

ГЛАВА 2.2.2.

ИНФЕКЦИЯ *APHANOMYCES ASTACI* (ЧУМА РАКОВ)

1. Сфера применения

Инфекция *Aphanomyces astaci* означает инфекцию патогенным возбудителем *A. astaci* из семейства Leptolegniaceae, Phylum Oomycota (водяная плесень). Болезнь широко известна под названием «чума раков».

2. Информация о болезни

2.1. Особенности возбудителя

2.1.1. Этиологический агент, штаммы агента

Aphanomyces astaci является членом группы организмов, широко известных как водяная плесень. Хотя эта группа, Oomycetida или оомикоты (оомицеты), ранее относилась к грибам, позже она была переведена из царства грибов в протисты, и была включена в группу, называемую страменопилы или хромисты вместе с диатомовыми водорослями и бурыми водорослями. Хромисты — это супергруппа эукариот, возможно, полифилетическая, которую можно рассматривать как отдельное царство или включить в состав Protista.

Четыре группы (A – D) *A. astaci* были описаны на основе ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК (RAPD PCR) (Huang *с соавт.*, 1994; Diéguez Uribeondo *с соавт.*, 1995): Группа A (так называемые штаммы *Astacus*) включает ряд штаммов, которые были выделены из *Astacus astacus* (широкопалый речной рак) и *Astacus leptodactylus* (узкопалый речной рак); считается, что эти штаммы присутствовали в Европе в течение длительного периода времени. Группа B (штаммы *Pacifastacus* группы I) включает изоляты из *A. astacus* в Швеции и *Pacifastacus leniusculus* (американский сигнальный рак) из Лейк-Тахо, США. Вероятно, занос *A. astaci* произошел при импорте в Европу *P. leniusculus*, что привело к заражению местного вида *A. astacus* в Европе. Группа C (штаммы *Pacifastacus* группы II) включает штамм, выделенный из *P. leniusculus* из озера Питт, Канада. Еще один штамм (Pc), выделенный из *Procambarus clarkii* в Испании, относится к группе D (штамм *Procambarus*). Данный штамм демонстрирует температурные кривые/кривые роста с более высокими оптимальными температурами по сравнению с изолятами из северной Европы (Diéguez Uribeondo *с соавт.*, 1995). Штаммы *Aphanomyces astaci*, которые присутствовали в Европе в течение многих лет (штаммы группы A), по-видимому, являются менее патогенными, чем штаммы, появившиеся позднее (с 1960-х годов) в результате импорта раков из Северной Америки.

2.1.2. Выживание вне хозяина

Зооспоры *Aphanomyces astaci* остаются подвижными до 3 дней, а цисты выживают в дистиллированной воде в течение 2 недель (Svensson & Unestam, 1975; Unestam, 1966).

Поскольку *A. astaci* может иметь три цикла образования зооспор, максимальная продолжительность жизни вне хозяина может составлять несколько недель. Споры оставались жизнеспособными в суспензии спор, которая хранилась при 2°C в течение 2 месяцев (Unestam, 1966).

2.1.3. Стабильность агента (эффективные методы инактивации)

Aphanomyces astaci, как в культуре, так и в зараженных раках, погибает при кратковременном воздействии температуры +60°C или -20 ° C (или ниже) в течение 48 часов (или более) (Alderman, 2000; Oidtmann *с соавт.*, 2002). Гипохлорит натрия и йодофоры эффективны для дезинфекции контаминированного оборудования. Оборудование должно быть очищено перед дезинфекцией, поскольку выяснилось, что органическое вещество снижает эффективность йодофоров (Alderman & Polglase, 1985). Тщательная сушка оборудования (> 24 часа) также эффективна, так как *A. astaci* не устойчив к высыханию.

2.1.4. Жизненный цикл

Жизненный цикл *A. astaci* прост: вегетативные гифы проникают в ткани хозяина и разрастаются в них, что в конечном итоге приводит к развитию экстратрикаральных спорангий, из которых выходят первичные амебоидные споры. Они сначала инцистируются, а затем из них выходит двужгутиковая зооспора (вторичная зооспора). Двужгутиковые зооспоры плавают в толще воды и, встретив восприимчивого хозяина, прикрепляются и прорастают, образуя инвазивные вегетативные гифы. По-видимому, свободно плавающие зооспоры хемотактически притягиваются к кутикуле раков (Cerenius Söderhäll, 1984a), и часто оседают на кутикуле возле раны (Nyhlén & Unestam, 1980). Зооспоры способны к повторному инцистированию и повторному образованию, что продлевает период их инфекционной жизнеспособности (Cerenius & Söderhäll, 1984b). Способность к росту и спорообразованию зависит от штамма и температуры (Diéguez Uribeondo *с соавт.*, 1995).

2.2. Особенности хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды хозяев

На сегодняшний день все виды пресноводных раков должны рассматриваться как восприимчивые к инфекции *A. astaci*. Исход инфекции варьируется в зависимости от вида. Все стадии видов европейских раков, включая широкопалых речных раков (*Astacus astacus*) из северо-западной Европы, белоклешневых речных раков (*Austropotamobius pallipes*) из юго-западной и западной Европы, родственные виды *Austropotamobius torrentium* (горные реки юго-западной Европы) и узкопалых речных раков (*Astacus leptodactylus*) из Восточной Европы и Малой Азии, являются высоко восприимчивыми к инфекции (Alderman, 1996; Alderman *с соавт.*, 1984; Rahe & Soylu, 1989; Unestam, 1969b; Unestam, 1976; Unestam & Weiss, 1970). Лабораторные испытания продемонстрировали, что австралийские виды раков также высоко восприимчивы (Unestam, 1976). Североамериканские раки, такие как сигнальные раки (*Pacifastacus leniusculus*), красные флоридские раки (*Procambarus clarkii*) и виды *Orconectes spp.* инфицируются *A. astaci*, но при нормальных условиях инфекция не вызывает клинического заболевания или гибели. Было продемонстрировано, что все североамериканские виды раков, исследованные до настоящего времени, восприимчивы к инфекции, о чем свидетельствует присутствие патогена в кутикуле хозяина (Oidtmann *с соавт.*, 2006; Unestam, 1969b; Unestam & Weiss,

1970), и поэтому в настоящее время предполагается, что это относится и к любым другим североамериканским видам раков.

Существует еще только один вид ракообразных, восприимчивых к инфекции *A. astaci*: китайский мохнаторукий краб (*Eriocheir sinensis*) (Benisch, 1940).

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

Все стадии развития следует рассматривать как восприимчивые к инфекции.

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)

Виды хозяев, восприимчивые к инфекции *A. astaci*, делятся на две основные категории: виды хозяев, высоко восприимчивых к инфекции с развитием клинического заболевания и смертности, и виды хозяев, которые инфицируются, но инфекция не вызывает клинического заболевания или гибели.

Высоко восприимчивые виды

Вспышки клинического заболевания, вызванного инфекцией *A. astaci*, обычно известны под названием «чума раков». В местах вспышек заболевания можно обнаружить умирающих и мертвых раков различных размеров (и, следовательно, различного возраста).

Североамериканские виды раков

Превалентность инфекции, как правило, ниже у животных, у которых недавно закончилась линька (В. Oidtmann, неопубликованные данные). Тем не менее, тщательных исследований для подтверждения этих наблюдений не проводили. У молодых раков линька происходит несколько раз в год, тогда как линька взрослых раков обычно происходит не реже одного раза в год в умеренном климате. Следовательно, животные, у которых после последней линьки прошло некоторое время, могут демонстрировать более высокую превалентность по сравнению с животными, у которых линька прошла недавно.

2.2.4. Органы-мишени и инфицируемые ткани

Экзоскелет (кутикула) является тканью, которая инфицируется в первую очередь. Преимущественно поражается мягкая кутикула на нижней стороне брюшка и вокруг суставов. У высоко восприимчивых европейских видов раков патогену часто удается проникнуть через базальную пластинку, расположенную под слоем клеток эпидермиса. Оттуда *A. astaci* распространяется по всему телу, главным образом путем проникновения в соединительную ткань и гемальные пазухи; однако могут поражаться все ткани.

У североамериканских видов раков инфицирование обычно ограничивается кутикулой. Результаты ПЦР свидетельствуют о том, что часто инфицируется хвостовой веер (состоящий из уropодов и тельсона) и мягкая кутикула брюшка (Oidtmann *с соавт.*, 2006; Vrålstad *с соавт.*, 2011).

2.2.5. Персистентная инфекция

Было продемонстрировано, что несколько североамериканских видов раков заражаются *A. astaci* (Oidtmann *с соавт.*, 2006; Unestam, 1969a; Unestam & Söderhäll, 1977). У инфицированных прижившихся или выращенных на ферме популяций североамериканских раков инфекция не вызывает клинического заболевания или

повышенной смертности (Oidtmann *с соавт.*, 2006; Strand *с соавт.*, 2011; Strand *с соавт.*, 2012).

