

## ИНФИЦИРОВАНИЕ *GYRODACTYLUS SALARIS*

---

### 1. Предмет рассмотрения

Инфицирование *Gyrodactylus salaris* означает заражение патогенным возбудителем *Gyrodactylus salaris* (*G. salaris*), относящимся к роду *Gyrodactylus*, семейству *Gyrodactylidae*.

### 2. Информация о болезни

#### 2.1. Патогенные факторы

##### 2.1.1. Этиологический агент, штаммы возбудителя

Несколько штаммов или клад *Gyrodactylus salaris* были идентифицированы на основе генотипирования с использованием маркера митохондриальной цитохромоксидазы 1 (CO1) (Hansen и соавт., 2003; Hansen и соавт., 2007b; Meinilä и соавт., 2002; Meinilä и соавт., 2004). Хотя, по-видимому, не существует какого-либо соответствия между штаммами, идентифицированными по CO1 и патогенности (Hansen и соавт., 2007a), все штаммы, выделенные от атлантического лосося, которые были изучены в лабораторных экспериментах, до сих пор являются высокопатогенными для штаммов атлантического лосося. Штаммы, непатогенные для лосося, были выделены из неадромального арктического гольца (*Salvelinus alpinus*) в Норвегии (Olstad и соавт., 2007a; Robertsen и соавт., 2007) и из радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) в Дании (Jørgensen и соавт., 2007; Lindenstrøm и соавт., 2003).

##### 2.1.2. Выживаемость вне хозяина

Выживаемость отдельных паразитов зависит от температуры, например, в течение около 24 часов при температуре 19°C, 54 часа при температуре 13°C, 96 часов при температуре 7°C и 132 часа при температуре 3°C (Olstad и соавт., 2006). Аналогичным образом, выживаемость на погибшем хозяине зависит от температуры: максимальное время выживания *G. salaris* на мертвом атлантическом лососе составляет 72, 142 и 365 часов при 18, 12 и 3°C соответственно (Olstad и соавт., 2006).

##### 2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Известно, что *Gyrodactylus salaris* выживает при температуре от 0 до 25°C. Уровень толерантности к температуре выше 25°C неизвестен. Неустойчив к заморозанию. *Gyrodactylus salaris* чувствителен к высыханию. *Gyrodactylus salaris* погибает через несколько дней при pH ≤ 5. Он более чувствителен к низкому уровню pH (5,1 < pH < 6,4) в сочетании с алюминием и цинком, чем атлантический лосось-хозяин (Poléo и соавт., 2004; Soleng и соавт., 1999) (см. также раздел 2.4.2).

#### **2.1.4. Жизненный цикл**

*Gyrodactylus salaris* является облигатным паразитом с прямым жизненным циклом. Паразиты рожают живое потомство, другие стадии жизненного цикла отсутствуют.

### **2.2. Факторы, связанные с хозяином**

#### **2.2.1. Восприимчивые виды хозяев**

Виды, которые соответствуют критериям для включения в список вида, восприимчивого к заражению *G. salaris*, в соответствии с главой 1.5. *Кодекса здоровья водных животных (Водный кодекс)*,<sup>0</sup> включают: арктический голец (*Salvelinus alpinus*), атлантический лосось (*Salmo salar*), кумжа (*Salmo trutta*), хариус (*Thymallus thymallus*), североамериканская ручьевая форель (*Salvelinus fontinalis*) и радужная форель/микижа (*Oncorhynchus mykiss*).

#### **2.2.2. Виды с неполным доказательством восприимчивости**

Виды, по которым имеются неполные доказательства соответствия критериям для включения в список как восприимчивых к заражению *G. salaris* согласно главе 1.5. *Водного кодекса*, включают в себя: неизвестно.

Кроме того, результаты патоген-специфической положительной полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволили идентифицировать *G. salaris* на следующих организмах, но длительная активная инфекция не была продемонстрирована: [В стадии изучения].

#### **2.2.3. Восприимчивые стадии развития хозяина**

Все стадии развития хозяина восприимчивы, но смертность наблюдалась только на стадии мальков и молоди.

#### **2.2.4. Видовая или субпопуляционная предрасположенность (вероятность обнаружения)**

Не применимо.

#### **2.2.5. Органы-мишени и инфицированные ткани**

*Gyrodactylus salaris* обычно встречается на плавниках зараженного атлантического лосося, но распределение паразитов на хозяине может варьироваться в зависимости от интенсивности инфекции (Jensen & Johnsen, 1992; Мо, 1992). Паразиты также часто встречаются на теле и, реже, на жабрах. На других хозяевах распределение может отличаться, но в целом паразит относительно менее распространен на плавниках и относительно более распространен на теле по сравнению с атлантическим лососем.

#### **2.2.6. Персистентная инфекция**

Не применимо.

## 2.2.7. Векторы

Не применимо.

