

BOLESTI I TOKSINI ŠKOLJAKA REGULIRANI ZAKONOM

N. Topić Popović, E. Teskeredžić

Sažetak

U Hrvatskoj postoji duga tradicija uzgoja školjaka, uz perspektivu daljnjeg razvoja školjkarstva. Budući da su školjke osjetljivi organizmi koji zahtijevaju posebne uvjete uzgoja i klime, podložne su i mnogim bolestima. Bonamiozu, haplosporidiozu, marteiliozu, mikrocitozu i perkinsozu navodi Međunarodni ured za epizootije kao bolesti školjaka koje se prijavljuju po zakonu, a iridovirozu kao bolest od potencijalnog međunarodnog značenja. Iste su bolesti Zakonom o veterinarstvu iz godine 1997. regulirane kao zarazne bolesti školjaka čije je sprečavanje i suzbijanje od interesa za Republiku Hrvatsku. Iako se ne suzbija po zakonu, u tekstu je ovoga članka, zbog svoje važnosti, opisana i *Mytilicola* bolest. Prema Pravilniku Ministarstva zdravstva iz godine 1994., jestivi dio školjaka pretražuje se na toksine nekih morskih dinoflagelata, koji mogu biti štetni za ljudsko zdravlje, a to su PSP (Paralytic Shellfish Poison), DSP (Diarrhoeic Shellfish Poison) i NSP (Neuroparalytic Shellfish Poison).

Ključne riječi: školjke, bonamioza, marteilioza, haplosporidioza, mikrocitoza, perkinsoza, iridoviroza, toksini

UVOD

U Jadranu živi velik broj školjaka, no vrstama *Mytilus galloprovincialis* (dagnja) i *Ostrea edulis* (kamenica) posvećuje se pozornost u povećanoj stimulaciji uzgoja. Na našem primorju postoje vrlo povoljni uvjeti za život i uzgoj kamenica i njihovo množenje. Najpoznatija su uzgajališta kamenica u Lirskom kanalu, Pulskom i Malostonskom zaljevu i uvali Klimno na Krku (Milišić, 1991). Dagnja je najrasprostranjenija jadranska školjka, živi u uzobalnoj kamenoj zoni duž cijele obale i otoka Jadranskog mora, a osobito

Mr. sc. Natalija Topić Popović, dr. sc. Emin Teskeredžić, Institut »Ruder Bošković«, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za istraživanje i razvoj akvakulture, Bijenička 54, Zagreb, Hrvatska

gusto u novigradskom moru, Šibenskom, Malostonskom i Pulskom zaljevu (Milišić, 1991). Uzgajališta se podižu u blizini slatke vode i na područjima zaštićenim od mlataranja mora (Marguš i Teskeredžić, 1983). Uzgajane su školjke podložne klimatskim promjenama i mnogim bolestima (Malnar i sur., 1990). Njihov metabolizam i način hranjenja filtriranjem vode pogoduje nakupljanju bakterija, virusa, nametnika, toksina, fitoplanktona, otrova, kovina i drugih tvari iz vode u organizmu školjaka, čime postaju opasne i za ljude. Stoga je presudno važno uzgajati školjke u vodama koje nisu onečišćene.

Zakon o veterinarstvu iz godine 1997. (Narodne novine (N. N.) br. 70), u poglavlju o zaštiti životinja od zaraznih bolesti, kao zarazne bolesti školjaka čije je sprečavanje i suzbijanje od interesa za Republiku Hrvatsku navodi bonamiozu, marteiliozu, haplosporidiozu, mikrocitozu, perkinsozu i iridovirozu. Iste su bolesti opisane i u Priručniku Međunarodnog ureda za epizootije (OIE) iz 1997., a njihovo je prijavljivanje u OIE obvezno. Iako se ne suzbija po zakonu, zbog promjena koje izaziva na invadiranim školjkama, u tekstu ovog rada opisana je i *Mytilicola* bolest.

U Pravilniku o količinama pesticida, toksina, mikotoksina, metala i histamina i sličnih tvari koje se mogu nalaziti u namirnicama (N. N., br. 46/94), zabilježena su tri metabolička produkta nekih morskih dinoflagelata kojima se školjke hrane i koja se bez vidljivih promjena za školjke mogu nakupljati u njima, a opasna su za ljudsko zdravlje nakon konzumacije. To su PSP (Paralytic Shellfish Poison), DSP (Diarrhoeic Shellfish Poison) i NSP (Neuroparalytic Shellfish Poison), opisani u poglavlju o toksinima školjaka.

Broj je bolesti i toksina školjaka koje se otkrivaju i sprečavaju po zakonu povelik. Na žalost, zakonske mjere u tom su pogledu manjkave i ne nalaze se u jednom dokumentu. Trebalo bi stoga na jednome mjestu opisati sve bolesti i toksine školjaka koje su od važnosti za Republiku Hrvatsku, način njihove dijagnostike, točne mjere suzbijanja i liječenja, definirati uvjete pod kojima se školjke iz zaraženih uzgajališta mogu izvoziti i plasirati za ljudsku prehranu. Trebalo bi propisati koliko puta godišnje i na koji se način trebaju kontrolirati uzgajališta školjaka, i u istom propisu odrediti na koji način, gdje i kada će se provoditi ostale pretrage školjaka koje uključuju sanitarnu kontrolu na sadržaj bakterija i virusa u školjkama, te određivanje metala i drugih tvari koje se u školjkama mogu nakupiti, a potencijalno su opasne za ljudsko zdravlje.

BONAMIOZA

Bonamioza (bonamijaza) bolest je kamenica (*Ostrea edulis*): prvi je put opisana u Bretanji u Francuskoj godine 1979. (Kinne, 1983; Montes i sur., 1994). U posljednja dva desetljeća ta bolest dovodi do velikih mortaliteta uzgajanih kamenica u gotovo čitavoj Europi, Sjevernoj Americi, Australiji i Novom Zelandu (Elston i sur., 1966; Tendel, 1989; Van Banning, 1991a;

Hervio i sur., 1991; Hudson i Hill, 1991; Hine i Jones, 1994; Montes i sur., 1994).

Uzročnici su protozoe *Bonamia* sp. i *Bonamia ostreae*, haplosporidija iz koljena *Ascetospora* (Kinne, 1983; Zabaleta i Barber, 1995). Nije opasna za ljude, ali za kamenice je fatalna (Bannister, 1982; Bannister i Key, 1982). *Bonamia* se smješta u citoplazmu hemocita, te dovodi do ulceracije škrge i raspadanja vezivnoga tkiva, uz masovnu infiltraciju hemocita. Osim hemocitne, životni ciklus ovog nametnika uključuje i intraepitelnu fazu proliferacije binarnom fizijom i uništenje stanica (Hine i Wesley, 1994; Montes i sur., 1994). Ponekad je moguće uočiti lezije na epitelu probavnog divertikula, gonadama i u bubregu kamenica (Hine, 1991; Zabaleta i Barberi, 1995). Teško zaražene kamenice karakteristično su žute boje (Kinne, 1983).

