

ГЛАВА 2.1.1.

ИНФЕКЦИЯ

BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS

1. Предмет рассмотрения¹

В контексте данной главы, хитридиомикоз – это болезнь, возникающая в результате инфекции зооспорическим грибом *Batrachochytrium dendrobatidis* (Грибы (Fungi), Хитридиомикоты (Chytridiomycota), Ризофидиевые (Rhizophydiales)). Рекомендации в данной главе относятся ко всем видам Бесхвостых земноводных (Anura) (лягушки и жабы), Хвостатых земноводных (Caudata) (саламандры, тритоны и сирены) и Безногих земноводных (Gymnophiona) (червяги).

Все процедуры и реактивы, описываемые в данной главе, можно получить из Референтной лаборатории МЭБ. Все методы отбора образцов, гистологии, гистохимии и TaqMan-методы были валидированы (Nyatt с соавт., 2007).

2. Информация о болезни

2.1. Факторы возбудителя

2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя

Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) был впервые описан в 1998 и 1999 годах (Berger с соавт., 1998; Longcore et al., 1999) и в настоящее время является признанной причиной потенциально смертельной болезни – хитридиомикоза (смотрите План Австралии по снижению угрозы хитридиомикоза, который размещен по ссылке: <http://www.environment.gov.au/resource/infection-amphibians-chytrid-fungus-resulting-chytridiomycosis>).

Болезнь привела к массовой смертности, сокращению популяций и исчезновению (вплоть до восьми видов на территории Австралии) популяций и видов земноводных по всему миру (Fisher с соавт., 2009). В настоящее время признана способность Bd быстро распространяться по популяциям земноводных (Lips с соавт., 2006; Skerratt с соавт., 2007), обуславливать высокие показатели смертности (Lips с соавт., 2006) и сохраняться при низких уровнях плотности хозяев (Woodhams & Alford, 2005). На сегодняшний день Bd был идентифицирован на всех континентах (36 стран), где существует популяция земноводных. Bd поражает свыше 350 видов амфибий и был причастен в качестве движущего фактора к сокращению более чем 200 из этих видов (Skerratt с соавт., 2007).

Было сложно определить патогенез данной кожной болезни, поскольку не было обнаружено никаких сообразных патологических изменений во внутренних органах. Две, не исключаящие друг друга, гипотезы были опубликованы с целью

¹ NB: Версия, принятая Всемирной ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2011 года.

объяснения причины гибели. Первая состоит в том, что Vd вырабатывает протеолитические ферменты или другие активные соединения, которые впитываются через проницаемую кожу лягушки. Вторая предполагает, что повреждение функции кожи приводит к нарушению водного и электролитного баланса (осморегуляции) воды или электролитного баланса, что приводит к смерти (Berger с соавт., 1998). В недавнем сообщении (Voyles с соавт., 2009) приводятся данные в поддержку второй гипотезы.

2.1.2. Выживание вне хозяина

Предполагалось, но не было подтверждено, что Vd существует вне хозяина. ДНК выделяли с камней (Lips с соавт., 2006), а также Vd можно выращивать в лабораторных условиях на перьях птиц и влажной почве (Johnson & Speare, 2003; Johnson & Speare, 2005; Lips с соавт., 2006). Vd был обнаружен в лабораторных мезокосмах, из которых были удалены Vd-инфицированные *Rana sphenocéphala*.

2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)

Vd чувствителен к широкому спектру химических и физических методов обработки (Phillott с соавт., 2010). Эффективные растворы включают четвертичное аммониевое соединение, дидецилдиметиламмония хлорид (например, Path X, разведение 1 к 500 в течение 30 секунд) или бензалкония хлорид (например, F10, разведение 1 к 1500 в течение 1 минуты). Гипохлорит натрия (натрий хлорноватистокислый) эффективен при концентрациях 1% и выше. Также эффективно подвергание воздействию 70% этилового спирта и 1 мг мл⁻¹ Виркона (Virkon) в течение 20 секунд. Данные химические средства можно использовать для проведения дезинфекции в лаборатории, в хозяйстве по разведению лягушек и в полевой работе. Например, спиртовые салфетки можно использовать для дезинфекции ножниц, штангенциркулей и других инструментов в промежутках между животными. Культуры Vd не выживают при полном высушивании, однако на практике сохранение воды в каплях обеспечивает возможность выживания патогена в течение до 3 часов после «высыхания» (Johnson с соавт., 2003). Нагревание до температуры выше 37°C в течение 4 часов приводит к гибели спорангиев. Ультрафиолетовое излучение, которое в рутинном порядке используется для уничтожения бактерий, грибов и вирусов, неэффективно.

Vd способен расти, но при этом может не разрастаться обильно, на многих различных источниках азота (Piotrowski с соавт., 2004) и в стерильной озерной воде (Johnson & Speare, 2003; Johnson & Speare, 2005; Piotrowski с соавт., 2004). Дополнительные отдельные наблюдения позволяют предположить, что он может выживать и расти как сапробионт при отсутствии лягушек. Зооспоры могут сохранять подвижность в течение более чем 24 часа, при этом приблизительно 50% и 5% остаются подвижными по прошествии 18 часов и 24 часов, соответственно (Piotrowski с соавт., 2004).

2.1.4. Жизненный цикл

Жизненный цикл Vd имеет две основные стадии: подвижная, переносимая водой,

недолго живущая зооспора для распространения и стационарный, моноцентрический таллом, который развивается в зооспорангий для бесполого размножения. Vd адаптирован к жизни в многослойном эпидермисе кожи. Талломы живут внутри эпидермальных клеток, поначалу паразитируя на клетках на глубине нескольких слоев, и имеют темп развития, который совпадает с созреванием клетки по мере того, как она перемещается в наружные слои и ороговевает. Vd изначально растет в живых клетках, но талломы завершают свое развитие как зооспорангии в мертвых поверхностных ороговевших клетках, лишенных органелл. Выводные трубочки обладают способностью соединяться с мембраной эпидермальной клетки и растворять ее, выходя на поверхность клетки, обычно это поверхность, которая является дистальной по отношению к телу. Распределение спорангиев во взрослых особях и головастиках показывает, что многослойный, кератинизирующийся эпидермис является необходимым условием для Vd, когда он встречается в качестве паразита (Berger с соавт., 1998; Marantelli с соавт., 2004). Незрелые спорангии также могут расти внутри более глубоко расположенных клеток, которые содержат кератин. Резистентные неподвижные споры обнаружены не были.

2.2. Факторы хозяина

2.2.1. Восприимчивые виды-хозяева

Как уже говорилось выше, Vd был идентифицирован на шести континентах, у двух отрядов земноводных, 14 семейств и у более чем 350 видов. В обобщенном смысле можно сказать, что большинство, если не все бесхвостые и хвостатые земноводные являются восприимчивыми к инфекции Vd; смертность и заболеваемость варьируют от вида к виду. Смертность среди головастиков в большинстве случаев не регистрировалась (имеется одно сообщение, в котором утверждается иное) [Blaustein с соавт., 2005]) и, на сегодняшний день, жизнеспособный Vd не был обнаружен на икринках.

2.2.2. Восприимчивые стадии развития хозяина

Восприимчивыми стадиями развития хозяина являются все возрастные группы: личинки, метаморфы и взрослые особи (но не икринки).

2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность обнаружения)

Виды значительно различаются по своей врожденной восприимчивости. Микросреда обитания и окружающая среда, в которой обитает какой-либо вид, также являются ключевыми определяющими факторами для инфекции и болезни, поскольку вирулентность снижается при более теплых температурах (>26°C).

За исключением икринок, Vd можно обнаружить у всех возрастных категорий: личинок, метаморфов и взрослых особей посредством разнообразных методов – визуального осмотра головастиков, световой микроскопии, иммуногистохимии, электронной микроскопии, иммуноэлектронной микроскопии и количественной полимеразной цепной реакции.

2.2.4. Целевые органы и инфицируемая ткань

Целевым органом для отбора образцов является кожа (Nyatt с соавт., 2007). Одним зарегистрированным клиническим признаком хитридиомикоза является чрезмерное отслаивание кожи с поверхности эпидермиса. Отслоившаяся кожа часто происходит с вентральных поверхностей брюшка, конечностей и стоп и обычно идентифицируется (Berger с соавт., 2005a; Berger с соавт., 2005b; Pessier с соавт., 1999) по гиперкератозу и присутствию зооспорангиев. Отбор кожи на этих участках является очевидным способом максимально увеличить шансы обнаружения Vd.

2.2.5. Персистентная инфекция пожизненными носителями

Некоторые виды земноводных являются носителями длительно сохраняющихся инфекций в природных условиях при незначительном количестве или отсутствии фактических данных относительно заболеваемости или смертности. Неизвестно, являются ли такие виды пожизненными носителями.

2.2.6. Переносчики

Представители земноводных могут выступать в качестве резервуаров Vd, не демонстрируя при этом признаков инфекции. Способность Vd к выживанию в окружающей среде или в симпатрических видах позволяет ему приводить к исчезновению некоторых видов. Vd представляет собой значимый фактор риска для приблизительно 97% находящихся под угрозой полного исчезновения земноводных (Smith с соавт., 2006) и, как уже говорилось выше, ему приписывают то, что он стал причиной исчезновения некоторых видов земноводных (Fisher с соавт., 2009).

2.2.7. Известные или подозреваемые водные животные-носители

Только амфибии идентифицированы в качестве источников и носителей Vd.

2.3. Картина болезни

2.3.1. Механизмы передачи

Инфекция Vd может передаваться путем контакта одного животного с другим или через контакт с переносимыми водой подвижными зооспорами. Передача на большое расстояние, как это понимают, происходит иными путями, помимо воды; включая перемещение животных в процессе международной торговли (Rowley с соавт., 2007) и, возможно, посредством перемещения контаминированной воды или влажной почвы.

2.3.2. Превалентность

Превалентность значительно варьирует в зависимости от времени года, места и вида животных. В инфицированных популяциях превалентность, как правило, составляет по меньшей мере 5%, но нередко и 90%. В тропических регионах более высокие уровни превалентности регистрируются зимой и на больших высотах. Подробную информацию о его превалентности на основании интенсивного и глобального надзора (посредством полимеразной цепной реакции в реальном времени (кПЦР) можно найти по ссылке: <http://www.spatialepidemiology.net/bd-maps/>.