## 2.3. Паттерн болезни

### 2.3.1. Механизмы передачи

*Gyrodactylus salaris* распространился в реки и на фермы в основном за счет перемещения живой рыбы. Рыба, мигрирующая в солоноватой воде, также может способствовать распространению паразита между реками (см. также раздел 2.3.5). Популяции, обитающие вблизи зараженных рек, подвергаются большому риску заражения, если они находятся в одной и той же солоноватой водной системе. В случае заноса *G. salaris* на ферму с атлантическим лососем существует высокая вероятность заражения всей рыбы на ферме, в зависимости от схемы организации фермы.

### 2.3.2. Превалентность

Превалентность у молоди восприимчивых линий атлантического лосося в реках достигает почти 100% (Appleby & Mo, 1997; Johnsen & Jensen, 1991); аналогичным образом превалентность разводимого на ферме атлантического лосося (в пресной воде) повышается почти до 100% в течение короткого времени после заноса паразита. Превалентность резистентных линий в реках и на фермах неизвестна. Превалентность среди других восприимчивых видов обычно намного ниже, и может быть менее 10% (например, у разводимой на ферме радужной форели; Buchmann & Bresciani, 1997).

### 2.3.3. Географическое распределение

Распределение *Gyrodactylus salaris* ограничивается территорией Европы. Возбудитель был выделен из разводимого на ферме атлантического лосося или радужной форели в нескольких (главным образом, северных) европейских странах. В дикой природе паразит был обнаружен на диких лососевых, в основном, на атлантическом лососе в реках России, Швеции и Норвегии. Инфекция *G. salaris* чаще, чем это считалось ранее, встречается у разводимой на ферме радужной форели, и, вероятно, инфекция будет присутствовать в большем количестве стран, чем это известно в настоящее время. В 2006 году было зарегистрировано заражение *G. salaris* на рыбных фермах в Италии (Paladini и соавт., 2009), а в 2007 году - на рыбных фермах в Польше (Rokicka и соавт., 2007) и Македонии (Zietara и соавт., 2007). В 2009 г. Референтной лабораторией МЭБ был идентифицирован *G. salaris* в рыбоводческих хозяйствах в Румынии. Было продемонстрировано, что в Великобритании и Ирландии паразит отсутствовал.

### 2.3.4. Смертность и заболеваемость

Смертность среди мальков и молоди разводимого на ферме атлантического лосося может достигать 100% при отсутствии лечения. Смертность среди мальков и молоди дикого атлантического лосося в норвежских реках может достигать 98%, в среднем около 85%. Смертность у других восприимчивых видов хозяев обычно низкая или не наблюдается.

### **2.3.5. Факторы окружающей среды**

Хотя *G. salaris* в основном обитает в пресной воде, он легко размножается при уровне солености воды до 5-6 ppt (частей на триллион). Выживание при более высоком уровне солености зависит от температуры. Например, при температуре 1,4°C *G. salaris* может выживать в течение 240 часов, 78 часов и 42 часов при солености 10 ppt, 15 ppt и 20 ppt соответственно, тогда как при 12°C он может выживать в течение 72 часов, 24 часов и 12 часов при этих же уровнях солености, соответственно (Soleng & Bakke, 1997).

## **2.4. Контроль и предупреждение**

### **2.4.1. Вакцинация**

Вакцины отсутствуют.

### **2.4.2. Химиотерапия**

*Gyrodactylus salaris* чувствителен к изменениям химического состава воды. Он чувствителен к наиболее часто используемым химическим веществам для обработки емкостей для разводимых на ферме лососевых и их икры (например, соленая вода с высокой минерализацией, формальдегид и соединения, содержащие хлор и йод). Кроме того, *G. salaris* чувствителен к кислым растворам (pH 5,0–6,0) сульфата алюминия ( $[Al_2(SO_4)_3]$ ) (Soleng и соавт., 1999). Поскольку сульфат алюминия менее токсичен для рыб в умеренно подкисленных водах, чем *G. salaris*, это химическое вещество использовалось при попытках ликвидации паразита в речных системах Норвегии.

### **2.4.3. Иммуностимуляция**

Иммуностимуляция отсутствует.

### **2.4.4. Разведение резистентных популяций**

В лабораторных экспериментах селективное разведение привело к увеличению выживаемости у потомства (Salte и соавт., 2010). Тем не менее, селективное разведение не применялось к поголовью дикого лосося, главным образом потому, что поголовье будет оставаться зараженным и, следовательно, паразит сможет распространиться в другие реки.

### **2.4.5. Восполнение поголовья резистентными видами**

Восполнение поголовья резистентными штаммами атлантического лосося (например, штамм Балтийская Нева) в зараженных реках несовместимо с существующей системой управления штаммами атлантического лосося.

### **2.4.6. Блокирующие агенты**

Не применимо.