Исходя из результатов исследований, проведенных в отношении североамериканских видов раков, можно предположить, что все виды раков, обитающие на североамериканском континенте, могут быть инфицированы *A. astaci* без развития клинического заболевания, и поэтому они могут выступать в качестве пожизненных носителей патогена.

Последний отчет из Финляндии также указывает на то, что популяции холодноводных широкопалых речных раков могут быть хронически инфицированы при низкой превалентности (Viļjamaa-Dirks *с соавт.*, 2011).

2.2.6. Переносчики инфекции

Перемещение рыбы может привести к распространению *A. astaci*: например, через споры, присутствующие в транспортной воде, или при совместной транспортировке рыбы и зараженных раков, или при сочетании данных способов (Alderman *с соавт.*, 1987; Oidtmann *с соавт.*, 2002). Имеются также косвенные доказательства того, что инфекция распространяется через зараженное оборудование (сети, обувь, одежда и т. д.) (Alderman *с соавт.*, 1987).

2.3. Паттерн болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Основными путями распространения патогена являются: 1) перемещение зараженных раков, 2) перемещение спор с загрязненной водой или оборудованием, например при перемещении рыбы, или 3) заселение мест обитания североамериканскими видами раков.

Передача инфекции от рака к раку происходит путем выхода зооспор из зараженного животного и прикрепления зооспор к незараженным ракам. Зооспоры *A. astaci* активно плавают в толще воды, и продемонстрировали положительный хемотаксис в отношении раков (Cerenius & Söderhäll, 1984a).

В основном инфекция *A. astaci* распространялась в Европе между 1960-ми и 2000-ми годами путем заселения диких водоемов североамериканскими видами раков или через раков, попавших в дикую природу с ферм (Alderman, 1996; Dehus *с соавт.*, 1999). Распространение в настоящее время происходит главным образом в результате увеличения популяции североамериканских раков, случайной совместной транспортировки особей и путем подсадок североамериканских раков в дикие водоемы частными лицами (Edsman, 2004).

Заселение мест обитания, первоначально занятых высоко восприимчивыми видами, североамериканскими видами раков, инфицированными *A. astaci*, может привести к эпизоотии среди высоко восприимчивых животных. Скорость распространения будет зависеть, среди прочих факторов, от превалентности инфекции в популяции североамериканских раков.

Перемещение рыбы может привести к распространению *A. astaci*: например, через споры,

присутствующие в транспортной воде, или при совместной транспортировке рыбы и зараженных раков, или при сочетании данных способов (Alderman *с соавт.*, 1987; Oidtmann *с соавт.*, 2002). Имеются также косвенные доказательства того, что инфекция распространяется через зараженное оборудование (сети, обувь, одежда и т. д.) (Alderman *с соавт.*, 1987).

2.3.2. Превалентность

У высоко восприимчивых европейских видов раков проникновение спор *A. astaci* обычно приводит к заражению и в конечном итоге к гибели. Минимальная инфекционная доза до сих пор не установлена, но она может составлять всего одну спору на животное (В. Oidtmann, неопубликованные данные). Превалентность инфекции в популяции в начале вспышки может быть низкой (может заразиться несколько животных в популяции реки). Однако патоген развивается в инфицированных животных и впоследствии выходит в воду; как правило, он вызывает 100%-ную смертность в смежной популяции. Скорость распространения от первоначально зараженных животных зависит от нескольких факторов, одним из которых является температура воды. Следовательно, время от первого заноса патогена в популяцию до заметной смертности среди раков может сильно различаться и может составлять от нескольких недель до месяцев. Превалентность инфекции в течение этого времени постепенно увеличивается и обычно достигает 100%. Данные по популяции широкопалых речных раков (благородных раков) в Финляндии, в которой в 2001 году произошла массовая гибель в связи с инфекцией *A. astaci*, свидетельствуют о том, что в малочисленных популяциях широкопалых речных раков распространение болезни в популяции хозяев может занять несколько лет (Viljamaa-Dirks *с соавт.*, 2011).

Уровни превалентности у североамериканских раков, по-видимому, сильно различаются. Немногочисленные исследования продемонстрировали, что возможны уровни превалентности от 0 до 100% (Oidtmann *с соавт.*, 2006).

2.3.3. Географическое распределение

В Европе сообщения о высокой смертности среди раков регистрировались в Италии еще в 1860 году (Ninni, 1865; Seligo, 1895). Позднее также сообщалось о случаях гибели раков, (при отсутствии случаев заражения среди других видов водных животных), во франко-германском пограничном регионе в третьей четверти 19-го века. Оттуда происходило постоянное распространение инфекции, главным образом в двух направлениях: вниз по Дунаю на Балканы и к Черному морю, через Северо-Германскую низменность в Россию и оттуда на юг к Черному морю и на северо-запад к Финляндии и, в 1907 году в Швецию. В 1960-х годах были зарегистрированы первые вспышки в Испании, а в 1980-х наблюдалось дальнейшее распространение инфекции на Британские острова, в Турцию, Грецию и Норвегию (Alderman, 1996). Первоначальный резервуар возбудителя инфекции в 19 веке так и не был установлен; не было данных о том, что виды *Orconectes* были завезены в Европу до 1890-х годов, но распространение инфекции после 1960-х годов во многом связано с более поздним завозом североамериканских раков для разведения (Alderman, 1996). Произошло попадание завезенных видов в дикую природу, и *Pacifastacus leniusculus* и *Procambarus clarkii* в настоящее время широко акклиматизировались во многих частях Европы.

В Австралии и Новой Зеландии никогда не наблюдалось вспышек инфекции *A. astaci*, и в

настоящее время данные страны считаются свободными от этой болезни (веб-сайт OIE WAHID, доступ по состоянию на июнь 2011 года).

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Когда инфекция впервые попадает в незараженную популяцию высоко восприимчивых видов раков, в течение короткого промежутка времени обычно наблюдается высокий уровень смертности, поэтому в районах с высокой плотностью раков дно озер, рек и ручьев покрыто мертвыми и умирающими раками. Инфекция, сопровождающаяся гибелью раков, быстро распространяется от места первичной вспышки вниз по течению, тогда как распространение вверх по течению происходит медленнее. Там, где плотность популяции восприимчивых раков низкая, образуется меньше зооспор, и распространение инфекции будет происходить медленнее, и гибель будет не такой массовой. Температура воды оказывает некоторое влияние на скорость распространения инфекции, и это наиболее очевидно в популяциях раков с низкой плотностью, где распространение от животного к животному занимает больше времени, а интенсивность заражения будет ниже. Более низкие темпы роста смертности и больший диапазон клинических признаков у зараженных животных обусловлены более низкими температурами воды и уменьшением количества зооспор (Alderman *с соавт.*, 1987). Результаты исследований, проведенных в Финляндии, указывают на то, что при низких температурах воды широкопалые речные раки могут быть инфицированными в течение нескольких месяцев, без высокого уровня смертности (S. Viljamaa-Dirks, неопубликованные данные).

Иногда единичных особей высоко восприимчивых видов обнаруживали после того, как в реке или озере прошла волна инфекции *A. astaci*. Скорее всего, это связано с недостаточным воздействием патогена на данных животных во время вспышки (животные могли быть в притоке реки/озера или в части зараженной реки/озера, куда не проникли споры, или раки могли оставаться в норах во время эпизоотии). Тем не менее, было описано, что низковирулентные штаммы *A. astaci* выживали в водоемах, вызывая слабую инфекцию в оставшейся популяции (Viljamaa-Dirks *с соавт.*, 2011). Хотя остатки популяций восприимчивых видов раков обитают во многих водосборных бассейнах Европы, численность популяций с высокой плотностью, которые существовали 150 лет назад, в настоящее время сильно сократилась (Alderman, 1996; Souty-Grosset *с соавт.*, 2006). Популяции восприимчивых раков могут восстановиться, но как только плотность популяции и географическое распределение станут достаточными для контакта восприимчивых животных с инфекцией, возникнут новые вспышки инфекции *A. astaci* и будет происходить массовая гибель.

2.3.5. Факторы окружающей среды

В лабораторных условиях предпочтительный диапазон температур, при котором растет мицелий *A. astaci*, незначительно различается в зависимости от штамма. В исследовании, в котором сравнивалось несколько штаммов *A. astaci*, выделенных из различных видов раков, рост мицелия наблюдался в диапазоне от 4°C до 29,5°C, причем у штамма, выделенного из *Procambarus clarkii*, наблюдался более быстрый рост при более высоких температурах по сравнению с другими штаммами. Интенсивность спорообразования была одинаково высокой для всех протестированных штаммов при температуре от 4 до 20°C, но она заметно снижалась при 25°C для штаммов, выделенных не из *Procambarus clarkii*, и отсутствовала при 27°C. Напротив, спорообразование продолжалось в штамме *Procambarus clarkii* при 27°C. Доля подвижных зооспор (из всех зооспор, наблюдаемых в

суспензии зооспор) составила почти 100% при температуре от 4 до 18°C, и снизилась приблизительно до 60% при 20°C и приблизительно до 20% при 25°C у всех штаммов, кроме штамма *P. clarkii*. В штамме *P. clarkii* 80% зооспор оставались подвижными при 25°C, но подвижных спор не было обнаружено при 27°C (Diéguez Uribeondo *с соавт.*, 1995).