Nazočnost *B. ostreae* umjerena je do niska (5 do 10%) u naoko zdravim kamenicama, ali je uvijek veća od 70% u ugibajućim ili uginulim (Robert i sur., 1991). U terminalnoj fazi bolesti nametnik se eksplozivno umnaža (Kinne, 1983). Zbog njegove jake mitotičke aktivnosti u školjkama, bolest se širi izuzetno brzo (Hine, 1990; Van Banning, 1991; Montes i sur., 1993). Bolest je najintenzivnija između veljače i kolovoza (Hine, 1991; 1992). Kamenice su osjetljive na uzročnika u dobi do 15 mjeseci, no ta osjetljivost ne ovisi o njihovoj veličini (Montes i sur., 1991). Ekonomski su gubitci znatni, jer se teška uginuća pojave prije nego kamenice dosegnu tržišnu veličinu (Bodoy i sur., 1991). Ako *B. ostreae* ne dovede do pomora, znatno smanjuje indeks kondicije školjaka (Robert i sur., 1991). Preživjele kamenice nakon bonamioze pokazuju otpornost na tu bolest i upotrebljuju se dalje za selektivni uzgoj (Elston i sur., 1983; Hugh-Jones, 1994). Upravo za takve kamenice razvijena je tehnologija bazenskog uzgoja (Hugh-Jones, 1994).

Na širenje bolesti utječu transport zaraženih školjaka, stres i okolišni faktori (Van Banning, 1982; Elston i sur., 1986; Van Banning, 1991; Hudson i Hill, 1991).

Dijagnosticira se histološkim metodama (Barber i Davis, 1994; Zabaleta i Barber, 1995; OIE, 1997), citološki (OIE, 1997), imunofluorescencijom (Zabaleta i Barber, 1996) i elektronskom mikroskopijom (Montes i sur., 1994). Kontrola bolesti podrazumijeva trajno praćenje stokova kamenica na pojavu bonamioze, te zabranu prijenosa zaraženih školjaka u druga područja (Hudson i Hill, 1991).

Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva u Naredbi o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 1998. godini (N. N., br. 142/97), u poglavlju o zaraznim i nametničkim bolestima riba i školjaka, odredilo je da se najmanje 3 do 4 mjeseca nakon što su školjke nasadene na novo područje, ili ako su u zaraženom području prije nasadivanja bile duže od 3 do 4 mjeseca, trebaju obaviti histološka pretraga ili citološki pregled hemolimfe na prisutnost razvojnih ili odraslih oblika uzročnika bonamioze.

Zakonik OIE (1997) određuje da je zemlja, područje ili uzgajalište slobodno od bonamioze ako u posljednje dvije godine dijagnostičkim pretragama nije ustanovljena prisutnost uzročnika te bolesti ni u jednoj školjci, i samo takve školjke mogu dobiti certifikat za uvoz radi ljudske prehrane. Ovlaštene službe certifikat ne moraju tražiti ako primljive vrste školjaka dolaze iz zaraženog područja, a namijenjene su izravno za ljudsku prehranu bez reimerzije ili ako kratko razdoblje prije konzumacije budu smještene u karantenskim bazenima.

MARTEILIOZA

Marteilioza (digestive — gland disease) prvi je put opisana godine 1968. u Francuskoj (Kinne, 1983). Bolest napada kamenice (*O. edulis*) u SAD-u, kamenice (*Crassostrea virginica*) u Francuskoj, Italiji, Portugalu i u Španjolskoj, dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) u Italiji i Španjolskoj, kapice (*Argopecten gibbus*) u SAD-u (Da Ros i Massignan, 1985; Moyer i sur., 1995; Renault i sur., 1995; Robiedo i Figueras, 1995).

Uzročnik je bolesti protozoa *Marteilia refringens*, haplosporidija iz koljena *Ascetospora* (Mialhe i sur., 1985; Renault i sur., 1995). Iz kamenica su izdvojene još tri vrste *Marteilia*, koje mogu uzrokovati marteiliozu. To su: *M. sydneyi* u Australiji, sličnog razvojnog ciklusa i veličine kao *M. refringens* (Grizel, 1982; Kinne, 1983), *M. lengchi* u Perzijskom zaljevu (Kinne, 1983) i *M. maurini*, izdvojena i iz dagnje u Francuskoj i Italiji (Auffret i Poder, 1983; Figueras, 1992; Villalba i sur., 1993).

M. refringens ima neobičan razvojni ciklus, koji nije u potpunosti razjašnjen, uglavnom zbog toga što je nametnika teško održavati u laboratorijskim uvjetima (Grizel, 1997; Andrews, 1984). Sporulacija *M. refringens* uključuje niz endogenih pupanja koja tvore sporoplazme unutar sporoplazmi (Grizel, 1982). Presporulacija, odnosno vegetativna faza nametnika sastoji se od ovoidnih plazmodija unutar tubula probavne žlijezde, crijeva i, eventualno, škrge (Kinne, 1983). U trenutku otpuštanja sporangija dolazi do pucanja epitelnih stanica u probavnim tubulima (Robiedo i Figueras, 1995).

Bolesne školjke ugibaju zbog izgladnelosti, a probavna žlijezda postaje smeđastožute boje (Villalba i sur., 1994; Moyer i sur., 1995). Omotač bolesne školjke postaje proziran, a ona prestaje rasti. Razmjerno s intenzitetom bolesti, nametnik inhibira razvoj gonada (Villalba i sur., 1993). Prvi su znakovi bolesti vidljivi ljeti, bez obzira na veličinu školjke (Grizel, 1977; Balouet, 1977), a spore je moguće uočiti kroz cijelu godinu (OIE, 1997).

Na širenje bolesti utječu transport zaraženih školjaka, no i lokalitet i dubina uzgoja — zabilježen je manji nalaz *M. refringens* u školjaka držanih na otvorenijim vodama nego u onih uz obalu (Farley, 1989; Figueras, 1992; Fuentes i sur., 1995).

Znakovi bolesti nisu patognomonični, točna je identifikacija vrlo teška, no moguća je histološki (OIE, 1997), citološki (OIE, 1997) i elektronskom mikroskopijom (Auffret i Poder, 1983; Mialhe i sur., 1985; Figueras, 1992; Renault i sl., 1995).

Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva u Naredbi o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 1998. godini (N. N., br. 142/97), u poglavlju o zaraznim i nametničkim bolestima riba i školjaka, odredilo je da se pri temperaturama višim od 17 °C treba obaviti citološka ili histološka pretraga organa školjaka na prisutnost uzročnika marteilioze.

Zakonik OIE (1997) određuje da je zemlja, područje ili uzgajalište slobodno od marteilioze ako u posljednje dvije godine dijagnostičkim pretragama nije ustanovljena prisutnost uzročnika te bolesti ni u jednoj školjci, i samo takve školjke mogu dobiti certifikat za uvoz radi ljudske prehrane. Ovlaštene službe certifikat ne moraju zatražiti ako primljive vrste školjaka dolaze iz zaraženog područja, a namijenjene su izravno za ljudsku prehranu bez reimerzije ili ako kratko razdoblje prije konzumacije budu smještene u karantenskim bazenima.

HAPLOSPORIDIOZA

Haplosporidioza (Delaware Bay disease, MSX bolest) prvi je put opisana kao bolest kamenica (*Crassostrea gigas*) godine 1957. u SAD-u, kada je na jednom uzgajalištu (Delaware Bay) uništila 95% uzgajanih kamenica (Ford i Haskin, 1982; Farle i sur., 1988). Otada se proširila kroz SAD i Europu, a zahvaća kamenice (*Ostrea edulis*, *Crassostrea virginica*, *C. gigas*), dagnje (*Mytilus galloprovincialis*), brodotočce (*Teredo navalis*) i druge školjke (Hilman i sur., 1982; Andrews, 1984; Newell, 1984; Comps i Lopez-Gomez, 1992; Barber i Ford, 1995).

