



Rapurutto piileskelee vesistöissä, mutta löytyykö sitä vesinäytteistä?

Johtava asiantuntija Satu Viljamaa-Dirks

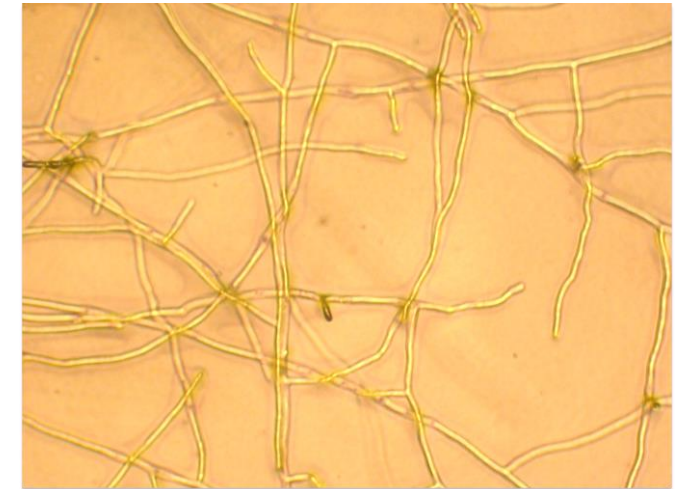
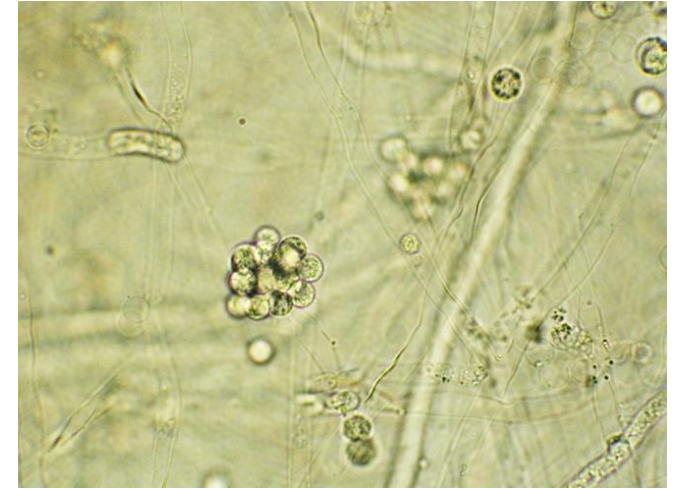
OIE rapuruton vertailulaboratorio
Eläintautibakteriologian ja -patologian yksikkö