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

Икра, которая переносится с зараженных ферм, должна быть продезинфицирована (с использованием йодсодержащих соединений).

#### **2.4.8. Основы практики рыбоводства**

Общие рекомендуемые практики рыбоводства в целях предотвращения распространения инфекционных возбудителей между подразделениями в пресноводных рыбохозяйствах применимы к *G. salaris*. Оборудование (например, рыболовные сети), используемые в одном подразделении, не должны использоваться в другом подразделении без надлежащей дезинфекции.

### **3. Отбор образцов**

#### **3.1. Отбор индивидуальных образцов**

В тех случаях, когда производится отбор проб, и подозрение на инфекцию отсутствует, должна осуществляться случайная выборка с достаточным количеством рыбы, например, из реки. В хозяйствах отбирают рыбу, если у нее наблюдаются клинические признаки инфекции (как описано в разделе 4.1.1).

#### **3.2. Консервация образцов для передачи**

Рыбу подвергают умерщвлению и не допускают ее высыхания перед консервацией. Целую рыбу следует хранить в 80–100% этаноле во флаконах, достаточно больших, чтобы обеспечить дополнительное пространство для консерванта. Концентрация этанола после консервации не должна быть ниже 70%. Как правило, эта концентрация обеспечивается в случае, если соотношение рыбы к этанолу не превышает 1:9. Более низкая концентрация может вызвать распад слизистой ткани и эпидермиса, и выпадение образцов *Gyrodactylus*, даже если они подвергнуты консервации. Флаконы должны иметь достаточно широкое отверстие, чтобы избежать соскабливания с образцов *Gyrodactylus*, когда рыбу помещают во флакон или вынимают для исследования. Флаконы следует хранить в горизонтальном положении до тех пор, пока не будет достигнута фиксация/консервация ткани для предотвращения скручивания рыбы. Это облегчает осмотр рыбы, поскольку ее можно легко повернуть с помощью щипцов под микроскопом. После того, как консервация рыбы завершена, флаконы можно хранить в вертикальном положении.

Поскольку *G. salaris* характерен для плавников атлантического лосося, также могут быть использованы плавники, отрезанные от тела и хранящиеся в этаноле, как описано выше. Это особенно удобно для крупной рыбы и в полевых условиях, когда, например, транспортировка ограничена.

#### **3.3. Объединение образцов**

Образцы могут быть объединены, однако каждую рыбу впоследствии исследуют и анализируют отдельно. Плавники рыбы, полученной из хозяйства или выловленной из реки, можно объединить, а также исследовать и анализировать отдельно, но в этом случае каждый плавник не может быть соотнесен с определенной рыбой-хозяином.

### **3.4. Наиболее подходящие для исследования органы или ткани**

Для исследования подходит рыба в виде живых целых образцов, либо в живом виде под действием анестезии (например, с MS222), либо недавно умерщвленные, либо в консервированном виде. Кроме того, могут быть подвергнуты исследованию свежие или консервированные плавники. Во всех случаях используется один и тот же метод исследования (см. Раздел 4.3.1). Обследование живой анестезированной рыбы является очень трудоемким и не рекомендуется.

Вместо исследования всей рыбы можно проверить плавники (используя метод, описанный в разделе 4.3.1). В случае заражения молоди норвежского лосося, почти у всех рыб имеется хотя бы один *G. salaris* на одном из плавников. У некоторых рыб образцы *G. salaris* могут появляться на теле или голове, включая ноздри, жабры и полость рта. Распределение *G. salaris* на плавниках и других частях рыбы варьируется в зависимости от вида рыбы и, по-видимому, зависит от линии лососевых.

### **3.5. Не подходящие для исследования образцы/ткани**

Мертвая рыба, хранящаяся на льду, неприемлема для исследования на *Gyrodactylus*, даже если рыба хранится отдельно в полиэтиленовых пакетах и т. д. Паразиты быстро умирают, если не покрыты водой, и поскольку эти паразиты не имеют экзоскелета, мертвые паразиты быстро распадаются. Если такую мертвую рыбу промыть в воде, в осадке могут быть обнаружены образцы *Gyrodactylus*. Однако, если образцы не найдены в осадке, нельзя сделать вывод, что рыба не была заражена. Образцы *Gyrodactylus*, фиксированные в формальдегиде, трудно идентифицировать морфологически, и они не подходят для анализа ДНК.

## **4. Диагностические методы**

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

#### **4.1.1. Клинические признаки**

Обычно у рыб, имеющих одного или до нескольких десятков образцов паразитов, отсутствуют клинические признаки.

На ранней стадии болезни характерно усиленное свечение (рыба травмирует кожу о субстрат). Позже, рыба может приобрести сероватый цвет из-за увеличенного производства слизи, и плавники могут быть разрушены. Больные рыбы – вялые, и обычно находятся в стоячей воде.