2.3.3. Географическое распространение

Случаи инфекции Vd были зарегистрированы на всех континентах (смотрите выше). Актуальная информация (страны, регионы, виды животных – количество протестированных, положительные/отрицательные, метод идентификации, год сообщения, статус согласно Международному союзу охраны природы [МСОП, IUCN] и места) указана на сайте <http://www.spatalepidemiology.net/bd-maps/>. На момент публикации данной главы Vd был зарегистрирован в 72 странах, за подробной информацией, пожалуйста, обращайтесь на указанный выше интернет-сайт.

2.3.4. Смертность и заболеваемость

Некоторые виды земноводных сосуществуют с Vd, в то время как другие становятся жертвами болезни (Davidson с соавт., 2003; Hanselmann с соавт., 2004; Retallick с соавт., 2004). Даже в пределах видов некоторые популяции могут сосуществовать с Vd, в то время как другие сокращаются вплоть до исчезновения (Briggs с соавт., 2005). Vd следует рассматривать как высоко инфекционный и потенциально смертельный патоген, который может привести к исчезновению вида.

2.3.5. Факторы окружающей среды

Вспышки хитридиомикоза, главным образом, ассоциированы с временами года (более холодные месяцы), высотой (сокращение численности по большей части ограничивается популяциями, живущими на больших высотах) и среда размножения. Что касается последней, сокращение численности наиболее ярко выражено у видов, живущих в проточных водах. Тяжесть последствий болезни для популяции также коррелирует с небольшим распространением популяций, которые являются менее плодовитыми (Williams & Hero, 1998).

ПРИМЕЧАНИЕ: Действующими в рамках данных идентифицированных «факторов» являются более сложные взаимодействия и, очевидно, присущие различия в восприимчивости.

2.4. Контроль и профилактика

2.4.1. Вакцинация

Отсутствует.

2.4.2. Химиотерапия

Vd восприимчив к ряду противогрибковых средств и невысоким уровням тепла (>30°C) при тестировании *in vitro*, однако, существует мало проверенных методов для освобождения земноводных от Vd (Berger с соавт., 2010). Воздействие теплом (32°C в течение 5 дней и 37°C в течение двух периодов продолжительностью 8 часов с интервалом в 24 часа), как было продемонстрировано, эффективно против хитридиомикоза у двух видов амфибий (Phillott с соавт., 2010; Woodhams с соавт., 2003). Следует провести тестирование и оптимизацию воздействия теплом на целом ряде видов, а многие земноводные умеренных широт не выдержали бы температуру

37°C. Хотя ванны как с итраконазолом (0,01% в течение 5 минут в день в течение 11 дней), так и формалином/малахитовым зеленым представляются эффективными методами лечения для лягушек на постметаморфозной стадии развития (Forzan с соавт., 2008; Hohreiter & Rigg, 2001; Nichols & Lamirande, 2009; Parker et al., 2002), данные испытания были не настолько тщательными, при этом одной из проблем является токсичность, в особенности в случае формалина/малахитового зеленого. Тем не менее, ванны с итраконазолом широко использовались в программах по спасению и сохранению земноводных, а отдельные данные позволяют предположить, что он эффективен для взрослых и подвзрослых особей. Сообщалось об успешном лечении инфицированных головастиков одного вида в ходе контролируемого испытания с использованием низкой дозы итраконазола (1,5 мг литр⁻¹), что, однако, могло сопровождаться депигментацией (Garner с соавт., 2009).

ПРИМЕЧАНИЕ: Водно-растворимая форма итраконазола доступна далеко не везде. Имелись сообщения о безопасном и эффективном способе обработки против инфекций Vd (взрослые особи и головастики) относительно вориконазола. Обработка заключается в опрыскивании один раз в день в течение 7 дней из расчета 1,25 мг литр⁻¹ (Martel с соавт., 2010).

2.4.3. Иммуностимуляция

Тестирование не проводилось.

2.4.4. Выведение резистентных особей

Никаких программ по выведению резистентных особей не инициировалось; однако некоторые страны разрабатывают национальные планы по контролю хитридиомикоза. Эти планы предусматривают применение санитарно-гигиенических процедур для лиц, имеющих дело с дикими земноводными, и признание того, что изолированные районы девственной природы с высокоуязвимыми видами нуждаются в защите от Vd. Еще одно направление деятельности заключается в создании содержащихся в неволе популяций для высоковосприимчивых видов, находящихся под угрозой со стороны распространяющихся эпидемических волн, или уже инфицированных популяций, претерпевающих медленное, устойчивое сокращение (Проект «Ковчег земноводных» (Amphibian Ark): <http://www.amphibianark.org/>).

2.4.5. Пополнение поголовья резистентными видами

Присутствие резистентных видов, как считают, повышает передачу угрожаяемым видам. Были организованы программы по выведению в условиях неволи с целью пополнения диких популяций угрожаяемых лягушек.

2.4.6. Блокирующие агенты

Тестирование не проводилось.

2.4.7. Дезинфекция

Сводная информация о процедурах дезинфекции обобщена в недавней статье

(Phillott с соавт., 2010), где детально описаны процедуры, касающиеся ловли диких земноводных, обращения с ними и их содержания; дезинфекции кожи до и после инвазивных процедур; маркировки лягушек; дезинфекции кожи, закрытия ран и обработки вспомогательного оборудования (Таблица 2.1.). Данные процедуры предназначены для обеспечения мер гигиены в пределах одного места, чтобы свести к минимуму риск передачи Vd между особями. В статье также подробно описаны процедуры по мерам гигиены при входе, выходе и перемещению между местами для предотвращения повышенного риска распространения Vd выше фоновых уровней.

Таблица 2.1. Стратегии дезинфекции, которые подходят для уничтожения Vd (Retallick с соавт., 2004)

Применение	Дезинфицирующее средство	Концентрация	Время
Дезинфицирование хирургических принадлежностей и других инструментов (например, весов, штангенциркулей)	Бензалкония хлорид	2 мг мл ⁻¹	1 минута
	Этиловый спирт	70%	1 минута
Дезинфицирование оборудования для сбора и контейнеров	Гипохлорит натрия	1%	1 минута
	Path X или Четвертичное аммониевое соединение 128 (Quaternary ammonium compound 128)	разведение 1 к 500	0,5 минуты
	Trigene	разведение 1 к 5000	1 минута
	F10	разведение 1 к 5000	1 минута
	Виркон	2 мг мл ⁻¹	1 минута
	Перманганат калия	1%	10 минут
	Полное просушивание	–	>3 часов
	Термическая обработка	60°C	30 минут
	Термическая обработка	37°C	8 часов
Дезинфицирование обуви	Гипохлорит натрия	1%	1 минута
	Path X или Четвертичное аммониевое соединение 128 (Quaternary ammonium compound 128)	разведение 1 к 500	0,5 минуты
	Trigene	разведение 1 к 5000	1 минута
	F10	разведение 1 к 5000	1 минута
	Полное просушивание	–	>3 часов
Дезинфицирование ткани/одежды	Стирка в горячей воде	60°C или выше	30 минут

2.4.8. Общие практики ведения хозяйства

В случаях, когда объекты по разведению в неволе представляют угрозу для диких популяций, следует соблюдать следующие требования:

- i) Воду, отходы и другие материалы необходимо подвергать обработке с целью уничтожения *Vd* или хранить, уничтожать или удалять в место, где они не будут представлять угрозы. Например, инфицированные воды можно спускать в закрытые канализационные системы, сброс из которых осуществляется напрямую в морскую среду.
- ii) Сельскохозяйственных животных, в том числе животных, которых используют для получения продуктов питания, необходимо огородить/закрыть таким образом, чтобы предотвратить их уход во внешнюю среду.
- iii) Лица, оборудование и материалы, покидающие территорию объекта, должны проходить очистку, достаточную для того, чтобы предотвратить перенос *Vd*.
- iv) Земноводных, выпускаемых в дикую природу, необходимо содержать в условиях строгой изоляции и тестировать на наличие *Vd* перед тем, как выпустить. Если при тестировании для каких-либо экземпляров будет получен положительный результат, следует проводить обработку и повторное тестирование всех животных до тех пор, пока они не будут чистыми от инфекции.
- v) При планировании объектов, рассматривая место расположения и проектное решение, следует принимать во внимание местный статус по *Vd*, а также доступность безопасного снабжения водой и расходными материалами и безопасного уничтожения отходов. Например, деятельность по разведению лучше всего осуществлять в тропических низменных районах, где *Vd* представляет меньшую угрозу для местных видов и где легче получить доступ к более безопасному уничтожению отходов.
- vi) Там, где *Vd* присутствует на локальном уровне, необходимо принять меры для того, чтобы не увеличить уровень его содержания или не занести новые штаммы в местную окружающую среду. При осуществлении деятельности по разведению следует обеспечивать, чтобы уровень содержания в сточных водах и других материалах был снижен до фоновых уровней перед сбросом в окружающую среду и чтобы вновь прибывшие животные были обработаны и очищены перед подсаживанием к другим земноводным.

В тех случаях, когда внешние источники представляют угрозу для содержащихся в неволе коллекций, следует соблюдать следующие требования:

- i) Вода, а также другие прибывающие лица и поступающие материалы должны быть подвергнуты обработке для удаления *Vd*, за исключением тех случаев, когда известно, что они поступили из безопасных источников.
- ii) Поступающих земноводных следует изолировать и протестировать. Если при тестировании для каких-либо экземпляров будет получен положительный результат, необходимо проводить обработку и повторное тестирование всей

группы до тех пор, пока они не будут чистыми от инфекции.

3. Отбор образцов

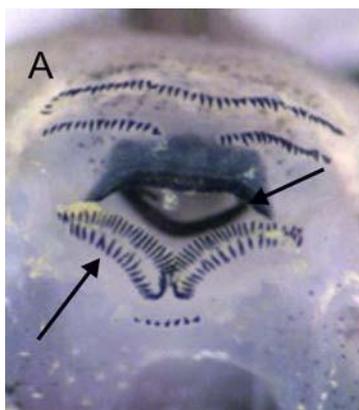
3.1. Выбор отдельных образцов

Vd реплицируется в ороговевших (кератинизированных) частях ротового аппарата головастика и, в большинстве случаев, на вентральных поверхностях и пальцах ног взрослых земноводных. Целевыми органами являются ампутированные пальцы ног («toe-clips») (не рекомендуется по этическим причинам), мазки с кожи (взрослые особи) и ротовых частей (головастики), а также метод ванн для целых животных (взрослые особи и головастики) (Nyatt с соавт., 2007).

