Le Roux с соавт., 2001) и *M. galloprovincialis* (López-Flores с соавт., 2004; Novoa с соавт., 2005; Robledo с соавт., 1995a; Villalba с соавт., 1993b).

Инфекция *M. refringens* наблюдалась у устриц *Ostrea stentina*, у двустворчатых моллюсков видов *Solen marginatus* (López-Flores с соавт., 2008a) и *Chamelea gallina* (López-Flores с соавт., 2008b), а также мидии *Xenostrobus securis* (Pascual с соавт., 2010).

Другие виды *Ostrea*, включая *O. chilensis*, *O. puelchana*, *O. angasi*, и *O. denselamellosa*, оказались заражены *Marteilia* sp. при размещении в зараженном районе (Berthe с соавт., 2004; Martin, 1993). Однако в этих случаях, идентификация паразита не была проведена на молекулярном уровне.

В дополнение к этому, различные стадии, включая зрелую стадию паразитов, напоминающих *M. refringens*, наблюдались при гистологии съедобных сердцевидок (*Cerastoderma edule*), съедобных моллюсков (видов *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Tapes rhomboides*, *T. pullastra*, *Ensis minor*, *E. siliqua*) и устриц (*Crassostrea virginica*) среди других двустворчатых видов (Berthe с соавт., 2004; López-Flores с соавт., 2008b). Во всех этих случаях, идентификация паразитов является неточной.

И, наконец, копепод *Paracartia grani* оказался восприимчивым к *M. refringens* и эти виды могли участвовать в передаче паразитов между двустворчатыми (см. 2.3.1).

2.2.2. Восприимчивые стадии хозяина

Известно о восприимчивости молодых особей и особей, находящихся на более позднем этапе развития (Grizel, 1985).

2.2.3. Предрасположенность видов и субпопуляций (вероятность обнаружения)

Marteilia refringens обычно вызывает клиническую инфекцию у *O. edulis* (Grizel с соавт., 1974) и *Ostrea* spp. (Berthe с соавт., 2004; Grizel, 1985). У плоских устриц и мидий превалентность и интенсивность инфекции обычно выше у отдельных особей в возрасте двух лет или старше (Audemard с соавт., 2001; Villalba с соавт., 1993b).

2.2.4. Органы-мишени и зараженная ткань

Marteilia refringens инфицирует пищеварительный тракт. Молодые плазмиды обнаруживаются главным образом в эпителии нижнегубных щупалец и в желудке (Grizel с соавт., 1974). Спорообразование происходит в канальцах и протоках пищеварительных желез. Пропагулы высвобождаются в проток пищеварительного

тракта и выделяются в среду через фекалии (Audemard с соавт., 2002; Berthe с соавт., 2004).

2.2.5. Персистирующая инфекция с пожизненными носителями

Инфекция *M. refringens* представляет собой смертельную болезнь устриц (Alderman, 1979; Audemard с соавт., 2002; Grizel с соавт., 1974). Смерть возникает в течение второго года после первичной инфекции (Alderman, 1979; Grizel, 1985), таким образом, инфекция может персистировать более одного года и может быть пожизненной. Мидии обычно не подвергаются негативному воздействию *M. refringens* (Berthe с соавт., 2004), но о том, возникает ли спорообразование *M. refringens*, и могут ли мидии быть переносчиками *M. refringens*, неизвестно (Berthe с соавт., 2004; Le Roux с соавт., 2001).

2.2.6. Векторы

Некоторые виды зоопланктона, включая копепойдные виды (*Acartia discaudata*, *A. clausi*, *A. italica*, *Othoina* sp., *Euterpina acutifrons*) и личиночные стадии зоо короткохвостых десятиногих ракообразных, а также неплактонных видов, таких как *Lineus gisserensis* (Nematoda) и *Cereus pendunculatus* (Cnidaria) были выявлены с помощью ПЦР и могут выступать в роли векторов для паразита (Audemard с соавт., 2002; Carrasco с соавт., 2007).

2.2.7. Известные или предполагаемые переносчики среди диких водных животных

Дикие популяции плоских устриц, *O. edulis*, мидии, *Mytilus edulis* и *M. galloprovincialis* заражаются *M. refringens* и могут не демонстрировать клинических признаков или смертности.

Marteilia refringens отмечалась у диких *Solen marginatus* (López-Flores с соавт., 2008a), *Chamelea gallina* (López-Flores с соавт., 2008b), *Xenostrobus securis* (Pascual с соавт., 2010) и *Ostrea stentina* без четкого влияния паразита на эти виды хозяина.

Другие двустворчатые виды были перечислены в качестве потенциально восприимчивых к *M. refringens* и, таким образом, могут выступать в роли переносчиков.

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Передача *M. refringens* вероятно происходит через промежуточного хозяина (Audemard с соавт., 2002; Carrasco с соавт., 2008b). Паразит может передаваться экспериментальным путем от *O. edulis* и *M. galloprovincialis* копеподу *Paracartia grani* (Audemard с соавт., 2002; Carrasco с соавт., 2008b). Передача от *P. grani* к *O. edulis* или *M. galloprovincialis* не демонстрировалась экспериментально (Audemard с соавт., 2002; Carrasco с соавт., 2008b). У устриц ранние стадии болезни возникают

в желудке, щупальцах и даже жабровом эпителии. Существует мнение, что первичная инфекция возникает через кормовые потоки. У мидий ранние стадии наблюдались в эпителии жабр, мантии, желудке и первичных пищеварительных канальцах (Carrasco с соавт., 2008a).