Haplosporidiozu primarno uzrokuje protozoa *Haplosporidium nelsoni*, haplosporidija iz koljena *Ascetospora*, no bolest mogu uzrokovati i druge vrste haplosporidija: *H. costale*, *H. armoricanum*, *H. tapetis*, *H. tumefacientis* (Andrews, 1982; Kinne, 1983; McGovern i Burreson, 1990; Friedman i Hedrick, 1995). Višejezgreni plazmodiji *H. nelsoni* mogu se naći u škragama, suprabranhijalnim komorama, srčanom epitelu, duž probavnog sustava, u gonadama i vezivnome tkivu školjaka (Ford, 1985; Comps i Lopez-Gomez, 1992; Friedman i Hedrick, 1995). Nalaz spora rijedak je u adultima, ali je moguć u mladim školjkama, dakle, čitav razvojni ciklus *H. nelsoni* može proći u mladim školjkama (Barber i Ford, 1995). Prema Kinneu (1983), domaćin uglavnom ugiba prije sporulacije.

Znakovi bolesti nisu specifični, a uključuju otvaranje školjaka, smanjivanje plašta, izglednost, bljedoću probavne žlijezde, te povremenu tvorbu pustula na unutrašnjoj strani ljuštare. Škrge i plašt bolesnih školjaka često dobivaju smeđastocrnu boju. Mikroskopski je vidljivo smanjenje broja fagocita, relativno

povišenje broja hijalinih hemocita, fagocitoza, fibroza, tvorba apscesa i ulceracija, piknoza i nekroza (Meyers, 1981; Kinne, 1983; Comps i Lopez-Gomez, 1992; Friedman i Hedrick, 1995). Razina enzima u hemolimfi (osobito alkalna i kisela fosfataza) signifikantno pada u teško infestiranih kamenica (Kinne, 1983). Dok je nametnik ograničen na škrge, koncentracija proteina hemolimfe je stabilna, ali proporcionalno s intenzitetom bolesti, tj. kad ona postaje sistemna, koncentracija serumskih proteina naglo pada (Ford, 1985; Ford, 1986), pa je moguće da je iscrpljivanje pojedinih metaboličnih supstrata primaran uzrok smrti bolesnih kamenica (Newell, 1984).

Salinitet vode važan je čimbenik kontrole rasprostranjenosti *H. nelsoni*, jer nametnik ne može opstati u vodama saliniteta manjeg od 10 ppt (Haskin i Ford, 1982; Haskin i sur., 1982; Newell, 1984; Haskin i Ford, 1989; Paynter, 1994). Najveći mortaliteti školjaka oboljelih od haplosporidioze u ljetnim su mjesecima (Andrews, 1982; OIE, 1997), a školjke koje prežive, kao i njihovi potomci, mogu postati otporni na tu bolest (Ford i Haskin, 1982; Kinne, 1983; Haskin i Ford, 1987).

Dijagnosticira se histološki, citološki (OIE, 1997) i elektonskom mikroskopijom (Larsson, 1987). Mjere sprečavanja bolesti moraju, među ostalim, biti i stroge kontrole prijenosa i prijevoza školjaka, te razvoj specifičnih dijagnostičkih tehnika koje bi mogle unaprijediti sanitarnu kontrolu (ELISA-test, stanične kulture), (Grizel, 1990). PCR (polymerase chain reaction) umnažanje najosjetljivija je metoda za dijagnostiku *H. nelsoni* (Stokes i Burreson, 1995, 1996). PCR primjeri mogu prepoznati rDNA *H. nelsoni* iz 50 ng genomske DNA bolesne školjke (Stokes i sur., 1996).

Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva u Naredbi o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 1998. godini (N. N., br. 142/97), u poglavlju o zaraznim i nametničkim bolestima riba i školjaka, odredilo je da se na svim uzgajalištima školjaka u slučaju sumnje na bolest trebaju obaviti citološke pretrage zaraženih organa na prisutnost uzročnika haplosporidioze.

Zakonik OIE (1997) određuje da je zemlja, područje ili uzgajalište slobodno od haplosporidioze ako u posljednje dvije godine dijagnostičkim pretragama nije ustanovljena prisutnost uzročnika te bolesti ni u jednoj školjci, i samo takve školjke mogu dobiti certifikat za uvoz radi ljudske prehrane. Ovlaštene službe certifikat ne moraju zatražiti ako primljive vrste školjaka dolaze iz zaraženog područja, a namijenjene su izravno za ljudsku prehranu bez reimerzije ili ako kratko razdoblje prije konzumacije budu smještene u karantenskim bazenima.

MIKROCITOZA

Mikrocitoza (Denman Island disease) bolest je tihooceanskih kamenica (*Crassostrea gigas*), prvi puta opisana godine 1960. u Kanadi (Farley, 1989).

Uzročnik je bolesti protozoa *Microcytos mackini* iz koljena *Ascetospora* (Farley i sur., 1988; Hervio i sur., 1995). U školjkama bolesnim od mikrocitoze, intracelularno i ekstracelularno, zapažen je osobit tip stanica, nazvan mikrostanicama (Kinne, 1983). Tehnikom injekcije tih mikrostanica pokušala se odrediti specifičnost *M. mackini* za određene domaćine. Rezultati su pokazali da bi visoku osjetljivost na tog nametnika mogle imati i druge kamenice (*Ostrea edulis* i *O. virginica*) (Hervio i sur., 1993). Priručnik OIE (1997) navodi da *M. mackini* napada mnoge vrste školjaka, kao *Crassostrea gigas*, *C. virginica*, *Ostrea edulis*, *Ostreola conchapila*, dok *M. roughleyi* invadira kamenice (*Saccostrea commercialis*) u Australiji.

Mikrocitozu karakteriziraju duboke pustule na tijelu i plaštu školjke, te apscesi drugih tkiva (Farley i sur., 1988). Bolesne su školjke vrlo sitne, vodenaste i prozirne, a histološki pokazuju generaliziranu hemocitnu infiltraciju, osobito vidljivu u području probavnih tubula (Kinne, 1983).

Bolest ima sezonski karakter (Hervio i sur., 1993), najčešće se razvija u proljeće, kada je temperatura vode viša od 8 °C, i nestaje ljeti, kad je temperatura vode oko 18 °C. Starije kategorije kamenica, od dvije godine naviše, najteže su pogođene ovom bolesti (Kinne, 1983).

Za dijagnostiku se koriste histološke metode (Hervio i sur., 1993; OIE, 1997), citološke (OIE, 1997), dokazivanje protutijela ili PCR-tehnika (Hervio i sur., 1995).

Zakonik OIE (1997) određuje da je zemlja, područje ili uzgajalište slobodno od haplosporidioze ako u posljednje dvije godine dijagnostičkim pretragama nije ustanovljena prisutnost uzročnika te bolesti ni u jednoj školjci, i samo takve školjke mogu dobiti certifikat za uvoz radi ljudske prehrane. Ovlaštene službe certifikat ne moraju zatražiti ako primljive vrste školjaka dolaze iz zaraženog područja, a namijenjene su izravno za ljudsku prehranu bez reimerzije ili ako kratko razdoblje prije konzumacije budu smještene u karantenskim bazenima.

PERKINSOZA

Perkinsoza (Dermo disease) bolest je kamenica (*Crassostrea virginica*) u SAD-u i Australiji, i kućica (*Tapes decussatus*) u Italiji i Portugalu (Lester, 1980; Lester i Davis, 1981; Breber, 1985; Faisal i sur., 1994; Powell i sur., 1994). Bolest je, uz visoke mortalitete uzgajanih kamenica, zapažena oko godine 1940. u Meksičkom zaljevu, a uzročnik je opisan 1950. (Farley i sur., 1988; Andrews, 1996).