Rapurutto, jokirapua uhkaava raputauti

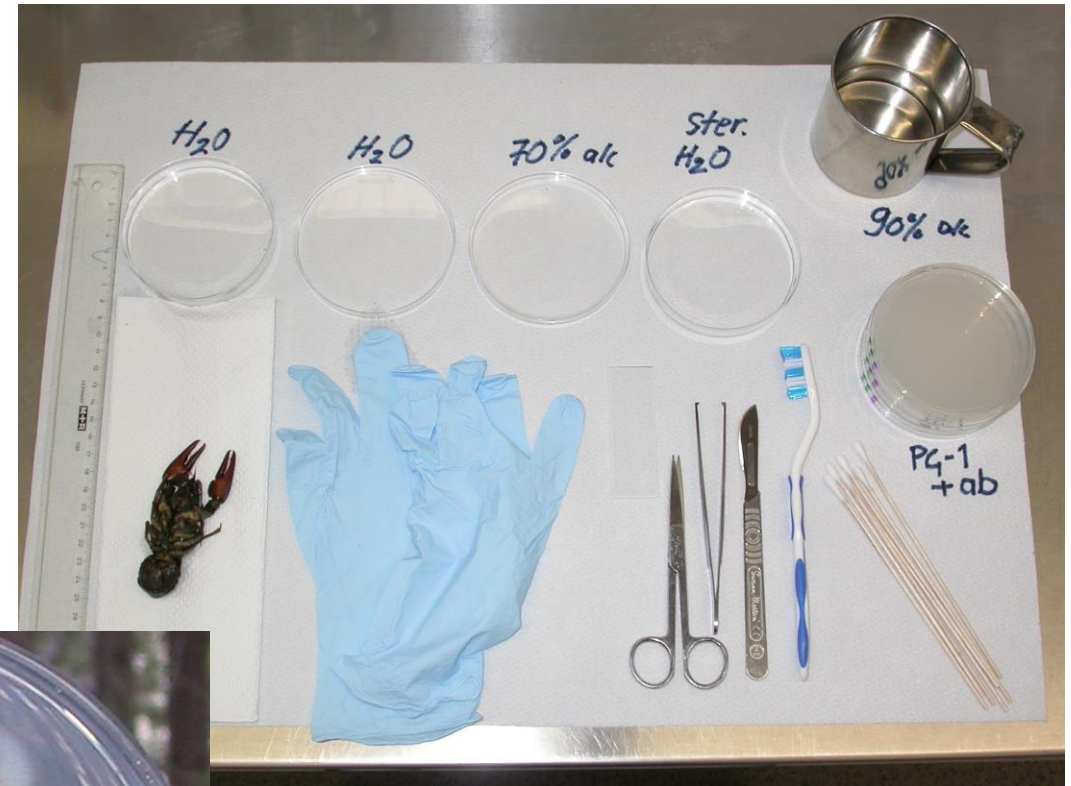
- Rapuruton aiheuttaja on loisiva leväsieni *Aphanomyces astaci*
- Elää vain makean veden rapujen kuoressa
- Sopeutunut yhteiseloon amerikkalaisten rapulajien kanssa
- 1800 –luvun puolivälissä siirtyi laivaliikenteen mukana vahingossa Eurooppaan
- Aiheutti puolustuskyvyttömille eurooppalaisille rapulajeille tappavan taudin
- Levisi nopeasti ja alkoi hävittää suomalaisia jokirapukantoja 1890-luvulla (jokiraputyypin rutto As)
- Täplärapujen mukana tuotiin uusi ruttotyyppi (täpläraputyypin rutto Ps1)





Perinteinen rapuruton diagnostiikka: viljely

- Kasvatetaan rapuruttoleväsieni ravusta elatusaineelle ja tunnistetaan
- Soveltuu parhaiten silloin, kun ravussa selkeät oireet
- Soveltuu huonosti, kun tartunta alhaisella tasolla
- Hidas ja vaatii kokemusta