2.3.2. Превалентность

Превалентность крайне изменчива – до 98% у *O. edulis*. Более высокая превалентность ожидается в зависимости от практики разведения и в районах, которые подвергались воздействию инфекции более 1 года (Berthe с соавт., 2004; Grizel, 1985).

2.3.3. Географическое распределение

Отмечается в Албании, Хорватии, Франции, Греции, Италии, Марокко, Португалии, Испании, Швеции, Тунисе и Соединенном Королевстве.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Инфекция является смертельной для устриц: уровень смертности составляет 50-90%, обычно отмечается летом и осенью и ассоциируется со спорообразованием паразита (Grizel, 1985; Grizel с соавт., 1974). Аналогичным образом, заболеваемость выше в более теплые периоды. Мидии менее подвержены инфекции, но в зонах, подвергнутых воздействию, отмечалась смертность до 40% (Berthe с соавт., 2004; Villalba с соавт., 1993b), интактные мидии демонстрировали 100% смертность после культивирования в течение 6 месяцев в зараженном районе (Thébault с соавт., 1999).

2.3.5. Факторы окружающей среды

Пороговой температурой для спорообразования и передачи паразитов является 17°C. Эта температура типична для устьев рек или заливов, где превалентность обычно выше в верхних слоях воды (Audemard с соавт., 2001; Berthe с соавт., 2004; Carrasco с соавт., 2007; Grizel, 1985). Инфекция *M. refringens* редко наблюдается в открытых морских водах (Grizel, 1985). Высокое содержание солей и обновление воды могут пагубно сказываться на развитии и передаче *M. refringens*, хотя эти параметры оказываются менее важными по сравнению с температурой (Audemard с соавт., 2001).

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Отсутствует.

2.4.2. Химиотерапия

Отсутствует.

2.4.3.

Иммуностимуляция

Отсутствует.

2.4.4. Резистентное разведение

Отсутствует.

2.4.5. Возобновление поголовья резистентными видами

Попытки предпринимались в Европе с различными видами рода *Ostrea*, но все они демонстрировали чувствительность (Grizel, 1985). Нативные поголовья *Ostrea edulis* и *Mytilus edulis*are высоко восприимчивы к инфекции. Несмотря на то, что некоторые первичные стадии *M. refringens* наблюдались у *Crassostrea gigas* (Berthe с соавт., 2004), эти виды оказываются резистентны к инфицированию таким паразитом.

2.4.6. Блокирующие агенты

Отсутствуют.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Нет данных.

2.4.8. Общие практики животноводства

Заселение при низкой плотности или в сочетании с резистентными видами моллюсков, такими как *Crassostrea gigas*, оказалось эффективным (Grizel, 1985).

3. Отбор образцов

3.1. Отбор индивидуальных образцов

Образцы от особей с раскрывающимися створками или недавно умерших особей (2 или более лет) должны отбираться по приоритету для того, чтобы увеличить шансы обнаружения зараженных устриц. Для гистологии образцы должны отбираться исключительно от живых (включая умирающих) устриц или мидий.

Отбор образцов от плоских устриц и мидий должен проводиться раз в год, когда известно, что превалентность будет максимальной. Если такая информация недоступна в конкретной экосистеме, предпочтительно осуществлять отбор образцов, когда температура достигает годового максимума (Audemard с соавт., 2001; Carrasco с соавт., 2007).

3.2. Сохранение образцов для представления

Для гистологии лучшим консервантом является фиксатор Дэвидсона (AFA), но 10% забуференный формалин или другие стандартные гистологические фиксаторы также допустимы. Для анализов полимеразной цепной реакции (ПЦР) образцы должны консервироваться в 95-100% этаноле или неденатурированном спирте.

3.3. Объединение образцов

Объединение образцов может иметь значение, но его влияние на рабочие характеристики диагностического инструмента не были оценены.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Для диагностики *M. refringens* при помощи гистологии используется срез ткани толщиной 3-5 мм, включающий жабры и пищеварительную массу. Для отдельных тестов, в том числе для отпечатков и ПЦР, фрагмент пищеварительной железы является наиболее предпочтительным.

3.5. Неподходящие образцы/ткани

Все ткани за исключением жабр и пищеварительной массы являются неподходящими.

4. Диагностические методы

4.1. Полевые диагностические методы

4.1.1. Клинические признаки

Клинические признаки включают мертвых или с раскрывающимися створками моллюсков, поскольку слабые животные особенно восприимчивы к любому дополнительному стрессу (Grizel, 1985; Grizel с соавт., 1974). Эти клинические признаки неспецифичны инфекции *M. refringens* и могут указывать на другие инфекции.