#### **4.1.2. Изменения в поведении**

Признак свечения распространен среди умеренно или сильно зараженных рыб, выращенных на ферме, так как они травмируют кожу о дно или стенки емкости или пруда. Рыба со значительной степенью инфицирования может иметь пониженную активность и оставаться в водах с несильным течением.

## **4.2. Клинические методы**

### **4.2.1. Макропатология**

Сильно зараженная рыба может стать серовой в результате повышенного образования слизи, а на более поздней стадии спинные и грудные плавники могут стать белесыми в результате утолщения (главным образом гипертрофии) эпидермиса.

Сильно зараженная рыба может иметь разрушенные плавники, особенно спинные, хвостовые и грудные, вследствие питания паразитов.

У рыб с инфекцией *G. salaris* обычно наблюдаются вторичные грибковые инфекции (*Saprolegnia* spp.).

### **4.2.2. Клиническая химия**

Не применимо.

### **4.2.3. Микроскопические патологические изменения**

Не применимо.

### **4.2.4. Влажные препараты**

Соскобы (влажные препараты) с кожи или плавников могут быть использованы для обнаружения образцов *Gyrodactylus* на зараженной рыбе. В этих случаях при высокой интенсивности заражения сотни или тысячи образцов *Gyrodactylus* присутствуют по всему телу и плавникам. Влажные препараты обычно не подходят для идентификации *Gyrodactylus* до уровня вида, и должны быть приготовлены другие препараты для морфологического анализа или анализа ДНК (см. ниже). Если количество образцов *Gyrodactylus* небольшое, вероятность обнаружения паразитов при использовании соскобов ограничена.

### **4.2.5. Мазки**

Не применимо.

### **4.2.6. Фиксированные срезы**

Не применимо.

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

Не применимо.

## **4.3. Обнаружение возбудителя и методы идентификации**

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

Обнаружение *Gyrodactylus* и идентификация *G. salaris* является двухэтапным процессом. Во-первых, образцы паразитов осматривают с помощью оптического оборудования, а во-вторых, паразиты идентифицируются, как правило, индивидуально с использованием другого оборудования и методов.

Для обнаружения *Gyrodactylus* необходимо использовать оптическое оборудование. В случае подозрения на вспышку инфекции *G. salaris*, где доступна только световая микроскопия, для обнаружения образцов *Gyrodactylus* можно использовать влажные препараты. Тем не менее, настоятельно рекомендуется не использовать этот метод в программе эпиднадзора, поскольку предполагаемая специфичность и чувствительность являются низкими (значение не известно), и, следовательно, количество изученных рыб является высоким.

Для исследования подходит рыба в виде живых целых образцов (под действием анестезии), либо недавно умерщвленная или подвергшаяся консервации. Во всех случаях используется один и тот же метод исследования (см. ниже). Исследование живой анестезированной рыбы очень трудоемко и не рекомендуется. Образцы *Gyrodactylus*, фиксированные в формальдегиде, также очень трудно идентифицировать, и они не подходят для анализа ДНК. Вместо того, чтобы исследовать целую рыбу, можно проверить плавники (методом, описанным ниже). В случае заражения молоди восприимчивых линий атлантического лосося, почти у всех рыб на одном из плавников имеется хотя бы один *G. salaris*. У некоторых рыб могут встречаться образцы *G. salaris* на теле или голове, включая ноздри, жабры и полость рта. Распределение *G. salaris* на плавниках и других частях рыбы отличается в зависимости от видов рыб, и распределение, по-видимому, также зависит от линии лососевых.

Живую анестезированную рыбу, свежесрезанные плавники или законсервированную в этаноле рыбу или плавники следует исследовать под бинокулярным препаративным микроскопом с мощной подсветкой. Рыбу помещают в контейнер и полностью покрывают пресной водой. Консервированная рыба также может быть исследована в этаноле. Живые паразиты легче обнаруживаются по их движениям, поэтому следует избегать нарушения преломления света на коже рыбы. Живые *Gyrodactylus* бесцветны, в то время как образцы *Gyrodactylus*, сохраненные в этаноле, обычно только слегка непрозрачны. Если препаративный микроскоп имеет верхнюю подсветку, нижняя часть столика микроскопа должна быть черной. Это увеличит контрастность, и паразитов будет легче обнаружить. Должна быть исследована вся поверхность рыбы, включая жабры и полость рта. Для этого процесса лучше всего использовать два пинцета. Плавники относительно мелких рыб (менее 10 см) также можно исследовать с помощью подсветки через дно микроскопа. Таким образом, на плавниках обычно можно легко обнаружить образцы *Gyrodactylus*.

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

Идентификация видов *Gyrodactylus* основана на морфологии и морфометрии маргинальных крючков-якорей (*hamuli*) и перегородок в опистапторе (органе прикрепления). Хорошая подготовка образцов является необходимым условием для идентификации видов.