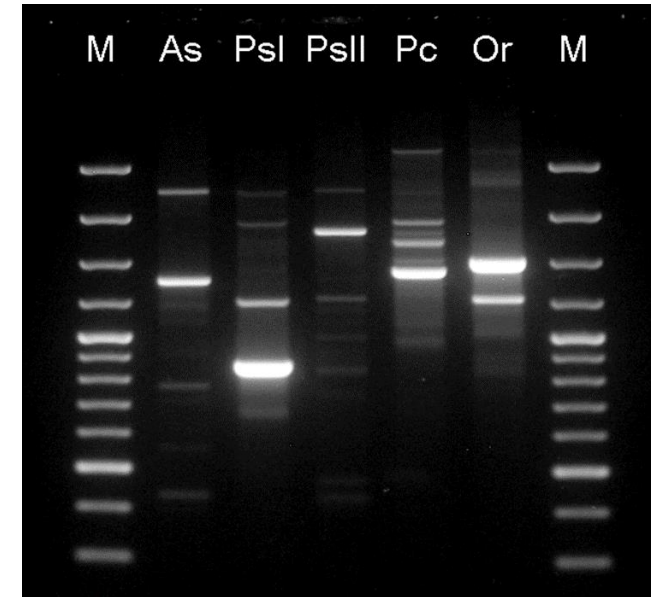


Molekyylibiologiset menetelmät helpottavat diagnostiikkaa



- Perinteinen PCR tunnistaa rapurutto-organismin DNAn ITS (internal transcribed spacer)- alueen perusteella (Oidtmann et al. 2004,2006) *
- TaqMan koettimenn perustuva semikvantitatiivinen reaaliaikainen PCR tunnistaa myös ITS aluetta (Vrålstad et al. 2009) *
- Rapuruton kitinaasigeeniä monistava PCR (Makkonen et al. 2012, Hochwimmer et al. 2009)
- Puhdasviljelmästä tehtävä tyypitys RAPD-PCR (Randomly amplified polymorphic DNA)(Huang et al. 1994) *
- Mikrosatelliitti markkerit, jotka tunnistavat puhdasviljelmästä tai suoraan ravun kuoresta eristetyn DNA:n, joita voidaan käyttää puhdasviljelmään tai suoraan ravunkuoreen (Grandjean et al. 2014) *
- Perinteinen PCR, jossa spesifit alukkeet rapuruton eri tyypeille (Minardi et al. 2018) *
- Rapuruton haplotyyppien tunnistus mitokondriaalista DNA:ta tunnistavilla alukkeilla (Makkonen et al. 2018)

*käytössä Ruokavirastossa



Molekyylibiologisten menetelmien etuja



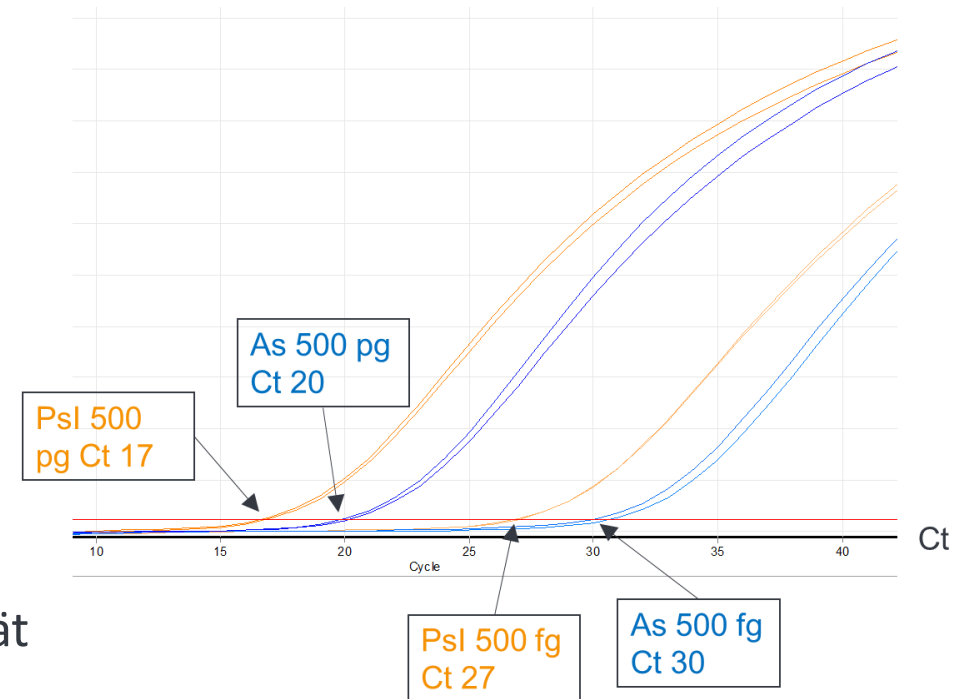
- Viljelymenetelmä epäonnistuu helposti , koska rapunäytteissä kasvaa paljon muitakin sieniä, leväsieniä ja bakteereita, jotka vaikeuttavat viljelyä. PCR menetelmissä ne eivät haittaa
- Viljelyyn verrattuna nopeita
- Eivät vaadi erikoisosaamista
- Eivät vaadi näytteen välitöntä käsittelyä kuten viljely
- Voidaan käyttää myös matalan tason tartuntojen havaitsemiseen
- Rapurutto-organismin tunnistaminen luotettavampaa kuin pelkästään viljelyyn perustuen
- Voidaan myös määrittää tartunnan taso (reaaliaikainen PCR)
- Voidaan tunnistaa rapuruton eri tyyppejä