4.1.2. Изменения в поведении

Раскрытие створок.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макропатология

Бледная пищеварительная железа, тонкое водянистое мясо, втянутость мантии и сниженный уровень роста отмечались у инфицированных устриц (Berthe с соавт., 2004; Grizel, 1985; Grizel с соавт., 1974), несмотря на то, что эти макроскопические признаки неспецифичны для инфекции *M. refringens*. У зараженных мидий наблюдается сниженный уровень роста и угнетение гонадного развития (Villalba с соавт., 1993а).

4.2.2. Клиническая химия

Отсутствует.

4.2.3. Микроскопическая патология

Пищеварительная железа, в которой возникает *M. refringens* и другие виды *Marteilia*, является местом внутриклеточного пищеварения и одним из основных участков для хранения метаболических резервов (Berthe с соавт., 2004). При

тяжелых инфекциях, *M. refringens* значительно снижает абсорбцию органического вещества (Robledo с соавт., 1995b). Тяжелые инфекции могут также вызывать ухудшение состояния, как следствие сниженного поглощения энергии. Кроме того, паразит может напрямую влиять на кормление хозяина и абсорбцию просто за счет его присутствия. Развитие адипогранулярных запасающих клеток в мантии *Mytilus galloprovincialis* было ингибировано в присутствии *M. refringens* (Villalba с соавт., 1993b). Вероятно, *M. refringens* также препятствует накоплению гликогена в *O. edulis* (Robert с соавт., 1991).

Marteilia sydneyi незначительно отличается от *M. refringens*. В световой и трансмиссионной электронной микроскопии критерии признания основаны на присутствии или отсутствии полосатых включений в споровых зачатках и концентрических мембранах, окружающих зрелые споры, количестве спорангиальных зачатков в плазмодии и количестве спор в спорангии.

4.2.4. Влажные препараты

При развившейся инфекции зрелые спорангии с преломными гранулами могут наблюдаться во влажных препаратах, полученных от устриц/мидий с раскрывающимися створками или недавно умерших устриц/мидий или фекалий живых устриц/мидий.

4.2.5. Мазки

При развившейся инфекции паразиты размером до 30-40 мкм могут наблюдаться в отпечатках пищеварительной железы от устриц/мидий с раскрывающимися створками или недавно умерших устриц/мидий.

4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология

При развившейся инфекции могут наблюдаться различные стадии паразитов в эпителии пищеварительного тракта.

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Влажные препараты готовят при развившейся инфекции.

4.3.1.1.1.1. Образцы для отбора

Устрицы/мидии с раскрывающимися створками или недавно умершие устрицы/мидии или фекалии живых устриц/мидий.

4.3.1.1.1.2. Техническая процедура

Нанесите фрагмент пищеварительной железы или фекалий на предметное стекло. Наблюдения проводятся при 400-кратном увеличении и теоретически могут демонстрировать преломные гранулы в зрелых спорангиях.

4.3.1.1.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Отсутствуют.

4.3.1.1.1.4. Уровни валидации

4.3.1.1.1.4.1. Специфичность и чувствительность

Неизвестна, но предположительно низкая.

4.3.1.1.1.4.2. Золотой стандарт

Не валидирован в отношении гистологии.

4.3.1.1.1.5. Интерпретация результатов

- Положительный результат означает присутствие крупных (20-30 мкм) сферических телец, содержащих толстостенные структуры.
- У восприимчивых видов в рамках известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат указывает на инфекцию *M. refringens*.
- У других видов за пределами известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат указывает на инфекцию *Marteilia* sp., которая должна быть подтверждена Референтной лабораторией МЭБ.

4.3.1.1.1.6. Доступность коммерческих тестов

Нет коммерчески доступных наборов.

4.3.1.1.2. Отпечатки

При развившейся инфекции подготавливают отпечатки пищеварительной железы.

4.3.1.1.2.1. Образцы для отбора

Устрицы/мидии с раскрывающимися створками или недавно умершие устрицы/мидии.

4.3.1.1.2.2. Техническая процедура

После высушивания тканей на абсорбирующей бумаге делают несколько отпечатков на предметном стекле. Стекла высушивают на воздухе, фиксируют в метаноле или абсолютном этаноле и окрашивают при помощи коммерчески

доступного набора для окраски мазков крови, в соответствии с инструкциями производителя. После промывки в проточной воде и высушивания, на стекла устанавливается покровное стекло с помощью соответствующей синтетической смолы. Сначала стекла рассматривают при 200-кратном увеличении, а затем во время масляной иммерсии при 1000-кратном увеличении.

4.3.1.1.2.3.

Положительные/отрицательные контроли

Рекомендуются и доступны по запросу в Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.1.2.4. Уровни валидации

4.3.1.1.2.4.1. Специфичность и чувствительность

Неизвестна. Инфекция может быть фокальной, а также в виду того, что инфекция нацелена на различные ткани на ранних или поздних этапах, отпечатки могут пропускать ранние и вялотекущие уровни инфекции.

4.3.1.1.2.4.2. Золотой стандарт

Не валидирован в отношении гистологии.