Расщепление мягких тканей, с сохранением только твердых частей,

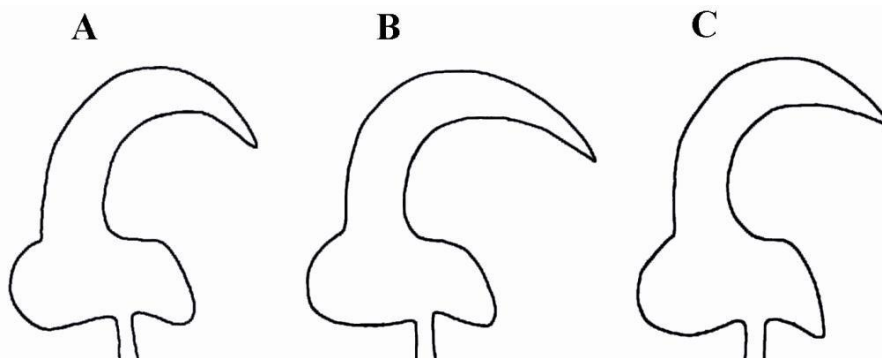


рекомендуется в случае, когда для надежной морфометрической диагностики необходима морфометрия с высоким разрешением. Мягкие ткани можно расщеплять в растворе (около 1 мкл) с содержанием 75 мМ Трис, 10 мМ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), 5% SDS (додecilсульфат натрия) и 100 мг мл<sup>-1</sup> протеиназы К, рН 8,0. После добавления раствора для расщепления реакцию необходимо проверить в микроскопе до завершения, а затем закончить добавлением стоп-раствора (1:1 глицерина и 10% нейтрального забуференного формалина). Процедура расщепления подробно описана Harris и соавт., 1999. Идентификация *G. salaris* осуществляется в соответствии со следующими источниками: Cunningham и соавт., 2001; Malmberg, 1957; Malmberg, 1970; McNugh и соавт., 2000; Olstad и соавт., 2007b; Shinn и соавт., 2004.

Размер опистапоральных твердых частей у *Gyrodactylus* сильно варьируется, например, в зависимости от температуры, тогда как форма более стабильна (Mo, 1991a; Mo, 1991b; Mo, 1991c). Поэтому возможности использования линейных измерений для определения морфологии может не всегда быть достаточно для установления достоверного диагноза (Olstad и соавт., 2007b).

*Gyrodactylus salaris* морфологически схож с *G. Teuchis*, выделенным от коричневой форели, атлантического лосося и радужной форели, а также с *G. Thymalli*, выделенным от хариуса (рис. 1). Дифференциация видов может быть осуществлена обученными морфологами с учетом формы серпа маргинального крючка. *Gyrodactylus teuchis* имеет более длинный и более изогнутый серповидный клинок, в то время как *G. thymalli* имеет небольшой угол изгиба серпа (Cunningham и соавт., 2001; McNugh и соавт., 2000; Shinn и соавт., 2004).

**Рис. 1.** Маргинальные крючки (А) *Gyrodactylus salaris*, (В) *G. teuchis* и (С) *G. thymalli*.  
Рисунки выполнены в соответствии с Cunningham и соавт., 2001.



#### 4.3.1.1.1. Влажные препараты

Не применимо.

#### 4.3.1.1.2. Мазки

Не применимо.

#### 4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

Не применимо.

#### 4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

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

Не применимо.

##### 4.3.1.2.2. Методы на основе антител для обнаружения антигенов

Не применимо.

##### 4.3.1.2.3. Молекулярные методы

###### 4.3.1.2.3.1. Подготовка образцов

ДНК-матрица должна быть приготовлена из живых/свежих или консервированных этанолом образцов с использованием соответствующего протокола приготовления ДНК. Могут быть использованы наборы для извлечения ДНК в соответствии с инструкциями производителей.

###### 4.3.1.2.3.2. Анализ внутренней транскрибируемой спейсерной области гена рибосомной РНК

###### 4.3.1.2.3.2.1. Амплификация методом полимеразной цепной реакции (ПЦР-амплификация) внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS)

Для амплификации продукта длиной 1300 пар нуклеотидов на ITS-участке могут быть использованы такие праймеры, как 5'-TTT-CCG-TAG-GTG-AAC-ST-3' и 5'-TCC-TCC-GCT-TAG-TGA-TA -3'.

Условия циклирования для ПЦР являются следующими: начальная денатурация при температуре 95 °С в течение 5 минут; 30 циклов при температуре 94°С в течение 1 минуты, 50°С в течение 1 минуты, 72°С в течение 2 минут; окончательная экстензия при 72 °С в течение 7 минут (Cunningham, 1997). При анализе частично расщепленного материала, спейсеры ITS1 и ITS2 могут быть амплифицированы в двух отдельных реакциях, используя наборы праймеров и соблюдая условия ПЦР, описанные в Matejusová и соавт., 2001.