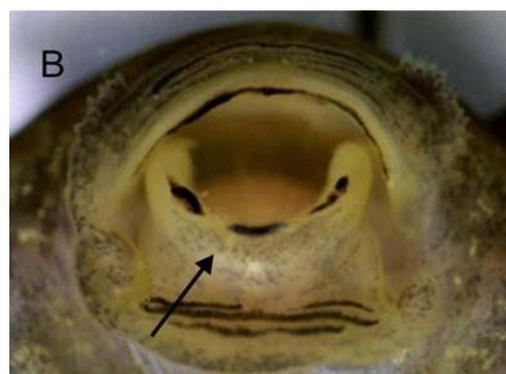
3.1.1. Ампутированные пальцы ног (взрослые особи), ротовые диски (головастики/личинки) и мазки (взрослые особи и головастики)

Иссечение пальцев ног для использования в ПЦР в реальном времени с использованием технологии TaqMan (TaqMan-ПЦР) можно произвести в полевых условиях и хранить их в сухом виде или в 70% спирте. В качестве альтернативы их можно собрать в пробирки объемом 1,5 мл и хранить при температуре -80°C до экстракции ДНК. Ампутированные пальцы ног, подлежащие обработке для гистологии, следует зафиксировать в 10% нейтральном забуференном формалине.

В полевых условиях мазки из ротовой полости головастика (с ротовых дисков – смотрите фотографии ниже) можно взять при помощи тампонов с тонким наконечником². Ротовые диски также можно рассечь и высушить воздухом на фильтровальной бумаге. Инфицированных животных можно идентифицировать по депигментации (стрелочка на фотографии В) челюстных чехликов («клювика»), укороченным зубам или отсутствию зубов (Изображения предоставлены доктором D. Obendorff; Кафедра патологии, Университет Тасмании).



Нормальный ротовой диск
(пигментированные ткани)



Восточная жаба-банджо,
Limnodynastes dumerilii, пораженная

² Medical Wire & Equipment Co. MW100-100.

западной кринии, *Crinia signifera*

Vd

При взятии мазков у лягушек, обратную сторону ног, стопы и участок на брюшке, через который происходит всасывание воды («drink patch») следует всесторонне обработать тампоном (3-5 раз), а затем отломить тампон в пробирку объемом 1,5 мл. Взятие мазков с ротового аппарата головастиков следует осуществлять путем введения тампона в ротовую полость и совершения несколько раз вращательных движений тампоном.

3.1.2. Водяная ванна и фильтры

Поскольку кожа инфицированных лягушек отслаивается в окружающую их среду, земноводных можно поместить в контейнеры, содержащие свободные от Vd растворы (например, раствор DS – подробная информация указана ниже). Воду «ванны» можно подвергнуть анализу непосредственно (смотрите ниже) после 15-минутного погружения. В качестве альтернативы, воду ванны можно профильтровать, а фильтры (например, фильтр 0,45 мкм³) хранить в высушенном виде (при комнатной температуре или 4°C) до момента анализа.

3.1.2.1. Реактивы

3.1.2.1.1. Приготовление слабого солевого раствора (DS)

KH ₂ PO ₄	0,001 M
MgCl ₂	0,0001 M
CaCl ₂	0,00002 M

3.1.2.1.1.1. Стоковый раствор № 1 (фосфатный стоковый раствор)

KH ₂ PO ₄	136,0 г
K ₂ HPO ₄	174,18 г
(NH ₄) ₂ HPO ₄	132,07 г

Дистиллированная вода до объема 1000 мл

3.1.2.1.1.2. Стоковый раствор № 2 (кальций-магниевый стоковый раствор)

CaCl ₂ ·2H ₂ O	36,76 г
MgCl ₂ ·6H ₂ O	50,83 мг

Дистиллированная вода до объема 500 мл

Довести до pH 7 с помощью KOH (слабый раствор).

Для приготовления DS используйте 0,1 мл кальций-магниевого стокового раствора с 0,5 мл фосфатного стокового раствора в 1000 мл дистиллированной

³ Sartorius Minisart № 16555.

воды.

3.2. Сохранение образцов в целях предоставления на исследование

Тампоны и иссеченные ротовые диски можно хранить в сухом виде при комнатной температуре (не более 23°C).

ПРИМЕЧАНИЕ: Подвержение продолжительному воздействию высокой температуры (как, например, в оставленных без присмотра автомобилях) может сократить извлечение нуклеиновой кислоты.

Для исследования методом световой и электронной микроскопии зафиксируйте ткани в 10% нейтральном забуференном формалине и 2,5% забуференном глутаральдегиде, соответственно. Образцы следует обрабатывать так, как это описано для Эпизоотического гематопозитического некроза и Инфекции ранавирусом.

3.3. Объединение образцов в пул

Можно объединять в пул не более пяти образцов (хотя можно пропустить слабоположительные).

ПРИМЕЧАНИЕ: Рекомендуется объединять образцы в пул только, если речь идет о популяционном исследовании для получения данных о присутствии/отсутствии (Nyatt с соавт., 2007).

3.4. Наиболее подходящие органы или ткани

Кожа – вентральная (взрослые особи), пальцы ног (взрослые особи) и ротовой аппарат (головастики).

3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования

Внутренние органы и икринки.

4. Диагностические методы

4.1. Методы полевой диагностики

4.1.1. Клинические признаки

У большинства инфицированных животных клинические признаки отсутствуют. Период демонстрации признаков, как правило, короткий и ограничивается теми земноводными, которые погибли.

4.1.2. Изменения в поведении

Преобладают признаки со стороны центральной нервной системы. Изменения в поведении включают медленные и неkoordinированные движения, несоответствующее норме сидячее положение, тетанические судороги, потерю выпрямительного рефлекса и паралич.

4.2. Клинические методы

4.2.1. Макроскопическая патология

При тяжелой форме инфекции могут быть отмечены макроскопические изменения кожи, которые включают чрезмерное слущивание кожи (чаще и более мелкими частичками) и эритему. Данные клинические признаки не являются специфическими для хитридиомикоза.

4.2.2. Клиническая химия

У больных коралловопалых литорий (коралловопалых квакш) (*Litoria caerulea*) концентрации натрия и калия в плазме снижаются на –20% и –50%, соответственно (Voyles с соавт., 2009).

4.2.3. Микроскопическая патология

Микроскопия включает исследование влажных препаратов кожи (соскобы, мазки или кожа в целом виде), гистологических срезов кожи, окрашенных гематоксилином и эозином, а также иммуногистохимию срезов кожи. Данные рутинные тесты обладают высокой прогностичностью положительного результата. Подробная информация о данных методах, а также то, каким образом следует интерпретировать результаты, представлено ниже.

4.2.4. Влажные препараты

Можно исследовать образцы кожи в целом виде, с перепонки или каких-либо других мест; при данном методе сохраняется анатомия кожи и можно исследовать большой участок поверхности. Преимущество данного метода заключается в том, что образец может быть ориентированным, и расположение подозреваемого возбудителя может оказать помощь в идентификации. Например, можно установить, располагаются ли предполагаемые грибные профили внутри поверхностных клеток, указывая, таким образом, на наличие Vd, или же они расположены в более глубоких слоях и, таким образом, являются профилями нормальной морфологии земноводных. Данный метод является быстрым, недорогим и, при использовании квалифицированными наблюдателями, эквивалентным по чувствительности окрашиванию гематоксилином и эозином (Longcore с соавт., 2007). Он полезен при изучении здоровых лягушек, от которых невозможно получить пластинки слущивающейся кожи.

В полевых условиях инфицированных головастиков нередко можно идентифицировать по утрате окраски на челюстных чехликах, что можно увидеть при помощи ручной лупы ($\times 10$). Части ротового аппарата головастиков также можно исследовать, отрезав фрагменты зубных рядов или челюстных чехликов и размяв их под покровным стеклом, при этом можно наблюдать кластеры спорангиев.

Во влажных срезах и мазках (смотрите ниже) круглые-овальные внутриклеточные спорангии обычно встречаются в виде скоплений (комочков). Старые пустые спорангии являются стадией, наиболее преобладающей в слущивающейся коже, хотя нередко обнаруживаются и спорангии, содержащие зооспоры. Выводные трубочки (ассоциируемые с зооспорангиями), из которых выходят зооспоры, обычно направлены перпендикулярно к поверхности кожи и, таким образом, выглядят как маленькие кружочки, которые могут быть с трудом различимы. Наблюдение внутренних септ внутри спорангиев повышает степень уверенности в результатах

диагностики. Ядра клеток эпидермиса имеют похожий размер со спорангиями, но их можно отличить по их неправильной формы, нечетким мембранам и внешнему виду (плоские, зернистые, серые).

4.2.5. Мазки

Исследование соскобов или мазков кожи посредством световой микроскопии представляет собой быстрый и простой метод идентификации Vd и может быть проведено на нефиксированных, замороженных или фиксированных образцах (Berger с соавт., 2009a). Слущивающуюся кожу снимают или соскабливают с лягушки (используя скальпель или стерильную пластиковую ложечку) и расправляют на предметном стекле с каплей воды, накрывают покровным стеклом, и исследуют препарат с помощью составного светового микроскопа. В идеале получается ровный монослой кератинизированных эпидермальных клеток. На начальном этапе используется увеличение $\times 100$ для сканирования среза, а затем используется увеличение $\times 400$ для того, чтобы подтвердить присутствие спорангиев. Круглые-овальные внутриклеточные спорангии (5–13 мкм) встречаются в виде комочков внутри хозяйских клеток. Старые пустые спорангии являются стадией, наиболее преобладающей в слущивающейся коже, хотя нередко обнаруживаются и спорангии, содержащие зооспоры.

4.2.5.1. Образцы, подготовленные согласно описанному выше, могут быть окрашены путем применения следующих процедур

4.2.5.1.1. Лактофенол хлопковый голубой

4.2.5.1.1.1. Реактивы (выход 1 литр)

Фенол	200,0 г
Хлопковый голубой	0,5 г
Глицерол	400 мл
Молочная кислота	200 мл
Деионизированная вода	200 мл

- i) Поместите каплю 70% спирта на предметное стекло микроскопа.
- ii) Погрузите образец/материал в каплю спирта.
- iii) Добавьте одну или две капли лактофенола/хлопокового голубого прежде, чем спирт испарится.
- iv) Держа покровное стекло между указательным и большим пальцами, коснитесь одного края капли монтирующей среды краем покровного стекла и мягко опустите, избегая образования воздушных пузырьков. Теперь препарат готов для исследования.