4.3.1.1.2.5. Интерпретация результатов

- Положительный результат — это наблюдение клеток, варьирующих в размере до 30-40 мкм. Цитоплазма окрашивается базофильно, тогда как ядро имеет эозинофильную окраску. Наблюдаются бледные ореолы вокруг крупных, сильно окрашенных (преломных) гранул и у более крупных клеток - клетка внутри группы клеток (Berthe с соавт., 2000; Berthe с соавт., 2004; Grizel с соавт., 1974).
- У восприимчивых видов в пределах известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат точно указывает на инфекцию *M. refringens*.
- У других видов или за пределами известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат указывает на инфекцию *Marteilia* spp., которая должна подтверждаться Референтной лабораторией МЭБ.

4.3.1.1.2.6. Доступность коммерческих тестов

Коммерчески доступные наборы для быстрого окрашивания включают Difquick®/ Hemacolor®.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

4.3.1.1.3.1. Гистология

4.3.1.1.3.1.1. Образцы для отбора

Живые устрицы/мидии.

4.3.1.1.3.1.2. Техническая процедура

Срезы ткани, которые включают жабры, пищеварительную железу, мантию и гонаду, должны фиксироваться в течение 24 часов в фиксаторе Дэвидсона, с последующей нормальной подготовкой для парафиновой гистологии и окрашивания, например, гематоксилином и эозином. Наблюдения проводятся при повышенном увеличении до $\times 1000$.

4.3.1.1.3.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Рекомендованы и доступны по запросу в Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.1.3.1.4. Уровни валидации

4.3.1.1.3.1.4.1. Специфичность и чувствительность

Значения чувствительности и специфичности для гистологии оценивались на 70% и 99%, соответственно (Thébault с соавт., 2005).

4.3.1.1.3.1.4.2. Золотой стандарт

Гистология является золотым стандартом и *in situ* гибридизация валидируется совместно с гистологией.

4.3.1.1.3.1.5. Интерпретация результатов

- Положительный результат – наблюдение клеток, варьирующих в размере от 4 до 40 мкм. Молодые плазмодии (однойядерные) обнаруживаются главным образом в эпителии нижнегубных щупалец и желудка. Образование спор подразумевает клеточные деления внутри клеток и происходит в канальцах и протоках пищеварительной железы. Преломные гранулы возникают в процессе образования спор, но не наблюдаются на ранних стадиях. На поздних стадиях инфекции, спорангии свободно наблюдаются в полости пищеварительной железы. Цитоплазма окрашивается базофильно, тогда как ядро имеет эозинофильную окраску. Гранулы могут варьировать от темно-красного до темно-оранжевого цвета.
- *Marteilia refringens* незначительно отличается от *M. sydneyi*. Критерии признания основаны на отсутствии полосатых включений в зачатках споронта *M. sydneyi*, формировании 8-16 споровых зачатков в каждом плазмодии вместо 8 для *M. refringens*, появлении двух спор в каждом спорангии в отличие от 4 у *M. refringens*, и присутствии толстого слоя концентрических мембран, окружающих зрелые споры *M. sydneyi*.

- У восприимчивых видов в пределах известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительные результаты позволяют сделать вывод об инфекции *M. refringens*.
- У других видов или за пределами известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат, особенно с наблюдаемыми преломными гранулами, свидетельствует об инфекции *Marteilia* spp., которая требует подтверждения от Референтной лаборатории МЭБ

4.3.1.1.3.1.6. Доступность коммерческих тестов

Нет коммерчески доступных наборов.

4.3.1.1.3.2. Трансмиссионная электронная микроскопия

4.3.1.1.3.2.1. Техническая процедура

Кусок ткани небольшого размера (1–2 мм) фиксируют в 3% глутаральдегиде (в 0,22 мкм фильтрованной морской воды [FSW]) в течение одного часа, промывают трижды в FSW, фиксируют в 1% осмиевой кислоте и промывают дважды еще раз в FSW. После дегидратации в последовательных ванночках с этанолом, и двух ванночках с пропиленоксидом, образцы постепенно пропитывают и погружают в Эпон. После полимеризации при 60°C сначала отрезают блоки по 0,5–1 мкм для контроля качества, а затем по 80-100 нм для изучения под электронным микроскопом. Ультратонкие срезы помещают на медные сетки и подвергают контр-окрашиванию с помощью уранилацетата и лимоннокислого свинца.

4.3.1.1.3.2.2. Положительные контроли

Отсутствуют.

4.3.1.1.3.2.3. Уровни валидации

4.3.1.1.3.2.3.1. Специфичность и чувствительность

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) аналогично гистологии позволяет дифференцировать *Marteilia refringens* и *M. sydneyi*. Критерии признания такие же, как те, что представлены в разделе 4.3.1.1.3.1. Гистология.

4.3.1.1.3.2.4. Интерпретация результатов

- Положительный результат означает присутствие паразитов в эпителии пищеварительной железы или желудка. Могут наблюдаться различные стадии паразита (Longshaw с соавт., 2001). Первичная клетка представляет единичную вторичную клетку внутри себя. Вторичные клетки происходят из серий делений и включают восемь преспорангиев. Третичные клетки включают эти 8 преспорангиев, которые разделились, содержащих

четырёхспоровые примордии (зачатки). Споровые зачатки отщепляются внутри, чтобы продуцировать зрелые споры. Зрелые споры состоят из трех спороплазм, одна внутри другой; наиболее удаленные от середины содержат гаплоспоросомы.

