

*XENOHALIOTIS CALIFORNIENSIS*

---

**1. Предмет рассмотрения<sup>1</sup>**

Внутрицитоплазматические инфекции, вызванные *Xenohaliothis californiensis*, риккетсиозной бактерией, в эпителии желудочно-кишечного тракта вызывают заболевание (так называемый синдром увядания [Naaker с соавт., 1992]) у диких и выращиваемых на фермах морских ушек, *Haliotis* spp. (Vetigastropoda: Mollusca [Friedman с соавт., 2000]). К серьезным признакам заболевания относятся атрофия стопы, пятнистость пищеварительной железы, анорексия, слабость и летаргия (Balseiro с соавт., 2006; Friedman с соавт., 2000; Gardner с соавт., 1995).

**2. Информация о болезни**

**2.1. Факторы агента**

**2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента**

*Xenohaliothis californiensis* является внутриклеточной бактерией семейства *Anaplasmataceae* (Dumler с соавт., 2001) и близко родственна представителям родов *Ehrlichia*, *Anaplasma* и *Cowdria* (Friedman с соавт., 2000). Болезнь, вызываемая этой бактерией, известна как синдром увядания (Friedman с соавт., 2002; Naaker с соавт., 1992), и ее более уместно называть риккетсиозом морских ушек. Информация о наличии разновидностей штаммов этой бактерии отсутствует; однако недавние наблюдения показали, что некоторые бактерии *X. californiensis* могут быть инфицированы фагами (Friedman & Crosson, неопубликованные данные). Диморфная бактерия от палочковидной до сферической формы имеет размеры в среднем 332 × 1550 нм в бациллярной форме и в среднем 1405 нм в сферическом морфотипе. Бактерия размножается в внутрицитоплазматических вакуолях диаметром 14-56 мкм в желудочно-кишечном эпителии (Friedman с соавт., 2000).

**2.1.2. Выживание вне хозяина**

Несмотря на то, что *X. californiensis* считается облигатным внутриклеточным организмом, бактерия может выживать вне хозяина в течение неопределенного периода времени, что подтверждается исследованиями передачи через воду (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2002; Friedman с соавт., 2007; Rosenblum с соавт., 2008).

**2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)**

Опираясь на результаты успешной деконтаминации в лаборатории, эта бактерия легко инактивируется погружением в <10% отбеливатель. Кроме того, воздействие гипохлорита кальция на морскую воду, содержащую бактерию, >10 мг на литр 1 [ppm] и дезинфекция оборудования в ванне с 1% йодоформом в пресной воде в течение 1 часа являются эффективными дезинфицирующими средствами, основанными на результатах использования этих методов дезинфекции в морской лаборатории с проточной морской водой при отсутствии обнаружения этого патогенного организма в соседних популяциях морских ушек (Friedman & Finley, 2003; Friedman, pers. obs.).

---

<sup>1</sup> NB: Версия принята Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2012 г.  
2019 © OIE - МЭБ - Руководство по диагностическим тестам для водных животных - 14/11/2019

#### 2.1.4. Жизненный цикл

Бактерия делится бинарным делением (Friedman с соавт., 2000) и имеет прямую горизонтальную передачу (Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2001b). Хотя ее обычно не обнаруживают у аквакультурных морских ушек до тех пор, пока она не перейдет в стадию выращивания (максимальный размер > 2,5 см), исследование с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) 6-недельных морских ушек, подвергшихся воздействию бактерии, показало, что ушки размером 1-2 мм могут быть инфицированы (Moore с соавт., неопубликованные наблюдения).

### 2.2. Факторы хозяина

#### 2.2.1. Восприимчивые виды хозяина

*Xenohaliotis californiensis* поражает представителей рода *Haliotis*, и естественные инфекции наблюдались у черных морских ушек (*H. cracherodii*), белых морских ушек (*H. sorenseni*), красных морских ушек (*H. rufescens*), розовых морских ушек (*H. corrugata*), зеленых морских ушек (*H. fulgens*), маленьких морских ушек (*H. diversicolor supertexta*) (Wetchateng, 2008; Wetchateng с соавт., 2010), европейских морских ушек (*H. tuberculata*) (Balseiro с соавт., 2006) в дикой природе или в условиях аквакультуры, а также плоских (*H. wallalensis*) и японских морских ушек (*H. Discus-hannai*) при лабораторных испытаниях (Friedman, неопубликованные наблюдения). Исследования других видов морских ушек не проводились. Температура является важным фактором как для передачи патогенных организмов, так и для проявления болезни (Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 1997; Raimondi с соавт., 2002; Rosenblum с соавт., 2008).

#### 2.2.2. Стадии восприимчивости хозяина

Несмотря на то, что на всех пост-личиночных стадиях развития наблюдалась чувствительность к инфекции *X. californiensis*, клиническое проявление болезни обычно наблюдается у животных в возрасте старше 1 года у аквакультурных морских ушек (Friedman, неопубликованные наблюдения) и у всех классов размеров морских ушек, наблюдаемых в диких популяциях, обследованных на настоящее время (например, Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 1997; Naaker с соавт., 1992; Steinbeck с соавт., 1992; Van Blaricom с соавт., 1993; Van Blaricom с соавт., 2011).

#### 2.2.3. Вероятность обнаружения видов или субпопуляций

Вероятность обнаружения увеличивается с увеличением размера морского ушка. Животные размером менее 10 мм имеют меньшую вероятность обнаружения с помощью гистологии, но равную вероятность обнаружения с помощью ПЦР (Friedman с соавт., 2007; Moore с соавт., 2011).

#### 2.2.4. Целевые органы и инфицированные ткани

*Xenohaliotis californiensis* инфицирует эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта задней части пищевода, пищеварительной железы и, в меньшей степени, кишечника (Friedman с соавт., 2000).

## 2.2.5. Устойчивая инфекция пожизненными носителями

Инфекции могут сохраняться в течение длительного времени без развития клинических проявлений болезни, если хозяин находится в прохладной воде (например, 15°C для красных морских ушек) и воздействие повышенных температур морской воды (например, > 17°C для красных, черных и белых морских ушек) обычно приводит к развитию клинического заболевания (Friedman & Finley, 2003; Moore с соавт., 2000; Steinbeck с соавт., 1992). Изменение температуры морской воды с более низкой средней температурой (например, 16,5°C для красного морского ушка) может усугубить потери (Moore с соавт., 2011). Последние данные свидетельствуют о том, что некоторые виды, особенно те, которые населяют более теплые воды, могут содержать бактерии без развития клинических проявлений болезни (Wetchateng, 2008; Wetchateng с соавт., 2010).

## 2.2.6. Векторы

Хотя не было идентифицировано альтернативных хозяев, не принадлежащих к семейству галиотидов (морских ушек), было высказано предположение, что некоторые колониальные асцидии могут концентрировать бактерию (на основании данных ПЦР). Таким образом, возможность того, что такие виды действуют как переносчики бактерий, существует, но необходимы дальнейшие исследования возможных переносчиков (J.D. Moore, неопубликованное наблюдение).

