



Мальцев В.Н., зав. сектором ихтиопатологии, кандидат биологических наук

Отдел «Керченский» Азово-Черноморского филиала ФГБНУ «ВНИРО», ул. Свердлова, 2, г. Керчь, 298300, Россия, E-mail: maltsev66@mail.ru



Рис. 1. Цилиндрические касетные пластиковые садки, в которых выращиваются тихоокеанские устрицы в Черном море (морская ферма АО «Морской клуб», п. Большой Утрищ, Краснодарский край) (скриншот из фильма «Устрицы и мидии Большого Утрища», YouTube)

Недавно перкинсозы были отнесены к основным болезням тихоокеанских устриц при их культивировании [Mercer, Gennari, Lovatelli, 2024]. Средиземноморская мидия пока не числится среди восприимчивых к этой болезни более 20-ти видов двустворчатых моллюсков, при этом в Средиземном море у нее обнаружен другой опасный перкинсон, вызываемый *Polteni*. Среди восприимчивых к *P. marinus* хозяев указаны моллюски, которые обитают в Азовском и Черном морях, а именно, кроме тихоокеанских устриц, песчаная мидия (*Mya arenaria*), сибирская мидия (*Mytilus edulis*), а также модиолусы *Modiolus* spp. *P. marinus* не обладает строгой специфичностью к хозяевам, и может неизбежно заражать разных моллюсков в неблагополучных (зараженных) акваториях. Точными данными обо всех хозяевах *P. marinus* наука пока не располагает [Carnegie, Arzul, Bushek, 2016]. Своевременная диагностика этой болезни в Азово-Черноморском бассейне особенно актуальна сейчас, в связи с возросшей активностью морских фермеров, выращивающих мидий и устриц, которая сопряжена с рисками случайного заноса и распространения в этом регионе опасных болезней моллюсков. Исследования выполнены по заказу Федерального агентства по рыболовству РФ; государственное задание № 076-00001-24-00; «Проведение прикладных научных исследований», тема 31 (2024 г.).

Материал и методы. Научную литературу собирали с использованием реферативных баз данных Scopus и Pro Quest, а также полнотекстовых источников информации на сайтах Google Академия, ScienceDirect, Wiley Online Library, Springer, к которым сотрудники ФГБНУ «ВНИРО» и его филиалов имели доступ в рамках национальной подписки. В работе использованы 123 источника, из которых на русском языке – 26 (21,1%), на иностранных языках – 97 (78,9%); монографий и диссертаций – 21; научных статей – 72; нормативных документов – 11; электронных баз данных – 6, других источников (сайты, брошюры) – 13). Из них 64 работы (52,0%) опубликовано в течение последних 10 лет. Проанализированные информационные материалы позволили оценить эпизоотическую опасность перкинсозов, в том числе для культивируемых в Азовском и Черном морях двустворчатых моллюсков, а также детализировать методы клинической и лабораторной диагностики перкинсоза, вызываемого *P. marinus*. За основу взяты стандарты Международного эпизоотического бюро (МЭБ) [OIE – Aquatic Animal ..., 2024; OIE – Manual of Diagnostic Tests ..., 2024], характеризующие общепризнанные методы диагностики перкинсозов, которые дополнены сведениями из других научных публикаций. Апробированы клинические, патологоанатомические и гистологические методы диагностики перкинсозов тихоокеанских устриц, выращиваемых на морских фермах Кавказа (районы г. Анапы, п. Джубга, п. Дивноморское) и Крыма (озеро Донузлав, п. Новоозерное, п. Ласпи) (материал собран в 2019-2020 гг). Моллюсков исследовали с использованием микроскопа Микмед-6, укомплектованного цифровой камерой TourCam (5 Мп), окуляр-микрометром, программой обработки микроскопических изображений Tour View 3.7, а также с помощью бинокля ST-6BT или МСП-2. Применялись методы неполных паразитологических вскрытий моллюсков, клинической и патологоанатомической оценки состояния их здоровья, рекомендованные в нормативных и научных руководствах [МУК 3.2.988-00, Шкорбатов, Старобогатов, 1990; Asia Diagnostic Guide..., 2001; OIE – Manual of Diagnostic Tests ..., 2024].