Полевые наблюдения продемонстрировали, что вспышки инфекции *A. astaci* происходят при широком диапазоне температур и, по крайней мере, в диапазоне от 4 до 20°C. Скорость распространения внутри популяции зависит от нескольких факторов, включая температуру воды. При температуре от 4 до 16°C скорость эпизоотии увеличивается в связи с более высокими температурами воды. При низких температурах воды кривая эпизоотии может подниматься очень медленно, и период, в течение которого наблюдаются случаи гибели, может составлять несколько месяцев (В. Oidtmann, неопубликованные данные).

В буферной, дистиллированной воде споруляция происходит при рН от 5 до 8, (оптимальный диапазон рН от 5 до 7). Оптимальный диапазон рН для плавания зооспор, по-видимому, находится в пределах от 6 до 7,5, а максимальный диапазон рН составляет от 4,5 до 9,0 (Unestam, 1966).

На появление зооспор влияет наличие определенных солей в воде. CaCl₂ стимулирует появление зооспор из первичных цист, тогда как MgCl₂ оказывает ингибирующее действие. Как правило, появление зооспор запускается путем переноса вегетативного мицелия в среду, где питательные вещества отсутствуют или имеют низкую концентрацию (Cerenius & Söderhäll, 1984b).

2.4. Профилактика и борьба с болезнью

После заноса *A. astaci* в популяцию высоко восприимчивых видов раков в дикой природе, распространение внутри зараженной популяции невозможно контролировать. Таким образом, предотвращение заноса имеет ключевое значение. Во избежание заноса, необходимо принять следующие меры:

4. Следует предотвращать перемещение потенциально зараженных живых или мертвых раков, потенциально контаминированной воды, оборудования или любых других предметов, посредством которых патоген может быть занесен из неблагополучного пункта в благополучный пункт, где содержатся восприимчивые виды.

5. Если планируется перемещение рыбы, водный источник следует оценить с точки зрения вероятности наличия в нем инфицированных раков (включая североамериканских раков-носителей).

6. Следует избегать перемещения рыбы из пункта, где в настоящее время наблюдается эпизоотия инфекции *A. astaci*, так как это сопряжено с высоким риском распространения заболевания.

7. Если планируется перемещение рыбы из водного источника, в котором водятся североамериканские раки, к методам вылова рыбы в данном водоеме предъявляются следующие требования: а) совместная транспортировка рыбы и раков не допускается; б) в

транспортной воде должны отсутствовать споры *A. astaci*, и, с) оборудование должно дезинфицироваться между каждым использованием; d) груз не должен контаминироваться при транспортировке.

8. Не следует выпускать североамериканских раков в дикие водоемы в районах, где присутствует какой-либо из высоко восприимчивых видов. После того как их выпустили, североамериканские раки имеют тенденцию распространяться, иногда на большие расстояния. Если планируется выпустить североамериканских раков в дикие водоемы, то должна быть проведена оценка риска для прогнозирования долгосрочных возможных последствий. В конечном итоге могут инфицироваться высоко восприимчивые популяции раков вдали от места выпуска.

9. Чрезвычайно трудно осуществить меры биобезопасности, полностью гарантирующие, что раки не покинут аквакультурные предприятия. Поэтому необходимо провести оценку риска, чтобы определить, следует ли создавать эти предприятия.

Определенные пути заноса, такие как выпуск североамериканских раков частными лицами, трудно контролировать.

2.4.1. Вакцинация

В настоящее время нет доказательств того, что вакцины обеспечивают долгосрочную защиту ракообразных, и даже если это не так, вакцинация природных популяций раков нецелесообразна.

2.4.2. Лекарственное лечение

В настоящее время не известно никаких методов лечения высоко восприимчивых видов раков после их заражения.

2.4.3. Иммуностимуляция

В настоящее время не известно никаких иммуностимуляторов, которые могли бы успешно защитить высоко восприимчивые виды раков от инфекции и последующего заболевания, вызванного инфекцией *A. astaci*.

2.4.4. Разведение для получения резистентной популяции

За 125 лет, прошедших с момента появления инфекции *A. astaci* в Европе, получено мало свидетельств резистентности популяций европейских раков. Однако тот факт, что у североамериканских раков, как правило, не развивается клиническое заболевание, позволяет предположить, что возможен отбор для получения резистентной популяции, и лабораторные исследования с использованием штаммов *A. astaci* с ослабленной вирулентностью могут быть успешными. Однако в настоящее время нет опубликованных данных таких исследований.

2.4.5. Повторное заселение резистентными видами

Североамериканские раки использовались в различных европейских странах для восполнения утраченного поголовья местных раков. Однако, поскольку североамериканские раки считаются восприимчивыми к *A. astaci*, повторное заселение североамериканскими раками может создать резервуар инфекции *A. astaci*. Это сведет к

минимуму вероятность успешного повторного заселения местными видами. Следует провести оценку риска для принятия решения о повторном заселении.

2.4.6. Блокирующие агенты

Нет данных.

2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок

Имеется ограниченная информация о восприимчивости икринок раков к инфекции *A. astaci*. Unestam & Söderhäll отмечают, что они экспериментально подвергли икринки *Astacus astacus* и *P. leniusculus* воздействию суспензий зооспор и не смогли вызвать инфекцию (Unestam & Söderhäll, 1977). Однако подробные данные этих исследований не были опубликованы.

Несмотря на то, что опубликованных данных недостаточно, дезинфекция личинок после заражения вряд ли будет успешной, поскольку *A. astaci* будет защищен от дезинфекции кутикулой раков, в которой он будет присутствовать.

2.4.8. Общие практики разведения раков

Если планируется создание хозяйства по разведению раков высоко восприимчивых видов, следует тщательно изучить, имеются ли североамериканские виды раков вблизи территории запланированного участка, или присутствуют ли популяции североамериканских раков вверх по течению (для участков, которые расположены непосредственно на реке или берут воду из реки), даже если они находятся на большом расстоянии вверх по течению. Если североамериканские виды раков присутствуют, существует высокая вероятность того, что восприимчивые раки, выращенные в хозяйстве, в конечном итоге инфицируются.

В эндемичном районе, где выращиваются высоко восприимчивые виды, следует соблюдать следующие рекомендации по биобезопасности во избежание заноса *A. astaci* в хозяйство:

1. Должны осуществляться общие меры биобезопасности (например, контролируемый доступ на территорию; дезинфекция обуви при входе в хозяйство; расследование случаев гибели, если они имеются; завоз живых животных (раков, рыб) только из источников, свободных от инфекции *A. astaci*).
2. Не следует допускать перемещения потенциально инфицированных живых или мертвых раков, потенциально контаминированной воды, оборудования или любых других предметов, посредством которых патоген может быть занесен из неблагоприятного пункта в благополучный пункт, где содержатся восприимчивые виды.
3. Если планируется перемещение рыбы или раков, они не должны поступать из рек или других водоемов, в которых обитают потенциально инфицированные раки (либо восприимчивые популяции раков, в которых в настоящий момент наблюдается вспышка инфекции *A. astaci*, либо североамериканские раки-носители).
4. В хозяйство не должны завозиться североамериканские раки.

5. Рыба, полученная из неизвестных источников пресной воды или из источников, где могут присутствовать североамериканские раки или может иметь место вспышка инфекции *A. astaci*, не должна использоваться в качестве приманки или корма для раков, кроме тех случаев, когда рыба подверглась температурной обработке, уничтожающей *A. astaci* (см. Раздел 2.1.3).

6. Любое оборудование, ввезенное в хозяйство, должно быть продезинфицировано.

3. Отбор образцов

3.1. Отбор отдельных особей

В случае подозрения на вспышку инфекции *A. astaci* в популяции высоко восприимчивых видов раков, образцы раков, отобранных для выявления *A. astaci*, в идеале должны включать: а) живых раков с признаками заболевания и б) живых раков, которые кажутся здоровыми. Мертвые раки также могут быть пригодными, хотя это будет зависеть от их состояния.

Живых раков следует перевозить в контейнерах из полистирола с небольшими отверстиями для аэрации или в аналогичных контейнерах. Температура в контейнере не должна превышать 16°C.