###### 4.3.1.2.3.2.2. Секвенирование и анализ последовательностей ITS

Амплифицированные фрагменты ITS, подготовленные, как описано выше в разделе 4.3.1.2.3.2.1, должны быть секвенированы, и последовательности должны быть подвергнуты анализу с помощью поиска BLAST в базе данных GenBank/EMBL для установления сходства с известными последовательностями. В дополнение к праймерам для ПЦР следует использовать как минимум два внутренних праймера, таких как 5'-ATT-TGC-GTT-CGA-GAG-ACC-G и 5'-TGG-TGG-ATC-ACT-CGG-CTC-A (Zietara & Lumme, 2003). Несколько последовательностей других видов, заражающих лососевых, например, *G. derjavini*, *G. derjavinoides*, *G. truttae*, *G. teuchis* и *G. thymalli* доступны в GenBank/EMBL. *Gyrodactylus salaris* и *G. thymalli* не могут быть дифференцированы этим методом, но последовательности ITS отличают *G. salaris* и *G. thymalli* от всех других известных видов.

#### 4.3.1.2.3.3. Анализ митохондриального гена цитохромоксидазы I

##### 4.3.1.2.3.3.1. ПЦР-амплификация митохондриального гена цитохромоксидазы I (CO1)

Для амплификации гена CO1 можно использовать праймеры 5'-ТАА-ТСГ-GCG-GGT-ТСГ-GТА-А-3' и 5'-GAA-ССА-TGT-АТС-GTG-TAG-СА-3') (Meinilä и соавт., 2002). Условия циклирования для ПЦР являются следующими: начальная денатурация при температуре 95°C в течение 5 минут; 35 циклов при температуре 95°C в течение 1 минуты, 50°C в течение 1 минуты, 72°C в течение 2 минут; окончательная экстензия при 72°C в течение 7 минут. Дополнительные наборы праймеров для амплификации CO1 можно найти в следующих источниках: Meinilä и соавт., 2002; Meinilä и соавт., 2004.

##### 4.3.1.2.3.3.2. Секвенирование и анализ последовательностей CO1

Амплифицированные фрагменты CO1, полученные, как описано выше, подвергаются секвенированию и сравнению с другими последовательностями, используя поиск BLAST в базе данных GenBank/EMBL. В дополнение к праймерам для ПЦР, могут быть использованы по меньшей мере два внутренних праймера, такие как 5'-ССА-ААГ-ААС-САА-ААТ-ААГ-TGT-TG-3' и 5'-TGT-СУС-ТАС -САГ-TGC-TAG-ССГ-СТГ-G-3' (Hansen и соавт., 2003).

Если полученная последовательность не имеет 100% соответствия в GenBank / EMBL, необходимо провести филогенетический анализ, чтобы установить сходство с другими доступными последовательностями. Данный метод может быть использован для того, чтобы различить разные клады *G. salaris* и *G. thymalli*.

**ПРИМЕЧАНИЕ.** С помощью последовательностей CO1 нельзя однозначно дифференцировать *G. salaris* и *G. thymalli*, но они могут быть использованы для отнесения образцов к соответствующей кладе. За некоторыми исключениями, клады *G. salaris* и *G. thymalli* в целом хорошо соответствуют предпочтениям хозяина и/или географическому распределению паразитов.

Обратите внимание, что некоторые исследователи решили представить все свои последовательности, полученные как от атлантического лосося, так и от хариуса в качестве *G. salaris*, что вызывает путаницу при сравнении последовательностей (как ITS, так и CO1) с последовательностями в GenBank/EMBL при осуществлении поиска BLAST. Таким образом, всегда следует проверять идентичность последовательностей в GenBank/EMBL.

Если последовательность нельзя отнести ни к одной из признанных клад *G. salaris* или *G. thymalli*, следует обратиться за консультацией в Референтную лабораторию МЭБ.

#### 4.3.1.2.4. Очистка возбудителя

Не применимо.

#### 4.3.2. Серологические методы

Не применимо.

#### 5. Классификация тестов по назначению

Не применимо.

#### 6. Тест (ы), рекомендованные для целевого надзора с целью объявления свободы от инфекции *Gyrodactylus salaris*

Методы диагностики/обнаружения для объявления свободы аналогичны указанным в разделе 4.3.

#### 7. Подтверждающие диагностические критерии

##### 7.1. Определение случаев с подозрением на инфекцию

Наблюдение за образцами *Gyrodactylus* у атлантического лосося или радужной форели (или других восприимчивых хозяев) либо при исследовании соскобов кожи под световым микроскопом, либо плавников или кожи, изученных под стереомикроскопом.