## 2.2.7. Известные или подозрительные дикие водные животные-носители

Отсутствуют

## 2.3. Паттерн болезни

Болезнь (синдром увядания) возникает при повышенной температуре воды (~ 18°C и выше) у морских ушек со средними и тяжелыми инфекциями (Friedman с соавт., 2000; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000). Инкубационный период синдрома увядания является продолжительным и обычно составляет от 3 до 7 месяцев (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 1997; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2001b). Клиническое заболевание характеризуется морфологическими изменениями пищеварительной железы, которые различаются у разных видов и могут включать дегенерацию (атрофию канальцев, увеличение соединительной ткани и воспаление) и/или метаплазию пищеварительных канальцев. Метаплазия включает замену терминальных секреторных/абсорбтивных ацинусов абсорбционными/транспортными протоками, внешне похожими на постэзофагус. Эти морфологические изменения сопровождаются анорексией, истощением запасов гликогена с последующим использованием мышц стопы в качестве источника энергии и последующей смертью (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 1997; Friedman с соавт., 2007; Kismohandaka с соавт., 1995; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2001b). Стопа пораженных ушек содержит меньше организованных мышечных пучков, обильную соединительную ткань и может содержать больше церозных клеток, чем у здоровых людей (Friedman с соавт., 2007; Moore с соавт., 2000; Van Blaricom с соавт., 1993). Выжившие морские ушки остаются инфицированными даже в условиях низкой температуры воды, например, в северной Калифорнии (Friedman & Finley, 2003).

### 2.3.1. Механизмы передачи

Передача *X. californiensis* является горизонтальной и предполагается, что она осуществляется

фекально-оральным путем. Воздействие морской воды, содержащей инфекционный материал, на морских ушек достаточно для передачи бактерии, и прямой контакт с животными не требуется (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000; Мур и др., 2001b). Было продемонстрировано, что температуры ниже 13 °С ограничивают передачу бактерий (т.е. менее 1% передачи) по сравнению с температурой, сохраняющейся в пределах ~ 18 °С (передача 72-94%) (Braid с соавт., 2005).

### 2.3.2.Превалентность

Таблица 2.1. Вариации превалентности *Xenohaliotis californiensis*: виды и локализация

Виды	ПЦР, превалентность		Гистологические исследования, превалентность		Ссылки
	Дикие	Аквакультура	Дикие	Аквакультура	
<i>Haliotis rufescens</i>	ND	0–100%	1–75% <sup>a</sup>	0–100% <sup>b</sup>	Friedman & Finley, 2003; Moore с соавт., 2000; Friedman, unpublished obs.
<i>Haliotis cracherodii</i>	ND	NA	74–98%	NA	Friedman & Finley, 2003
<i>Haliotis sorenseni</i>	0	0–100%	0	0–100%	Friedman с соавт., 2007; Moore с соавт., unpublished obs.
<i>Haliotis fulgens</i>	ND	ND	44–100%	ND	Moore с соавт., 2009; Tinajero с соавт., 2002
<i>Haliotis corrugata</i>	ND	ND	62–63%	ND	Tinajero с соавт., 2002
<i>Haliotis walallensis</i>	NA	NA	0	NA	J.D. Moore, unpublished obs.
<i>Haliotis discus-hannai</i>	ND	0	0	0	C.S. Friedman, unpublished obs.
<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	ND	61%	ND	53%	Wetchateng, 2008; Wetchateng с соавт., 2010 <sup>c</sup>
<i>Haliotis tuberculata</i>	ND	ND	0%	14.5-52%	Balseiro с соавт., 2006

- Превалентность 1–17% наблюдалась в северной Калифорнии и до 75% в центральной и южной Калифорнии.
- У морских ушек больших размеров обычно наблюдается более высокая превалентность инфекции.
- Всего было отобрано 36 животных с одной фермы в Таиланде. ND = нет данных; NA = не применимо.

### 2.3.3.Географическое распространение

*Xenohaliotis californiensis* встречается вдоль юго-западного побережья Северной Америки в Калифорнии, США и Нижней Калифорнии, Мексика. Тем не менее, поскольку инфицированные морские ушки были доставлены в Чили, Китай (Народную Республику), Китайский Тайбэй, Исландию, Ирландию, Израиль, Японию, Испанию и Таиланд и, возможно, в другие страны, предполагается, что географический диапазон этиологического агента широкий там, где выращиваются калифорнийские красные морские ушки, *Haliotis rufescens*, или в районах, где местные виды контактировали с красными морскими ушками (Wetchateng, 2008).

#### 2.3.4. Смертность и заболеваемость

Восприимчивость зависит от вида, так как известно, что бактерия вызывает заболевание у черных (до 99% смертности; Moore с соавт., 2009), белых (до 100% смертности; Friedman & McCormick, неопубликованные наблюдения), красных (до 35% смертность; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2001b), розовых (также называемых желтыми) и зеленых (также называемых синими) морских ушек (Tinajero с соавт., 2002). В отличие от других видов морских ушек, изученных на сегодняшний день, масштаб смертности морских ушек недостаточно хорошо задокументирован относительно розовых и зеленых морских ушек. Однако в Нижней Калифорнии, Мексика, до 100% зеленых (синих) и 63% розовых (желтых) морских ушек могут быть инфицированы, причем до 43% зеленых и 71% розовых ушек имеют микроскопические признаки заболевания. (дегенерация и метаплазия пищеварительной железы; Tinajero с соавт., 2002). Инкубационный период варьируется в зависимости от температуры, но обычно включает в себя длительный предварительный период от 3 до 7 месяцев. Смертность обычно наступает через 1-2,5 месяца после появления видимых клинических признаков (Friedman с соавт., 1997). *Xenohaliotis californiensis* была недавно обнаружена на основании гистологических и молекулярных данных в нескольких азиатских странах, включая Китай (Народную Республику), Китайский Тайбэй и Таиланд (Wetchateng, 2008; Wetchateng с соавт., 2010). Распространенность не подтверждена документально, но до 61% *H. diversicolor supertexta* были инфицированы на ферме в Таиланде, однако, как и у европейского морского ушка, *H. tuberculata*, ни у одного морского ушка не было клинических признаков синдрома увядания (Balseiro с соавт., 2006); Van Blaricom с соавт., 2011).

#### 2.3.5. Факторы окружающей среды

Болезнь (синдром увядания) возникает при повышенной температуре воды (~ 18-25 ° C у морских ушек с умеренными и тяжелыми инфекциями (Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2000; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2011; Rosenblum с соавт., 2008). Передача паразитов усиливается у откормленных (94%) морских ушек по сравнению с голодными (72%) морскими ушками (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005 г.). Количество субклинических инфекций у *H. diversicolor supertexta* увеличивалось при 27–29°C (Van Blaricom с соавт., 2011). Поскольку морские ушки являются облигатными морскими видами, устойчивость к солености у *Rickettsia*-подобных организмов (RLO) не исследовалась.