4.3.1.1.3.2.5. Доступность коммерческих тестов

Нет коммерчески доступных тестов.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные среды

Недоступно.

4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе антител

Недоступны или не используются в настоящее время в диагностических целях, но моноклональные антитела были разработаны и опубликованы (Berthe с соавт., 2004). Эти антитела не дают кросс-реакции в отношении *M. sydneyi*.

4.3.1.2.3. Молекулярные технологии

4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Протоколы ПЦР разработаны и опубликованы (Berthe с соавт., 2000; Le Roux с соавт., 1999; Le Roux с соавт., 2001; López-Flores с соавт., 2004).

Рекомендуются праймеры ПЦР, которые нацелены на регион ITS1 (внутренний транскрибируемый спейсер) (Le Roux с соавт., 2001), поскольку они могут амплифицировать исключительно *M. refringens*. Однако некоторые праймеры, направленные на малую субъединицу (SSU) рРНК комплекса генов, также доступны и позволяют проводить амплификацию *M. refringens* и *M. sydneyi* (Grizel с соавт., 1974; Le Roux с соавт., 1999). В дополнение к этому, «гнездовая» ПЦР была разработана с использованием праймеров, нацеленных на межгенный спейсер рДНК (López-Flores с соавт., 2004). Исследование проводилось только с *M. refringens*. Этот анализ продемонстрировал большую чувствительность, чем анализ ПЦР ITS1, но он должен быть исследован более тщательно на специфичность.

4.3.1.2.3.1.1. Образцы для отбора

Живые или недавно умершие устрицы/мидии.

4.3.1.2.3.1.2. Техническая процедура

Образцы ткани помещают в 95–100% этанол или замораживают до выделения ДНК. Выделение ДНК сопровождается разрушением протеиназы К в течение ночи при 50–55°C, и выделении фенол-хлороформа с этаноловой преципитацией или методикой центрифужной колонки с использованием коммерчески доступных наборов (например, Qiagen). ПЦР проводится при объеме 50 мкл. ПЦР смеси 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 дНТФ, 1 мкМ прямого и обратного праймеров, 0,02 ед. мкл⁻¹ ДНК-полимераза Taq, и 10–100 нг выделенной ДНК. После денатурации ДНК при 94°C в течение 5 минут проводят 30 циклов по следующей схеме: денатурация при 94°C в течение 1 минуты, отжиг при 55°C в течение 1 минуты и элонгация при 72°C в течение 1 минуты на т.п.о. Проводится финальный этап элонгации в течении 10 минут при 72°C. Для обнаружения *M. refringens*, проводят ПЦР с праймерами, которые нацелены на регион ITS1 (5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3' и 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3') (Le Roux с соавт., 2001).

4.3.1.2.3.1.3. Положительные/отрицательные контроли

Обязательны. Положительные контроли 1) ПЦР со специфичными праймерами для геномной ДНК от высокоинфицированного хозяина или ДНК от очищенных паразитов; 2) неспецифичная амплификация (актин, SSU, и т.п.). Отрицательные контроли: 3) отсутствуют реакции целевой ДНК; 4) ПЦР со специфичными праймерами на геномной ДНК от неинфицированных хозяев. Положительные контроли доступны по запросу в Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3.1.4. Уровни валидации

4.3.1.2.3.1.4.1. Специфичность и чувствительность

Неизвестные значения. Кросс-реакции с исследуемыми образцами не возникало и специфичность расценивается, как очень высокая (Kleeman с соавт., 2002; Le Roux с соавт., 1999). Ожидается, что эта ПЦР технология будет обнаруживать *M. refringens*. Поскольку инфекция может быть фокальной, а также из-за того, что инфекция затрагивает различные ткани на ранних и поздних этапах, чувствительность обнаружения ПЦР может быть ниже, чем ожидалось при теоретическом исполнении ПЦР.

4.3.1.2.3.1.4.2. Золотой стандарт

Отсутствует валидация в отношении гистологии.

4.3.1.2.3.1.5. Интерпретация результатов

- Положительный результат это положительная ПЦР-амплификация при ожидаемом размере, с отрицательными показателями всех отрицательных контролей и положительными показателями всех положительных контролей.
- У восприимчивых видов в пределах известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат ПЦР, ассоциированный с положительным результатом, полученным

посредством гистологии или отпечатков, подтверждает инфекцию *M. refringens*.

- У других видов или за пределами известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат ПЦР, ассоциированный с положительным результатом, полученным путем гистологии или отпечатков, является весьма показательным для инфекции *M. refringens*, но необходимо секвенирование продукта ПЦР перед постановкой подтверждающего диагноза.

4.3.1.2.3.1.6. Доступность коммерческих тестов

Нет коммерчески доступных наборов.

4.3.1.2.3.2. *In-situ* гибридизация (ISH)

Протоколы ISH были разработаны и опубликованы (Berthe с соавт., 2000; Le Roux с соавт., 1999).