Контейнер должен обеспечивать защиту от значительных перепадов температур вне контейнера. В периоды жаркой погоды следует использовать морозильные пакеты со льдом, чтобы температура не оказывала вредного воздействия на животных. Пакеты могут быть прикреплены внутри на дне транспортного контейнера. Тем не менее, раки должны быть защищены от прямого контакта с морозильными пакетами. Для этого можно использовать, например, картон или нескольких слоев газеты.

Раков следует перевозить во влажной атмосфере, например, с использованием увлажненной древесной стружки/опилок, газеты или травы/сена. Если транспортная вода не достаточно насыщена кислородом, живых раков не следует перевозить в воде, поскольку они могут задохнуться.

Время между отбором живых животных и доставкой в исследовательскую лабораторию не должно превышать 24 часов.

Даже если на месте предполагаемой вспышки найдены только мертвые животные, они могут быть пригодны для диагностики. В зависимости от их состояния, их можно: а) перевозить в охлажденном состоянии (если предполагается, что они погибли совсем недавно), или б) поместить в неметилированный этанол (минимальная концентрация 70%; см. Раздел 3.2).

Если животные находятся в стадии разложения, маловероятно, что будет получен достоверный результат, однако, при отсутствии других животных, их все равно можно протестировать.

3.2. Консервирование образцов

Как описано выше, предпочтительно использовать неконсервированных раков. Если транспортировка недавно погибших или умирающих раков не может быть организована, раки могут быть зафиксированы в этаноле (минимум 70%). Однако фиксация может снизить чувствительность теста. Соотношение раков и этанола в идеале должно быть 1:10 (1 часть раков, 10 частей этанола).

3.3. Объединение образцов в пулы

Не рекомендуется.

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

У высоко восприимчивых видов раков наиболее подходящей тканью для отбора образцов является мягкая кутикула брюшка, которая находится на нижней стороне брюшка.

У североамериканских видов раков рекомендуется отбор образцов мягкой кутикулы брюшка, уропод и тельсона.

3.5. Неподходящие образцы/ткани

Автолитический материал не подходит для анализа.

4. Методы диагностики

Если имеется большое количество мертвых раков высоко восприимчивых видов, а остальная водная фауна остается здоровой, то можно заподозрить, что популяция инфицирована *A. astaci*. Клинические признаки инфекции *A. astaci* включают изменения в поведении и ряд видимых внешних поражений. Однако клинические признаки имеют ограниченную диагностическую ценность. Основными доступными методами диагностики являются полимеразная цепная реакция (ПЦР) и выделение патогена в культуральных средах с последующим подтверждением его идентичности. Выделение может быть сложным и для него требуется, чтобы образцы были в хорошем состоянии, при их поступлении в диагностическую лабораторию (Oidtmann *с соавт.*, 1999). Молекулярные методы в меньшей степени зависят от скорости доставки образцов и могут использоваться для большего диапазона образцов по сравнению с методами, основанными на выделении возбудителя (Oidtmann *с соавт.*, 2006; Vrålstad *с соавт.*, 2009).

4.1. Полевые методы диагностики

4.1.1. Клинические признаки

Высоко восприимчивые виды

Макроскопические клинические признаки различны и зависят от серьезности заражения и температуры воды. Первым признаком эпизоотии может быть появление раков в дневное время (раки обычно ведут ночной образ жизни), у некоторых из раков может нарушиться координация, раки опрокидываются на спину и не могут перевернуться. Однако часто первым признаком вспышки является большое количество мертвых раков в реке или озере (Alderman *с соавт.*, 1987).

У восприимчивых видов, если численность раков достаточна для быстрого распространения заболевания, особенно при летних температурах воды, все высоко восприимчивые местные виды раков на участке реки протяженностью более 50 км могут погибнуть в течение 21 дня или ранее, с момента первых наблюдаемых случаев гибели (D.

Alderman, субъективные комментарии.) Инфекция *A. astaci* имеет беспрецедентную степень тяжести, поскольку зараженные восприимчивые раки обычно не выживают. Однако следует подчеркнуть, что наличие большого количества мертвых раков само по себе недостаточно для диагностики. Следует оценить общее состояние остальной водной фауны. Гибель или исчезновение других водных беспозвоночных, равно как и раков, даже если рыба выживает, может указывать на загрязнение (например, загрязнение инсектицидами, такими как циперметрин, приводило к постановке ошибочного диагноза).

Североамериканские виды раков

Иногда считается, что меланизированная кутикула является признаком инфекции *A. astaci*. Однако меланизация может иметь самые разные причины и не является специфическим признаком инфекции *A. astaci*.

4.1.2. Изменение поведения

Высоко восприимчивые виды

Зараженные раки высоко восприимчивых видов могут оставлять свои убежища в дневное время (что обычно не наблюдается у раков), у них пропадает рефлекс защиты и наблюдается прогрессирующий паралич. Умиравшие раки иногда лежат на спине. Животные часто уже не в состоянии перевернуться. Иногда можно увидеть, как зараженные животные пытаются чесать или щипать себя.

Североамериканские виды раков

Зараженные североамериканские раки не демонстрируют каких-либо поведенческих изменений (B. Oidtmann, неопубликованные данные).

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

Высоко восприимчивые виды

В зависимости от ряда факторов, очаги инфекции у раков могут быть видны невооруженным глазом или могут быть не заметными, несмотря на тщательное исследование. Такие очаги лучше всего можно увидеть под стереомикроскопом малой мощности увеличения, и чаще всего их можно узнать по белым пятнам на мышцах под кутикулой. В некоторых случаях кутикула и мышцы могут приобрести коричневую окраску, а в других случаях в инфицированной кутикуле можно увидеть гифы в виде мелких коричневых (меланизированных) следов в самой кутикуле. Участки, которые подлежат тщательному исследованию, включают мягкую кутикулу на нижней стороне брюшка и хвоста, кутикулу перианальной области, кутикулу между панцирем и брюшком, суставы грудных ног (ходильных ног), особенно проксимальный сустав и, наконец, жабры.

Североамериканские виды раков

Зараженные североамериканские раки могут иногда иметь меланизированные пятна на мягкой кутикуле, например, мягкой кутикуле на нижней стороне брюшка. Тем не менее, данные меланизированные пятна могут быть вызваны механическими повреждениями или инфицированием другими видами водяной плесени, и не являются специфическими.

4.2.2. Клиническая химия

Подходящие методы отсутствуют.

4.2.3. Микроскопическая патология

Если ткань для фиксации была выбрана неправильно, будет трудно обнаружить гифы *A. astaci* в окрашенных препаратах. Можно использовать метод гистологического окрашивания, например серебряную окраску Грокотта с контрокраской обычным гематоксилином и эозином. Однако данный материал не подтверждает, что наблюдаемые гифы принадлежат *A. astaci*.

См. также Раздел 4.2.4

4.2.4. Влажные препараты

В небольших кусочках мягкой кутикулы, вырезанных из участков, упоминаемых выше (Раздел 4.2.1), и исследованных под составным микроскопом с использованием малой и средней мощности увеличения, будет подтверждено наличие асептатных грибковых гиф шириной 7–9 мкм. Обычно можно обнаружить гифы, которые пронизывают всю толщину кутикулы, образуя трехмерную сеть гиф в сильно пораженных областях кутикулы. Присутствие гемоцитов хозяина и, возможно, некоторая меланизация, ассоциированная с гифами и их инкапсулирование, позволяют предположить, что гифы представляют собой патоген, а не вторичный оппортунистический возбудитель заболевания. В некоторых случаях исследование поверхности данных влажных препаратов кутикулы продемонстрирует наличие характерного для *A. astaci* спорангия со скоплениями инцистированных первичных спор (см. Раздел 4.3).

4.2.5. Мазки

Не применимо.

4.2.6. Фиксированные срезы ткани

См. Раздел 4.2.3

4.2.7. Электронная микроскопия/цитопатология

Не применимо.

4.3. Методы обнаружения и идентификации агента

4.3.1. Метод прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы

4.3.1.1.1. Влажные препараты

Как указано выше (Раздел 4.2.4), предварительно идентифицировать *A. astaci* можно на основании i) наличия гиф, пронизывающих кутикулу и ii) спорангиев правильных морфологических типов (см. ниже) на поверхности экзоскелетов раков.

4.3.1.1.2. Мазки

Не применимо.

4.3.1.1.3. Фиксированные срезы ткани

См. Раздел 4.2.3

4.3.1.2. Выделение и идентификация агента

4.3.1.2.1. Культура клеток /искусственные среды

Высоко восприимчивые виды

Следует позаботиться о том, чтобы животные, которые будут использоваться для выделения *A. astaci* в культуре, не подвергались высушиванию.

Методы выделения были описаны Benisch, 1940; Nyhlén & Unestam, 1980; Alderman & Polglase, 1986; Cerenius *с соавт.*, 1988; Oidtmann *с соавт.*, 1999 и Viljamaa-Dirks & Heinikainen, 2006.