#### 2.4. Контроль и профилактика

Самая эффективная профилактика - избегание возбудителя. В случае возникновения инфекции содержание морских ушек при температуре  $\leq 15$  ° C может снизить передачу RLO и последующую передачу болезни (Braid с соавт., 2005). Применение окситетрациклина (см. Раздел 2.4.2 ниже) снижает потери.

### **2.4.1. Вакцинация**

Вакцинация не является эффективным вариантом контроля инфекции *X. californiensis*.

### **2.4.2. Химиотерапия**

Уменьшение плотности и применение диеты, содержащей окситетрациклин, может снизить потери (Friedman с соавт., 2003; Friedman с соавт., 2007; Rosenblum с соавт., 2008). Пероральный прием 12-19% ТМ-100 (90-100 мг / кг) с лечебной диетой в течение 10 или 20 дней обеспечивает защиту от повторного инфицирования бактериями на несколько месяцев. Последние данные показывают, что пероральный прием 12% ТМ-100 в течение одного дня может снизить распространенность бактериальных инфекций с 80% до 10% и среднюю интенсивность инфекции с 1,4 до 0,1 по шкале 0–3 (Friedman с соавт., 2000; Friedman и др., 2007). Основываясь на наблюдениях за окситетрациклином в необработанных морских ушках, которые получали морскую воду от обработанных животных, считается, что либо потребление морской воды, содержащей лекарственное средство, либо абсорбция может быть ключевым путем потребления этого терапевтического средства (Friedman с соавт., Неопубликованные данные).

### **2.4.3. Иммуностимуляция**

Нет данных об иммуностимуляции как о мере контроля данной болезни.

### **2.4.4. Разведение резистентных особей**

Интерес к селекции резистентных морских ушек, особенно с целью восполнения популяции, повышается. Дикие черные морские ушки продолжают пополнять популяцию вдоль островов Чаннел Айлендс у берегов Калифорнии с 2002г. И некоторые особи, участвующие в пополнении популяции выживают, что свидетельствует о том, что эти особи могут быть более устойчивы к данной болезни, вызываемой риккетсиями (Tinajero с соавт., 2002). Недавние лабораторные исследования продемонстрировали повышенную резистентность к болезни у потомства черных морских ушек, которые выжили после инфицирования *X. californiensis* по сравнению с особями из популяций, неинфицированных болезнью (Friedman с соавт. неопубликованные данные).

### **2.4.5. Восполнение популяции устойчивыми видами**

В настоящее время данных нет, и необходимо учитывать относительные преимущества выращивания альтернативных видов.

### **2.4.6. Блокирующие агенты**

Нет данных

### **2.4.7. Дезинфекция икры и личинок**

Не было предпринято попыток дезинфекции икры и личинок. Личинки морских ушек не питаются и маловероятно, что передача происходит до оседания и метаморфоза, после того, как начинается кормление (Moore & Friedman, неопубликованные данные).

## 2.4.8. Общие практики содержания

Практика содержания, направленная на уменьшение проблем, вызываемых *X. californiensis*, типична для любой бактериальной болезни и включает покупку проверенных семян (без признаков инфекции), содержание в отдельных семьях или группах (т.е. избегание высокой степени сортировки и смешения разрозненных групп), ополаскивание рук и оборудования в пресной или йодированной воде и их просушивание между использованием. По возможности рекомендуется изоляция инфицированных групп. Если применяется лечение окситетрациклином, терапевтическое применение в соответствии с федеральными рекомендациями (например, FDA-CVM<sup>2</sup> в США или EMEA<sup>3</sup> в Европе) до наступления тепловодного сезона может снизить потери и инфицирование. Как правило, требуется только одно применение в течение второго или третьего года роста в течение типичного 3–4-летнего цикла культивирования.

## 3. Отбор образцов

### 3.1. Отбор индивидуальных особей

Для рутинного отбора проб рекомендуется выборочный или случайный отбор особей, а оптимальное количество собранных образцов будет варьироваться в зависимости от размера популяции и желаемого уровня обнаружения (например,  $n = 60$  для популяции  $> 2000$  особей). Для оптимизации обнаружения (целевого отбора проб) рекомендуется отбор морских ушек с клиническими признаками снижения веса (атрофированная pedalная мышца). По возможности, у животных следует отбирать пробы после тепловодного периода (например, 30 дней) ( $> 18^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.2. Консервация образцов для передачи

Образцы следует поместить в 80–95% неденатурированный этанол (ткань: этанол 1: 9 [об. / об.]) и хранить при температуре 4–20°C. Образцы также можно мгновенно заморозить в жидком азоте и хранить при  $-80^{\circ}\text{C}$  до тестирования. Образцы этанола следует отправлять в лабораторию на льду в соответствии с национальными или международными стандартами транспортировки легковоспламеняющихся материалов, если применимо. Замороженные образцы следует отправлять на сухом льду в соответствии с национальными или международными стандартами транспортировки, если применимо.

### 3.3. Объединение образцов в пул

В идеале образцы следует иссечь и хранить отдельно. Если в качестве меры экономии средств желательно объединение образцов в пул, рекомендуется объединять образцы ( $n = 5$  / пул) для выделения ДНК и последующих ПЦР-анализов. Чтобы учесть возможное разбавление целевой ДНК, соответствующее объединению в пул, ПЦР следует проводить в трех повторностях.

### 3.3. Наилучшие органы и ткани

Лучшая целевая ткань - это задний пищевод, а вторая лучшая ткань - комплекс пищеварительной железы и кишечника.

<sup>2</sup> Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США - Центр ветеринарной медицины

<sup>3</sup> Европейское агентство по лекарственным средствам

### **3.4. Неподходящие образцы/ткани**

Ткани, не относящиеся к пищеварительной системе не содержат риккетсиозной ДНК, и их следует избегать.

## **4. Диагностические методы**

Макроскопические признаки болезни, при их наличии, включают атрофию педальной мышцы, пятнистость пищеварительной железы, потерю аппетита и вялость. Следует иметь в виду, что животные могут страдать от преclinical инфекции во время инкубационного периода, если это более устойчивые к болезни виды, или если они содержатся в воде с температурой не выше 15°C. Болезнь характеризуется внутрицитоплазматическими бактериальными включениями в заднем отделе пищевода, кишечнике и абсорбирующем/транспортном эпителии пищеварительной железы, в то время как при умеренных и обширных инфекциях наблюдаются дегенеративные или метапластические изменения в пищеварительной железе с последующей атрофией педальной мышцы у восприимчивых видов.