Рекомендуется использование зонда, который нацелен на SSU генного комплекса рРНК, поскольку он был валидирован в отношении гистологии (Le Roux с соавт., 1999; Thébault с соавт., 2005). Однако этот зонд продемонстрировал кросс-реакцию с *Marteilia sydneyi* и *Marteilioïdes chungmuensis* (Kleeman с соавт., 2002). В дополнение к этому, анализ ISH был разработан с использованием зонда, направленного на межгенный трейсер рДНК (López-Flores с соавт., 2008a; López-Flores с соавт., 2008b). Этот анализ продемонстрировал большую специфичность, чем анализ ISH SSU, но требует тщательной валидации.

4.3.1.2.3.2.1. Образцы для отбора

Живые мидии/устрицы или мидии/устрицы с раскрывающимися створками.

4.3.1.2.3.2.2. Техническая процедура

Для проведения ISH моллюсков фиксируют в фиксаторе примерно на 24 часа, а затем помещают в парафин. Делают срезы по 5 мкм и помещают на стекла, покрытые аминоалкилсиланом, которые затем подвергают термообработке в печи в течение ночи при 40°C. Срезы депарафинизируют путем погружения в ксилен или эквивалентное вещество на 10 минут. Этот этап повторяют один раз и затем растворитель устраняется путем последовательного погружения в две ванночки с абсолютным спиртом, по 10 минут каждая. Затем срезы регидрируют путем погружения в серии этанола. Эти срезы обрабатывают протеиназой К (100 мкг мл⁻¹) в ТЭ буфере (Трис [50 мМ], ЭДТА [10 мМ]), при 37°C в течение 30 минут. Стекла дегидрируют путем погружения в серии этанола и затем высушивают. Срезы инкубируют с 100 мкл гибридизационного буфера (4 × SSC [стандартный цитратно-солевой буфер], 50% формамид, 1 × раствор Денхардта, 250 мкг мл⁻¹ тРНК дрожжей, 10%

декстрансульфат), содержащим 10 нг (1 мкл ПЦР реакции, приготовленной согласно описанию выше с использованием праймеров CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG и TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) диоксигенин-меченного зонда (Le Roux с соавт., 1999). Срезы покрывают пластиковыми покрывными стеклами *in-situ* и помещают в термостат при 95°C на 5 минут. Затем предметные стекла охлаждают на льду 1 минуту перед проведением гибридизации в течение ночи при 42°C в камере влажности. Далее срезы дважды промывают в течение 5 минут в $2 \times SSC$ при комнатной температуре и однократно в течение 10 минут в $0,4 \times SSC$ при 42°C. Этапы обнаружения осуществляются в соответствии с инструкциями производителя. Затем стекла промывают стерильной дистиллированной водой (dH_2O). Срезы контрастно окрашивают красителем Бисмарка (коричнево-желтый), промывают в dH_2O , и используют покрывные стекла с помощью водной монтирующей среды.

4.3.1.2.3.2.3.

Положительные/отрицательные контроли

Обязательны. Положительные контроли:

1) ISH зараженного хозяина; 2) неспецифичная ISH (SSU рДНК) образцов.

Отрицательные контроли:

3) отсутствие реакций зонда ISH; 4) ISH незараженных хозяев. Положительные контроли доступны по запросу в Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3.2.4. Уровни валидации

4.3.1.2.3.2.4.1. Специфичность и чувствительность

90% и 99%, соответственно, в случае с ISH (Thébault с соавт., 2005). Ожидается, что протокол ISH будет выявлять *M. refringens*; однако этот зонд продемонстрировал кросс-реакцию с *M. sydneyi* и *Marteilioïdes chungmuensis* (Kleeman с соавт., 2002).

4.3.1.2.3.2.4.2. Золотой стандарт

Совместно валидирован с гистологией.

4.3.1.2.3.2.5. Интерпретация результатов

- Положительный результат демонстрируется фиолетово-черным мечением клеток *M. refringens* в пределах известных целевых тканей, с отрицательными показателями всех отрицательных контролей и положительными показателями всех положительных контролей.
- У восприимчивых видов в пределах известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат ISH подтверждает инфекцию *M. refringens*.

- У других видов или за пределами известного географического диапазона инфекции *M. refringens*, положительный результат ISH требует дополнительной молекулярной характеристики с целью определения видов паразита. Однако такого рода случай должен быть адресован в соответствующую Референтную лабораторию МЭБ.

4.3.1.2.3.2.6. Доступность теста

Зонд может быть получен из соответствующей Референтной лаборатории МЭБ.

4.3.1.2.3.3. Секвенирование

Секвенирование рекомендуется в качестве одного из финальных этапов для подтверждающей диагностики. Целевые регионы - SSU рДНК, ITS1 и IGS (межгенный спейсер). Несмотря на то, что последовательности доступны в общественных генетических банках, рекомендуется сообщать о таких случаях в соответствующую Референтную лабораторию МЭБ.