Molekyylibiologisten menetelmien haasteita

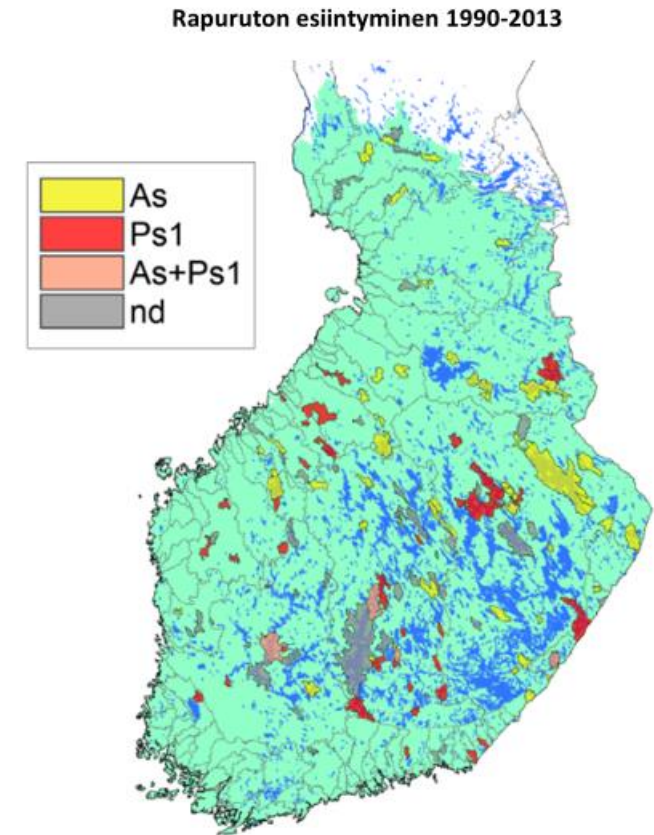
- Osa menetelmistä niin herkkiä, että näytteen pienikin kontaminaatio helposti johtaa väärään positiiviseen tulokseen
- Herkempiä kuin viljely, eli tuloksen varmistaminen hankalaa
- Vain pieni osa ravun kuoresta voidaan analysoida: rapuruttoa on usein vain jossain osassa kuorta
- Viljelyyn verrattuna kallista ja vaatii paremmin varustellun laboratorion
- Perustuu olemassa olevaan geenitietoon
- Genotyyppien määrittämiseen soveltuvat menetelmät eivät ole kovin herkkiä
- Eri genotyyppien monistumisessa eroja eli herkkyys vaihtelee





Rapuruttotilanne Suomessa

- Ensimmäinen tartunta 1890-luvulta As-tyypin rapurutto, aiheuttaa edelleen akuutteja tautipurkauksia, mutta myös piilevänä tartuntana heikoissa jokirapukannoissa
- Suomeen 1960-luvulla tuotu amerikkalainen täplärapu kantaa luontaisesti Ps1-tyypin rapuruttoa
- Ps1-tyyppi aiheuttaa yleensä akuutin taudin jokiravussa
- Diagnostinen tarve on tunnistaa sekä akuutit että piilevät rapurutot
- Piilevien tartuntojen löytäminen erityisen tärkeää, koska estävät palautusistutukset



Rapuruton eri tyyppien esiintyminen Eviran (EELAn) diagnoosien mukaan 1990-2013. Taustavärinä jokiravun levinneisyys 2010.

Kartta © Luke: Rapuruton vaikutukset Suomen raputalouteen. Tutkimuksia ja selvityksiä 5/2014

Perinteinen menetelmä koesumputukset ja/tai rapujen tutkiminen otannalla



Jokirapujen piilevistä tartunnoista edelleen vähän tutkimustietoa
Tutkittava rapumäärä riippuu odotettavissa olevasta tautitasosta, vaihtelee voimakkaasti eri vesistöissä
Tilastollisesti luotettava tutkiminen otannalla käytännössä liian kallista!