### **4.1. Полевые диагностические методы**

#### **4.1.1. Клинические признаки**

Морские ушки, пораженные инфекциями *X. californiensis*, могут страдать от субклинических инфекций в течение препатентного периода или при температуре воды не выше 15°C. Инфицированные особи могут демонстрировать различные уровни истощения (атрофии), от незначительного до серьезного, при более высоких температурах воды.

#### **4.1.2. Изменения в поведении**

Во время эпидемии пораженные морские ушки часто прикрепляются к горизонтальным (а не вертикальным или перевернутым) поверхностям, выглядят слабыми (их легко отделить от поверхности рукой) и истощенными (сморщенными) (Naaker с соавт., 1992). Аквакультурные морские ушки также отказываются от приема пищи. К тому же, присутствие аномально большого количества свежих раковин также может указывать на болезнь.

### **4.2. Клинические методы**

#### **4.2.1. Макроскопическая патология**

Клиническая характеристика болезни, вызванной *X. californiensis*, основана на комбинации морфологических изменений в ткани в присутствии возбудителя. Морфологические изменения включают атрофированную мышцу ноги, что заметно на макроскопическом и микроскопическом уровне (гистология). Как непосредственный результат катаболизма педальной мышцы, инфицированные морские ушки выделяют значительно более высокие уровни аммиака по сравнению с неинфицированными особями (Kismohandaka с соавт., 1995). Если обнаруживаются умирающие особи морских ушек, то наличие пятнистости пищеварительной железы (темно-коричневая с небольшими очагами рыжевато-коричневой ткани), указывающая на метапластические изменения, является убедительным доказательством наличия этой болезни (Friedman с соавт., 2000).

#### **4.2.2. Клиническая химия**

Можно использовать стандартный гликогеновый тест (Balseiro с соавт., 2006) для проверки снижения уровня гликогена в пищеварительной железе и педальной мышце. Однако снижение уровня гликогена связано с отказом от потребления пищи и неспособностью ее переваривать,



что является неспецифичным для этой болезни (т.е. схоже с признаками голодания) [Balseiro с соавт., 2006]).

#### **4.2.3. Микроскопическая патология**

Наличие базофильных, овальных внутрицитоплазматических включений в эпителии пищеварительного тракта (задний отдел пищевода, транспортные протоки и метапластический эпителий пищеварительной железы и/или кишечника). Метапластические изменения в пищеварительной железе, которые включают трансформацию секреторных концевых отделов - ацинусов в абсорбирующий/транспортный эпителий, усиливаются у морских ушек, зараженных *X. californiensis* (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Friedman с соавт., 2002; Moore с соавт., 2000; Moore с соавт., 2001b). Несмотря на то, что метаплазия наблюдалась у всех пораженных видов, исследованных до настоящего времени, реакция на инфекцию может варьировать у разных хозяев. Красные морские ушки и белые морские ушки, например, обычно реагируют метапластическими изменениями (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Moore с соавт., 2000), в то время как черные морские ушки обычно реагируют комбинацией метаплазии, дегенерации пищеварительных каналов и воспаления (Friedman с соавт., 1997; Friedman с соавт., 2002). Уровень гликогена в педальной мускулатуре у пораженных особей ниже, и количество мышечных пучков меньше, чем у здоровых особей (Balseiro с соавт., 2006; Braid с соавт., 2005; Gardner с соавт., 1995). У некоторых морских ушек может наблюдаться повышение уровня серозных клеток в мышце ноги (Van Blaricom с соавт., 1993), но эти признаки не являются патогномоничными для этого заболевания. Молодые особи белых морских ушек могут демонстрировать очевидные метапластические изменения в пищеварительном тракте без присутствия *X. californiensis* (Friedman с соавт., 2007). Таким образом, присутствие *X. californiensis* в эпителии пищеварительного тракта параллельно с морфологическими изменениями, отмеченными выше, указывают на наличие клинического синдрома увядания.

#### **4.2.4. Влажные препараты**

Несмотря на отсутствие рекомендаций, цитоплазматические включения можно увидеть посредством метода фазового контраста или микроскопии по методу дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) при исследовании заднего отдела пищевода; морфология пищеварительных тканей усложняет интерпретацию влажных препаратов.

#### **4.2.5. Мазки**

Окрашенные мазки эпителия пищеварительного тракта могут использоваться с целью обнаружения бактериальных включений. Однако исследование небольших кусочков заднего отдела пищевода, которые были высушены на слайде и окрашены ДНК флуорохромом, может быть более легким для интерпретации, чем окрашенные мазки.

#### **4.2.6. Фиксированные срезы**

Не применяется.

#### **4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология**

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) может использоваться для подтверждения присутствия *Риккетсия*-подобных организмов. Однако, этот метод не может быть подтверждающим в отношении этого возбудителя по причине недостаточного количества уникальных морфологических характеристик. Если используется ТЭМ, то она обнаружит межклеточные колонии палочковидных прокариот с большим количеством рибосом и имеющих трехслойные клеточные стенки внутри мембранно-связанных вакуолей в

цитоплазме эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта. Диморфные бактерии, с формами от палочковидных до круглых, имеют в среднем размеры  $332 \times 1550$  нм, если имеют форму бациллы, и 1405 нм при сферическом морфотипе. Бактерия репродуцируется внутри внутрицитоплазматических вакуолей 14–56 мкм в диаметре (Friedman с соавт., 2000).

### **4.3. Методы выявления и идентификации возбудителя**

#### **4.3.1. Методы прямого обнаружения**

Некоторые методы идентификации и обнаружения *X. californiensis* в образцах ткани или экстрагированной ДНК приведены в разделах ниже.

##### **4.3.1.1. Микроскопические методы**

###### **4.3.1.1.1. Влажные препараты**

Ткани (задний отдел пищевода) могут быть рассечены, помещены на предметное стекло и исследованы с помощью микроскопии методом дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) или фазово-контрастной микроскопии при  $\times 200$  или  $\times 400$  увеличении после расплющивания покровным стеклом. Риккетсиозные включения и прозрачные круглые включения появляются внутри эпителия пищевода. Этот метод не рекомендуется для использования, так как включения иногда трудно идентифицировать.

###### **4.3.1.1.2. Мазки**

Отпечатки ткани можно использовать для выявления инфекции *X. californiensis*, при ее интенсивности от умеренной до высокой. Однако гистология является более чувствительным методом, чем исследование отпечатков ткани.

###### **4.3.1.1.2.1. Метод окрашивания**

Делают надрез заднего отдела пищевода и отпечатывают на слайде. Фиксируют мазок метанолом и окрашивают по модифицированному методу Гимза. Высушивают и исследуют на наличие риккетсиозных включений при погружении в масло, либо покрывают покровным стеклом и изучают при  $\times 200$ – $400$  увеличении.

