



Euroopa Liit
Euroopa Merendus- ja Kalandusfond

Eesti Maaülikool

Eesti rannikumerest püütud meriforellide
(*Salmo trutta morpha trutta*) parasitoloogiline
uuring

Töövõtulepingu nr. 10-1/MI/3723 lõpparuanne

Tartu, 2018

Sisukord

Lühikokkuvõte	3
1. Sissejuhatus	5
2. Meriforell.....	7
2.1 Meriforelli bioloogia	7
3. Meriforelli majanduslik tähtsus ja kalakasvatustlik taastootmine	10
4. Meriforelli haigused ja parasiidid	11
4.1 Proliferatiivne neeruhaigus	11
4.2 Paeluss <i>Eubothrium crassum</i>	15
4.4 Parasitaarsed koinfektsioonid	17
5. MATERJAL JA METOODIKA	18
5.1 Proovide kogumine.....	18
5.1.1 Proovide kogumine harrastuskalastajate ning teadlaste poolt	18
5.1.2 Proovide kogumine kutseliste kalurite poolt	20
5.2. Kalade parasitoloogiline uurimine.....	21
5.2.1 Proliferatiivne neeruhaigus.....	21
5.2.2 Sooleparasiidid	23
5.3 Statistiline andmetöötlus	25
6. Tulemused	26
6.1 Uuritud kalade iseloomustus.....	26
6.2 Parasiitusside arv.....	27
6.3 Proliferatiivse neeruhaiguse esinemine	30
7. Kasutatud kirjandus.....	34

Lühikokkuvõte

Eesti Maaülikooli poolt teostatud töö eesmärgiks oli uurida sooleparasiitide ning proliferatiivse neeruhaiguse (PKD) esinemist Eesti põhjarannikult püütud täiskasvanud meriforellidel (*Salmo trutta*) ning sealhulgas hinnata parasiitide võimalikku mõju kalade üldisele seisundile. Uuring viidi läbi aastatel 2015 kuni 2017. Kaladelt kogusid proove harrastuskalastajad ja viimasel aastal kutselised rannakalurid Virumaa ja Läänemaa püügipiirkonnast, vt joonised 6 ja 7. Proove koguti põhjarannikult püütud kaladelt, alates Rutjalt (Lääne-Virumaa) kuni Hara laheni (Läänemaa). Kolme aasta jooksul jõuti koguda ja analüüsida koeproove 159-lt meriforellilt. Uuringusse sattus emaseid kalu 52,5%, isaseid kalu 37,5% ja sugu jäi määramata 10% kaladest. Uuritud kalade keskmine kaal oli 1720,6 g, sealhulgas maksimumkaal 4650 g ja miinimumkaalus kala oli 450 g vt joonis 13.

Parasiitusse esines 146-l kalal (**93,6%** kõigist uuritud kaladest), keskmine parasiitusside arv kala kohta oli 18,4 (keskmine üksnes parasiitussidega kaladel 19,6), maksimum 74 ussi vt joonis 14. Analüüsil selgus, et selline paelusside arv ei kahjusta peremeesorganismide tervist ja ei tohiks otseselt vähendada kalaliha kvaliteeti. Milline see mõju tegelikult on, nõuab eraldi uurimist. Parasiitusside arv eri püügipiirkondades on toodud joonisel 17.

Väga ohtlik proliferatiivne neeruhaigus (PKD) esines 72-l kalal, s.o. 45,6%-l kõigist uuritud kaladest, vt joonis 18. Neeruhaigus tuvastati 38,1 % emastel ja 58,6 % isastel kaladel. Joonisel 20 on toodud proliferatiivse neeruhaigusega kalade osakaal sõltuvalt püügipiirkonnast.