Prevalences in noble crayfish (real time PCR):
Acute infection: River Lamujoki 2010 14/15 (93%)
Slowly progressing infections:
River Simojoki: 2010 7/52 (13%)
2011 0/9 (0%)
River Kemijoki: 2010 2/55 (4%)
2011/June 3/67 (4%)
2011/August 12/93 (13%)
Chronic infection:
Lake Pyhäjärvi 2011 13/58 (22%)



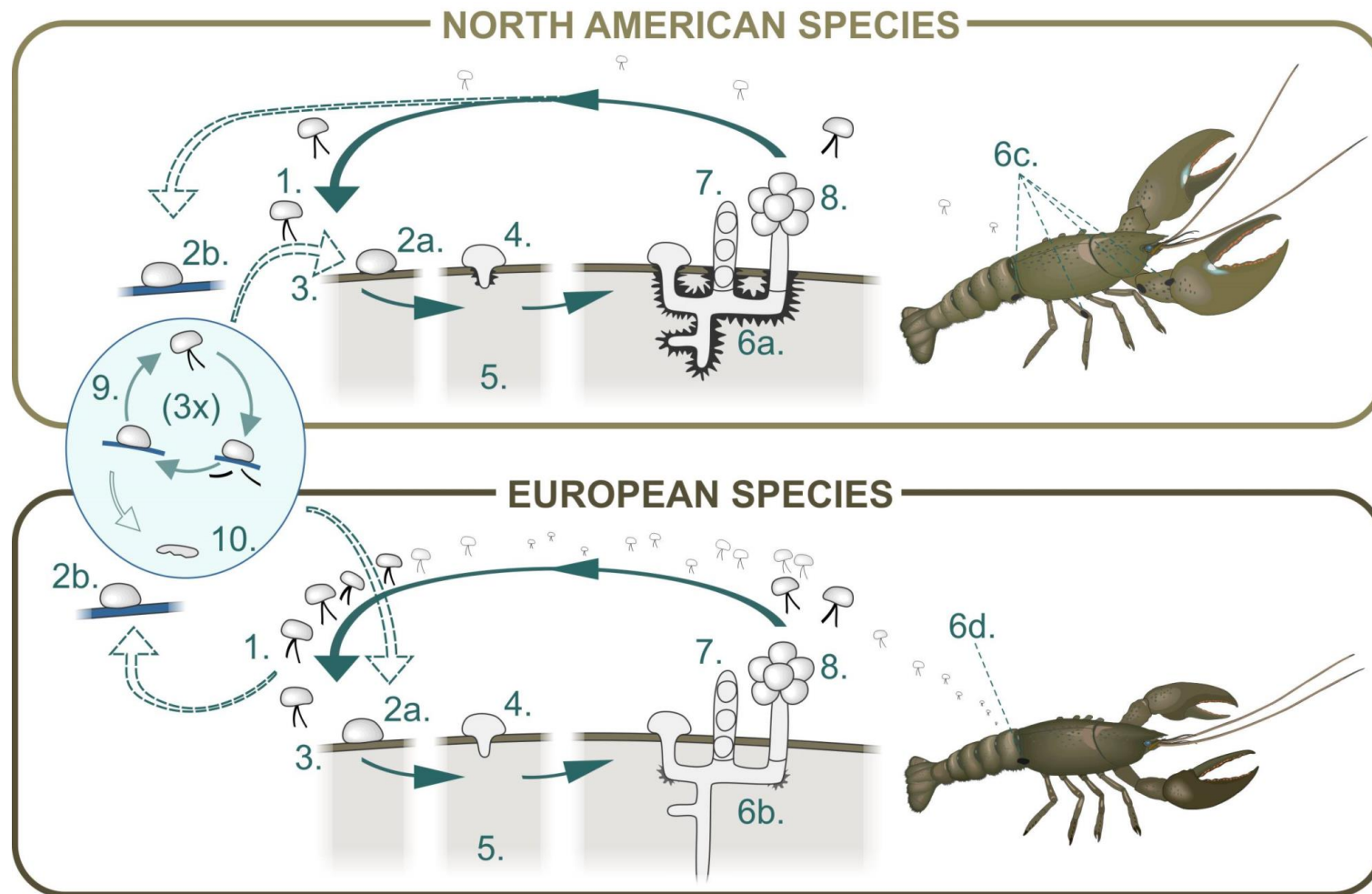
Löytyykö rapurutto myös vedestä?