###### **4.3.1.1.2.2. Метод флуоресценции**

Делают надрез заднего отдела пищевода, измельчают и помещают на слайд, высушивают феном в течение  $\sim 20$  минут. Окрашивают предметные слайды флуоресцентным красителем для нуклеиновой кислоты, например пропидием йодида или Хехстом 33258 (Naaker с соавт., 1992). Инкубируют в темноте в течение 3 минут и просматривают в режиме эпифлуоресценции при  $\times 200$  увеличении. Бактериальные включения отличаются от ядра хозяина по размеру и частоте. Однако, если предметные стекла с образцами необходимо оставить для будущих исследований, их следует тщательно высушить и хранить высушенными до момента окрашивания.

Включения паразита, 14–56 мкм в диаметре, перемежаются с более мелкими ядрами хозяина. Изучение одного предметного стекла в течение 5 минут достаточно при  $\times 200$  увеличении (Moore с соавт., 2001a). Этот метод менее чувствителен, чем гистология, поэтому невозможно различить бактериальную морфологию. Лучше всего его применять как экспресс-метод внутри известного ареала болезни.

Эти тесты не были валидированы и не доступны для приобретения.

#### **4.3.1.1.3. Фиксированные срезы**

##### **4.3.1.1.3.1. Гистология**

Гистологическая процедура подробно описана в Главе 2.4.0 этого *Водного Руководства*. Удаляют раковину и делают несколько 3–5 мм поперечных срезов, содержащих задний отдел пищевода, пищеварительную железу и мышцу ноги. Поместить надрезанную ткань в растворы Дэвидсона или Карсона (см. Главу этого *Водного Руководства*) на 24 часа и подготовить для рутинной гистологии в парафине. С поперечными срезами легче всего работать, если их поместить в кассеты до проведения фиксации. Соотношение должно составлять не более одного объема ткани на десять объемов фиксирующего раствора.

Депарафинизированные 3–5 мкм срезы следует окрашивать гематоксилином и эозином и просматривать при помощи световой микроскопии на наличие бактериальных включений (продолговатые, базофильные внутрицитоплазматические вакуоли, 14–56 мкм в диаметре [Friedman с соавт., 2000]) в заднем отделе пищевода и пищеварительной железе и морфологических изменений в пищеварительной железе и ноге. Рекомендуется исследовать срезы при  $\times 200$  или  $\times 400$  увеличении.

*Xenohalotis californiensis* могут быть морфологически схожи с другими морскими риккетсиозными бактериями. У калифорнийских морских ушек обнаруживались до трех морфологически различных внутрицитоплазматических бактерий (Friedman с соавт., неопубликованные данные). Окончательный диагноз по бактериям может включать молекулярные способы (e.g. гибридизация *in-situ* [ISH]). Окончательный диагноз синдрома увядания с помощью гистологии должен включать обнаружение бактерии и морфологические изменения в пищеварительной железе, метаплазию и/или атрофию, и такие же признаки в мышце ноги.

При обнаружении отхода в географическом ареале синдрома увядания, визуализация внутриклеточных бактериальных очагов в эпителии пищеварительного тракта с помощью гистологического исследования, может считаться подтверждающим методом и считается золотым стандартом в отношении этой болезни. Однако подтверждение с помощью гистологии параллельно с ПЦР и секвенированием или ISH рекомендуется для определения вида риккетсиозных бактерий у морских ушек, которые прежде не были известны, как восприимчивые к бактерии или инфекции в новом географическом регионе.

Этот тест не был официально валидирован. Однако гистология считалась подтверждающим исследованием на наличие *X. californiensis*.

##### **4.3.1.1.3.2. Исследование с помощью трансмиссионной электронной микроскопии**

Процедуры трансмиссионной электронной микроскопии описаны в Главе 2.4.0 этого *Водного Руководства*. При этом исследовании просматриваются палочковидные прокариоты с большим количеством рибосом, имеющие трехслойные клеточные стенки, собирающиеся в межклеточные колонии внутри мембранно-связанных вакуолей в цитоплазме эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта. Диморфные, от палочковидных до круглых, бактерии имеют в среднем размеры  $332 \times 1550$  нм, если имеют форму бациллы, и в среднем 1405 нм при сферическом морфотипе. Бактерия репродуцируется внутри внутрицитоплазматических вакуолей, 14–56 мкм в диаметре (Friedman с соавт., 2000). Это исследование не было официально валидировано.

#### **4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя**

Размножение *X. californiensis* в культуре клеток (по причине отсутствия клеточных линий, полученных от морских моллюсков) и на искусственных средах до настоящего времени было unsuccessful.

#### **4.3.1.2.1. Культура клеток/искусственные среды**

Не разработаны.

#### **4.3.1.2.2. Методы обнаружения антигена на основе антител**

Не разработаны.

#### **4.3.1.2.3. Молекулярные методы**

##### **4.3.1.2.3.1. Полимеразная цепная реакция**

Положительная ПЦР амплификация дает только предположительный диагноз, так как выявляет ДНК, но не обязательно жизнеспособный патоген. Необходимо использовать другие методы, предпочтительно гистологию и ISH, для визуализации патогена. При использовании параллельно с гистологией, ПЦР можно использовать для подтверждения. Изучение амплифицированной последовательности рекомендуется при исследовании новых видов хозяев или случаев в новой географической зоне. Последовательности должны быть сопоставимы с известной 16S рДНК последовательностью этой бактерии (Номер доступа в GenBank AF133090; [Andree с соавт., 2000]).

Пробы для ПЦР должны отбираться от заднего отдела пищевода или пищеварительной железы и подготавливаться с помощью классического метода выделения фенолом-хлороформом или коммерческих тест-систем для выделения ДНК с возможностью удаления ингибиторов (напр. тест-системы для выделения ДНК из фекалий или почвы), которые присутствуют в пищеварительной железе морских ушек. Ткань заднего отдела пищевода рекомендована для использования, так как инфекции в этой области неизменно более сильные, чем в ткани пищеварительной железы. Положительная контрольная реакция должна всегда быть включена в ПЦР и должна состоять из геномного ДНК, экстрагированной от зараженной особи, или плазмиды, содержащей инсерцию в виде амплифицированного продукта. Если используют плазмиду в качестве положительного контроля, рекомендуется добавить ~100 п.о. инсерцию в клонированный фрагмент с целью снятия обеспокоенности в отношении перекрёстной контаминации аэрозолированной плазмидной ДНК. К тому же, в ситуациях, когда присутствует низкое количество копий целевой ДНК, эта плазида может вытеснить саму мишень. Отрицательный контроль, состоящий из мастер-микса без добавления матрицы, также должен быть включен в ПЦР. Все реакции должны прогоняться в двух повторностях. Обнаружение 160 п.о. полосы в пробах ткани и положительных контрольных реакциях является признаком успешного исследования. Чувствительность и специфичность этого теста находятся в процессе формальной оценки со стороны Референтной лаборатории МЭБ (Friedman с соавт., неопубликованные данные). Коммерческих тестов на данный момент не существует.