Uzročnik je perkinsoze *Perkinsus marinus*, protozoa iz koljena *Apicomplexa* (Levine, 1978). Uz *P. marinus*, opisane vrste u redu *Perkinsea* jesu *P. atlanticus*, uzročnik bolesti kućica u južnom Portugalu (Auzoux-Bordenave i sur., 1995), i *P. olseni* u Australiji (OIE, 1997).

Životni ciklus *P. marinus* počinje vegetativnom fazom u kojoj se jednojezgrene aplanospore povećavaju i sukcesivno dijele. Kako one rastu i postaju zrelije, tako se razvija velika vakuola, koja može zauzeti do 90% volumena stanice (Kinne, 1983). Nakon izlaska iz tkiva školjaka, razvijaju se zoosporangiji. Zoospore su sposobne invadirati i infestirati novog domaćina smještajući se u epitel tkiva školjke (Chu i sur., 1985; Auzoux-Bordenave, 1995; Volety i sur., 1995). Bolest najčešće započinje na škrgama (McLaughin, 1998).

Znakovi su bolesti otvaranje školjaka, izglednost i blijeda probavna žlijezda (Kinne, 1983). Moguća je maceracija aduktornog mišića, a u uznapredovalim stadijima bolesti omotač gubi sekretornu funkciju i smanjuje se, a školjka prestaje rasti (Lester i Davis, 1981). *P. marinus* sintetizira ekstracelularne proteine i luči ih u mišiće i organe školjke, dovodeći do njihove lize (Faisal i sur., 1994). Odrasle su kamenice najosjetljivije na uzročnika ljeti i odmah nakon mrijesta, a epizootije uglavnom vode do istrebljenja cijele populacije (Powell i sur., 1994; Calvo i sur., 1996).

Uzročnik se prenosi vodom sa školjke na školjku, osobito brzo ako su u gustom nasadu (Kranz i Otto, 1981). *P. marinus* je moguće uzgojiti u laboratoriju, a pokusne infekcije školjaka uspjele su samo s *P. marinus* i *Bonamia ostreae* (Balouet i Poder, 1985). Dokazano je, ipak, da su laboratorijski uzgojeni nametnici manje infektivni i manje patogeni nego oni u prirodi (Chintala i sur., 1995; Gauthier i Varta, 1995).

Temperatura i salinitet glavni su faktori opstanka *P. marinus*. On se najbolje razvija na temperaturama iznad 28 °C i pri salinitetu od 25 do 30 ppt, dok niži salinitet inhibira njegovu aktivnost (Ford, 1992; Chu i sur., 1995; Gauthier i Varta, 1995).

Dijagnosticira se histološki (OIE, 1997), citološki i elektronskom mikroskopijom (Levine, 1978; Daros i Canzonier, 1986; McLaughin, 1996). Dijagnoza je moguća i uzgojem tkivnih uzoraka školjaka u tioglikolatnom mediju (OIE, 1997). Marsh i sur. (1995) razvili su vrlo osjetljivu, specifičnu metodu identifikacije *P. marinus* u hemolimfi kamenica. Nakon uzimanja 1 ml hemolimfe školjke i izdvajanja DNA iz hemocita, PCR amplifikacijom moguće je otkriti čak samo 10 pg DNA *P. marinus* po µg DNA hemocita školjke.

Ograničenje prijenosa bolesnih školjaka u područja gdje žive školjke slobodne od ovog nametnika, te smanjivanje uzgojne gustoće glavni su načini zaštite od perkinsoze (Powell i sur., 1994).

Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva u Naredbi o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 1998.

godini (N. N., br. 142/97), u poglavlju o zaraznim i nametničkim bolestima riba i školjaka, odredilo je da se pri temperaturama vode višim od 20 °C treba obaviti histološka pretraga organa školjaka na prisutnost uzročnika perkinsoze.

Zakonik OIE (1997) određuje da je zemlja, područje ili uzgajalište slobodno od perkinsoze ako u posljednje dvije godine dijagnostičkim pretragama nije ustanovljena prisutnost uzročnika te bolesti ni u jednoj školjci, i samo takve školjke mogu dobiti certifikat za uvoz radi ljudske prehrane. Ovlaštene službe certifikat ne moraju zatražiti ako primljive vrste školjaka dolaze iz zaraženog područja, a namijenjene su izravno za ljudsku prehranu bez reimerzije ili ako kratko razdoblje prije konzumacije budu smještene u karantenskim bazenima.

IRIDOVIROZA

Iridoviroza (gill disease) bila je uzrokom masovnih pomora portugalskih kamenica (*Crassostrea angulata*) uzgajanih u Francuskoj od godine 1966. do 1970. (Balouet i Poder, 1985). Iridovirus je uzročnik bolesti i drugih kamenica uzgajanih u Francuskoj, Španjolskoj i u Portugalu (*Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*), (Kinne, 1983; OIE, 1997).

Elektronskim je mikroskopom vidljivo da iridovirus u prvoj fazi bolesti narušava gradnju pojedinačnoga škržnog filameta, u drugoj fazi oštećuje veliki broj filamenata, tako da se respiratorna površina znatno smanji, a u trećoj fazi bolesti dovodi do gotovo potpune degeneracije škrge (Comps, 1978). Na škragama je uočljiva pojava jednog ili više žutih točkastih područja koja se povećavaju i postaju smeđe boje, a eventualno i perforiraju tkiva. Na mišiću aduktoru i plaštu katkad se pojavljuju žute ili zelene pustule, uz moguće perforacije tkiva (Kinne, 1983).

Tehnikom fluorescencije moguće je dokazati pojavu jezgara bez kromatina, specifičnu (ADN) fluorescenciju, te potvrditi pripadnost uzročnika grupi iridovirusa (Comps, 1980). Histološkim je metodama moguće uočiti specifične lezije škrge (Balouet i Poder, 1985; OIE, 1997). Iridovirus je moguće otkriti PCR-tehnikom (Gould i sur., 1995) i elektronskom mikroskopijom (OIE, 1997).

Prema Zakoniku OIE (1997), prilikom međunarodne trgovine može se zatražiti na uvid certifikat koji izdaje zemlja izvoznica, a koji potvrđuje da je uzgajalište, područje ili zemlja iz koje školjke dolaze redovito provodila odgovarajuće metode za utvrđivanje prisutnosti iridoviroze, i to s negativnim rezultatom.

MYTILICOLA BOLEST

Morske školjke često sadrže brojne kopepodne nametnike (Kinne, 1983). Gotovo da nema uzgajališta školjaka u Europi gdje nije zabilježen nalaz

najčešćeg od njih — *Mytilicola intestinalis* (Bateau i sur., 1992). *M. intestinalis* prvi je put opisan godine 1902. kao crijevni nametnik dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) uzgajanih u Tršćanskom zaljevu (Ceschia i sur., 1991).

Uzročnik ne infestira samo dagnje (*M. galloprovincialis*, *M. edulis*) već i kamenice (*Ostrea edulis*) i kućice (*Tapes decussatus*), iako manjim intenzitetom (Dare, 1982). Kamenicu (*Crassostrea gigas*) češće napada *Mytilicola orientalis* (Balouet i Poder, 1985; Rodriguez i Carrasco, 1993; Goater i Weber, 1996).