- Viime vuosina yleistynyt eliöiden jäljittäminen analysoimalla ympäristöstä saatuja näytteitä, eli ympäristö-DNA (eDNA, environmental DNA)
- Käytetään jo paljon mm. kalalajien havaitsemiseen
- Kehitetty myös eri rapulajien tunnistamiseen vesistöistä
- Käytetty myös rapuruttoanalytiikassa, kun kartoitetaan epidemioiden laajuutta ja leviämistä (herkät reaaliaikaiset menetelmät)
- Soveltuisiko myös piileviin rapuruttoihin?

Rapuruttoleväsienien elinkierto



- Rapurutto löytyy joko ravun kuoresta rihmastona tai vedestä lyhytikäisinä uimaitiöinä
- Akuutissa taudissa paljon rihmastoa ja paljon vapautuvia itiöitä, mutta lyhyen aikaa
- Kantajaravuissa vähän rihmastoa ja vähän vapautuvia itiöitä
- Kuorenvaihdot ja rapujen lisääntymisaika otollisia itiöiden muodostumiselle



(Imitating the illustration by Iñaki Diéguez-Urbeondo (Souty-Crosset et al. 2006 "Atlas of crayfish in Europe"), © RKTL)



eDNA: ratkaistavia kysymyksiä

- Näytteenottoaika
- Näytteenottopaikka, syvyys
- Analysoitava vesimäärä
- Käytettävä suodatusmenetelmä
- Käytettävä PCR-menetelmä



Mitä tiedetään odotettavissa olevasta itiömäärästä?



- Kokeellisesti 48 tuntia ennen ravun kuolemaa ja 12 tuntia kuoleman jälkeen itiömäärä 500-2000 itiötä/l, 24 tuntia – 48 tuntia kuolemasta 12000-65000 itiötä/l (Makkonen et al. 2013)
- Täplärapulammikon vesinäytteet (5l) 56% positiivisia, taso vaihteli 0-50 itiötä/l (Strand et al. 2014)



- Järviympäristössä, jossa voimakkaasti infektoituneita täplärapuja, positiivisten (92%) vesinäytteiden (15l) itiömäärä vaihteli 0,2-11 itiötä/l
- Täplärapujärvi, jossa lievästi infektoituneita täplärapuja, alle viidennes vesinäytteistä (100l) positiivisia, itiömäärä 0,05-9 itiötä/l
- Akuutti rapurutto jokiravuiissa pienessä joessa, kaikki vesinäytteet (5l) positiivisia, 20-500 itiötä/l