Рис. 3. Пластиковые мешки со створками погибших устриц. Эти биологические отходы образовались после массовой гибели устриц в одном из морских хозяйств оз. Донузлав в мае-июне 2018 г. Кумулятивная смертность молоди тогда достигала 75-90 %, а такая же смертность подращиваемых и товарных устриц – 30-40 % [Мальцев, 2019]

Результаты. Перкинсон, вызываемый *P. marinus*, способен вызывать длительную деградацию устричной индустрии в неблагополучных (зараженных) акваториях. В настоящее время болезнь имеет ограниченное географическое распространение (преимущественно восточное побережье США и Мексики), но демонстрирует тенденцию к проникновению в новые регионы (тихоокеанское побережье Америки, Китай, Корея, Бразилия, Испания и др.) в связи с увеличением объемов международной торговли моллюсками и потеплением климата. Контроль над перкинсомом, вызываемым *P. marinus*, законодательно закреплен в официальных документах МЭБ (= Всемирная организация по охране здоровья животных), Европейского союза (ЕС), США, Канады, Австралии, Новой Зеландии, Кореи, Индии и других стран. В России эпизоотический надзор над *P. marinus* регламентирован отечественным законодательством [Приказ Министерства сельского хозяйства РФ от 14 декабря 2015 года № 635, электронный ресурс], однако ветеринарные инструкции по его диагностике пока не утверждены; поэтому государственный контроль над этой болезнью в стране системно не проводится. На территории (акваториях) России, в том числе в Азовском и Черном морях, *P. marinus* лабораторно и достоверно не выявлялся. В международной практике предварительный диагноз на перкинсон, вызываемый *P. marinus*, ставят на основании обнаружения у моллюсков совокупности эпизоотических, клинических и патолого-анатомических признаков этой болезни. Кратко, клиническими признаками перкинсоза устриц являются хроническая массовая гибель взрослых моллюсков; при этом у мертвых и умирающих створки приоткрыты; они медленно закрываются при постукивании по раковине; мягкое тело больных моллюсков бледное, истощенное и (или) водянистое. Клинические признаки заражения моллюсков *P. marinus* не являются специфичными для данного заболевания, поэтому требуют дифференциальной и подтверждающей лабораторной диагностики.

Актуальность. С 2010-х годов в акватории Черного моря активно развивается промышленное выращивание тихоокеанских устриц *Crassostrea gigas* (= *Magallana gigas*) (рис. 1). Основными районами их культивирования является побережье Кавказа (от г. Анапы до г. Сочи), южный берег Крыма (п. Ласпи, п. Качивели), а также запад Крыма (озеро Донузлав и прилегающая к нему морская акватория). В настоящее время в Крыму и на Кавказе функционирует до 20-ти устричных (мидийно-устричных) хозяйств (ферм), которые, согласно официальным статистическим данным, в 2019 г. вырастили более 2 тыс. т товарных устриц (эти цифры вызывают у нас сомнение). В 2020 г. было произведено 831 т устриц, что в 3 раз меньше, чем в 2019 г., а в 2021-2022 гг - около 330 т (в 6-7 раз меньше) (рис. 2). Обозначилась нарастающая тенденция по сокращению производства устриц на юге России. Во многих морских хозяйствах Кавказа и Крыма регистрируются случаи повышенной (сверхнормативной) смертности молоди и товарных устриц (рис. 3), что существенно снижает производительность и рентабельность морских ферм. Мировая практика показывает значительное сдерживающее влияние болезней на мидийно-устричную индустрию. Известны случаи массового заболевания американской (*C. virginica*), тихоокеанской и других устриц перкинсомом, вызываемым *Perkinsus marinus*, спровоцированные стрессовыми факторами внешней среды.

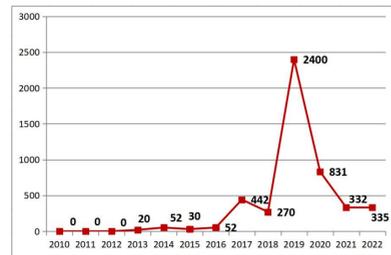


Рис. 2. Объемы товарного выращивания тихоокеанских устриц в Черном море (Кавказ, Крым) с 2010 по 2022 гг., тонны [Статистические сведения по рыбной ..., 2023 и др.]

ДИАГНОСТИКА ПЕРКИНСОЗА ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ, ВЫЗЫВАЕМОГО *PERKINSUS MARINUS*

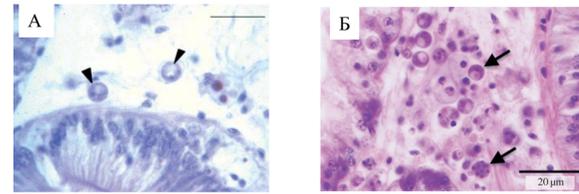


Рис. 4. Гистологические препараты (фиксированные срезы) из тканей американской устрицы, зараженной *P. marinus* (А, Б). Стрелки указывают на единичные зрелые трофозонты паразита диаметром 7-8 мкм, имеющие крупную вакуоль и ассиметрично расположенное ядро. На фото Б нижняя стрелка указывает на томит *P. marinus*, состоящий из незрелых трофозонтов. Масштабная линейка 20 мкм, окраска гематоксилин-эозином [Asia Diagnostic Guide..., 2001; Carnegie, Arzul, Bushek, 2016]

Проведенные нами пробные светооптические тестирования свежих и окрашенных мазков или отпечатков органов (жабр, пищеварительной железы, мускула-замыкателя) устриц (обследовано около 50 экз. моллюсков), выращиваемых в Крыму и на Кавказе, показали присутствие на некоторых гистологических препаратах клеток, морфологически напоминающих трофозонтов рода *Perkinsus*. Интенсивность инвазии ими была невысокой; у большинства зараженных моллюсков мы не наблюдали признаков истощения, что может свидетельствовать о неостром течении болезни. Этот наш предварительный диагноз пока не подтвержден молекулярными тестированиями; необходимы дополнительные исследования.