Среда для выделения (IM) по Alderman и Polglase, 1986: 12,0 г агара; 1,0 г дрожжевого экстракта; 5,0 г глюкозы; 10 мг оксолиновой кислоты; 1000 мл речной воды; и 1,0 г пенициллина G (стерильного), добавленного после автоклавирования и охлаждения до 40°C. Речная вода определяется как любая природная речная или озерная вода, в отличие от деминерализованной воды.

Любое поверхностное загрязнение следует сначала удалить с мягкой внутренней поверхности кутикулы на нижней стороне брюшка или с любых других областей, из которых будет вырезаться кутикула, тщательно протерев кутикулу влажным (с использованием автоклавированной воды) чистым одноразовым бумажным полотенцем. Простого асептического иссечения инфицированных тканей, которые затем помещаются в виде маленьких кусочков (3–5 мм²) на поверхность планшетов со средой для выделения, обычно достаточно для успешного выделения *A. astaci* из умирающих или недавно погибших (<24 часов) животных. В зависимости от ряда факторов, очаги инфекции у раков могут быть легко видны невооруженным глазом или могут быть не заметными, несмотря на тщательное исследование. Такие очаги лучше всего можно увидеть под стереомикроскопом малой мощности увеличения, и чаще всего их можно узнать по белым пятнам на мышцах под кутикулой. В некоторых случаях кутикула и мышцы могут приобрести коричневую окраску, а в других случаях в инфицированной кутикуле можно увидеть гифы в виде мелких коричневых (меланизированных) следов в самой кутикуле. Участки, которые подлежат тщательному исследованию, включают мягкую кутикулу на нижней стороне брюшка и хвоста, кутикулу перианальной области, кутикулу между панцирем и брюшком, суставы грудных ног (ходильных ног), особенно проксимальный сустав и, наконец, жабры.

Если инфицированные ткани вырезаются с осторожностью, загрязняющие вещества не должны представлять значительных проблем при выделении. Небольшие кусочки кутикулы и мышц можно перенести в чашку Петри со стерильной водой и затем разрезать на мелкие кусочки стерильными инструментами для переноса в среду для выделения (IM). Подходящими инструментами для такой работы являются скальпели, остроконечные пинцеты и ножницы.

Для минимизирования возможной контаминации, проводится дезинфекция кутикулы этанолом, и погружение стерильного стеклянного кольца на глубину 1-2 мм в среду для выделения. Это может повысить успех выделения (Nyhlén & Unestam, 1980; Oidtmann *с соавт.*, 1999). Было описано добавление теллурида калия во внутреннюю часть стеклянного кольца (Nyhlén & Unestam, 1980).

Инокулированный агар можно инкубировать при температуре от 16 до 24°C. Чашки Петри должны быть закрыты герметизирующей пленкой (например, парафильмом¹), чтобы предотвратить высыхание.

На агаре для выделения рост новых изолятов *A. astaciis* почти полностью происходит внутри агара, за исключением температур ниже 7°C, когда происходит поверхностный рост. Колонии бесцветны. Размеры и внешний вид гиф почти одинаковы в тканях раков и в агаре. Вегетативные гифы являются аseptическими гифами шириной (5)7–9(10) мкм (т.е. обычный диапазон составляет 7–9 мкм, но по результатам наблюдений он варьируется от 5 до 10 мкм). Молодые, активно растущие гифы имеют плотную оболочку в виде крупнозернистой цитоплазмы с многочисленными рефрактивными глобулами (Alderman & Polglase, 1986). Более зрелые гифы имеют вакуолизированную цитоплазму, которая в значительной степени ограничена периферией, оставляя только тонкие нити протоплазмы, образующие связь с крупной центральной вакуолью. Самые старые гифы, по-видимому, лишены содержимого. Гифы сильно ветвятся, вегетативные ответвления часто бывают несколько уже, чем основные гифы на протяжении первых 20–30 мкм роста.

Когда активно растущие талломы или части талломов из бульонной или агаровой культуры переносят в речную воду (природная вода с катионами способствует спорообразованию в большей степени, чем дистиллированная вода), спорангии легко образуются через 20–30 часов при 16°C и 12–15 часов при 20°C. Талломы, перенесенные из бульонной культуры, можно промыть стерильной речной водой в стерильном сите из нержавеющей стали перед переносом в свежую стерильную речную воду для стимулирования спорообразованию. Талломы в агаре следует переносить, вырезая тонкую полоску с поверхности агара, содержащего водяную плесень, таким образом, чтобы перенести минимальное количество агара, содержащего питательные вещества. Следует всегда использовать большой объем стерильной речной воды относительно количества переносимой водяной плесени (100:1). Спорангии являются мицелиоидными, терминальными или интеркалярными, развиваются из недифференцированных вегетативных гиф. Форма спорангий различна: терминальные спорангии простые, они развиваются из новых экстратрикаральных гиф, тогда как интеркалярные спорангии могут иметь довольно сложную форму. Интеркалярные спорангии развиваются путем роста новой латеральной экстратрикаральной ветви, которая образует трубочку спорангия для выброса спор. Цитоплазма данных развивающихся трубочек для выброса спор достаточно плотная, и эти ветви немного шире (10–12 мкм), чем обычные вегетативные гифы. Спорангии имеют одну основную перегородку в случае терминального спорангия и перегородки на обоих концах сегмента в случае интеркалярных спорангий. Такие перегородки заметно толще стенок гиф и имеют высокий рефракционный индекс. Последовательные участки вегетативной гифы могут развиваться в спорангий, и большая часть вегетативного таллома способна перерасти в спорангий.

¹ Ссылка на конкретные коммерческие продукты в качестве примеров не означает, что они одобрены МЭБ. Это относится ко всем коммерческим продуктам, указанным в данном Руководстве по водным животным.

Внутри развивающегося спорангия цитоплазма расщепляется на группы вытянутых компонентов (10–25 × 8 мкм), которые первоначально связаны нитями протоплазмы. Хотя концы этих цитоплазматических единиц становятся закругленными, они остаются удлиненными до и во время выброса. Выброс спор проходит по ахлюидному типу, то есть первая стадия спор представляет собой апланоспору, которая инцистируется у отверстия спорангия и, вероятно, представляет собой недоразвитую сапролегниевую первичную зооспору. Не было обнаружено никаких доказательств существования жгутиковой первичной споры, поэтому в данном описании использовались термины «спорангий», а не «зооспорангий» и «первичная спора», а не «первичная зооспора». Выброс спор проходит быстро (<5 минут), и отдельные первичные споры (= компоненты цитоплазмы) проходят через кончик спорангия и накапливаются вокруг отверстия спорангия. Скорость цитоплазматического расщепления и выброса зависит от температуры. При выходе каждая первичная спора сохраняет свою удлиненную неправильную амебоидную форму незадолго до инцистирования.

Инцистирование характеризуется постепенным округлением с последующим формированием стенки цисты, о чем свидетельствует изменение рефракционного индекса клетки. Период времени от выхода до инцистирования составляет 2–5 минут. Некоторые споры могут отделиться от массы спор на кончике спорангия и инцистироваться отдельно. Формирование стенки первичной цисты происходит быстро, и после инцистирования споры остаются вместе как единая группа и хорошо прилипают к кончику спорангия, так что для разрушения массы спор требуется заметное физическое воздействие.

Инцистированные первичные споры имеют сферическую форму, их диаметр составляет (8)9–11(15) мкм, и они относительно немногочисленны, (8)15–30(40) на спорангий по сравнению с другими видами *Aphanomyces*. Споры остаются инцистированными в течение 8–12 часов. Оптимальная температура для образования спорангиев и выброса спор для большинства европейских изолятов *A. astaci* находится в диапазоне от 16 до 24°C (Alderman & Polglase, 1986). Для некоторых изолятов, особенно из водоемов Испании, оптимальные температуры могут быть более высокими (Dehus *c соавт.*, 1999). Выброс вторичных зооспор из первичных цист достигает максимума при 20°C и не происходит при 24°C. Что касается новых изолятов *A. astaci*, для большинства первичных цист выброс в качестве вторичных зооспор является нормой, хотя это может происходить по-разному в зависимости от старения в длительной лабораторной культуре. Образование спорангиев и выброс спор происходит при температуре до 4°C. *A. astaci* не выживает в культуре при температуре -5°C и ниже в течение более 24 часов, хотя может потребоваться температура -20°C в течение >48 часов в тканях инфицированных раков, а также *A. astaci* не остается жизнеспособным в тканях раков, которые подверглись обычной кулинарной обработке (Alderman, 2000; Oidtmann *c соавт.*, 2002).

Во многих случаях выброс некоторых первичных спор из спорангия не происходит, а многие спорангии вообще не выбрасывают спор. Вместо этого первичные споры, по-видимому, инцистируются *in situ* внутри спорангия, часто приобретают сферическую, а не удлиненную форму и, безусловно, претерпевают те же изменения рефракционного индекса, которые указывают на инцистирование спор вне спорангия. Такое инцистирование внутри спорангия наблюдается у раков. Споры, инцистированные при

таких условиях, по-видимому, способны прорасти, вызывая дальнейший рост гиф.