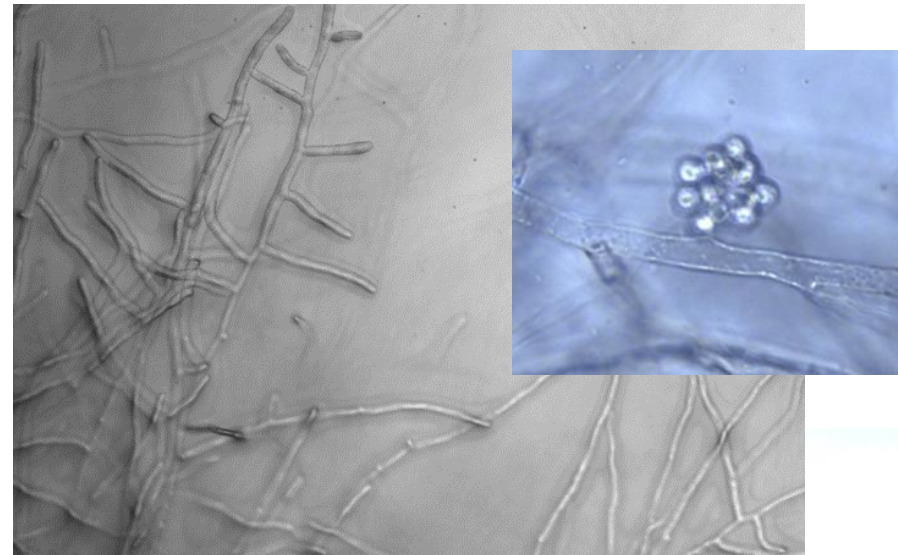
eDNA, haasteita

- Odotettavissa oleva vähäinen kohde-DNA:n määrä
- Tarvitaan melko isoja vesimääriä: käytetty jopa 100 l ultrasuodatuksella (dead end ultrafiltration DEUF)
- Suhteessa paljon ylimääräistä DNA:ta
- Suomen vesistöjen vedenlaatu: paljon humusta, joka PCR-inhibiittori
- Huonosti tunnetut rapuruton lähisukulaiset vesiympäristössä
- Ajoitus oltava kohdallaan myös akuuttien tapausten havaitsemiseen (<https://www.vetinst.no/en/surveillance-programmes/crayfish-plague-aphanomyces-astaci>)

eDNA haasteita: huonosti tunnetut rapuruton lähisukulaiset vesiympäristössä



- Kaavin Mäntyjärvi: useina vuosina positiivisia PCR-tuloksia sumppukokeissa, ravuista eristetty uusi rapuruttoa muistuttava laji *Aphanomyces fennicus*
- *A. fennicus* yleisyys Suomessa tuntematon, mutta sillä on ympäristölajille tyypillisiä ominaisuuksia
- Toistaiseksi ei ole onnistuttu estämään kokonaan monistumista reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä- geneettisesti hyvin lähellä rapuruttoa





eDNA ja rapujen tutkimisen yhdistäminen?

- Rapuruton kantajadiagnostiikkaa tehdään nyt 60 ravusta, jotka seurannassa 1-2 kk
- Näistä valitaan makroskooppisten ja mikroskooppisten muutosten perusteella 10 rapua DNA-analyysiin (kohdistettu otanta)



- Ruokavirastossa kehitetty eDNA diagnostiiikka vesihomeelle (*Saprolegnia parasitica*), joka rapuruton sukulainen
- Voidaanko rapututkimus korvata analysoimalla rapujen säilytysvettä säännöllisin väliajoin?
- Jos vesistöstä ei löydy analysoitavia rapuja, vaatii kuitenkin suuritöistä sumputusta ennen laborioriotutkimusta

Lähteet:



- Grandjean, F. et al. 2014. Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Veterinary Microbiology* 170: 317-324.
- Hochwimmer, G. et al. 2009. Identification of two GH18 chitinase family genes and their use as targets for detection of the crayfish-plague oomycete *Aphanomyces astaci*. *BMC Microbiology* 9: 184-2180-9-184.
- Huang, T. et al. 1994. Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* 126: 1-9.
- Makkonen, J. et al. 2018. MtDNA allows the sensitive detection and haplotyping of the crayfish plague disease agent *Aphanomyces astaci* showing clues about its origin and migration. *Parasitology* 145(9):1210-1218.
- Makkonen, J. et al. 2013. Timing and quantifying *Aphanomyces astaci* sporulation from the noble crayfish suffering from the crayfish plague. *Veterinary Microbiology* 162: 750-755.
- Makkonen, J. et al. 2012. The diversity of the pathogenic Oomycete (*Aphanomyces astaci*) chitinase genes within the genotypes indicate adaptation to its hosts. *Fungal Genetics and Biology : FG & B* 49: 635-642.
- Minardi, D. et al. 2018. New genotyping method for the causative agent of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) based on whole genome data. *Journal of Invertebrate Pathology* 156:6-13.
- Oidtmann, B. et al. 2004. Detection of genomic DNA of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* (Oomycete) in clinical samples by PCR. *Veterinary Microbiology* 100: 269-282.
- Oidtmann, B. et al. 2006. Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 53-64.
- Strand, D. et al. 2012. Monitoring the spore dynamics of *Aphanomyces astaci* in the ambient water of latent carrier crayfish. *Veterinary Microbiology* 160: 99-107.
- Strand, D. et al. 2014. Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *Journal of Applied Ecology* .
- Vrålstad, T. et al. 2009. A quantitative TaqMan MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology* 137: 146-155.



Kiitos mielenkiinnosta