4.2.5.1.2. Конго-красный

4.2.5.1.2.1. Реактивы

Стоковый раствор	насыщенный
Конго-красный (краситель)	1,0 г
Стоковый NaCl	500 мл
(Стоковый NaCl 30,0 г + 200 мл дистиллированной воды)	200 мл
Рабочий раствор (Конго красный)	
Стоковый раствор Конго красного	50,0 мл
1% натрий NaOH	0,5 мл

Свежеприготовленным (и отфильтрованным) раствором красителя «Конго красный» окрасьте соскобы кожи или мазки в течение 45–60 минут. Хитиновые стенки пустых спорангиев (стенки) и выходящие на поверхность выводные трубочки окрасятся в кирпично-красный цвет. Стенки наиболее незрелых, зрелых и пустых спорангиев также окрашиваются.

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании данной процедуры зооспоры не окрашиваются. Ядра эпидермальных клеток окрашиваются Конго-красным в бледно-оранжевый цвет, если клетки повреждены. Отфильтруйте через стекловату, раствор должен быть прозрачным, не замутненным, сразу же используйте.

Можно использовать DipQuick⁴ для окрашивания для общей диагностической цитологии. Для обнаружения Vd используйте данный краситель, чтобы идентифицировать зооспоры и стенки спорангиев; цитоплазма и ядра хозяйских клеток также будут окрашены. Это запатентованный краситель и необходимо следовать процедуре производителя.

ПРИМЕЧАНИЕ: Данные красители могут улучшить точность и облегчить диагностику, однако сравнительные испытания не проводились.

4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя

4.3.1. Методы прямого обнаружения

4.3.1.1. Микроскопические методы помимо влажных препаратов и мазков

4.3.1.1.1. Световая микроскопия: фиксированные срезы

Подготовьте ткани в соответствии с традиционными процедурами. Изготовьте срезы блоков (5 мкм) и окрасьте гематоксилином и эозином (Druy & Wallington, 1980). Изготавливайте срезы таким образом, чтобы получить вертикальный срез через всю кожу.

Исследование пальцев осуществляют, изготавливая срезы целой стопы (вентральной поверхностью вниз) или срезы отдельно взятого пальца ноги. Если речь идет о пальцах ног, максимальную длину *stratum corneum* получают

⁴ http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/diff_quick_ellis.htm

в результате продольного, а не поперечного среза. Пальцы декальцифицируют в ЭДТА (EDTA) в течение 48 часов при температуре 37°C или в 10% муравьиной кислоте в течение 3–5 дней перед обработкой. В качестве альтернативы, при использовании более крупных пальцев, например, от земноводных с длиной туловища вместе с головой («snout-vent length») >60 мм, возможно отделить кожу от подлежащей фаланги и изготовить срез кожи без кости.

В *stratum corneum* хитрид имеет сферическую или овальную форму с выводными сосочками, выступающими из поверхности. Выводные сосочки можно увидеть на гистологических срезах, но не часто. Зооспоры, которые развиваются в спорангии, выходят через открытую выводную трубочку. Стенка зооспорангия гладкая, однородная по толщине и обычно является эозинфильной при окрашивании. Содержимое зооспорангиев варьирует в зависимости от стадии развития хитрида; можно выделить четыре стадии: (1) Ранняя стадия содержит расположенную в центре базофильную, довольно однородную массу. (2) Зооспорангии становятся многоядерными, а затем происходит деление цитоплазмы для образования зооспор. Зооспоры являются базофильными и на поперечных срезах выглядят как тела круглой или овальной формы, их насчитывается примерно 4–10 в зависимости от плоскости среза. (3) После выхода зооспор через выводной сосочек остается пустой зооспорангий. На некоторых стадиях пустых колоний видны тонкие септы, разделяющие спорангий на внутренние ячейки. (4) Пустой спорангий может сжиматься, приобретая неправильную форму. Во время этой конечной стадии пустую оболочку иногда колонизируют бактерии, и их можно увидеть на срезе как базофильные палочки или кокки. Пустые спорангии являются наиболее распространенной стадией, которая присутствует на отслаивающемся поверхностном слое. В гистологических срезах диаметр зооспорангиев варьирует от 5 до 13 мкм. Они имеют сходный размер с ядрами эпидермальных клеток и различную длину, обычно от 2 до 4 мкм, но иногда достигают размера 10 мкм. Зооспоры имеют диаметр около 2 мкм. Инфекция, как правило, ассоциирована с кожной патологией, и эти изменения можно использовать для обнаружения, при малом увеличении, участков, которые, по всей видимости, инфицированы. Очаговый гиперкератоз и эрозии часто наблюдаются в области, прилегающей к организмам. Может иметь место неравномерное утолщение эпидермиса (гиперплазия). В некоторых смертельных случаях обширное отслаивание гиперкератотического слоя оставляет эпидермис с небольшим количеством организмов. В таких случаях, тем не менее, *Vd* может быть обнаружен в малых количествах в слегка кератинизированном поверхностном слое или может в больших количествах наблюдаться в отслоившейся коже. Спорангии не присутствуют на участках обширного изъязвления (Berger с соавт., 2009b).

4.3.1.1.2. Электронная микроскопия

Получение образцов (кожа и пальцы ног) описано в другом месте (Berger с

соавт., 2005a). Изучение кожи инфицированной лягушки посредством электронной микроскопии показывает зону конденсированной хозяйской цитоплазмы, толщиной не более 2,5 мкм, вокруг некоторых спорангиев. Эта зона, по-видимому, в основном представляет собой фибриллы (без органелл). Более поверхностные эпидермальные клетки содержат более крупные спорангии, а ядра и органеллы хозяйских клеток, как, например, митохондрии, расположены на одной стороне клетки. Рядом с поверхностью кожи эпидермальная цитоплазма конденсируется в тонкий слой вокруг грибных талломов, а органеллы хозяйских клеток исчезают, как это происходит во время нормального процесса созревания эпидермальных клеток. Ядра клеток становятся темными и уплотненными, но не настолько уплощенными, как в нормальном *stratum corneum*. Кератинизация, по-видимому, происходит раньше положенного времени в инфицированных клетках ниже поверхности кожи, по сравнению с неинфицированными клетками в том же эпидермальном слое. Межклеточные соединения инфицированных клеток обычно выглядят нормальными. Некоторые инфицированные клетки и неинфицированные клетки поблизости от очагов инфекции сильно вздуты, хотя митохондрии и другие органеллы в этих клетках интактны. Ядра некоторых инфицированных клеток в *stratum granulosum* сморщенные и хроматолитические. Патология в более глубоко расположенных эпидермальных клетках, находящихся настолько далеко, как в базальном слое, включает очаговое сморщивание, увеличенное межклеточное пространство, вакуолизацию и разжижение цитоплазмы. Гиперкератоз, по-видимому, был отчасти связан с повышенным оборотом эпидермальных клеток. Разбухание эпидермальных клеток рядом с очагами инфекции позволяет предположить наличие гиперпластической реакции. Спорангии, по-видимому, инициируют преждевременную гибель и кератинизацию хозяйских клеток. Утоньшение эпидермиса может происходить в тех случаях, когда развитие эпидермальных клеток не соответствует повышенному темпу отслаивания, обусловленному повышенной гибелью клеток. У других инфицированных лягушек может наблюдаться заметно утолщенный эпидермис из-за гиперплазии, превышающей отслаивание.

4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

4.3.1.2.1. Выделение, культивирование и архивирование Vd

4.3.1.2.1.1. Выделение

Отберите животных (живых, умирающих или недавно павших) и держите их в охлажденном и влажном состоянии до момента исследования. Проведите идентификацию Vd, как описано выше.

- i) Исследуйте кожу при помощи препаровальной лупы ($\times 10$ или $\times 20$).
- ii) Используйте острую и стерильную иглу, для того чтобы удалить неплотно прикрепленную кожу из промежутков между пальцами стопы и других мест на вентральной поверхности животного. Если

кожа не является неплотно прикрепленной, используйте пинцет с игловидными концами и отрывайте кусочки от переднего края кожи между задними пальцами или используйте лезвие бритвы с одной режущей кромкой для того, чтобы иссечь перепонку из промежутка между пальцами ног. Если у животных в стадии личинки наблюдается отсутствие зубов или депигментация челюстного чехлика, удалите эти участки при помощи пинцета с игловидными концами.

- iii) Поместите кожу или челюстной чехлик на предметное стекло микроскопа в капле стерильной дистиллированной воды и накройте покровным стеклом. Наблюдайте при помощи составного микроскопа при увеличении $\times 100$ и $\times 400$.
- iv) Исследуйте на наличие спорангиев (имеющих стенки, сферических–овальных тел диаметром 10–30 мкм) внутри эпидермальных клеток.

ПРИМЕЧАНИЕ: Некоторые спорангии будут септированными (т.е. будут содержать перегородки клеточных стенок), которые делят тело гриба, или таллом, на два или более спорангиев. Некоторые спорангии могут содержать зооспоры, а некоторые окажутся пустыми.

- v) Поместите кожу, на которой наблюдался Vd, на культуральную чашку (9 см), содержащую питательный агар mTGH и антибиотики, которые добавляют после автоклавирования.
- vi) Используйте заостренную и стерилизованную иглу, чтобы оторвать и протолкнуть маленький ($< 1 \times 1$ мм) кусочек инфицированной кожи ($\times 40$) сквозь питательный агар (культуральная чашка, 9 см). Если кусочки кожи толстые и не отрываются, нарежьте кожу на маленькие кусочки с помощью микроножниц или ножниц для кутикулы.
- vii) Через каждые несколько миллиметров отводите иглу от кусочка кожи и обтирайте ее, проводя сквозь агар (чтобы удалить контаминирующие бактерии, дрожжи и грибные споры).
- viii) Изменяйте направление кожи и очищайте ее, перемещая вперед и назад сквозь агар.

ПРИМЕЧАНИЕ: Бактериальная и грибная контаминация представляют собой меньшую проблему при работе с тканью головастика.

- ix) После очищения образца с помощью агара поместите очищенную кожу на свежую чашку с mTGH-агаром. Обязательно сделайте так, чтобы новая чашка была приоткрыта минимальным образом, и вотрите образец в толщу агара при помощи иглы. Повторите этот процесс для остальных кусочков кожи; для каждого подхода рекомендуется, чтобы по меньшей мере шесть кусочков очищенной кожи были размещены на каждой из двух чашек. Запечатайте чашку с питательным агаром при

помощи Parafilm® или другой лабораторной пленки, обтянув ею чашку по периметру.