Вторичные зооспоры выходят через сосочек, сосочек образуется незадолго до выброса спор. Цитоплазма споры медленно, амебоидным образом выходит из узкой поры на кончике сосочка, округляется и начинает легкое раскачивающее движение, когда начинается появление жгутика, и форма споры постепенно изменяется от сферической до почкообразной. Жгутики прикрепляются сбоку (Scott, 1961); зооспоры являются типичными сапролегниевыми вторичными зооспорами размером 8×12 мкм. Активная подвижность появляется в течение приблизительно 5–20 минут (в зависимости от температуры), и вначале зооспоры движутся медленно и хаотично. При температуре от 16 до 20°C зооспоры могут продолжать плавать в течение как минимум 48 часов (Alderman & Polglase, 1986).

Чувствительность и специфичность метода культивирования могут сильно различаться в зависимости от опыта специалиста, проводящего тестирование, но в целом они будут ниже, чем при использовании ПЦР.

Североамериканские виды раков

Выделение *A. astaci* культивированием, согласно методам, описанным для высоко восприимчивых видов, обычно дает неудовлетворительный результат. В настоящее время рекомендуемым методом для выявления инфекции у данных видов является ПЦР.

4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

Отсутствуют.

4.3.1.2.3. Молекулярные методы

Животные

В случае подозрения на вспышку заболевания у высоко восприимчивых видов раков для выделения ДНК рекомендуется отбирать умирающих или недавно погибших (<24 часов) раков. Живых раков можно убить с помощью хлороформа. Если единственными имеющимися животными являются животные, которые умерли за несколько дней до выделения ДНК, их можно протестировать, но отрицательный результат ПЦР следует интерпретировать с осторожностью, поскольку возможно, что произошла деградация ДНК. Можно использовать эндогенные контроли для определения того, произошла ли деградация. Для них рекомендуется использовать ткани хозяина, которые содержат большее количество клеток хозяина по сравнению с кутикулой; сама кутикула содержит очень мало ядер клеток хозяина. Если обстоятельства не позволяют доставить раков в специализированную лабораторию в течение 24 часов, возможна фиксация в 70% этаноле (соотношение этанола к ткани раков $\geq 10:1$), но это может привести к снижению выхода ДНК.

Выделение ДНК

При анализе животных высоко восприимчивых видов, мягкая кутикула на нижней стороне брюшка является рекомендуемой тканью для выделения ДНК. Любое поверхностное загрязнение следует сначала удалить с мягкой кутикулы на нижней стороне брюшка, тщательно протерев кутикулу влажным (с использованием автоклавированной воды) чистым одноразовым бумажным полотенцем. Затем мягкую кутикулу на нижней стороне

брюшка вырезают и измельчают в жидком азоте по 30–50 мг до мелкого порошка с помощью пестика и ступки (можно использовать альтернативные методы измельчения, но перед рутинным использованием их следует сравнить с методом жидкого азота). Для идентификации носителя отбирают и обрабатывают по-отдельности 30-50 мг ткани из мягкой кутикулы на нижней стороне брюшка, а также тельсон и уropоды. ДНК выделяют из измельченной кутикулы, используя метод на основе протеиназы К (например, набор тканей DNeasy; Qiagen, Hilden, Германия; протокол для тканей насекомых), следуя инструкциям производителя (Oidtmann *с соавт.*, 2006) или используя СТАВ (анализ на основе бромид цетилтриметиламмония) (Vrålstad *с соавт.*, 2009). Параллельно с образцами должны тестироваться и отрицательные контроли. В качестве отрицательных контролей могут использоваться ткани креветок.

4.3.1.2.3.1. ПЦР

Было разработано несколько ПЦР-анализов с различными уровнями чувствительности и специфичности. Здесь описаны два анализа, которые обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Оба анализа нацелены на участок ITS (внутренний транскрибируемый спейсер) кластера ядерных рибосомных генов в геноме *A. astaci*. Согласно стандартной процедуре проведения любых диагностических тестов на основе ПЦР, отрицательные контроли должны тестироваться параллельно с образцами, для контроля возможной контаминации. Контрольные образцы из окружающей среды (с использованием, например, ткани креветок, как описано выше) и контроль экстрагирования холостой пробы при выделении ДНК следует использовать параллельно с образцами безматричного контроля ПЦР (матричная ДНК заменяется сверхчистой водой). Образец безматричного контроля ПЦР должен включать контрольный образец ПЦР из окружающей среды, оставленный открытым во время пипетирования образца ДНК.

Метод 1:

В данной традиционной ПЦР используются сайты видоспецифических праймеров, находящиеся в участках ITS1 и ITS2. Прямой праймер (ВО 42) 5'-GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CT-3' и обратный праймер (ВО 640) 5'-СТА-ТСС-ГАС-ТСС-ГСА-ТТС-TG-3'. Реакционная смесь для ПЦР объемом 50 мкл содержит 1 × ПЦР-буфера, 75 мМ Трис/НСl, рН 8,8, 20 мМ [NH₄]₂SO₄, 0,01% (об/об) Твин 20), 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого dATP, dCTP, dTTP и dGTP, 0,5 мкМ каждого праймера и 1,25 единиц ДНК-полимеразы (например, ДНК-полимеразы Thermoprime Plus; AB Gene, Epsom, UK) или эквивалентной Taq-полимеразы и 2 мкл матричной ДНК. Денатурация смеси проводится при 96°C в течение 5 минут, затем 40 циклов амплификации: 1 минута при 96°C, 1 минута при 59°C и 1 минута при 72°C со стадией финальной элонгации в течение 7 минут при 72°C. Амплифицированную ДНК анализируют с помощью электрофореза в агарозном геле. Целевой продукт представляет собой фрагмент размером 569 пар оснований. Подтверждение идентичности ПЦР-продукта рекомендуется проводить с использованием секвенирования. Анализ позволяет последовательно обнаружить до 500 фг геномной ДНК-мишени, что эквивалентно десяти зооспорам, используемым в реакции ПЦР (Tuffs & Oidtmann, 2011).

Метод 2:

Данный анализ представляет собой ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зондов связывания с малой бороздкой (MGB), нацеленную на уникальный мотив последовательности *A. astaci* в участке ITS1 размером 59 пар оснований. Прямой праймер AphAstITS-39F (5'-AAG-GCT-TGT-GCT-GGG-ATG-TT-3'), обратный праймер AphAstITS-97R (5'-CTT-CTT-GCG-AAA-CCT-TCT-GCT-A-3') и TaqMan зонд связывания с малой бороздкой (MGB) AphAstITS-60T (5'-6-FAM-TTC-GGG-ACG-ACC-CMG-BNF-Q-3'), меченный флуоресцентным репортерным красителем FAM на 5'-конце зонда и нефлуоресцентным гасителем (MGBNFQ) на 3'-конце. ПЦР-амплификация в реальном времени выполняется в общем объеме 25 мкл, содержащем 12,5 мкл Master Mix для ПЦР (например, Universal PCR Master Mix или Environmental PCR Master Mix, Applied Biosystems), 0,5 мкМ прямого (AphAstITS-39F) и обратного (AphAstITS-97R) праймера, 0,2 мкМ 200 нМ зонда MGB (AphAstITS-60T), 1,5 мкл сверхчистой воды и 5 мкл матричной ДНК (неразбавленной и разбавленной в 10 раз). Амплификацию и обнаружение выполняют на оптических реакционных планшетах, запечатанных оптической клейкой пленкой или аналогичным материалом на термоцикле в реальном времени. Программа ПЦР включает начальную стадию деконтаминации продолжительностью 2 минуты при 50°C, чтобы обеспечить оптимальную ферментативную активность UNG, затем 10 минут при 95°C для активации ДНК-полимеразы, деактивации UNG и денатурации матричной ДНК, и 50 последовательных циклов по 15 секунд при 95°C и 60 секунд при 58°C. Серии разведений с эталонной ДНК с известным содержанием ДНК необходимо проводить параллельно с образцами.

Абсолютный предел обнаружения данного анализа составил приблизительно 5 копий целевой матрицы, что эквивалентно менее чем одному геному *A. astaci* (Vrålstad *с соавт.*, 2009). В другом исследовании сообщалось о стабильном обнаружении вплоть до 50 фг с использованием данного анализа (Tuffs & Oidtmann, 2011).

Диагностическая чувствительность любого теста в значительной степени зависит от качества отобранных образцов. Если расследуется вспышка заболевания, ожидается, что чувствительность теста у животных, которые погибли от инфекции *A. astaci* не позднее чем за 12 часов до отбора образцов или у живых раков, демонстрирующих явные клинические признаки заболевания, будет высокой. Исследования, направленные на изучение потери чувствительности, вызванной плохим качеством образцов (например, в связи с поздним отбором, обработкой образцов или ненадлежащим хранением образцов), не проводились. Рекомендуется тестировать несколько (5–10) раков, чтобы компенсировать различия в качестве образцов и в местах проникновения патогена.