Razvojni stadiji nametnika podijeljeni su u nauplije, metanauplije, kopepodite I–V i preadulte prije spolno zrelih adulta (Gee i Davey, 1986). Nametnik dovodi do metaplastičkih promjena u epitelu crijeva školjke, a može invadirati i probavnu žlijezdu, koja tada mijenja boju u crvenu (Moore i sur., 1978). Infestacije su ponekad i do 100%, a moguće je izdvojiti čak do 30 kopepoda iz jedne dagnje (Kinne, 1983). *M. intestinalis* je u dagnjama uzgajanim u Tršćanskom zaljevu prisutna do 58% (Ceschia i sur., 1991). Manji primjerci školjaka rjeđe obole, a intenzitet je bolesti veći u zaklonjenim, obalnim vodama (Fuentes i sur., 1995; Goater i Weber, 1996). Bolest je najizrazitija u proljeće i jesen (Figueras i Figueras, 1981).

Uvozom kamenica (*Crassostrea gigas*) u Francusku uvezen je i kopepod *M. orientalis*, koji uzrokuje metaplastične promjene u crijevu domaćina slične onima koje uzrokuje *M. intestinalis*, često uz fibrozu vezivnoga tkiva. Oba nametnika mogu uzrokovati začepljenje lumena crijeva ili distenziju crijevne stijenke (Kinne, 1983).

Laboratorijskim je pokusima dokazano da na uzročnika najbolje djeluju organofosfatni preparati (Bateau i sur., 1989; 1992).

TOKSINI ŠKOLJAKA

Neki morski dinoflagelati kojima se hrane školjke imaju sposobnost tvorbe toksina, koji ne škode školjkama u kojima se nakupljaju, no mogu biti vrlo štetnoga djelovanja na druge organizme i konačnog konzumenta, čovjeka. U Pravilniku o količinama pesticida, toksina, mikotoksina, metala i histamina i sličnih tvari koje se mogu nalaziti u namirnicama (N. N., br. 46/94), zabilježene su tri takve tvari opasne za ljudsko zdravlje: PSP (Paralytic Shellfish Poison), NSP (Neuroparalytic Shellfish Poison) i DSP (Diarrhoeic Shellfish Poison).

PSP-otrovanja uzrokovana su neurotoksinima koje tvore morski dinoflagelati, poglavito *Gonyaulax catenella* i *Gl. tamarensis*. Školjke postaju otrovne nakon akumulacije toksina u njihovim probavnim žlijezdama. Toksin je vrlo snažan, ne razgrađuje se uobičajenom termičkom obradom, a već jedan sat nakon konzumacije školjaka u kojima je nakupljen blokira neuromuskularne veze, dok kroz 12 sati može dovesti do respiratorne paralize (Byran, 1987).

PSP-otrovanje često se povezuje s cvatnjom fitoplanktona, poglavito s tzv. *red-tide* cvatnjama. Temperatura vode ima znatan utjecaj na rast dinoflagelata i tvorbu toksina (M arguš, 1991). Školjke postaju otrovne nakon nekoliko dana u vodama s visokim koncentracijama toksičnih dinoflagelata, a detoksikacija može trajati nekoliko mjeseci u vodama bez dinoflagelata ili s malim koncentracijama tih dinoflagelata (Byran, 1987). Po spomenutom Pravilniku (N. N., br. 46/94), jestivi dio školjkaša ne smije u 100 g sadržavati više od 40 µg PSP. U SAD-u i Kanadi (Naidu, 1991) granična je razina 80 µg PSP u 100 g školjke, i u takvim se slučajevima izlovljene školjke uništavaju, a uzgajalište odmah zatvara. Prije ponovna otvaranja uzgajališta, analize moraju biti ponovljene tri puta kroz 14 dana i svaki put pokazati prihvatljivo niske razine toksina. Školjke i voda uzorkuju se i analiziraju kroz čitavu godinu, a osobito u tzv. kritičnim razdobljima.

Prva pojava DSP u Jadranu zabilježena je 1989 (Hansell i sur., 1992). Uzročnici su otrovanja morski dinoflagelati *Dinophysis spp.*, tj. njihov metabolički produkt, okadaična kiselina (Lucentini i sur., 1993). Nakon konzumacije školjaka u kojima je akumuliran, toksin uzrokuje povraćanje, abdominalne boli i proljev (Boni i sur., 1992). *Gymnodinium breve* odgovoran je pak za NSP simptome koji uključuju akutnu respiratornu iritaciju povezanu s aerosolima fragmenata te alge (O'Hara, 1993). Prema spomenutu Pravilniku (N. N., br. 46/94), DSP i NSP mogu se nalaziti ispod granice detekcije priznate metode.

ZAKLJUČAK

Bolesti školjaka koje su važne za Republiku Hrvatsku opisane su u Zakonu o veterinarstvu (N. N., br. 70/97). Propise o pretragama koji se moraju provesti na školjkama odredili su Ministarstvo zdravstva (N. N., br. 46/94) i Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva (N. N., br. 142/97), a Ministarstvo gospodarstva (N. N., br. 108/97) donijelo je Pravilnik o načinu obavljanja nadzora kakvoće određenih proizvoda pri uvozu i izvozu (koji uključuje i školjke i njihove proizvode) i odredilo organizacije koje taj posao mogu obavljati.

Propisi i mjere koje se tiču bolesti školjaka i potencijalnih opasnosti školjaka za ljudsko zdravlje (toksini, bakterije, virusi, metali i dr.) trebali bi biti ujedinjeni jednim dokumentom. Treba voditi računa o tome da Hrvatska pri uvozu/izvozu školjaka mora zadovoljavati propisane standarde za međunarodnu trgovinu i stoga zakonske mjere trebaju biti iscrpne, razumljive, pregledne i tako omogućiti brzu i učinkovitu dijagnostiku.

Summary

SHELL DISEASES AND TOXINS REGULATED BY LAW

N. Topić Popović, E. Teskeredžić*

There is a long tradition of cultivating shells in Croatia, and the shell industry has a good perspective of further development. Since shells are delicate organisms that require special breeding conditions and climate, they are also subject to many diseases. Bonamiosis, haplosporidiosis, maritelliosis, microcytosis and perkinsosis are stated by the International Bureau for Epizootics as shell diseases that, in keeping with law, must be reported, and iridovirus as a disease of a potential international importance. The same diseases are regulated by the Veterinary Law from 1997 as infectious diseases prevention of which is of an interest for the Republic of Croatia. Although, according to the law, it does not have to be prevented, in this article the disease *Mytilicola* is also described. According to the Health Department Statute from 1994, eatable part of shells are being tested for toxins of some marine dinoflagellates that can damage human health, and these are PSP (Paralytic Shellfish Poison), DSP (Diarrhoeic Shellfish Poison) and NSP (Neuroparalytic Shellfish Poison).

Key words: shells, bonamiosis, maritelliosis, haplosporidiosis, microcytosis, perkinsosis, iridovirus, toxins

* Mr. sc. Natalija Topić Popović, dr. sc. Emin Teskeredžić, Institut »Ruder Bošković«, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za istraživanje i razvoj akvakulture, Bijenička 54, Zagreb, Hrvatska

LITERATURA

- Andrews, J. D. (1982): Epizootiology of late summer and fall infections of oysters by *Haplosporidium nelsoni*, and comparison to annual life cycle of *Haplosporidium costalis*, a typical haplosporidan. J. Shellfish Res., 2, (1), 15–23.
- Andrews, J. D. (1984): Epizootiology of diseases of oysters (*Crassostrea virginica*), and parasites of associated organisms in eastern North America. Diseases of Marine Organisms, 37, (1–4), 149–166.
- Andrews, J. D. (1996): History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay. J. Shellfish Res., 15, (1), 13–16.
- Auffret, M., Poder, M. (1983): Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les cotes de Bretagne nord. Rev. Trav. Inst. Peches Marit, Nantes, 47, (1–2), 105–109.