Сущность культурального метода диагностики перкинсозов состоит в создании искусственных условий на специальных средах для роста паразита вне организма хозяина. В настоящее время используются две модификации этого метода, а именно метод Рэя по культивированию на жидкой тиогликолевой среде (RFTM-метод) (рис. 5) и метод использования целого тела моллюсков. Оба они имеют низкую специфичность; то есть выделяют не только *P. marinus*, но и других представителей рода *Perkinsus*. Экспериментально подтверждена очень высокая чувствительность обоих методов культивирования; она такова, что позволяет обнаружить одну клетку паразита в теле хозяина. Эти методы рекомендованы для постановки предварительных диагнозов как при тестировании клинически больных, так и клинически здоровых моллюсков, в том числе для эпизоотического мониторинга в популяциях молоди и взрослых моллюсков [OIE – Manual of Diagnostic Tests ..., 2024]. Недостатками является то, что в тестируемых пробах может увеличиваться количество гингоспор не только *Perkinsus* spp., но и других организмов, таких как *Pseudoperkinsus tapetis* (Mesomycetozoa). Культуральные тестирования мы не выполняли.

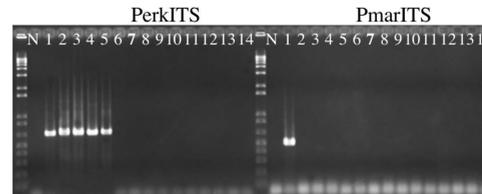


Рис. 6. Результаты тестирований (продукты электрофореза) ДНК, выделенной от разных видов рода *Perkinsus* и динофлагеллят методом классической ПЦР. Слева - использованы родоспецифичные праймеры PerkITS; справа - видоспецифичные праймеры PmarITS; N - отрицательный контроль; 1 - *P. marinus*, 2 - *P. chesapeakei*, 3 - *P. andrewsi*, 4 - *P. poleni*, 5 - *P. mediterraneus*, 6-14 - разные виды динофлагеллят, а именно 6 - *H. perezi*, 7 - *A. ocellatum*, 8 - *P. piscicida*, 9 - *P. schumwayae*, 10 - *A. carterae*, 11 - *C. cohnii*, 12 - *K. micrum*, 13 - *P. foliaceum*, 14 - *P. micans*. Видно, что родоспецифичные праймеры PerkITS идентифицировали лишь разные виды *Perkinsus*, и не реагировали с ДНК динофлагеллят. Видоспецифичные праймеры PmarITS обнаружили лишь ПЦР-продукты *P. marinus* молекулярной массой 509 п.н. [Audemard, Reece, Burtson, 2004]

Для диагностики перкинсозов **методами специфической гибридизации in-situ** разработаны специфические ДНК-зонды, нацеленные на ген малой субъединицы (SSU), позволяющие идентифицировать представителей рода *Perkinsus* (родовой уровень диагностики; зонд Perksp700DIG), а также нацеленные на ген большой субъединицы (LSU), обнаруживающие *P. marinus* (видовая диагностика; зонд PmarLSU-181DIG) (рис. 7). Оба целевых гена входят в комплекс рРНК. Гибридизация (связывание) происходит не только с генами рРНК в ядрах клеток, но и с их многочисленными цитоплазматическими транскриптами. В отношении перкинсозов эти методы обладают очень высокой чувствительностью и специфичностью. Они пригодны для постановки как предварительных, так и окончательных диагнозов; могут применяться для исследований клинически больных, а также здоровых моллюсков при осуществлении программ эпизоотического мониторинга. Их недостатками является повышенная трудоемкость и медленность тестирований. Для лабораторной диагностики перкинсоза, вызываемого *P. marinus*, рекомендуется, как и в случае ПЦР, в начале выполнить тестирование представителей рода *Perkinsus* (родовая диагностика), а затем, в том случае, если получен положительный результат, провести дополнительное тестирование в отношении *P. marinus* (видовая диагностика). Видовая диагностика *P. marinus*, без родовой, применяется для подтверждения предварительных положительных диагнозов, полученных гистологическими и культуральными методами [OIE – Manual of Diagnostic Tests ..., 2024]. Этот метод мы не апробировали.