Было проведено исследование специфичности аналитического теста (Oidtmann *с соавт.*, 2006; Tuffs & Oidtmann, 2011; Vrålstad *с соавт.*, 2009), и перекрестной реакции не наблюдалось. Однако в связи с открытиями новых штаммов *Aphanomyces*, для подтверждения диагноза рекомендуется проводить секвенирование. В случае ПЦР в реальном времени, для этого потребуется отдельная амплификация ПЦР-продукта, либо с использованием праймеров, как описано в методе 1, либо с использованием праймеров ITS1 и ITS4 (см. Раздел «Секвенирование» ниже).

4.3.1.2.3.2. Секвенирование

ПЦР-продукт размером 569 пар оснований можно амплифицировать, используя праймеры BO42 и BO640. Размер ПЦР ампликона проверяют с использованием электрофореза в

агарозном геле и очищают путем вырезания из геля (например, с использованием системы очистки ДНК Freeze n 'Squeeze, Anachem, Luton, Соединенное Королевство). Обе цепи ДНК следует секвенировать с использованием праймеров, применяемых в ходе начальной амплификации. Консенсусная последовательность строится с использованием программного обеспечения для секвенирования и сравнивается с опубликованными последовательностями с использованием программы для обнаружения сходства последовательностей белков путем их локального выравнивания (программа BLAST). Если установлено 100%-ное совпадение между анализируемой последовательностью и опубликованными последовательностями, то амплифицированным продуктом является *A. astaci*. Если 100%-ное совпадение не установлено, дальнейшее секвенирование следует проводить с использованием праймеров ITS-1 (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3') и ITS-4 (5'-TCC- TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3') (White *с соавт.*, 1990), которые генерируют ампликон размером 757 пар оснований, предоставляющий данные о последовательности в том же участке, но удлинённый на обоих концах по сравнению с последовательностью, сгенерированной праймерами BO42 и BO640. Эта удлинённая последовательность должна подтвердить идентичность возбудителя на уровне вида.

Высоко восприимчивые виды

ПЦР (традиционная или в реальном времени) является подходящим методом для расследования предполагаемых вспышек инфекции *A. astaci* (см. Раздел 7.1). Если выполняются условия, на основании которых устанавливается случай подозрения на болезнь, амплификация ПЦР-продукта ожидаемого размера с использованием традиционной ПЦР или ПЦР в реальном времени в качестве подтверждающей диагностики может считаться достаточной, если обнаружен высокий уровень матричной ДНК. Если обнаружены низкие уровни матричной ДНК (слабая амплификация) или образцы исследуются из участка, не отвечающего условиям, на основании которых устанавливается случай подозрения на болезнь, для подтверждения диагноза рекомендуется проводить секвенирование ПЦР-продуктов, генерированных согласно описанию в разделе «Секвенирование».

4.3.1.2.4. Выделение агента

Не применимо.

4.3.2. Серологические методы

Не применимо.

5. Категории тестов в зависимости от их назначения

Методы, имеющиеся в настоящее время для диагностики клинических заболеваний, вызванных инфекцией *Aphanomyces astaci* у высоко восприимчивых видов, перечислены в Таблице 5.1. Методы целевого надзора для демонстрации свободы от инфекции *A. astaci* у высоко восприимчивых видов представлены в Таблице 5.2.

Клиническое заболевание крайне редко встречается у североамериканских раков. Поэтому классификация методов диагностики клинического заболевания у данных видов не приводится. Однако методы целевого надзора для демонстрации свободы от инфекции у североамериканских раков перечислены в Таблице 5.3.

Обозначения, используемые в Таблице: а = метод является рекомендуемым методом по причинам доступности, полезности и диагностической специфичности и чувствительности; b = метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = метод может применяться в некоторых ситуациях, но стоимость, точность или другие факторы строго ограничивают его применение; и d = метод в настоящее время не рекомендуется для данной цели. Это несколько субъективное разделение на категории, поскольку пригодность включает в себя надежность, чувствительность, специфичность и полезность. Хотя не все тесты, относящиеся к категории а или b, прошли формальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и факт того, что они широко применялись без сомнительных результатов, делает их подходящими.

Таблица 5.1. Методы диагностики инфекции *A. astaci* у высоко восприимчивых видов раков

Метод	Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
Макроскопические и микроскопические признаки	b	d
Выделение и культивирование	b	d
Гистопатология	d	d
ПЦР	a	b или a ¹
кПЦР	a	b или a ¹
Секвенирование ПЦР-продуктов	н/п	a
Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	н/п	н/п
Методы на основе антител	н/п	н/п
ДНК зонды <i>in situ</i>	н/п	н/п

ПЦР = полимеразная цепная реакция; кПЦР = количественная ПЦР; ЭМ = электронная микроскопия; н/п = не применимо или нет в наличии; ¹ = см. определение подтвержденного случая болезни в Разделе 7.1

Таблица 5.2. Методы целевого надзора для демонстрации свободы от инфекции *A. astaci* у высоко восприимчивых видов раков

Метод	Метод скрининга	Подтверждающий метод
Исследование макроскопических признаков и смертности	a	c
Микроскопические признаки (влажные препараты)	c	c
Выделение и культивирование	c	b
Гистопатология	d	d
ПЦР	a	b, возможно a ¹
кПЦР	a	b, возможно a ¹
Секвенирование ПЦР-продуктов	н/п	a
Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	н/п	н/п
Методы на основе антител	н/п	н/п
ДНК зонды <i>in situ</i>	н/п	н/п

ПЦР = полимеразная цепная реакция; кПЦР = количественная ПЦР; ЭМ = электронная микроскопия; н/п = не применимо или нет в наличии; ¹ = см. определение подтвержденного случая болезни в Разделе 7.1

Таблица 5.3. Методы целевого надзора для демонстрации свободы от инфекции *A. astaci* у североамериканских видов раков

Метод	Метод скрининга	Подтверждающий метод
Макроскопические и микроскопические признаки	d	d
Выделение и культивирование	c	c
Гистопатология	d	d
ПЦР	a	b
кПЦР	a	b
Секвенирование ПЦР-продуктов	н/п	a
Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	н/п	н/п
Методы на основе антител	н/п	н/п
ДНК зонды <i>in situ</i>	н/п	н/п

ПЦР = полимеразная цепная реакция; кПЦР = количественная ПЦР; ЭМ = электронная микроскопия; н/п = не применимо или нет в наличии

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

6.1. Высоко восприимчивые виды

Фермы по разведению раков, на которых содержатся восприимчивые раки, необходимо инспектировать с периодичностью, указанной в Главе 2.2.0. Отсутствие смертности (сюда не входят потери, связанные с истреблением хищниками) в популяции в течение периода не менее 12 месяцев, в сочетании с отсутствием клинических признаков, а также макроскопической и микроскопической патологии на момент обследования, являются подходящими методами для данной цели. Надзор за популяцией диких раков представляет большие проблемы, особенно там, где данный вид находится под угрозой исчезновения. Поскольку перемещение как рыбы, так и раков из зараженных водоемов представляет риск передачи заболевания, необходим мониторинг статуса популяций раков, чтобы убедиться, что они остаются здоровыми.

На фермах по разведению раков инфекцию *A. astaci* можно заметить относительно быстро в связи быстрым нарастанием смертности в разводимой популяции.

Для проведения целевого надзора рекомендуется проводить регулярные инспекции с отбором образцов, если имеются случаи гибели от заболевания или случаи подозрения на заболевание. Если обнаружены умирающие или погибшие животные, рекомендуется анализировать образцы с помощью ПЦР, а если ПЦР дает положительный результат, ПЦР-продукты, полученные с использованием праймеров 42 и 640 или ITS-1 и ITS -4, должны подвергаться секвенированию, а последовательности должны анализироваться.

6.2. Североамериканские виды раков

Что касается североамериканских видов раков, образцы животных необходимо отбирать и анализировать с помощью одного из описанных выше методов ПЦР. По причинам более высокой чувствительности, ПЦР в реальном времени является рекомендуемым методом. Это относится как к выращенным на ферме, так и к прижившимся ракам, и в программах

надзора необходимо учитывать риски косвенной передачи инфекции в связи с перемещением рыбы.

7. Подтверждающие диагностические критерии

7.1. Определение случая подозрения на болезнь

У высоко восприимчивых видов раков подозрение на инфекцию *A. astaci* возникает, если выполняется как минимум одно из следующих условий:

- i) Если наблюдается высокая смертность только среди высоко восприимчивых видов пресноводных раков, а остальная флора и фауна, особенно другие водные ракообразные, остаются здоровыми.
- ii) Наличие макроскопических и микроскопических признаков, указывающих на инфекцию *A. astaci*.
- iii) Выделение и культивирование водяной плесени, указывающей на принадлежность *A. astaci*.
- iv) Положительный результат ПЦР на *A. astaci*.
- v) Положительный результат ПЦР в реальном времени на *A. astaci*.