- Auzoux–Bordenave, S., Vigario, A. M., Ruano, F., Domart–Coulon, I., Doumenc, D. (1995): In vitro sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *J. Shellfish Res.*, 14, (2), 469–475.
- Balouet, G. (1977): *Marteilia refringens* — considerations of the life cycle and development of Abers disease in *Ostrea edulis*. Int. Symp. Haplosporidian and Haplosporidian — like Diseases of Shellfish, Gloucester Point, VA, USA, 17 Aug. 1977, 41, (1–2), 64–66.
- Balouet, G. Poder, M. (1985): Current status of parasitic and neoplastic diseases of shellfish: A review. pp. 371–378. In Ellis, A. E. (edt.) *Fish and shellfish pathology*. Academic Press, London, 412 pp.
- Bannister, R. C. A. (1982): *Bonamia* threat: The facts. *Fish. News.*, 3611, 6.
- Bannister, R. C. A., Key, D. (1982): *Bonamia*, a new threat to the native oyster industry. *Fish. Not. Dir. Fish. Res. G. B.*, 71, 9.
- Barber, B. J., Davis, C. V. (1994): Prevalence of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* populations in Maine. *J. Shellfish Res.*, 13, (1), 298.
- Barber, R. D., Ford, S. E. (1995): MSX life cycle: Spores and non–oyster hosts. *Milford Aquaculture Seminar*, 14, (1), 238–239.
- Blateau, D., Coguic, Y., Mialhe, E., Grizel, H., Flamion, G. (1989): Mussel (*Mytilus edulis*) treatment against the red copepod *Mytilicola intestinalis*. *Aquaculture Europe* 1989, 10, 33–34.
- Blateau, D., Coguic, Y., Mialhe, E., Grizel, H. (1992): Mussel (*Mytilus edulis*) treatment against the red copepod *Mytilicola intestinalis*. PAMAQ IV: Fourth International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture. 107, (2–3), 165–169.
- Bodoy, A., Bougrier, S., Greairon, P., Garnier, J., Boulo, V. Heurtebise, S. (1991): Does the prevalence of *Bonamia* and *Marteilia* diseases be reduced (sic) on flat oysters (*Ostrea edulis*) of Atlantic and Mediterranean origin, when they are reared together with the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) in tidal ponds, Copenhagen, Denmark ICES, 9.
- Boni, L., Mancini, L., Milandri, A., Poletti, R., Pompei, M., Viviani, R. (1992): First cases of diarrhoeic shellfish poisoning in the Northern Adriatic Sea. pp. 419–426. In Vollenweider, R. A., Marchetti, R., Viviani, R. (eds.) *Marine Coastal Eutrofication*, Univ. Bologna, Italy
- Breber, P. (1985): On–growing of the carpet–shell clam (*Tapes decussatus* (L.)): Two years experience in Venice Lagoon. *Aquaculture*. 44, (1), 51–56.
- Bryan, F. L. (1987): Seafood–Transmitted infections and Intoxications in Recent Years, pp. 319–328. In Kramer, D. E., Liston, J. (eds.) *Seafood Quality Determination*. Elsevier, Amsterdam. 677 pp.
- Burreson, E. M. (1996): 101 uses for the small subunit ribosomal RNA gene: Applications to *Haplosporidium nelsoni*. *J. Shellfish Res.*, 15, (2), 574.
- Calvo, L. M., Burreson, E. M., Dungan, C. F., Roberson, B. S. (1996): *Perkinsus marinus* transmission dynamics in Chesapeake Bay. *J. Shellfish Res.*, 15, (2), 496.
- Ceschia, G., Mion, A., Orel, G., Giorgetti, G. (1991): Indagine parassitologica delle mitilcolture del Friuli–Venezia Giulia. *Hydrores Inf.*, 8, (9), 5–12.
- Chintala, M. M., Alcox, K. A., Ford, S. E., Bushek, D. (1995): Cultured and natural *Perkinsus marinus* cells: A possible mechanism for virulence differences. *Milford Aquaculture Seminar*, 14, (1), 240.

- Chu, E., Sminkey, T., Cassey, B. B., Hepworth, D. A. (1985): Development of techniques to study acquired immunity to *Perkinsus marinus* in the American oyster *Crassostrea virginica*. J. Shellfish Res., 5, (1), 33–34.
- Chu, E., Volety, A. K., La Peyre, J. F. (1995): Annual variation of hemolymph components and *P. marinus* infection in oysters sampled from deep water shoal, James River, Virginia. Triennial Meeting of Fish Culture Section of American Fisheries Society, World Aquaculture Society Nation Shellfisheries Association, 15, (1), 263.
- Comps, M. (1978): Evolution de recherches et etudes recentes en pathologie des huitres. Oceanol. Acta, 1, (2), 255–262.
- Comps, M. (1980): Mise en evidence par fluorescence du virus de la maladie des branchies de l'huitre portugaise *Crassostrea angulata* — Lmk. Sci. Peche, 301, 17–18.
- Comps, M., Lopez-Gomez, C. (1992): A new haplosporidian infection of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Cuad. Area Cienc. Mar. Semin. Estud. Galegos, 6, 147.
- Dare, P. J. (1982): The susceptibility of seed oysters of *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* Thunberg to natural infestation by the copepod *Mytilicola intestinalis*. Steuer. Aquaculture, 26, (3–4), 201–211.
- Da Ros, L., Massignann, F. (1985): Parasitological investigation on *Mytilus galloprovincialis* Lmk. bred in the Venice Lagoon (Chioggia Basin). Oebalia, 11, (2), 809–811.
- Daros, L., Canzonier, W. J. (1986): *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the Mediterranean basin. Pathology in Marine Aquaculture, 9, 137–138.
- Elston, R. A., Farley, C. A., Kent, M. L. (1986): Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. Cis. Aquat. Org., 2, (1), 49–54.
- Elston, R. A., Kent, M. L., Wilkinson, M. T. (1987): Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. Aquaculture, 64, (3), 237–242.
- Faisal, M., La Peyre, J. F., Schafhauser, D. Y., Rizkalla, E. H. (1994): Potential virulence factors of *Perkinsus marinus*. J. Shellfish Res., 13, (1), 313.
- Farley, C. A., Wolf, P. H., Elston, R. A. (1988): A long term study of »microcell« disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). Fish. Bull, 86, (3), 581–584.
- Farley, C. A. (1989): Mass mortalities and infectious lethal diseases in bivalve mollusks and associations with geographic transfers of populations. J. Shellfish Res., 7, (3), 554.
- Figueras, A., Figueras, A. J. (1981): *Mytilicola intestinalis* Steuer, in cultivated mussels in the Ria of Vigo. Invest. Pesq. Barc., 45, (2), 263–278.
- Figueras, A. J. (1992): Influence of place and depth in the epizootiology of *Marteilia* sp., *Mytilicola intestinalis* and other diseases of cultured mussels in Galicia (NW Spain). Cuad. Area Cienc. Mar. Semin. Estud. Galegos., 6, 160.
- Ford, S. E., Haskin, H. H. (1982): History and epizootiology of *Haplosporidium nelsoni* (MSX), an oyster pathogen in Delaware Bay, 1957–1980. J. Invertebr. Pathol., 40, (1), 118–141.