Заключение. Перкинсон, вызываемый *P. marinus*, потенциально опасен для культивируемых и диких моллюсков (устриц, мидий, мий, модиолусов) Азовского и Черного морей. Болезнь способна нанести значительные ущербы черноморской устричной индустрии, основанной на выращивании тихоокеанских устриц, а также местным морским экосистемам. Обобщенные нами данные о клинической и лабораторной диагностике этого заболевания предназначены для уточнения эпизоотической ситуации по перкинсомам в Азовском и Черном морях. Они могут быть применены для утверждения ветеринарных инструкций по контролю перкинсозов в РФ. Своевременная и точная диагностика перкинсозов позволит сократить риски их возможных вспышек, уменьшить потери, обеспечит условия для стабильной продуктивной работы устричных хозяйств в Черном море и устойчивости его экосистем.

Гистологический метод рекомендован для дифференциальной диагностики перкинсоза от других протозойных, бактериальных и вирусных болезней. Он считается наиболее информативным и не дорогим, более подходящим (лучше работающим) при тестировании клинически больных моллюсков; он также пригоден для осуществления программ эпизоотического мониторинга. Положительной его чертой является то, что сразу несколько органов и тканей моллюсков могут быть протестированы на перкинсозы; гистология позволяет обнаружить в том числе скрытую (субклиническую) инвазию. Этот метод выявляет тканевое (органо) расположение паразитов, их патогенное воздействие и защитные реакции хозяина [Dungan, Reece, 2020]. В отношении перкинсоза, вызываемого *P. marinus*, применяют стандартный гистологический метод фиксированных срезов (тканей) моллюсков (окраска гематоксилин-эозином) (рис. 4), а также метод окрашенных мазков гемолимфы моллюсков (окраска гематологическим красителем). Оба они имеют низкую специфичность (выявляют паразитов на уровне рода), поэтому используются в основном для предварительной диагностики, для мониторинга (скрининга), и не рекомендованы в качестве подтверждающих тестов [OIE – Manual of Diagnostic Tests ..., 2024]. Гистологический метод не позволяет определить перкинсозов на уровне вида.

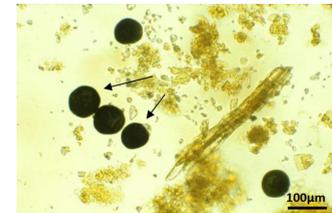


Рис. 5. Временный препарат из мацерированной ткани моллюска после инкубирования ее на тиогликолевой среде и окрашивания раствором Люголя (метод Рэя), на котором видны темно окрашенные увеличенные гингоспоры *P. marinus*. Масштабная линейка 100 мкм [Sunila, 2008; Dungan, Reece, 2020]

Методы традиционной (классической) ПЦР для диагностики перкинсозов основаны на изучении нуклеотидных вариаций ITS-региона, относящегося к генному комплексу рРНК. Разработаны ПЦР-тесты для обнаружения представителей рода *Perkinsus* (родовая диагностика; праймеры PerkITS-85 и PerkITS-750) и идентификацию *P. marinus* (видовая диагностика; праймеры PmarITS-70F и PmarITS600R) (рис. 6). Рекомендуется последовательное родовое, а затем, при положительном результате, видовое тестирование образцов; это увеличивает надежность получаемых результатов. Видовая ПЦР диагностика *P. marinus*, без родовой, применяется для подтверждения положительных диагнозов, полученных гистологическими и культуральными методами. Методы традиционной ПЦР в отношении перкинсоза устриц обладают высокой специфичностью и чувствительностью, сопоставимой с таковой культурального метода. Они рекомендованы для постановки как предварительных, так и окончательных диагнозов, а также пригодны для осуществления программ эпизоотического мониторинга. Недостатком является то, что такие тесты очень специфичны и позволяют выявлять только те патогены, на которые они нацелены, например, не обнаруживая в пробах близкородственных перкинсозов [Carnegie, Arzul, Bushek, 2016]. Их недостатком является также то, что тестируются небольшие участки (объемы) тканей моллюсков, что может приводить к ложно отрицательным результатам при низкой интенсивности инвазии. ПЦР тестированиями мы не апробировали.

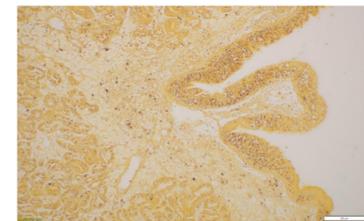


Рис. 7. Гистологический срез кишечника американской устрицы *Crassostrea virginica*, инвазированной *P. marinus*, который обработан по методу in-situ гибридизации с применением ДНК-зонда PmarLSU-181DIG. ДНК паразита, расположенные в кишечном эпителии и соединительной ткани, окрашены в темно-синий-фиолетовый цвет. Масштабная линейка 200 мкм [EURL for Molluscs Diseases ..., electronic resource]