##### 7.2. Определение подтвержденных случаев

Заражение *G. salaris* должно быть подтверждено при условии соответствия следующим критериям:

i) Морфология соответствует *G. salaris*;

или

ii) Молекулярная идентификация образца(ов) *Gyrodactylus* относительно *G. salaris* (или *G. thymalli*) путем секвенирования ITS с последующим секвенированием и филогенетическим анализом CO1 для отнесения последовательности к ближайшему известному родственнику является предпочтительной.

#### 8. Список литературы

APPLEBY C. & MO T.A. (1997). Population Dynamics of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea) Infecting Atlantic Salmon, *Salmo salar*, Parr in the River Batnfjordselva, Norway. *J. Parasitol.*, **83**, 23–30.

BAKKE T.A., HARRIS P.D. & CABLE J. (2002). Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. *Int. J. Parasitol.*, **32**, 281–308.

- BAKKE T.A., HARRIS P.D., HANSEN H., CABLE J. & HANSEN L.P. (2004). Susceptibility of Baltic and East Atlantic salmon *Salmo salar* stocks to *Gyrodactylus salaris* (Monogenea). *Dis. Aquat. Org.*, **58**, 171–177.
- BUCHMANN K. & BRESCIANI J. (1997). Parasitic infections in pond-reared rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Denmark. *Dis. Aquat. Org.*, **28**, 125–138.
- CUNNINGHAM C.O. (1997). Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea: *Gyrodactylidae*) ribosomal RNA genes. *J. Parasitol.*, **83**, 215–219.
- CUNNINGHAM C.O., MO T.A., COLLINS C.M., BUCHMANN K., THIERY R., BLANC G. & LAUTRAITE A. (2001). Redescription of *Gyrodactylus teuchis* Lutraite, Blanc, Thiery, Daniel & Vigneulle, 1999 (Monogenea: *Gyrodactylidae*), a species identified by ribosomal RNA sequence. *Syst. Parasitol.*, **48**, 141–150.
- HANSEN H., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2003). Mitochondrial DNA variation of *Gyrodactylus* spp. (Monogenea, *Gyrodactylidae*) populations infecting Atlantic salmon, grayling, and rainbow trout in Norway and Sweden. *Int. J. Parasitol.*, **33**, 1471–1478.
- HANSEN H., BAKKE T.A. & BACHMANN L. (2007a). DNA taxonomy and barcoding of monogenean parasites: lessons from *Gyrodactylus*. *Trends Parasitol.*, **23** (8), 363–367.
- HANSEN H., BAKKE T.A. & BACHMANN L. (2007b). Mitochondrial haplotype diversity of *Gyrodactylus thymalli* (Platyhelminthes; Monogenea): extended geographic sampling in United Kingdom, Poland, and Norway reveals further lineages. *Parasitol. Res.*, **100**, 1389–1394.
- HARRIS P.D., CABLE J., TINSLEY R.C. & LAZARUS C.M. (1999). Combined ribosomal DNA and morphological analysis of individual gyrodactylid monogeneans. *J. Parasitol.*, **85**, 188–191.
- JENSEN A.J. & JOHNSEN B.O. (1992). Site Specificity of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea) on Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) in the River Lakselva, northern Norway. *Can. J. Zool.*, **41**, 264–267.
- JOHNSEN B.O. & JENSEN A.J. (1991). The *Gyrodactylus* story in Norway. *Aquaculture*, **98**, 289–302.
- JØRGENSEN T.R., LARSEN T.B., JØRGENSEN L.G., BRESCIANI J., KANIA P. & BUCHMANN K. (2007). Characterisation of a low pathogenic strain of *Gyrodactylus salaris* from rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 235–244.
- LINDENSTRØM T., COLLINS C.M., BRESCIANI J., CUNNINGHAM C.O. & BUCHMANN K. (2003). Characterization of a *Gyrodactylus salaris* variant: infection biology, morphology and molecular genetics. *Parasitology*, **127**, 165–177.
- MALMBERG G. (1957). Om förekomsten av *Gyrodactylus* på svenska fiskar. *Skr. söd. Sver. Fisk För.* (Årsskr., 1956), 19–76. (In Swedish, species descriptions and summary in English).
- MALMBERG G. (1970). The excretory systems and the marginal hooks as a basis for the systematics of *Gyrodactylus*

(Trematoda, Monogenea). *Ark. Zool. [Ser. 2]*, **23**, 1–235.

MATEJUSOVÁ I., GELNAR M., MCBEATH A.J.A., COLLINS C.M. & CUNNINGHAM C.O. (2001). Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five fish families (Teleostei). *Int. J. Parasitol.*, **31**, 738–745.

MCHUGH E.S., SHINN A.P. & KAY J.W. (2000). Discrimination of the notifiable pathogen *Gyrodactylus salaris* from *G. thymalli* (Monogenea) using statistical classifiers applied to morphometric data. *Parasitology*, **121**, 315–323.