ПЦР праймеры, разработанные для выявления *X. californiensis*, специфично амплифицируют 160 п.о. сегмент *Риккетсия*-подобного патогена. На данный момент праймеры имеют следующие обозначения: RA 5–1 (5'-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3') и RA 3–6 (5'-ACT-TGG-ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA-3'). Они нацелены на малую субъединичную рибосомную ДНК и, как было продемонстрировано, чувствительны и специфичны к этому патогену (Andree с соавт., 2000). ПЦР амплификация проводится в стандартном 20 мкл

реакционном объеме, содержащем 1 × ПЦР буфер, 1,5 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 400 нг мл<sup>-1</sup> BSA, 200 мкмоль dNTPs, 0.5 мкмоль каждого праймера, 1,6 единиц Taq-полимеразы и 100 нг матричной ДНК. Реакционные смеси прогоняют в амплификаторе. Программа реакции амплификации следующая: предварительная денатурация при 95°C в течение 5 минут, 40 циклов при 95°C в течение 1 минуты, при 62°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 30 секунд и конечная элонгация при 72°C в течение 10 минут. Аликвота каждой ПЦР реакции проверяется в отношении 160 п.о. продукта амплификации с помощью электрофореза в агаровом геле и окрашивания этидием бромида.

Тест был валидирован при диагностической специфичности и чувствительности в 1.0 (Friedman *с соавт.*, неопубликованные данные). Не доступен для приобретения.

#### 4.3.1.2.3.2. Анализ последовательности

Анализ амплифицированной ДНК необходим для подтверждения идентичности последовательности с целевой бактерией (код доступа в GenBank AF133090). Анализ можно завершить стандартным клонированием и секвенированием множества клонов после проведения ПЦР амплификации исследуемой ДНК.

(ПРИМЕЧАНИЕ: рекомендуется проведение как прямого, так и обратного секвенирования.) Также можно использовать прямое секвенирование ПЦР продуктов.

#### 4.3.1.2.3.3. *In-situ* гибридизация

ISH это предпочтительный метод для подтверждения идентификации, так как он позволяет визуализировать гибридизацию специфичного зонда с целевым организмом. Однако ДНК зонды должны быть тщательно исследованы на предмет специфичности и валидированы в сравнительных исследованиях до того, как они могут быть использованы для подтверждающей идентификации.

ISH была разработана для выявления *Риккетсия*-подобных прокариотов в срезах ткани (Antonio *с соавт.*, 2000). Специфично меченые олигонуклеотидные зонды гибридизируются с малой субъединичной рибосомной РНК бактерии. Эта гибридизация обнаруживается с помощью конъюгата антител, который распознает меченые зонды. Добавляют субстрат для конъюгата антител, вызывая колориметрическую реакцию, что позволяет визуализировать гибридизацию зонда с ДНК паразита. Несмотря на то, что этот метод не был официально валидирован, анализы на специфичность с использованием некоторых риккетсиозных организмов двустворчатых моллюсков и рыб, указывают на то, что тест специфичен в отношении *X. californiensis* (Antonio *с соавт.*, 2000).

Процедура ISH проводится следующим образом. Положительные (известно инфицированные ткани) и отрицательные (неинфицированные и инфицированные различными бактериями) контроли должны быть включены в процедуру. Зонд синтезируют с помощью ПЦР, используя PCR DIG Probe Synthesis Kit. До использования DIG-меченого зонда, денатурируют зонд при 95°C в течение 3 минут и немедленно помещают на лед на ~30 минут с целью сепарации двуцепочечной ДНК. Хранят при -20°C или -80°C до использования. Последовательности зондов, обозначаемых как RA 5-1, RA 3-6, RA 3-8 и RA 5-6 (Antonio *с соавт.*, 2000) следующие: 5'-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3', 5'-ACT-TGG-ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA-3', 5'-CCA-CTG-TGA-GTG-GTT-ATC-TCC-TG-3', и 5'-GAA-GCA-ATA-TTG-TGA-GAT-AAA-GCA-3'.

1. После удаления раковины делают поперечный срез (3 -5 мм) таким образом, чтобы он содержал задний отдел пищевода, пищеварительную железу и мышцу ноги, и

помещают в фиксирующий AFA раствор Дэвидсона (глицерин [10%], формалин [20%], 95% этиловый спирт [30%], dH<sub>2</sub>O [30%], ледяная уксусная кислота [10%]) на 24–48 часов, затем переносят в 70% этанол до проведения гистологических процедур (этап ii). Пропорция должна быть не более одного объема ткани на 10 объемов фиксирующего раствора.

2. Образцы последовательно заливают в парафин с помощью классических гистологических процедур. Делают 5-6 мкм срезы и помещают на предметные стекла с положительно заряженной поверхностью или стекла, покрытые 3-аминопропил-триэтоксисилоном. Затем гистологические срезы оставляют сушиться на ночь в печи при 40°C.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** этап просушки можно пропустить при использовании предметных стекол с положительно заряженной поверхностью.

3. Срезы депарафинизируют путем погружения в ксилен или другой менее токсичный осветлитель на 10 минут. Растворитель удаляют последовательным погружением в две ванны с абсолютным спиртом на 10 минут каждая и регидратируют погружением в серию разведений спирта. Срезы затем дважды моют в течение 5 минут Трис буфером (pH 7.2; 0.2 М Tris/HCl, 2.0 ммоль CaCl).
4. Срезы обрабатывают протеиназой К, 50 мкг мл<sup>-1</sup> в Трис буфере при 37°C в течение 45 минут. Реакцию останавливают посредством трехкратного отмывания срезов ФБР в течение 10 минут для каждой из процедур.
5. Срезы предварительно гибридизируют в течение 10 минут – 1 часа при 37°C в буфере предварительной гибридизации (4 × SSC, 50% формамид).
6. Затем раствор для предварительной гибридизации смывают в 2× SSC и недолго просушивают до замены на буфер для предварительной гибридизации, содержащий диоксигенин-меченые зонды (1:373, зонд:буфер [о:о]). Срезы можно денатурировать\* поместив их на термостат при 100°C в течение 10 минут и затем закрывают пластиковыми покровными стёклами для ISH. Предметные стекла затем гибридизируют в течение ночи при 53°C в камере влажности. \*Этот этап можно пропустить при желании.
7. Аккуратно удаляют покровные стекла со срезов, погрузив предметные стекла на 5 – 10 минут в 2× SSC при комнатной температуре. Срезы моют дважды в течение 15 минут в 1 × SSC при 40°C, и один раз в течение 15 минут в 0.5 × SSC при 40°C. Срезы затем помещают в Буфер 1 (100 ммоль Tris/HCl, 10 ммоль NaCl, pH 7.5) на 10 минут.
8. Срезы помещают в Буфер 1 (см. этап vii), в который был добавлен 0,3% Triton X-100 и 2% овечья сыворотка, на один час при комнатной температуре (не позволять предметным слайдам высыхать).
9. Анти-диоксигениновый конъюгат антител с щелочной фосфатазой разбавляют 1:1000 (или в соответствии с рекомендациями производителя) в Буфере 1 с добавлением 0,3% Triton X-100 и 1% овечьей сыворотки и обрабатывают срезы тканей. Срезы покрывают покровными стёклами для ISH и инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре в камере влажности.