4.3.1.2.4. Очищение возбудителя

Очищение возбудителя в настоящее время не применяется для диагностических целей, но протоколы очищения разработаны и опубликованы (Miahle с соавт., 1985; Robledo с соавт., 1995a).

4.3.2. Серологические методы

Не применяются.

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели их применения

В качестве примера, методы, доступные в настоящее время для целевого надзора и диагностики *M. Refringens*, перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, используемые в Таблице, указывают: а = 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; с = 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 b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинное применение и тот факт, что они широко использовались без неточных результатов, делает их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор		Подтверждающий
-------	----------------	--	----------------

	Личинки	PLs	Молодые особи	Взрослые особи	Предположительный диагноз	диагноз
Макроскопические признаки	d	d	c	c	c	d
Влажные препараты	d	d	c	c	c	d
Отпечатки	d	d	b	b	a	c
Гистопатология	d	d	a	a	b	c
<i>In situ</i> ДНК зонды	d	d	d	d	d	b
ПЦР	a	a	a	a	a	a
Секвенирование	d	d	d	d	d	a
Трансмиссионная электронная микроскопия	d	d	d	d	d	b

PLs = постличинки; ПЦР = полимеразная цепная реакция

6. Тест(ы) рекомендуемые для целевого надзора для признания свободы от инфекции *Marteilia refringens*

Предписанные методы для целевого надзора для признания свободы от инфекции в соответствии с Водным Кодексом: отпечатки ткани (пищеварительная железа), гистология или ПЦР.

7. Подтверждающие диагностические тесты

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Любой положительный результат, полученный с помощью любой диагностической методики следует рассматривать в качестве подозрительного.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

У известных восприимчивых видов и в пределах известного географического диапазона, подтвержденный случай *M. refringens* представляет собой положительный результат, полученный с помощью отпечатков ткани или гистологии совместно с ISH или ПЦР.

У других видов хозяев или за пределами известного диапазона *M. refringens*, рекомендуется подтверждение путем секвенирования и описания трансмиссионной электронной микроскопии.

8. Список литературы

ALDERMAN D.J. (1979). Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Mar. Fishery Rev.*, **41**, 67–69.

AUDEMARD C., BARNAUD A., COLLINS C.M., LE ROUX F., SAURIAU P.-G., COUSTAU C., BLACHIER P. & BERTHE F.C.J. (2001). Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **257**, 87–108.

AUDEMARD C., LE ROUX F., BARNAUD A., COLLINS C., SAUTOUR B., SAURIAU P.-G., DE MONTAUDOUIN X., COUSTAU C., COMBES C. & BERTHE F.C.J. (2002). Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. *Parasitology*, **124** (3), 315–323.

BERTHE F.C.J., LE ROUX F., PEYRETAILLADE E., PEYRET P., RODRIGUEZ D., GOUY M. & VIVARÈS C.P. (2000).

The existence of the phylum Paramyxea Desportes and Perkins, 1990 is validated by the phylogenetic analysis of the *Marteilia refringens* small subunit ribosomal RNA. *J. Euk. Microbiol.*, **47** (3), 288–293.

BERTHE F.C.J., LE ROUX F., ADLARD R.D. & FIGUERAS A. (2004). Marteiliosis in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 433–448.

CARRASCO N., ARZUL I., BERTHE F.C.J. & FURONES M.D. (2008a). *In situ* hybridization detection of initial infective stages of *Marteilia refringens* (Paramyxea) in its host *Mytilus galloprovincialis*. *J. Fish Dis.*, **31**, 153–157.

CARRASCO N., ARZUL I., CHOLLET B., ROBERT M., JOLY J.-P., FURONES M.D. & BERTHE F. (2008b).

Comparative experimental infection of the copepod *Paracartia grani* with *Marteilia refringens* and *M. maurini*. *J. Fish Dis.*, **31**, 497–504.

CARRASCO N., LOPEZ-FLORES I., ALCARAZ M., FURONES M.D., BERTHE F.C.J. & ARZUL I. (2007). Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxea) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitology*, **134**, 1541–1550.

CAVALIER-SMITH T. & CHAO E.E. (2003). Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist.*, **154** (3-4), 341–358.

COMPS M. (1976). *Marteilia lenghi* n. sp., parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **40**, 347–349.

COMPS M. (1983). Etude morphologique de *Marteilia christenseni* sp. n. parasite du lavignon *Scrobicularia piperata* P. (mollusque pélecypode). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **47**, 99–104.