- Ford, S. E. (1985): Effects of MSX disease on oyster hemolymph proteins. *J. Shellfish Res.*, 5, (1), 35–36.
- Ford, S. E. (1986): Comparison of hemolymph proteins from resistant and susceptible oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *J. Invertebr. Pathol.*, 47, (3), 283–294.
- Ford, S. E. (1992): Avoiding the transmission of disease in commercial culture of molluscs, with special reference to *Perkinsus marinus* (dermo) and *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *J. Shellfish Res.*, 11, (2), 539–546.
- Friedman, C. S., Hedrick, R. P. (1995): Haplosporidian infections of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. Triennial Meeting of Fish Culture Section of American Fisheries Society World Aquaculture, Society National Shellfisheries Association, 14, (1), 226.
- Fuentes, J., Villalba, A., Zapata, C., Alvarez, G. (1995): Effects of stock and culture environment on infections by *Marteilia refringens* and *Mytilicola intestinalis* in the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, 21, (3), 221–226.
- Gauthier, J. D., Varta, G. R. (1995): In vitro culture of the eastern oyster parasite *Perkinsus marinus*: Optimization of the methodology. *J. Invertebr. Pathol.*, 66, (2), 156–168.
- Gee, J. M., Davey, J. T. (1986): Stages of the life history of *Mytilicola intestinalis* Steuer, a copepod parasite of *Mytilus edulis* (L.), and the effect of temperature on their rates of development. *J. Cons. Ciém.*, 42, (3), 254–264.
- Goater, C. P., Weber, A. P. (1996): Factors affecting the distribution and abundance of *Mytilicola orientalis* in the mussel, *Mytilus trossulus*, in Barkley Sound, B. C. *J. Shellfish Res.*, 15, (3), 681–684.
- Gould, A. R., Hyatt, A. D., Hengstberger, S. H., Whittington, R. J., Coupar, B. E. H. (1995): A polymerase chain reaction (PCR) to detect epizootic haematopoietic necrosis virus and Bohle iridovirus. *Dis. Aquat. Org.*, 22, (3), 211–215.
- Grizel, H. (1977): *Marteilia refringens* and oyster disease — recent observations. *Int. Symp. Haplosporidian and Haplosporidian — like Diseases of Shellfish*, Gloucester Point, VA, USA, 17 Aug. 1977, 41, (1–2), 38–39.
- Grizel, H. (1982): *Marteilia refringens* disease. The parasite and new epidemic situation in France. *Invertebrate Pathology and Microbial Control*, 291–294.
- Grizel, H. (1990): Prophylactic strategies and zootechnic measures, recent advances. *Advances in Tropical Aquaculture, Workshop Held in Tahiti, French Polynesia 1989*, 9, 227–231.
- Hansell, G., Boni, L., Cabrini, M., Pompei, M. (1992): Toxic or potentially toxic dinoflagellates from the Northern Adriatic Sea. pp. 107–114. In *Vollenweider, R. A., Marchetti, R., Viviani, R.* (eds.) *Marine Coastal Eutrofication*, Univ. Bologna, Italy
- Haskin, H. H., Ford, S. E. (1982): *Haplosporidium nelsoni* (MSX) on Delaware Bay seed oyster beds: A host–parasite relationship along a salinity gradient. *J. Invertebr. Pathol.*, 40, (3), 388–405.
- Haskin, H. H., Ford, S. E., O'Connor, D. (1982): Environmental influences on MSX infection patterns in Delaware Bay. *J. Shellfish Res.*, 2, (1), 97.

- Haskin, H. H., Ford, S. E. (1987): Breeding for disease resistance in molluscs. Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, 18, (19), 431–441.
- Haskin, H. H., Ford, S. E. (1989): Low salinity control of *Haplosporidium nelsoni* (MSX). J. Shellfish Res., 8, (2), 468–469.
- Hervio, D., Vuillemin, V., Bachere, E., Cochennec, N., Buolo, V., Le Coguc, Y., Mazurie, J., Mialhe, E. (1991): Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster *Ostrea edulis* with the intrahaemocytic protozoan parasite *Bonamia ostreae* (Ascetospora); Application in selecting resistant oysters. Aquaculture and the Environment, 14, 147–148.
- Hervio, D., Bower, S. M., Meyer, G. R. (1993): Delection, isolation, and host specificity of *Microcytos mackini*, the cause of Denman Island disease in Pacific oysters *Crassostrea gigas*. J. Shellfish Res., 12, (1), 136.
- Hervio, D., Meyer, G. R., Bower, S. M., Adlard, R. D. (1995): Development of specific molecular probes for serological and PCR assays for the identification and diagnosis of *Microcytos mackini*, the cause of Denman Island disease in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Triennial Meeting of Fish Culture Section of American Fisheries Society World Aquaculture— Society National Shellfisheries Association, 14, (1), 268.
- Hillman, R. E., Maciolek, N. J., Lahey, J. I., Belmore, C. I. (1982): Effects of a haplosporidian parasite, *Haplosporidium* sp. on species of the molluscan woodborer *Teredo* in Barnegat Bay, New Jersey. J. Invertebr. Pathol, 40, (3), 307–319.
- Hine, P. M. (1990): Parasites and diseases of commercially important molluscs in New Zealand. Advances in Tropical Aquaculture, Workshop Tahiti, French Polynesia, 9, 199–206.
- Hine, P. M. (1991): The annual pattern of infection by *Bonamia* in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. Aquaculture, 93, (3), 241–251.
- Hine, P. M., (1992): Ultrastructural and ultracytochemical observations on *Bonamia* sp. in oysters (*Tiostrea chilensis*), with a consideration of organelle function. PAMAQ IV: 4 th Int. Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture, Vigo (Spain), 107, (2–3), 175–183.
- Hine, P. M., Jones, J. B. (1994): *Bonamia* and other aquatic parasites of importance to New Zealand. N. Z. J. Zool., 21, (1), 49–56.
- Hine, P. M., Wesney, B. (1994): Interacion of phagocytosed *Bonamia* sp. (Haplosporidia) with haemocytes of oysters *Tiostrea chilensis*. Dis. Aquat. Org., 20, (3), 219–229.
- Hudson, E. B., Hill, B. J. (1991): Impact and spread of bonamiasis in the UK Aquaculture, 93, (3), 279–285.
- Hugh-Jones, D. L. (1994): Farming the European flat oyster (*Ostrea edulis*) in Ireland today. Bull. Aquacult. Assoc. Can., 94, (4), 3–8.
- Kinne, O., editor (1983): Diseases of marine animals. Volume II. Biologishe Anstalt Helgoland, Hamburg. 1038 pp.
- Kranz, G. E., Otto, S. V. (1981): More on oyster diseases. Oyster Culture Maryland Proceedings Second Annual Maryland Oyster Conference, 68–84.
- Larsson, J. I. R. (1987): On *Haplosporidium gammari*, a parasite of the amphipod *Rivulogammarus pulex*, and its relationship with the phylum Ascetospora. J. Invertebr. Pathol., 42, (2), 159–169.