10. Предметные стекла промывают дважды в Буфере 1 в течение 10 минут для каждого этапа (см. этап vii) и дважды в Буфере 2 (100 ммоль Tris/HCl, 100 ммоль NaCl, 50 ммоль MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5) в течение 10 минут. Раствор для проявления цветной реакции (добавляют 45 мкл нитросинего тетразолия, 35 мкл 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат, р-толуидин соль [BCIP]) в 10 мл Буфера 2 на 30 минут – 1 час в камере влажности в темноте.
11. Затем предметные стекла ополаскивают трижды стерильной дистиллированной водой (dH<sub>2</sub>O). Срезы контрастно окрашивают Бисмарком коричневым Y в течение 3 минут, ополаскивают dH<sub>2</sub>O, затем 70% этиловым спиртом с последующим кратким ополаскиванием 100% спиртом до этапа просушки на воздухе и покрытия покровными стёклами с помощью заливочной среды. Присутствие патогена демонстрируется фиолетово-черным мечением клеток паразитов.

Этот тест не был официально валидирован и не доступен для приобретения.

#### 4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

До сегодняшнего дня не разработано.

### 5. 5. Рейтинг исследований на основании цели использования

Методы, доступные на данный момент для надзора, выявления и диагностики *X. californiensis* перечислены в Таблице 5.1. ниже. В таблице используются следующие обозначения: a = метод является рекомендуемым методом по причине доступности, практичности, диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = метод может применяться в некоторых ситуациях, но затраты, точность или другие факторы значительно ограничивают диапазон его применения; и d = метод на настоящий момент не рекомендуется для проведения в этих целях. Эти данные неким образом субъективны, так как пригодность включает в себя вопросы надежности, чувствительности, специфичности и практичности. Несмотря на то, что не все тесты, перечисленные как категория a или b, прошли формальные процедуры стандартизации и валидации, их рутинная природа и тот факт, что они широко использовались без получения сомнительных результатов, делает их пригодными для использования.

*Таблица 5.1. Методы целевого надзора, выявления и диагностики*

Метод	Целевой надзор			Предположительный диагноз	Подтверждающий диагноз
	Личинки	Молодь	Взрослые		
<b>Макроскопические признаки</b>	d	c	c	c	d
<b>Биопроба</b>	d	d	c	c	c(a) <sup>a</sup>
<b>Отпечатки ткани – окрашивание по Гимза</b>	d	c	c	b	b(c) <sup>b</sup>
<b>Гистопатология</b>	d	b	b	a	a <sup>c</sup>
<b>ТЭМ</b>	d	d	d	b	c
<b>In-situ ДНК зонды</b>	d	c	c	a	a

ПЦР	d	a	a	a	c(a) <sup>d</sup>
SSU рДНК секвенирование	d	d	d	a	a

a. Для ценной маточной популяции возможно использовать полимеразную цепную реакцию (ПЦР) на образцах фекалий в качестве первого скрининг-теста, при отрицательных результатах, можно в последствии использовать биопробу в комбинации с гистологией (см Раздел 6).

b. Отпечатки ткани используют в комбинации с ПЦР и возможным секвенированием для подтверждения возбудителя.

c. В новых случаях, таких как новый географический регион, ПЦР и секвенирование рекомендуются для подтверждения вида бактерии.

d. ПЦР сама по себе не является подтверждающим анализом, но при применении в комбинации с гистологией ее можно считать подтверждающим тестом. ТЭМ = трансмиссионная электронная микроскопия; SSU рДНК = малая субъединичная рибосомная ДНК.

## **6. Тесты, рекомендуемые для целевого надзора с целью объявления свободы от инфекции *Xenohaliotis californiensis***

Метод для целевого надзора с целью объявления свободы от *X. californiensis* это гистология в комбинации с ПЦР и анализом последовательности либо с помощью ISH. Учитывая хронический характер заболевания и влияние температуры, на каждой производственной площадке рекомендуется исследовать животных в инкубаторах и выростных прудах в течение теплого сезона. Морские ушки, содержащиеся в более холодных водах, могут быть хронически инфицированы без демонстрации каких-либо признаков заболевания. Также рекомендуется ПЦР исследование образцов фекалий или биопроба с более мелкими морскими ушками (напр. 1- 4 см), живущими среди маточного поголовья в течение не менее 6 недель при >17°C.

## **7. Подтверждающие диагностические критерии**

В соответствии с *Водным кодексом* все случаи у других видов должны быть немедленно отправлены в Референтную лабораторию МЭБ для подтверждения, неважно связаны ли с этим случаем клинические признаки или нет.

### **7.1. Определение случая подозрения**

Случай подозрения на инфекцию *X. californiensis* и ассоциированное с ней клиническое заболевание (синдром увядания) могут включать макроскопические клинические признаки (слабость, вялость, отказ от приема пищи, атрофия pedalной мышцы и пятнистость пищеварительной железы) и смертность в совокупности с тепловодными условиями, в частности внутри известного географического ареала этого заболевания. У аквакультурных морских ушек отказ от пищи может быть первым признаком болезни. Эти клинические признаки в комбинации с обнаружением атрофии мышцы ноги при микроскопии, телец включения в эпителии желудочно-кишечного тракта или ПЦР результаты (без подтверждения секвенированием) также представляют собой случай подозрения.

### **7.2. Определение подтвержденного случая**



Подтверждение инфекции *X. californiensis* зависит от обнаружения возбудителя при гистологии и ПЦР в совокупности с секвенированием, или ISH. Макроскопические признаки и отпечатки ткани сами по себе не могут использоваться для подтверждающей диагностики и должны дополняться гистологией, ISH или ПЦР с секвенированием.

Подтверждение синдрома увядания зависит как от наличия возбудителя, так и от наличия микроскопических признаков болезни. Как минимум метаплазия или дистрофия пищеварительной железы, наблюдаемые при гистологическом исследовании, должны сопровождать инфекцию *X. californiensis* для диагностирования клинического синдрома увядания.