- FEIST S.W., HINE P.M., BATEMAN K.S., GRANT D.S. & LONGSHAW M. (2009). *Paramarteilia canceri* sp. n. (Cercozoa) in the European edible crab (*Cancer pagarus*) with a proposal for the revision of the order Paramyxida Chatton, 1911. *Folia Parasitologica*, **56** (2), 73–85.
- GRIZEL H. (1985). Etude des récentes épizooties de l'huître plate (*Ostrea edulis* Linné) et leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse Doctorat es Sciences, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 145 pp.
- GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J.R., COUSSERANS F., DUTHOIT J.L. & LE PENNEC M.A. (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Sci. Pêche Bull. Inst. Pêches marit.*, **240**, 7–29.
- KLEEMAN S.N., LE ROUX F., BERTHE F. & ADLARD R.D. (2002). Specificity of PCR and *in situ* hybridisation assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*. *Parasitology*, **125**, 131–141.
- LE ROUX F., LORENZO G., PEYRET P., AUDEMARD C., FIGUERAS A., VIVARÈS C., GOUY M. & BERTHE F.C.J. (2001). Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J. Euk. Microbiol.*, **48** (4), 449–454.
- LE ROUX F., AUDEMARD C., BARNAUD A. & BERTHE F.C.J. (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Mar. Biotechnol.*, **1** (6), 588–597.
- LONGSHAW M., FEIST S.W., MATTHEWS A. & FIGUERAS A. (2001). Ultrastructural characterisation of *Marteilia* species (Paramyxia) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 137–142.
- LÓPEZ-FLORES I., DE LA HERRAN R., GARRIDO-RAMOS M.A., NAVAS J.I., RUIZ-REJON C. & RUIZ-REJON M. (2004). The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology*, **129**, 411–419.
- LÓPEZ-FLORES I., GARRIDO-RAMOS M.A., DE LA HERRAN R., RUIZ-REJÓN C., RUIZ-REJÓN M. & NAVAS J.I. (2008a). Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and *in situ* hybridization. *Mol. Cell Probes*, **22**, 151–155.
- LÓPEZ-FLORES I., ROBLES F., VALENCIA J.M., GRAU A., VILLALBA A., DE LA HERRÁN R., GARRIDO-RAMOS M.A., RUIZ-REJÓN C., RUIZ-REJÓN M. & NAVAS J.I. (2008b). Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and *in situ* hybridisation in *Chamelea gallina* from the Balearic Islands (Spain). *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 79–87.
- MARTIN A.G. (1993). Relance de l'huître plate – Rapport d'avancement des travaux année 1991. Rapport Ifremer. RIDRV-93.026 RA/Trinité, 40 pp. MIAHLE E., BACHERE E., LE BEC C. & GRIZEL H. (1985). Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) parasites de bivalves marins. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **301, Serie III, 4**, 137–142.

- MOYER M.A., BLAKE N.J. & ARNOLD W.S. (1993). An ascetosporan disease causing mass mortality in the Atlantic calico scallop, *Argopecten gibbus* (Linnaeus, 1758). *J. Shellfish Res.*, **12** (2), 305–310.
- NORTON J.H., PERKINS F.P. & LEDUA E. (1993). *Marteilia*-like infection in a giant clam, *Tridacna maxima*, in Fiji. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 328–330.
- NOVOA B., POSADA D. & FIGUERAS A. (2005). Polymorphisms in the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *J. Fish Dis.*, **28** (6), 331–338.
- PASCUAL S., VILLALBA A., ABOLLO E., GARCI M., GONZALES A.F., NOMBELA M., POSADA D. & GUERRA A. (2010). The mussel *Xenostrobus securis*: a well established alien invader in the Ria de Vigo (Spain, NE Atlantic). *Biological Invasions*, **12**, 2091–2103.
- PERKINS F.O. & WOLF P.H. (1976). Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. – Haplosporidian pathogen of Australian oysters. *J. Parasitol.*, **62**, 528–538.
- ROBERT R., BOREL M., PICHOT Y. & TRUT G. (1991). Growth and mortality of the european oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquatic Living Resource*, **4**, 265–274.
- ROBLEDO J.A.F., MIAHLE E. & FIGUERAS A. (1995a). Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). In: Techniques in Fish Immunology – 4. Immunology and pathology of aquatic invertebrates, Stolen J.C., Fletcher T.C., Smith S.A., Zelikoff J.T., Kaattari S.L., Anderson R.S., Soderhall K. & Weeks-Perkins B.A., eds. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, USA, 117–121.
- ROBLEDO J.A.F., SANTAREM M.M., GONZALEZ P. & FIGUERAS A. (1995b). Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic loads. *Aquaculture*, **133**, 311–322.
- THÉBAULT A., BAUD J.P., LE SAUX J.C., LE ROUX F., CHOLLET B., LE COGUIC M.J., FLEURY P.G., BERTHE F. & GERARD A. (1999). Compte rendu sur les mortalité de juillet 1999 des moules (*Mytilus edulis*) en poches dans l’Aber Benoît. Rapport IFREMER., 12 pp.
- THÉBAULT A., BERGMANN S., POUILLOT S., LE ROUX F. & BERTHE F.C.J. (2005). Validation of *in situ* hybridization and histology assays for the detection of the oyster parasite *Marteilia refringens*. *Dis. Aquat. Org.*, **65** (1), 9–16.
- VILLALBA A., MOURELLE S.G., CARBALLAL M.J. & LOPEZ M.C. (1993a). Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 205–213.
- VILLALBA A., MOURELLE S.G., LOPEZ M.C., CARBALLAL M.J. & AZEVEDO C. (1993b). Marteliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW. Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 61–72.

*

* *

NB: Существует Референтная лаборатория МЭБ по инфекции *Marteilia refringens* (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 *Marteilia refringens*, пожалуйста, обратитесь в Референтную лабораторию МЭБ