- х) Инкубируйте запечатанные чашки при температуре от 17 до 23°C. В течение последующих одной-трех недель проверяйте развитие, переворачивая культуральную чашку вверх дном на предметном столе составного микроскопа (×100). Проверяйте чашки на наличие контаминантов и удаляйте грибные и бактериальные колонии при помощи стерилизованного скальпеля. Исследуйте на наличие подвижных зооспор Bd (3–4 мкм) рядом с кожей (1–3 дня после инокуляции) или сферических очертаний растущих талломов (обычно в пределах от нескольких дней до 2 недель). Если видны гифы, растущие с очищенной кожи, асептически удалите колонию с гифами с чашки, используемой для выделения, при помощи стерильного ножа/скальпеля.
- xi) Когда на коже наблюдаются колонии Bd, часть колонии можно асептически удалить и поместить в каплю воды на предметном стекле микроскопа. Осуществляйте наблюдение при помощи составного микроскопа и идентифицируйте спорангии и зооспоры путем сравнения с опубликованными фотографиями (e.g. Berger с соавт., 2002; Longcore с соавт., 1999; и <http://umaine.edu/chytrids/batrachochytrium-dendrobatidis/photographs-of-development-in-amphibian-skin-and-in-pure-culture/>).
- xii) При положительной идентификации и достаточном росте (2 недели – 1 месяц) асептически перенесите колонию (или ее часть) на чашку с 1% триптонным агаром. Гриб лучше всего растет в группах, поэтому следите за тем, чтобы не разделить спорангии во время переноса. Инкубируйте в течение 1–2 недель; если культура свободна от контаминирующих микроорганизмов (например, бактерий и грибов), распределите колонию на чашке и перенесите часть колонии в питательный бульон во флаконе (матрасе) с завинчивающейся крышкой объемом 250 мл. Чтобы подстраховаться, также перенесите фрагменты колонии на свежие чашки и запечатайте при помощи Parafilm®.

ПРИМЕЧАНИЕ: По возможности, проводите работы в шкафах с ламинарным потоком.

- xiii) Для стоков храните два комплекта культур в 1% жидком триптоне при 5°C. Хранящиеся в холодильнике культуры в жидкой среде остаются жизнеспособными в течение примерно четырех месяцев.

Реактивы

mTGh

8 г триптона

2 г гидролизата желатина

10 г агара

1000 мл дистиллированной воды

Добавьте 200 мг литр⁻¹ пенициллина G и 200-500 мг литр⁻¹ сульфата стрептомицина после автоклавирования; если бактерии все еще представляют проблему, добавьте 1 мг литр⁻¹ ципрофлоксациллина.

1% триптонный агар

10 г триптона

10 г агара

1000 мл дистиллированной воды

1% триптонный бульон

10 г триптона

1000 мл дистиллированной воды

4.3.1.2.1.2. Кривоархивирование из бульонной культуры

4.3.1.2.1.2.1. Подготовка культур

- i) Возьмите 2 мл активно растущей бульонной культуры (в возрасте 1 недели).
- ii) Добавьте к 13 мл нового бульона во флаконе (матрасе) (25 см²).
- iii) Инкубируйте в течение 3–4 дней, следя за тем, чтобы флаконы (матрасы) лежали плашмя.
- iv) В культурах должны присутствовать многочисленные очень активные зооспоры, отдельные спорангии размером от маленького до среднего, прикрепленные к пластику, и несколько более крупных поблизости от выходящих зооспор. Должно быть также множество комочков спорангиев, плавающих в бульоне.
- v) Поскребите боковые поверхности флакона (матраса) и прокрутите содержимое в настольной центрифуге при 1700 g в течение 10 минут.
- vi) Слейте супернатант (обратите внимание: супернатант содержит большое количество активных зооспор).
- vii) Ресуспендируйте осадок после центрифугирования в 1 мл 10% ДМСО (DMSO), 10% ФТС (FCS) в бульоне и заморозьте в криоконтейнере. 10% ДМСО в бульоне или криопротектор (как описывается ниже) также оказывают необходимое действие, но комбинация ДМСО, ФТС обеспечивает извлечение наилучшим

образом.

viii) После оттаивания и высевания на чашки с TGhL добавьте 1 мл DS.

4.3.1.2.1.2.2. Замораживание культур

- i) В ламинарном боксе внесите криопротектор (приблизительно 1 мл) в пробирку объемом 3 мл.
- ii) Соскребите часть культивируемой Bd и поместите в криопротектор. Если имеются участки культуры с твердыми комочками, тогда выберите несколько из них, с прикрепленным агаром и добавьте их к этой «порции».

ПРИМЕЧАНИЕ: Не добавляйте больше, чем приблизительно 0,5 см³ культуры.

- iii) Заморозьте, используя пластиковый криоконтейнер⁵, содержащий изопропанол (изопропиловый спирт).
- iv) Поместите криоконтейнеры в морозильник с температурой –80°C на ночь, затем поместите криопробирки в жидкий азот для постоянного хранения.

4.3.1.3.1.2.3. Размораживание культур

- i) Наполните контейнер водой (43°C).
- ii) Поместите криопробирки непосредственно из жидкого азота в эту воду и проследите за тем, чтобы они находились под водой. Встряхивайте в течение приблизительно 30 секунд.
- iii) Проверьте криопробирки, вынимая их воды, проверьте, для того, чтобы определить, разморозился ли криопротектор. Если разморозился, тогда вылейте содержимое в стерильную чашку Петри; если нет, поместите их обратно в теплую воду. Принципиально важно, чтобы образец не перегрелся.

ПРИМЕЧАНИЕ: Продолжительное подвергание Bd воздействию при температуре 43°C уничтожит данный организм.

СОВЕТ: Когда содержимое начнет оттаивать, держите криопробирку в руке с тем, чтобы тепло руки способствовало размораживанию.

- iv) Поместите образец на агар (TGhL) в чашке Петри.
- v) При помощи пипетки добавьте немного жидкого криопротектора на образец (в чашке Петри).
- vi) Нанесите несколько капель (приблизительно 1 мл) DS на перенесенный образец и инкубируйте (смотрите выше). Исследуйте

⁵ Рекомендуем контейнеры Mf Frosty® containers (Nalgene)

культуры на протяжении 7–10 дней на предмет движения зооспор. Если по прошествии 4–7 дней никакого движения не наблюдается, а агар выглядит сухим, нанесите несколько капель DS на культуру. Если никакого движения не происходит по прошествии 3 недель, культуры, по всей вероятности, погибли.

ПРИМЕЧАНИЕ: При наличии контаминации перенесите культуру на неконтаминированный участок. Если контаминация существенная, используйте TGhL с антибиотиками.

4.3.1.2.1.2.4. Реактивы

4.3.1.2.1.2.4.1. DS

Смотрите Пункт 3.1.2.

4.3.1.2.1.2.3.2. Криосреда

Стоковый раствор обезжиренного молока.

Добавьте 90 мл (30,5 г) сухого порошкового обезжиренного молока к 200 мл дистиллированной воды комнатной температуры в бутылке объемом 500 мл. Тщательно смешайте, затем автоклавируйте в течение не более чем 15 минут при скорости сброса давления 5–8 минут. Обратите внимание на то, что молоко очень легко карамелизуется, и часто приходится выбрасывать то, что получается в результате, и повторять этот этап. Если на выходе из автоклава раствор выглядит слишком коричневым – удалите его и переделайте стоковый раствор. Он должен быть бледно-коричневого/сливочного цвета.

4.3.1.2.1.2.3.3. Раствор № 1

Приготовьте 100 мл 20% глицерола в дистиллированной воде двойной перегонки и автоклавируйте на нормальном цикле.

4.3.1.2.1.2.3.4. Раствор № 2

В шкафу приготовьте 17% стерильный раствор обезжиренного молока (смотрите выше) путем добавления 17 мл раствора обезжиренного молока к 83 мл стерильной воды.

4.3.1.2.1.2.3.5. Криопротектор

В шкафу приготовьте 200 мл криопротектора путем добавления равных объемов раствора № 1 к раствору № 2. Следует поддерживать стерильность путем фламбирования горлышка бутылки при использовании.

4.3.1.3. Методы обнаружения, основанные на использовании антител

Следует отметить, что антитела, используемые во всех соответствующих методах, перекрестно реагируют с целым рядом грибов (Berger et al., 2002). В связи с этим

их следует использовать с осторожностью и в сочетании с классической световой и/или электронной микроскопией (смотрите Пункт 4.3.1.).

4.3.1.3.1. Совместная локализация *Vd* и кератина при помощи гистохимии и специализированного окрашивания

Срезы, полученные от инфицированных животных, обрабатывали посредством модифицированной версии процедуры (Berger с соавт., 2002). Срезы инкубировали с конъюгированным иммунопероксидазой (IPX) вторичным антителом, что в результате привело к красно-коричневому окрашиванию *Vd*, расположенного посреди эпителиальных клеток (контрокрашенных гематоксилином Lillie-Mayer⁶).

4.3.1.3.1.1. Процедура № 1: Иммунопероксидаза

- i) Освободите срезы от воска: 10 минут в печи с температурой 60°C, ксилен 1 минута (× 3), 100% этиловый спирт (технический) 1 минута × 2, 70% этиловый спирт 1 минута, проточная водопроводная вода 1 минута, дистиллированная вода.
- ii) Ополосните в буфере (ФБР) для удаления возможных воздушных пузырьков.
- iii) Нанесите первичное антитело в требуемом разбавлении (определите эмпирическим путем); используйте 0,1% порошковое обезжиренное молоко/раствор БСА в ФБР (PBSA) в качестве разбавителя.
- iv) Инкубируйте предметные стекла в течение 45 минут при 37°C.
- v) Ополосните предметные стекла в ФБР в течение 5 минут.
- vi) Блокируйте эндогенный пероксид: Нанесите 3% H₂O₂ в дистиллированной воде, 200 мкл слайд⁻¹, на 20 минут при комнатной температуре.
- vii) Ополосните предметные стекла в ФБР в течение 5 минут.
- viii) Добавьте систему визуализации «Envision +»⁷ (антикроличью для поликлонального антитела, антимишиную – когда первичным является моноклональное антитело (MAb)), 3–4 капли в течение 20 минут, 37°C.
- ix) Ополосните предметные стекла в ФБР в течение 5 минут.
- x) Достаньте предметные стекла из кассет «sequenza» и поместите в подставку для окрашивания в емкость с буфером. Выложите слайды на горизонтальную подставку для окрашивания, протирая вокруг срезов салфеткой, и нанесите раствор субстрата из расчета 200 мкл на слайд.
- xi) Добавьте 200 мкл диметил формамида (ДМФА) к 200 мг порошка АЭК

⁶ Sigma

⁷ “ENVISION +”: Dako Peroxidase anti-mouse Code 4000 (15 мл) или 4001 (110 мл)

(3-амино-9-этилкарбазол, Sigma), убедитесь, что порошок полностью растворился, добавьте 10 мл 0,05 М ацетатного буфера pH 5,0, добавьте 5 мкл 30% H₂O₂.