## 8. Список литературы

ANDREE K.B., FRIEDMAN C.S., MOORE J.D. & HEDRICK R.P. (2000). A polymerase chain reaction for detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with Withering Syndrome in Black Abalone (*Haliotis cracherodii*). *J. Shellfish Res.*, **19**, 213–218

ANTONIO D.B., ANDREE K.B., MOORE J.D., FRIEDMAN C.S. & HEDRICK R.P. (2000). Detection of Rickettsiales-like prokaryotes (RLPs) by *in situ* hybridization in black abalone *Haliotis cracherodii* with withering syndrome. *J. Invertebr. Pathol.*, **75**, 180–182

BALSEIRO P., ARANGUREN R., GESTAL C., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2006). *Candidatus Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture*, **258**, 63–72

BRAID B.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., HEDRICK R.P., TJEERDEMA R.S. & FRIEDMAN C.S. (2005). Health and survival of red abalone, *Haliotis rufescens*, under varying temperature, food supply and exposure to the agent of withering syndrome. *J. Invertebr. Pathol.*, **89**, 219–231

DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P.J., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C., RIKIHISA Y. & RURANGIRWA F.R. (2001). Reorganization of general in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. System. Evol. Microbiol.*, **51**, 2145–2165

FRIEDMAN C.S., ANDREE K.B., BEAUCHAMP K.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2000). “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*” a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 847–855

FRIEDMAN C.S., BIGGS W., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2002). Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *J. Shellfish Res.*, **21** (2), 817–824

FRIEDMAN C.S. & FINLEY C.A. (2003). Evidence for an anthropogenic introduction of “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*”, the etiological agent of withering syndrome, into northern California abalone populations via conservation efforts. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **60**, 1424–1431

FRIEDMAN C.S., SCOTT B.B., STRENGE R.E. & MCCORMICK T.B. (2007). Oxytetracycline as a tool to manage and prevent losses of the endangered white abalone, *Haliotis sorenseni*, due to withering syndrome. *J. Shellfish Res.*, **26** (3), 877–885

FRIEDMAN C.S., THOMSON M., CHUN C., HAAKER P.L. & HEDRICK R.P. (1997). Withering syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *J. Shellfish Res.*, **16**, 403–411

- FRIEDMAN C.S., TREVELYAN G., MULDER E.P. & FIELDS R. (2003). Development of an oral administration of oxytetracycline to control losses due to withering syndrome in cultured red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*, **224** (1–4), 1–23
- GARDNER G.R., HARSHBARGER J.C., LAKE J., SAWYER T.K., PRICE K.L., STEPHENSON M.D., HAAKER P.L. & TOGSTAD H.A. (1995). Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *J. Invertebr. Pathol.*, **66**, 111–120
- HAAKER P.L., PARKER D.O., TOGSTAD H., RICHARDS D.V., DAVIS G.E. & FRIEDMAN C.S. (1992). Mass mortality and withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*, in California. *In: Abalone of the World.*, Shepard S.A., Tegner M.J. & Guzman del Proo S.A., eds, Blackwell Scientific, Oxford, UK, 214–224
- KISMOHANDAKA G., ROBERTS W., HEDRICK R.P. & FRIEDMAN C.S. (1995). Physiological alterations of the black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach, with withering syndrome. *J. Shellfish Res.*, **14** (1), 269–270
- MOORE J.D., CHERR G.N. & FRIEDMAN C.S. (2001a). Detection of “*CandidatusXenohaliotis californiensis*” (Rickettsiales-like prokaryote) inclusions in tissue squashes of abalone (*Haliotis* spp.) gastrointestinal epithelium using a nucleic acid fluorochrome. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 147–152
- MOORE J.D., JUHASZ C.I., ROBBINS T.T. & VILCHIS I. (2009). Green abalone, *Haliotis fulgens*, infected with the agent of withering syndrome do not express disease signs under a temperature regime permissive for red abalone, *Haliotis rufescens*. *Marine Biol.*, **156**, 2325–2330
- MOORE J.D., MARSHMAN B.C. & CHUN C.C. (2011). Health and survival of red abalone *Haliotis rufescens* from San Miguel Island, California, USA, in a laboratory simulation of La Niña and El Niño conditions. *J. Aquat. Anim. Health*, **23** (2), 78–84
- MOORE J.D., ROBBINS T.T. & FRIEDMAN C.S. (2000). Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with a gastrointestinal rickettsia-like prokaryote. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 26–34
- MOORE J.D., ROBBINS T.T., HEDRICK R.P. & FRIEDMAN C.S. (2001b). Transmission of the Rickettsiales-like prokaryote “*CandidatusXenohaliotis californiensis*” and its role in withering syndrome of California abalone *Haliotis* spp. *J. Shellfish Res.*, **20** (2), 867–874
- RAIMONDI P.T., WILSON C.M., AMBROSE R.F., ENGLE J.M. & MINCHINTON T.E. (2002). Continued declines of black abalone along the coast of California: Are mass mortalities related to El Niño events? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **242**, 143–152
- ROSENBLUM E.S., JUHASZ C., FRIEDMAN C.S., ROBBINS T.T., CRAIGMILL A., TJEERDEMA R.S. & MOORE J.D. (2008). Oxytetracycline as a treatment for abalone withering syndrome. Part II: Efficacy, pharmacokinetics, and long term resistance to re-infection at elevated sea water temperatures. *Aquaculture*, **277** (3–4), 138–148
- STEINBECK J.R., GROFF J.M., FRIEDMAN C.S., MCDOWELL T. & HEDRICK R.P. (1992). Investigations into mortality among populations of the California black abalone, *Haliotis cracherodii*, on the central coast of California, USA. *In: Abalone of the World.*, Shepard S.A., Tegner M.J. & Guzman del Proo S.A., eds. Blackwell Scientific, Oxford, UK, 203–213
- TINAJERO M.D.C.A., CACERES-MARTINEZ J. & AVILES J.G.G. (2002). Histopathological evaluation of the yellow abalone *Haliotis corrugata* and the blue abalone *Haliotis fulgens* from Baja California, Mexico. *J. Shellfish Res.*, **21** (2), 825–830

VAN BLARICOM G.R., FRIEDMAN C.S. & NEUMAN M.J. (2011). Dynamics of endangered black abalone populations at San Nicolas Island, Naval Base Ventura County, California. *Nat. Selections (US Department of Defense, Legacy Natural Resource Management Program)*, (in press).

VAN BLARICOM G.R., RUEDIGER J.L., FRIEDMAN C.S., WOODARD D.D. & HEDRICK R.P. (1993). Discovery withering syndrome among black abalone populations at San Nicolas Island, California. *J. Shellfish Res.*, **12** (2), 185–188

WETCHATENG T. (2008). *Rickettsia*-like organism (RLO) infection in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*: Histopathology, diagnosis and treatment. , PhD. Dissertation, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 49 pp

WETCHATENG T., FRIEDMAN C.S., WIGHT N.A., LEE P.Y., TENG P.H., SRIURAIRATTANA S., WONGPRASERT K. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2010). Withering syndrome in abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Dis. Aquat. Org.*, **90** (1), 69–76

\*

\* \*

**NB:** В настоящее время нет справочной лаборатории МЭБ по инфицированию *Xenohaliotis californiensis*.

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

- 
1. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США - Центр ветеринарной медицины.
  2. .