Североамериканские виды раков

У североамериканских видов раков подозрение на инфекцию *A. astaci* возникает, если выполняется как минимум одно из следующих условий:

- i) Положительный результат ПЦР на *A. astaci*.
- ii) Положительный результат ПЦР в реальном времени на *A. astaci*.

7.2. Определение подтвержденного случая болезни

У высоко восприимчивых видов раков случай инфекции *A. astaci* следует рассматривать как подтвержденный, если выполняются два или более условий:

- i) Выделение и культивирование водяной плесени, указывающей на принадлежность *A. astaci*.
- ii) Положительный результат ПЦР на *A. astaci*.
- iii) Положительный результат ПЦР в реальном времени на *A. astaci*.
- iv) Секвенированные ПЦР-продукты совпадают с известными последовательностями *A. astaci*.

Если расследуемый случай подозрения на болезнь произошел в стране или зоне, ранее считавшейся свободной от инфекции *A. astaci*, для подтверждения следует провести секвенирование ПЦР-продуктов.

У североамериканских видов раков случай инфекции *A. astaci* следует рассматривать как подтвержденный, если выполняются два или более условий:

- i) Положительный результат ПЦР на *A. astaci*.
- ii) Положительный результат ПЦР в реальном времени на *A. astaci*.
- iii) Секвенированные ПЦР-продукты совпадают с известными последовательностями *A. astaci*.

8. Список литературы

ALDERMAN D.J. (1996). Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Rev sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15** (2), 603–632.

ALDERMAN D.J. (2000). Summary final report: effects of exposure to high and low temperatures on the survival of the crayfish plague fungus *A. astaci* *in vitro* and *in vivo*. Australian Quarantine and Inspection Service, Canberra, Australia.

ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1985). Disinfection for crayfish plague. *Aquac. Res.*, **16**, 203–205.

ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1986). *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *J. Fish Dis.*, **9**, 367–379.

ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L. & FRAYLING M. (1987). *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. *J. Fish Dis.*, **10**, 385–393.

ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L., FRAYLING M. & HOGGER J. (1984). Crayfish plague in Britain. *J. Fish Dis.*, **7**, 401–405.

BENISCH J. (1940). Künstlich hervorgerufener *Aphanomyces* Befall bei Wollhandkrabben. *Zeitschrift fuer Fischerei*, **38**, 71–80.

CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1984a). Chemotaxis in *Aphanomyces astaci*, anarthropod-parasitic fungus. *J. Invertebr. Pathol.*, **43**, 278–281.

CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1984b). Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Exp. Mycol.*, **8**, 370–377.

CERENIUS L., SÖDERHÄLL K., PERSSON M. & AJAXON R. (1988). The crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* – diagnosis, isolation and pathobiology. *Freshw. Crayfish*, **7**, 131–144.

DEHUS P., BOHL E., OIDTMANN B., KELLER M., LECHLEITER S. & PHILLIPSON S.

(1999). German conservation strategies for native crayfish species with regard to alien species. *In: Crustacean Issues 11: Crayfish in Europe as Alien Species (How to Make the Best of a Bad Situation?)* Gherardi F. & Holdich D.M., eds. A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands, 149–160.

DIÉGUEZ URIBEONDO J., HUANG T.S., CERENIUS L. & SODERHÄLL K. (1995). Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycol. Res.*, **99**, 574–578.

EDSMAN L. (2004). The Swedish story about import of live crayfish. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **372–373**, 281–288.

HUANG T.S., CERENIUS L. & SODERHÄLL K. (1994). Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*, **126**, 1–9.

NINNI A.P. (1865). Sulla mortalità dei gambari (*Astacus fluviatilis* L.) nel veneto e più particolarmente nella provincial trevigiana. *Atti Inst. Veneto Ser. III*, **10**, 1203–1209.

NYHLÉN L. & UNESTAM T. (1980). Wound reactions and *Aphanomyces astaci* growth in crayfish cuticle. *J. Invertebr. Pathol.*, **36**, 187–197.

OIDTMANN B., GEIGER S., STEINBAUER P., CULAS A. & HOFFMANN R.W. (2006). Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 53–64.

OIDTMANN B., HEITZ E., ROGERS D. & HOFFMANN R.W. (2002). Transmission of crayfish plague. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 159–167.

OIDTMANN B., SCHMID I., ROGERS D. & HOFFMANN R. (1999). An improved isolation method for the cultivation of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Freshw. Crayfish*, **12**, 303–312.

RAHE R. & SOYLU E. (1989). Identification of the pathogenic fungus causing destruction to Turkish crayfish stocks (*Astacus leptodactylus*). *J. Invertebr. Pathol.*, **54**, 10–15.

SCHRIMPF A., SCHMIDT T. & SCHULZ R. (2014). Invasive Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) transmits crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*). *Aquat. Invasions*, **9**, 203–209.

SCOTT W.W. (1961). A monograph of the genus *Aphanomyces*. *Virginia Agricultural Research Station Technical Bulletin*, **151**, 1–95.

SELIGO A. (1895). Bemerkungen ueber die Krebspest, Wasserpest, Lebensverhaeltnisse des Krebses *Zeitschrift fuer Fischerei und deren Hilfswissenschaften*, **3**, 247–261.

SKURDAL J. & QVENILD T. (1986). Growth, maturity and fecundity of *Astacus astacus* in Lake Steinsfjorden, S.E. Norway. *Freshwater Crayfish*, **6**, 182–186.

- SOUTY-GROSSET C., HOLDICH D.M., NOEL P.Y., REYNOLDS J.D. & HAFFNER P. (2006). Atlas of Crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (Patrimoines naturels, 64), 188 pp.
- STRAND D.A., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H., EDVARDBSEN B., KLAVENESS D., JUSSILA J. & VRÅLSTAD T. (2011). Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 9–17.
- STRAND D.A., JUSSILA J., VILJAMAA-DIRKS S., KOKKO H., MAKKONEN J., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H. & VRÅLSTAD T. (2012). Monitoring the spore dynamics of *Aphanomyces astaci* in the ambient water of latent carrier crayfish. *Vet. Microbiol.*, **160**, 99–107.
- SVENSSON E. & UNESTAM T. (1975). Differential induction of zoospore encystment and germination in *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Physiologia Plantarum*, **35**, 210–216.
- TUFFS S. & OIDTMANN B. (2011). A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **153** (3–4), 343–353.
- UNESTAM T. (1966). Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. II. Factors affecting zoospores and zoospore production. *Physiologia Plantarum*, **19**, 1110–1119.
- UNESTAM T. (1969a). On the adaptation of *Aphanomyces astaci* as a parasite. *Physiologia Plantarum*, **22**, 221–235.
- UNESTAM T. (1969b). Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. *Report Institute Freshw. Res. Drottningholm*, **49**, 202–206.
- UNESTAM T. (1976). Defence reactions in and susceptibility of Australian and New Guinean freshwater crayfish to European-crayfish-plague fungus. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **53**, 349–359.
- UNESTAM T. & SÖDERHÄLL K. (1977). Specialisation in crayfish defence and fungal aggressiveness upon crayfish plague infection. *Freshw. Crayfish*, **3**, 321–331.
- UNESTAM T. & WEISS D.W. (1970). The host-parasite relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: responses to infection by a susceptible and a resistant species. *J. Gen. Microbiol.*, **60**, 77–90.
- VILJAMAA-DIRKS S. & HEINIKAINEN S. (2006). Improved detection of crayfish plague with a modified isolation method. *Freshw. Crayfish*, **15**, 376–382.
- VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S., NIEMINEN M., VENNERSTRÖM P. & PELKONEN S. (2011). Persistent infection by crayfish plague *Aphanomyces astaci* in a noble crayfish population – a case report. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* (in press).

VRÅLSTAD T., JOHNSEN S.I., FRISTAD R., EDSMAN L. & STRAND D.A. (2011). Potent infection reservoir of crayfish plague now permanently established in Norway. *Dis. Aquat. Org.*, **97**, 75–83.

VRÅLSTAD T., KNUTSEN A.K., TENGS T. & HOLST-JENSEN A. (2009). A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **137**, 146–155.

WHITE T.J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds Academic Press, San Diego, California, USA, 315–322.

*

* *

NB: Имеются Референтные лаборатории МЭБ по диагностике инфекции *Aphanomyces astaci* (см. Таблицу в конце данного *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения дальнейшей информации по инфекции *Aphanomyces astaci* (чума раков) свяжитесь с Референтными лабораториями МЭБ.

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 1995 ГОДУ; ПОСЛЕДНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2017 ГОДУ.