- xii) Проверьте срез, используемый в качестве положительного контроля, каждые 2 минуты, пока не будет получено оптимальное окрашивание, обычно в период от 2 до 5 минут.
- xiii) Остановите реакцию, промыв предметные стекла в дистиллированной воде.
- xiv) Проведите контрокрашивание в гематоксилине Lillie-Mayer (Мод.) в течение 30–90 секунд, ополосните в водопроводной воде, окрасьте в синий цвет в растворе Scott's Solution, ополосните в проточной водопроводной воде.
- xv) Ополосните предметные стекла в дистиллированной воде и заключите препараты в водную монтирующую среду.

4.3.1.3.1.2. Процедура № 2: Окраска для выявления щелочной фосфатазы и кератина

Гистологическая и гистохимическая идентификация Bd может быть осложнена отслаиванием поверхностного кератинизированного слоя (*stratum corneum*), что приводит к ошибочной диагностике, так как спорангии утрачиваются вместе с отшелушившейся кожей. Сочетание иммуноокрашивания на наличие Bd с трехцветной окраской на кератин по Холланду (Hollande's Trichrome keratin stain) помогает определить, не мог ли отрицательный результат быть получен из-за утраты кератинового слоя (Olsen с соавт., 2004).

Хотя щелочная фосфатаза (ЩФ, AP) не более эффективна в качестве субстрата, чем иммунопероксидаза (IPX), ей отдается предпочтение из-за выбеливающего эффекта на IPX-субстрате под действием последующего окрашивания для выявления кератина. ЩФ имеет преимущество в виде усиленного контраста между окрашиванием субстрата и кератина.

- i) Освободите срезы от воска при помощи ксилена и гидратируйте посредством этилового спирта нисходящей концентрации и проточной водопроводной воды.
- ii) Поместите в дистиллированную воду.
- iii) Инкубируйте срезы с антихитридным поликлональным антителом Rabbit 667 (1/1000 в 1% [вес/объем] обезжиренном молоке/трис-буферном солевом растворе [ТБС, TBS]) в течение 45 минут при 37°C.
- iv) Промойте срезы в течение 5 минут с помощью ТБС.
- v) Инкубируйте со щелочной фосфатазой ENVISION anti-rabbit/mouse

Alkaline Phosphatase⁸ в течение 20 минут при 37°C.

- vi) Опять промойте (5 минут) с помощью ТБС.
- vii) Добавьте ВСIP/NBT субстрат⁹ непосредственно к срезам и инкубируйте в течение 10 минут.
- viii) Ополосните предметные стекла дистиллированной водой.

На данной стадии, если дальнейшее окрашивание не требуется, предметные стекла следует заключить в гель на водной основе¹⁰ и герметически закрыть покровным стеклом.

4.3.1.3.1.2.1. Окраска для выявления кератина – Модифицированная трехцветная окраска по Холланду

- i) Достаньте предметные стекла из дистиллированной воды (после иммуномечения) и инкубируйте с 1% (вес/объем) фосфорномолибденовой кислотой¹¹ (раствор С) в течение 5 минут при комнатной температуре.
- ii) Ополосните дистиллированной водой и инкубируйте с насыщенным (как минимум 11% [вес/объем]) раствором оранжевого G (Orange G)¹² (раствор D) в течение 5 минут при комнатной температуре.
- iii) Большую часть раствора D следует слить и добавить 0,2% (вес/объем) светло-зеленый SF (Sigma) (раствор E) без ополаскивания на 2 минуты при комнатной температуре.
- iv) Поместите предметные стекла (без ополаскивания) в 100% этиловый спирт (×2), очистите в ксилене (×2) и заключите препараты в монтирующий гель на основе ксилена.
- v) Оставьте предметные стекла сохнуть до тех пор, пока монтирующая среда не застынет, затем рассмотрите при помощи светового микроскопа.

4.3.1.3.1.3. Интерпретация результатов окрашивания

В результате комбинированных методов окрашивания получают синий/фиолетовый цвет для Vd, оранжевый для кератина и прекератина и зеленый для коллагена и других субэпидермальных соединительных тканей.

Результат окрашивания	Интерпретация
-----------------------	---------------

⁸ DakoCytomation

⁹ DakoCytomation

¹⁰ Например, Immunon™, Thermo Shandon

¹¹ Ajax/Univar

¹² Gurr, Michrome #411

Кератин	Vd	
+	–	Лягушка была Vd-отрицательной. Присутствие кератина обеспечивает уверенность в результатах диагностики
+	+	Лягушка была инфицирована Vd
–	–	Допускает двоякую интерпретацию. Невозможна идентификация с отрицательным результатом, поскольку кератин отсутствует, а Vd может присутствовать в слущившейся коже

4.3.1.3.2. Обнаружение Vd с использованием ИФА с захватом антигена

Ввиду недостаточной чувствительности и специфичности, ИФА с захватом антигена не рекомендуется для обнаружения Vd.

4.3.1.3.3. Традиционная и иммуноэлектронная микроскопия

Принцип теста: кожу можно исследовать посредством электронной микроскопии. Традиционная электронная микроскопия (исследование ультратонких срезов) генерирует данные о структуре Vd. Использование Vd-специфических антител и меченых золотом антивидовых антител позволяет исследовать как ультраструктуру, так и антигенность (Berger с соавт., 2005a).

4.3.1.3.3.1. Традиционная трансмиссионная электронная микроскопия

Произведите фиксацию тканей, как описано у Berger с соавт., 2002. Если говорить коротко, то 2,5% (объем/объем) забуференный глутаральдегид (какодилат или фосфат) используется для фиксации клеток в течение 40 минут. Следом за первичной фиксацией клетки ополаскивают в том же буфере (3 × 20 минут), осуществляют постфиксацию в 1% (вес/объем) забуференном осмий тетраоксиде (1 час), промывают (3 × 5 минут) в воде, подвергнутой двойной дистилляции/обратному осмосу (RO), дегидратируют при помощи спирта восходящей концентрации (70–100%) и фильтруют и заливают в эпоксидную смолу (например, Spurr's или Epon).

4.3.1.3.3.2. Мечение срезов золотом

- i) Что касается мечения золотом ультратонких срезов залитого в смолу материала (Nyatt, 1991), следует обратить внимание на режимы фиксации и заливки. Например, клетки следует фиксировать в 0,25% (объем/объем) глутаральдегиде с 2–4% параформальдегидом. Вторичная фиксация не применяется, и клетки фильтруют и заливают в акриловую смолу¹³.
- ii) Следом за фиксацией и заливкой, изготовьте ультратонкие срезы и перенесите их на покрытые пленкой никелевые сеточки.
- iii) Изготовьте срезы из соответствующих блоков.
- iv) Блокируйте в 2% (вес/объем) порошковом обезжиренном молоке в растворе БСА в ФБР (PBS-A) (10 минут).

¹³ как, например, LR White или HM20 Lowicryl

- v) Блокируйте свободные альдегиды при помощи 0,1 М глицина в PBS-A (20 минут).
- vi) Промойте в PBS-A (3 × 1 минута). Это необязательный этап, применяемый только при наличии избыточного количества свободных альдегидов (о чем может свидетельствовать высокий фоновый уровень).
- vii) Если не используется протеин А-золото, тогда блокируйте в нормальной видовой сыворотке – эта сыворотка должна быть гомологична таковой, образующей комплекс с золотом. Рекомендуемое разведение – приблизительно 1/40 (10 минут).
- viii) Инкубируйте в первичном антителе. Если детали инкубирования неизвестны, тогда осуществите первоначальные реакции с разведениями от 1/100 до 1/2700 (с трехкратными разведениями). Разведите антитела в 1% (объем/объем) желатине, произведенном из холодноводных рыб, в PBS-A (60 минут, комнатная температура).
- ix) Ополосните в 1% (объем/объем) желатине, произведенном из холодноводных рыб, в PBS-A (6 × 3 минуты).
- x) Инкубируйте в меченом золотом вторичном антителе или протеин А-золоте или протеин G-золоте. Предлагаемое разведение 1/40 в PBS-A, содержащем 1% (вес/объем) бычий сывороточный альбумин (BCA, BSA), 0,1% (объем/объем) Tween 20 и 0,1% (объем/объем) Triton X, 60 минут, комнатная температура.
- xi) Ополосните в PBS-A (6 × 3 минут, комнатная температура).
- xii) Произведите постфиксацию в 2,5% (объем/объем) глутаральдегиде в PBS-A (5 минут, комнатная температура).
- xiii) Ополосните в воде (подвергнутой обратному осмосу, RO) (3 × 3 минуты, комнатная температура).
- xiv) Просушите на фильтровальной бумаге (тип не имеет критического значения).
- xv) Окрасьте в ацетате уранила и ацетате свинца.

4.3.1.3.3. *Интерпретация результатов*

Мембраны (внешние), ассоциированные с зооспорами и спорангиями, будут помечены золотом.

4.3.1.4. Молекулярные методы, TaqMan-ПЦР

Идентификация Vd возможна с использованием описанного и валидированного (Boyle с соавт., 2004; Nyatt с соавт., 2007) TaqMan-анализа в реальном времени. Анализ может быть завершен менее чем через 24 часа при относительно малых затратах.

В Taqman-ОТ-ПЦР используется набор праймер/зонд, предназначенный для нацеливания на высококонсервативный регион 5.8, 18 и 28S ДНК, разделенных внутренними транскрибируемыми спейсерами (ITS-1 и ITS-2) и межгенным спейсером, для обнаружения Vd с использованием мазков (тампонов), ампутированных пальцев ног, фильтров и ротовых дисков головастиков (нефиксированных или обезвоженных). Последовательности 5.8, 18 и 28S рРНК являются высококонсервативными, в то время как участки ITS-региона и межгенного спейсера быстро эволюционируют. Анализ обладает чувствительностью на уровне 0,1 зооспорных эквивалентов. Также он количественно определит уровень инфекции у животных.

Поскольку данный анализ весьма чувствителен, необходимо принять все возможные меры предосторожности для предотвращения контаминации (анализ количественно определит единственную зооспору в тестируемом образце). К ним относятся использование одноразовых принадлежностей для каждого образца, ношение перчаток, проведение анализов в боксе биологической безопасности II класса, аликвотирование реактивов для разового использования, использование наконечников с фильтром, использование специально предназначенных для определенной цели пипеток, работа в «чистой» зоне.