- Lester, R. J. G., Davis, G. H. G. (1981): A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. J. Invertebr. Pathol., 37, (2), 181–187.
- Levine, N. D. (1978): *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. J. Parasitol., 64, (3), 549.
- Lucentini, D. R., Draisci, R., Lucentini, L., Gianotti, L., Stacchini, A. (1993): Diarrhetic shellfish toxins in mussels: Optimization of HPLC method for okadaic acid determination. Riv. Sci. Aliment., 22, (4), 443–454.
- Malnar, L., Teskeredžić, E., Teskeredžić, Z. (1990): Bakterije školjakaša ušća rijeke Krke. Zbornik radova Simpozija »N. P. Krka — stanje istraženosti i problemi zaštite ekosistema«, Ekološka monografija, knjiga 2, Hrvatsko ekološko društvo, Zagreb, 435–442.
- Marguš, D., Teskeredžić, E. (1983): Uzgoj dagnji (*Mytilus galloprovincialis* Lkm) u uvali Martinska. Morsko ribarstvo, 3, 86–92.
- Marguš, D. (1991): Three European Scallops: *Pecten maximus*, *Chlamys opercularis* and *C. varia*. Yugoslavia. pp. 789–793. In Shumway, S. E. (ed.) Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Elsevier, Amsterdam, 1095 pp.
- Marsh, A. G., Gauthier, J. D., Varta, G. R. (1995): A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Parasitol., 81, (4), 577–583.
- McGovern, E. R., Burrenson, E. M. (1990): Classification of the Haplosporidiidae. J. Shellfish Res., 8, (2), 469.
- McLaughlin, S. M. (1996): Diagnosis and prevalence of *Perkinsus* sp. in Chesapeake Bay softshell clams, *Mya arenaria*: An update. J. Shellfish Res., 15, (2), 457.
- Meyers, T. R. (1981): Endemic diseases of cultured shellfish of Long Island, New York: adult and juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*). Aquaculture, 22, (4), 305–330.
- Mialhe, E., Bachere, E., Le-Bec, C., Grizel, H. (1985): Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) parasites de bivalves marins. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. III, Paris, 301, (4), 137–142.
- Milišić, N. (1991): Školjke i puževi Jadrana. Logos, Split, 302 pp.
- Montes, J., Villalba, A., Lopez, M. C., Carballal, J., Mourelle, S. G. (1991): Bonamiasis in native flat oysters (*Ostrea edulis* L.) from two intertidal beds of the Ortiguera Estuary (Galicia, N. W. Spain) with different histories of oyster culture. Aquaculture, 93, (3), 213–224.
- Montes, J., Lama, A., Anadon, R. (1993): Proliferative stage in the cycle of *Bonamia ostreae*. Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura, Pontevedra Spain, Centro de Investigaciones Marinas, 515–519.
- Montes, J., Anadon, R., Azevedo, C. (1994): A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. J. Invertebr. Pathol., 63, (1), 1–6.
- Moore, M. N., Lowe, D. M., Gee, J. M. (1978): Histopathological effects induced in *Mytilus edulis* by *Mytilicola intestinalis* and the histochemistry of the copepod intestinal cells. J. Cons. CIEM, 38, (1), 6–11.
- Moyer, M. A., Blake, N. J., Darden, R. L., Arnold, W. S. (1995): Mass mortality in the calico scallop *Argopecten gibbus* caused by *Marteilia*. Fisheries, Biology and Aquaculture of Pectinids: 8th International Pectinid Workshop, Cherbourg–France, 22–29 May 1991, 17, 41–44.

- Naidu, K. S. (1991): Sea scallop, *Placopecten magellanicus*, pp. 861–897. In Shumway, S. E. (ed.) *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, 1095 pp.
- Newell, R. I. E. (1984): The influence of environmental factors and the parasite MSX on the physiology of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shellfish Res.*, 4, (1), 96.
- O'Hara, P. J. (1993): Overview of the marine biotoxin crisis in 1993. pp. 3–6. In Jaspersen, J. A. (ed.) *Marine Toxins and New Zealand Shellfish*. Wellington, New Zealand.
- OIE *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases* (1997): Office International des Epizooties, Paris, France, pp. 251.
- OIE *International Aquatic Animal Health Code* (1997): Office International des Epizooties, Paris, France, pp. 192.
- Paynter, K. T. (1994): Performance of various oyster populations in Chesapeake Bay: Growth and disease tolerance. *J. Shellfish Res.*, 13, (1), 294–295.
- Powell, E. N., Hofmann, E. E., Klinck, J. M. (1994): *Perkinsus marinus*: Triggering mechanisms for epizootics. *J. Shellfish Res.*, 13, (1), 295.
- Renault, T., Cochennec, N., Chollet, B. (1995): Marteiliosis in American oysters *Crassostrea virginica* reared in France. *Dis. Aquat. Org.*, 23, (3), 161–164.
- Robert, R., Borel, M., Pichot, Y., Trut, G. (1991): Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquat. Living Resour. Vivantes Aquat.*, 4, (4), 265–274.
- Robiedo, J. A. F., Figueras, A. (1995): The effects of culture-site, depth, season and stock source on the prevalence of *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* LMK) from Galicia, Spain. *J. Parasitol.*, 81, (3), 354–363.
- Rodriguez, C., Carrasco, J. F. (1993): Associated pathology to the cultivated oyster *Crassostrea gigas* of the Eo Estuary (Principado De Asturias). *Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura*. Pontevedra, Spain, Centro de Investigaciones Marinas, 533–538.
- Stokes, N. A., Walker, J. G., Burreson, E. M. (1996): Comparison of *Haplosporidium nelsoni* diagnostic techniques: Polymerase reaction outperforms histology. *J. Shellfish Res.*, 15, (2), 498.
- Tendel, F. (1989): La bonamiose, maladie de l'huitre plate. *Ecole Nationale Veterinaire, Toulouse, France*, 103 pp.
- Van Banning, P. (1982): Some aspects of the occurrence, importance and control of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* in the Dutch oyster culture. *Invertebrate Pathology and Microbial Control*, 1982, 261–265.
- Van Banning, P. (1991a): Preface to the second meeting on bonamiasis. *Aquaculture*, 93, (3), 203–204.
- Van Banning, P. (1991): Observations on bonamiasis in stock of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in The Netherlands, with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen. *Aquaculture*, 93, (3), 205–211.
- Villalba, A., Montes, J., Carballal, M. J., Lopez, M. C., Mourelle, S. G. (1992): Epizootiology of marteiliasis affecting cultured mussels from estuaries of Galicia. *Cuad. Area Cienc. Mar. Semin. Estud. Galegos.*, 6, 201–202.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Carballal, M. J., Lopez, M. C. (1993): 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, (3), 205–213.
- Villalba, A., Perez-Camacho, A., Beiras, R., Labarta, U. (1994): Relationship of infections by the parasites *Marteilia refringens* and *Mytilicola intestinalis* with absorption efficiency and condition in cultured mussels. International Symposium on Aquatic Animal Health: Program and Abstracts. Davis, Ca-USA, 54.
- Volety, A. K., Chu, E., Ozkizilcik, S. (1995): Biochemical characterization of the oyster parasite, *Perkinsus marinus*: Lipid and fatty acid composition. Triennial Meeting of Fish culture Section of American Fisheries Society, World Aquaculture Society National Shellfisheries Association, 14, (1), 280–281.
- Zabaleta, A., Barber, B. J. (1995): Prevalence of *Bonamia ostreae* in European oysters in the Damariscotta River, Maine. Milford Aquaculture Seminar, 14, (1), 251.
- Zabaleta, A., Barber, B. J. (1996): Prevalence, intensity and detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* L. in the Damariscotta river area, Maine. J. Shellfish Res., 15, (2), 395–400.

Primljeno 4. 3. 1999.
Prihvaćeno 1. 6. 1999.