MEINILÄ M., KUUSELA J., ZIETARA M. & LUMME J. (2002). Primers for amplifying approximately 820 bp of highly polymorphic mitochondrial COI gene of *Gyrodactylus salaris*. *Hereditas*, **137**, 72–74.

MEINILÄ M., KUUSELA J., ZIETARA M.S. & LUMME J. (2004). Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Int. J. Parasitol.*, **34**, 515–526.

MO T.A. (1991a). Seasonal variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on parr of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in the River Batnfjordselva, Norway. *Syst. Parasitol.*, **19**, 231–240.

MO T.A. (1991b). Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) in a fish farm, with comments on the spreading of the parasite in south-eastern Norway. *Syst. Parasitol.*, **20**, 1–9.

MO T.A. (1991c). Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on parr of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in laboratory experiments. *Syst. Parasitol.*, **20**, 11–19.

MO T.A. (1992). Seasonal variations in the prevalence and infestation intensity of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., in the River Batnfjordselva, Norway. *J. Fish Biol.*, **41**, 697–707.

OLSTAD K., CABLE J., ROBERTSEN G. & BAKKE T.A. (2006). Unpredicted transmission strategy of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae): survival and infectivity of parasites on dead hosts. *Parasitology*, **133**, 33–41.

OLSTAD K., ROBERTSEN G., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2007a). Variation in host preference within *Gyrodactylus salaris* (Monogenea): an experimental approach. *Parasitology*, **134**, 589–597.

OLSTAD K., SHINN A.P., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2007b). Host-based identification is not supported by morphometrics in natural populations of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Platyhelminthes, Monogenea). *Parasitology*, **134**, 2041–2052.

PALADINI G., GUSTINELLI A., FIORAVANTI M.L., HANSEN H. & SHINN A.P. (2009). The first report of *Gyrodactylus salaris* Malmberg 1957 (Platyhelminthes, Monogenea) on Italian cultured stocks of rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Vet. Parasitol.*, **165** (3-4), 290–297.

POLÉO A.B.S., SCHJOLDEN J., HANSEN H., BAKKE T.A., MO T.A., ROSSELAND B.O. & LYDERSEN E. (2004). The effect of various metals on *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Parasitology*, **128**, 169–177.

ROBERTSEN G., HANSEN H., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2007). Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is a suitable host for *Gyrodactylus salaris* (Monogenea, *Gyrodactylidae*) in Norway. *Parasitology*, **134**, 257–267.

ROKICKA M., LUMME J. & ZIETARA M. (2007). Identification of *Gyrodactylus* ectoparasites in Polish salmonid farms by PCR-RFLP of the nuclear ITS segment of ribosomal DNA (Monogenea, *Gyrodactylidae*). *Acta Parasitologica*, **52**, 185–195.

SALTE R., BENTSEN H.B., MOEN T., TRIPATHY S., BAKKE T.A., ØDEGÅRD J., OMHOLT S. & HANSEN L.P.

(2010). Prospects for a genetic management strategy to control *Gyrodactylus salaris* infection in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) stocks. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **67**, 121–129.

SHINN A.P., HANSEN H., OLSTAD K., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2004). The use of morphometric characters to discriminate specimens of laboratory-reared and wild populations of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Monogenea). *Folia Parasitol.*, **51**, 239–252.

SOLENG A. & BAKKE T.A. (1997). Salinity tolerance of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea): laboratory studies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **55**, 1837–1845.

SOLENG A., POLÉO A.B.S., ALSTAD N.E.W. & BAKKE T.A. (1999). Aqueous aluminium eliminates *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon. *Parasitology*, **119**, 19–25.

ZIETARA M.S. & LUMME J. (2003). The crossroads of molecular, typological and biological species concepts: two new species of *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 (Monogenea: *Gyrodactylidae*). *Syst. Parasitol.*, **55**, 39–52.

ZIETARA M.S., ROKICKA M., STOJANOVSKI S., SKORKOWSKI E.F. & LUMME J. (2007). Alien mitochondrial DNA in variant clones of *Gyrodactylus salaris* indicates a complex hybrid history in salmonid farms. 7th International Symposium on Fish Parasites, Viterbo, Italy. *Parassitologia*, **49**, 119.

\*

\* \*

**NB:** Референтная лаборатория МЭБ занимается вопросами, связанными с инфекцией *Gyrodactylus salaris*

(см. Таблицу в конце данного *Водного руководства* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Пожалуйста, обратитесь в Референтную лабораторию МЭБ для получения дополнительной информации по инфекции *G. salaris*.

**NB:** ВПЕРВЫЕ ОДОБРЕНА В 1997 Г. КАК GYRODACTYLOSIS У  
АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (GYRODACTYLUS F); ПОСЛЕДНИЕ  
ИЗМЕНЕНИЯ В 2018 Г.