4.3.1.4.1. Подготовка тампонов

Тампоны, рекомендуемые для использования: Medical Wire & Equipment Co (Великобритания) MW 100-100, поставляемые Biomirieux Aust.). Альтернативные тампоны не были валидированы. При использовании альтернативных вариантов потребуются надлежащая валидация.

- i) Обработайте тампоном нижнюю поверхность стоп, ноги и участок на брюшке, через который происходит всасывание воды («drink patch») энергичными движениями 2-3 раза.
- ii) Отломите тампон в пробирку объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой (с О-образным кольцом), содержащую 30–40 мг 0,5 мм цирконий/силиконовых бусин¹⁴ и 50 мкл PrepMan Ultra¹⁵.
- iii) Гомогенизируйте при помощи гомогенизатора типа «beadbeater» (2 × 45 секунд). Центрифугируйте в микроцентрифуге (30 секунд) в промежутке между каждой гомогенизацией, для извлечения всего материала из пробирки, и еще раз после второй гомогенизации.
- iv) Поместите пробирки с завинчивающимися крышками в подходящий держатель и прогрейте образцы (10 минут при температуре 100°C).
- v) Охладите (2 минуты) при комнатной температуре, затем центрифугируйте в микроцентрифуге (3 минуты).
- vi) Соберите и храните столько супернатанта, сколько возможно – обычно

¹⁴ Biospec. Products - Cat. # 11079105z

¹⁵ Applied Biosystems. Cat. # 4318930

20–40 мкл.

При процессировании больших количеств, супернатанты можно хранить в 96-луночных планшетах с V-образным дном в каждом втором ряду – разведение (1/10 в воде) можно производить в промежуточных рядах планшета. Собранные супернатанты можно хранить в течение недели при 4°C, если в это время проводится анализ, в противном случае храните в замороженном виде при температуре –20°C. Запечатывайте планшеты во избежание испарения. Каждый раз необходимо предусматривать отрицательный контроль экстракции, чтобы гарантировать отсутствие контаминации (например, чистый тампон в 50 мкл PrepMan Ultra).

4.3.1.4.2. Подготовка ампутированных пальцев ног и ротовых частей

Экстракция – такая же, как и для тампонов. Используйте приблизительно (не более) 1 мг. Используйте новые стерильные лезвия скальпеля на чистой, свободной от Vd (т.е. не использовавшейся ранее) поверхности, например, чашке Петри. Что касается крупных пальцев ног, снимите кожу с пальца, используя чистые скальпели, чашку Петри и зубочистку, и добавьте не более 10% (вес/объем), чтобы не допустить перегрузки гомогенизационной системы; при необходимости, увеличьте объем PrepMan Ultra. Поместите образец непосредственно в пробирку с циркониевыми бусинами и PrepMan, как описано для тампонов.

4.3.1.4.3. Экстракция ДНК

Экстракцию ДНК осуществляют из ампутированных пальцев ног, тампонов, фильтров или ротовых дисков головастиков путем выделения с использованием PrepMan Ultra.

- i) 50 мкл PrepMan Ultra (200 мкл для фильтров) добавляют к каждому образцу вместе с 30–40 мг цирконий/силиконовых бусин диаметром 0,5 мм¹⁶.
- ii) Гомогенизируйте образец в течение 45 секунд в гомогенизаторе типа «bead-beater», например, Mini Beadbeater 8¹⁷.
- iii) Центрифугируйте (30 секунд, 13000 g в микроцентрифуге, ×2): при этом происходит извлечение всего материала из пробирки.
- iv) Прогрейте образец при температуре 100°C (10 минут), охладите (2 минуты) и центрифугируйте (13000 g, 3 минуты в микроцентрифуге).
- v) Отберите 20%¹ (?) супернатанта и сразу же используйте; образец можно хранить при температуре –20°C до момента использования.

4.3.1.4.4. Приготовление стандартов

¹⁶ Biospec Products

¹⁷ Biospec Products

- i) 2 мл активно растущей культуры *B. dendrobatidis* высевают в планшеты с TGhL и выращивают в течение 4-5 дней.
- ii) Зооспоры собирают путем заливания планшета дважды 2 мл раствора DS.
- iii) Произведите подсчет зооспор в гемоцитометре ($\times 4$).
- iv) Пеллетируйте 10^7 зооспор в микроцентрифуге (13000 g, 1 минута).
- v) Удалите осадок от центрифугирования и ресуспендируйте в 200 мкл PrepMan Ultra.
- vi) Кипятите суспензию в течение 10 минут, охлаждайте 2 минуты, центрифугируйте в микроцентрифуге в течение 3 минут и удалите 150 мкл супернатанта.
- vii) Разведите ДНК в дистиллированной воде (2×10^5 на мл геномных эквивалентов) и аликвотах, хранившихся при температуре -20°C .

4.3.1.4.5. Внутренние контроли

Ингибиторы TaqMan-анализа, такие как почва на тампонах, могут присутствовать после процесса экстракции, приводя к тому, что регистрируются ложно-отрицательные результаты. Присутствие ингибиторов в образцах можно обнаружить путем использования внутреннего контроля. Applied Biosystems® производит синтетический ампликон из плазмидного источника, последовательность которого, как известно, не встречается в природе. VIC-меченый и ограниченный праймерами для использования в мультиплексных анализах¹⁸: 1 мкл $10 \times \text{Eco IPC}$ смеси и 0,5 мкл $50 \times \text{Eco IPC}$ ДНК следует включить в состав мастер-микса 1 лунки трех повторностей. Значения пороговых циклов Ct в VIC-слое должны быть сопоставимы для контролей и тестируемых образцов. Если значение Ct тестируемого образца в VIC-слое в два-четыре раза выше, чем у отрицательного контроля, тогда образец следует развести 1/100 или больше.

4.3.1.4.6. TaqMan-анализ

- i) Аликвотируйте 20 мкл соединенных мастер-микса/праймеров/зонда на лунку.
- ii) Добавьте 5 мкл ДНК при разведении 1/10 (в воде) для образцов, подготовленных с использованием PrepMan Ultra.
- iii) Для каждого анализа необходимо использовать стандарты 100, 10, 1 и 0,1 зооспор для построения стандартной кривой. Стоковые растворы стандартов можно приготовить и хранить в замороженном виде и разводить при возникновении потребности.
- iv) Также на каждом планшете необходимо предусмотреть контроль экстракции без ДНК (безматричный контроль).

¹⁸ TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents (VIC Probe) # 4308323

- v) Все образцы, включая стандарты, следует выполнить в трех повторностях.
- vi) Последовательности праймеров и зонда:

<p>Праймер 1 (Прямой праймер): <i>ITS1-3 Bd</i>: 29 оснований 5'-CCT-TGA-TAT-AAT-ACA-GTG-TGC-CAT-ATG-TC-3'</p>
<p>Праймер 2 (Обратный праймер): <i>5.8S Bd</i>: 22 основания 5'-AGC-CAA-GAG-ATC-CGT-TGT-CAA-A-3'</p>
<p>Зонд: <i>Chytr MGB2</i> 15 нуклеотидов – FAM-меченый. 5'-6FAM-CGA-GTC-GAA-CAA-AAT-MGBNFQ-3'</p>

В Референтной лаборатории МЭБ амплификация осуществляется в термоциклере ABI 7500 fast или 7900 Sequence Detection System с использованием следующей программы: 50°C в течение 2 минут (перевар с использованием урацил-N-гликозилазы) 1 цикл; 95°C в течение 10 минут (активация Taq Gold термостабильной ДНК-полимеразы, присутствующей в мастер-миксе), 1 цикл; 95°C в течение 15 секунд, 60°C в течение 1 минуты; 45 циклов.

ПРИМЕЧАНИЕ: Праймеры и зонды ресуспендируют в соответствии с инструкциями изготовителя.

4.3.1.4.6.1. *Условия проведения циклов*

50°C	2 минуты
95°C	10 минут
<i>45 повторов:</i>	
95°C	15 секунд
60°C	1 минута

4.3.1.4.7. *Интерпретация данных*

После завершения исследования, следует проанализировать результаты, пользуясь следующими указаниями:

- i) Выполните настройки параметров ОВТ (устранение выбросов, базовая линия и пороговый уровень), установив диапазон уровня базовой линии

на 3, 15, а уровень пороговой линии – на Дельта RN 0,1 (Vd и внутренний контроль).

- ii) Если положительные образцы имеют значение СТ <18, снизьте верхнее значение уровня базовой линии с 15 до уровня, по меньшей мере, на 3 ниже, чем значение СТ образца.

Определите, валиден ли анализ, посредством визуализации:

- i) Лунки с положительными контролями: кривые амплификации на слое красителя FAM должны иметь характерную форму.
- ii) Экзогенный положительный контроль не должен быть более чем в два раза выше, чем его определенное значение в отрицательном контроле. Если значение СТ выше более чем в два раза, значит, имело место ингибирование реакции и образец следует развести (1/00).
- iii) Экстракция с использованием безматричного контроля и отрицательного контроля: определите отсутствие контаминации посредством наблюдения отсутствия характерных кривых амплификации на слое красителя FAM. Слой красителя VIC должен иметь значение СТ больше, чем 39.
- iv) Стандартная кривая: стандарты при концентрациях 1/100, 10, 1, 0,1 находятся в пределах указанного диапазона эталонного стандарта. R² больше, чем 0,98.

Если тест признается валидным, то результаты для лунок с тестируемым образцом можно интерпретировать, используя следующие критерии:

- Положительные результаты
Дефиниция: Присутствие специфических ампликонов, о чем свидетельствует характерная кривая амплификации, подобная положительному контролю при значении СТ, меньшем или равном 39 (во всех трех лунках).
- Отрицательные результаты
Дефиниция: Отсутствие специфических ампликонов, о чем свидетельствует отсутствие характерной кривой амплификации и наличие значения СТ, большего, чем 41 (во всех трех лунках).
- Неопределенные результаты
Дефиниция: наличие характерных кривых амплификации подобно положительному контролю, но при значении СТ в диапазоне между 39 и 41 или малое количество зооспорных эквивалентов в только одной или двух лунках).

5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для надзора, обнаружения и диагностики хитридиомикоза перечислены в Таблице 5.1. Обозначения, использованные в Таблице, означают: а = данный метод является методом, рекомендуемым по причинам доступности, целесообразности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; с = данный метод применяется в некоторых ситуациях, однако затраты, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение; d = данный метод в настоящее время не рекомендуется для данной цели; и NA = не применяется. Данные обозначения в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает в себя такие аспекты, как достоверность, чувствительность, специфичность и целесообразность. Хотя не все из тестов, перечисленных как относящиеся к категории а или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию (смотрите Главу 1.1.2. настоящего *Руководства по водным животным*), их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются, не давая при этом вызывающих сомнения результатов, делают их приемлемыми.

Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики

Метод	Целевой надзор				Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Яйцеклетки/семена	Головастики	Метаморфы	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	na	d	d	d	d	d
Гистопатология	na	c	c	c	c	c
Иммунопереоксидазное окрашивание	na	c	c	c	b	b
Трансмиссионная ЭМ	na	d	d	d	c	c
Иммуно-ЭМ	na	d	d	d	c	c
Выделение	na	na	na	na	na	na
ИФА с захватом антигена	na	na	na	na	na	na
ИФА с захватом антитела	na	na	na	na	na	na
ТaqMan-ПЦР	na	a	a	a	a	a
ПЦР-секвенирование	na	b	b	b	b	a

Гистопатология является высокоспецифичной; на больных животных она также является высокочувствительной. ЭМ = электронная микроскопия; ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ; ПЦР = полимеразная цепная реакция; na = не применяется.

6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора для объявления свободы от хитридиомикоза

Отбор образцов и соответствующие TaqMan-анализы, описанные в данной статье, могут

быть использованы для целевого надзора в отношении Vd. Прощедшая экспертную оценку процедура исследования, которая может быть использована для картирования Vd в пределах географических регионов, приведена в недавней статье (Skerratt с соавт., 2010).

7. Критерии подтверждающей диагностики

7.1. Дефиниция подозрительного случая

Земноводное, внешне здоровое или умирающее, которое демонстрирует аномальное поведение и имеет локализованные участки отшелушившейся кожи. Кожа должна заключать в себе признаки структуры, содержащей зооспоры и спорангии, которые окрашиваются с помощью антител, получаемых из референтной лаборатории.

7.2. Дефиниция подтвержденного случая

Земноводное, внешне здоровое, умирающее или павшее, в коже которого содержится Vd согласно TaqMan-анализу.

ПРИМЕЧАНИЕ: Гистология (окрашенные гематоксилином и эозином срезы) могут быть с уверенностью использованы квалифицированными патологами, поскольку нет никаких других грибов, присутствующих на земноводных, с подобной структурой (спорангии с выводными трубочками, зооспорами внутри клеток stratum corneum); однако, окончательное определение осуществляется посредством TaqMan-ПЦР.

8. Библиография

BERGER L., SPEARE R., DASZAK P., GREEN D., CUNNINGHAM A., GOGGIN C., SLOCOMBE R., RAGAN M., HYATT A., MCDONALD K., HINES H., LIPS K., MARANTELLI G. & PARKES H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9031–9036.

BERGER L., HYATT A., OLSEN V., HENGSTBERGER S., BOYLE D., MARANTELLI G., HUMPHREYS K. & LONGCORE J. (2002). Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 213–220.

BERGER L., HYATT A., SPEARE R. & LONGCORE J. (2005a). Life cycle stages of *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore с соавт. 1999, the amphibian chytrid. *Dis. Aquat. Org.*, **68**, 51–63.

BERGER L., SPEARE R. & SKERRATT L. (2005b). Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs (*Litoria caerulea*) with severe chytridiomycosis. *Dis. Aquat. Org.*, **68**, 65–70.

BERGER L., LONGCORE J., SPEARE R., HYATT A. & SKERRATT L.F. (2009a). Fungal Diseases in Amphibians. In: Amphibian Biology, Volume 8 Amphibian Decline: Disease, Parasites, Maladies, and Pollution. H. Heatwole and J.W. Wilkinson, Surrey Beatty & Sons, New South Wales, Australia, 2986–3052.

- BERGER L., SPEARE R., MARANTELLI G. & SKERRATT L. (2009b). A zoospore inhibition technique to evaluate the activity of antifungal compounds against *Batrachochytrium dendrobatidis* and unsuccessful treatment of experimentally infected green tree frogs (*Litoria caerulea*) by fluconazole and bezalkonium chloride. *Res. Vet. Sci.*, **87**, 106–110.
- BERGER L., SPEARE R., PESSIER A., VOYLES J. & SKERRATT L.F. (2010). Treatment of chytridiomycosis requires urgent clinical trials. *Dis. Aquat. Org.*, **Special 4: Chytridiomycosis: an emerging disease**, 17.
- BLAUSTEIN A., ROMANSIC J.M., SCHEESSELE E.A., HAN B.A., PESSIER A.P. & LONGCORE J.E. (2005). Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biol.*, **19**, 1460–1468.
- BOYLE D.G., BOYLE D.B., OLSEN V., MORGAN J.A.T. & HYATT A.D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 133–139.
- BRIGGS C.J., VREDENBURG V.T., KNAPP R.A. & RACHOWICZ L.J. (2005). Investigating the population-level effects of chytridiomycosis: an emerging infectious disease of amphibians. *Ecology*, **86**, 3149–3159.
- DAVIDSON E.W., PARRIS M., COLLINS J.P., LONGCORE J.E., PESSIER A.P. & BRUNNER J. (2003). Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia.*, **3**, 601–607.
- DRURY R.B. & WALLINGTON E.A. (1980). Carleton's Histological Technique, Oxford University Press, 520 pp.
- FISHER M.C., GARNER T.W.J. & WALKER S.F. (2009). Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *Microbiology*, **63**, 291–310.
- FORZAN M.J., GUNN H. & SCOTT P. (2008). Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs, diagnosis, treatment, and control. *J. Zoo. Wildl. Med.*, **39**, 406–411.
- GARNER T.W., GARCIA G., CARROLL B. & FISHER M.C. (2009). Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 257–260.
- HANSELMANN R., RODRIQUE A., LAMPO M., FAJARDO-RAMOS L., AGUIRRE A., MARM K.A., RODREQUIZ P. & DASZAK P. (2004). Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. *Biol. Conserv.*, **120**, 115–119.
- HOHREITER D.W. & RIGG D.K. (2001). Derivation of ambient water quality criteria for formaldehyde. *Chemosphere*, **45**, 471–486.
- HYATT A.D. (1991). Immunogold labelling techniques. *In: Electron Microscopy in Biology: a Practical Approach*. Harris R., ed. IRL Press, Oxford, UK, 59–81.

- HYATT A.D., BOYLE D.G., OLSEN V., BOYLE D.B., BERGER L., OBENDORF D., DALTON A., KRIGER K., HERO M., HINES H., PHILLOTT R., CAMPBELL R., MARANTELLI G., GLEASON F. & COLLING A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 175–192.
- JOHNSON M., BERGER L., PHILLIPS L. & SPEARE R. (2003). *In vitro* evaluation of chemical disinfectants and physical techniques against the amphibian chytrid, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 255–260.
- JOHNSON M. & SPEARE R. (2003). Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and control implications. *Dis. Aquat. Org.*, **9** (8), 922–925.
- JOHNSON M. & SPEARE R. (2005). Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 181–186.
- LIPS K., BREM F., BRENES F., REEVE J., ALFORD R., VOYLES J., CAREY C., LIVO L., PESSIER A. & COLLINS J. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** (9), 3165–3170.
- LONGCORE J., PESSIER A. & NICHOLS D. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, **91**, 219–227.
- LONGCORE J.R., LONGCORE J.E., PESSIER A.P. & HALTEMAN W.A. (2007). Chytridiomycosis widespread in anurans of northeastern United States. *J. Wildl. Management*, **71**, 435–444.
- MARANTELLI G., BERGER L., SPEARE R. & KEEGAN L. (2004). Distribution of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development. *Pacific Conservation Biol.*, **10** (1), 173–179.
- MARTEL A., VAN ROOIJ P., VERCAUTEREN G., BAERT K., VAN WAEYENBERGHE L., DEBACKER P., GARNER T.W., WOELTJES T., DUCATELLE R., HAESBROUCK F. & PASMANS F. (2010). Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycol.*, **49** (2), 143–49.
- NICHOLS D.K. & LAMIRANDE E.W. (2009). Successful treatment of chytridiomycosis. *Froglog*, **2001**, 46.
- OLSEN V., HYATT A.D., BOYLE D.G. & MENDEZ D. (2004). Co-localisation of *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin for enhanced diagnosis of chytridiomycosis in frogs. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 85–88.
- PARKER J.M., MIKAELIAN I., HAHN N. & DIGGS H.E. (2002). Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Comp. Med.*, **52**, 265–268.
- PESSIER A.P., NICHOLS D.K., LONGCORE J.E. & FULLER M.S. (1999). Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 194–199.
- PIOTROWSKI J.S., ANNIS S.L. & LONGCORE J.F. (2004). Physiology of *Batrachochytrium*

dendrobatidis, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, **96** (1), 9–15.

RETALLICK R.W.R., MCCALLUM H. & SPEARE R. (2004). Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community postdecline. *PLoS Biol.*, **2**, 1965–1971.

PHILLOTT A.D., SPEARE R., HINES H.B., MEYER E., SKERRATT L.F., MCDONALD K.R., CASHINS S.D., MENDEZ D. & BERGER L. (2010). Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 175–185.

ROWLEY J.J.L., CHAN S.K.F., TANG W.S., SPEARE R., SKERRATT L.F., ALFORD R.A., CHEUNG K.S., HO C.Y. & CAMPBELL R. (2007). Survey for the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hong Kong in native amphibians and in the international amphibian trade. *Dis. Aquat. Org.*, **78**, 87–95.

SKERRATT L.F., BERGER L., SPEARE R., CASHINS S., MCDONALD K., PHILLOTT A., HINES H. & KENYON N. (2007). Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*, **4**, 125–134.

SKERRATT L.F., MCDONALD K.R., HINES H.B., BERGER L., MENDEZ D., PHILLOTT A.D., CASHINS S.D., MURRAY K. & SPEARE R. (2010). Validation of the Mapping Protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* in Queensland, Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 117–129.

SMITH K., SAX D. & LAFFERTY K. (2006). Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conservation Biol.*, **5**, 1349–1357.

VOYLES J., YOUNG S., BERGER L., CAMPBELL G., VOYLES W.F., DINUDOM A., COOK D., WEBB R., ALFORD R.A., SKERRATT L.F. & SPEARE R. (2009). Pathogenesis of Chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, **23**, 582–585.

WILLIAMS S. & HERO J. (1998). Rainforest frogs of the Australian wet tropics: guild classification and the ecological similarity of declining species. *Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci.*, **265**, 597–602.

WOODHAMS D.C. & ALFORD R.A. (2005). The ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conservation Biol.*, **19**, 1449–1459.

WOODHAMS D.C., ALFORD R.A. & MARANTELLI G. (2003). Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 65–67.

*

* *