Uuringu tulemustele tuginedes võib öelda, et parasiitussidega on tabandunud küll palju kalu kuid usside arvukus ei ole kaladele üldisele seisundile märgatavat mõju avaldanud ja tegemist on nõ esteetilise probleemiga mis on häiriv vaid kalade rookimisel. Kas paelusstõve tagajärjel on parasiite kandvad kalad ka vastuvõtlikumad teiste parasiitaar- või bakteriaalhaiguste suhtes, vajab eraldi selgitamist.

Uuringu käigus tuvastatud suure arvu kudema tõusvate kalade tabandumine proliferatiivset neeruhaigust põhjustavate limaeoslastega on aga murettekitav. Võib öelda, et vanemad on oma järglastele ohtliku parasiidi edasikandjad. Halb on see, et need vähesed noorkalad, kellel siiski õnnestub ohtlik haigus läbi põdeda ja ellu jääda, jäävad parasiidi kandjateks ja nakatavad enda ja teiste järglasi ise kunagi kudema tõustes. Põhjalikku uurimist vajaks see,

millises ulatuses ja millised kudejõed näiteks Läänemaa ja Liivi Lahe piirkonnas ning suursaartel on haigustekitajatega nakatunud. Lisaks sellele ei tohiks piirduda ainult meriforellide uurimisega vaid peaks kaluritele oluliste kalaliikide nimistut laiendama.

Proliferatiivne/vohandiline neeruhaigus on põhjustanud ulatuslikku kahju. Tõve kätte surnud lõhilasi on leitud Saksamaal, Suurbritannias, Iirimaa, Prantsusmaal, Hispaanias, Itaalias, Šveitsis, Sloveenias, Taanis ja Rootsis. Hiljuti on registreeritud uusi haiguspuhangud ka Islandil, Põhja-Soomes ja Norras. Üsna kindlalt võib väita, et kuna looduses on samasuviste noorkalade suremust raske täpselt hinnata, võib neeruhaiguse mõju meie forellipopulatsioonidele märksa suurem kui senini kardetud. Selleks, et hinnata meriforellide vastupanuvõimet sellele haigusele, oleks vaja teha esimesed kontrolluuringud kogu Eesti rannikumere ulatuses ja neid mõne aasta pärast korrata. Siis saaksime ülevaate kas muretsemiseks on põhjust ja kas tuleks uuesti alustada forellipopulatsioonide tugevdamist kalakasvatustliku taastootmise teel.

Projektis osalenute nimel **Priit Päkk** DVM, Ph.D,
Eesti Maaülikool, VLI vesiviljeluse õppetool,
priit.pakk@emu.ee.

1. Sissejuhatus

Meriforell ehk iherus (*Salmo trutta morpha trutta*) on ihaldatud püügiobjekt nii harrastuskalastajatele kui ka kutselistele kaluritele. Meriforell on anadroomne siirdekala, kes elab täiskasvanuna meres ja siirdub jõkke vaid kudemiseks. Kõige rohkem on forelli jaoks sobivaid kudejõgesid ning ojasid Põhja-Eesti rannikul. See loob eeldused, et antud piirkonna meriforelli arvukus on kõrge. Suur osa meriforelli püügist Eesti rannikumeres toimub selles piirkonnas.

Kutseliste kalurite ning harrastuskalastajate andmetel leidub suuremal osal täiskasvanud meriforellide soolestikes lintjaid paelusse. Täiskasvanud meriforellidel on kirjeldatud paelussi *Eubothrium crassum* esinemist eelmise kümnendi keskel (Merilo 2005). Samuti on viimasel ajal hakatud uurima proliferatiivse neeruhaiguse (PKD) esinemist meriforelli noorjärgkudel. Kättesaadavad on dr. Anti Vasemägi juhitud töögrupi selleteemalised artiklid. Kuidas antud parasiidid täiskasvanud meriforelle mõjutavad, ei ole veel selge. Kahe erineva parasiidi koosseksisteerimine võib tekitada ka koinfektsioone või parasiitide vahelist antagonismi.

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida sooleparasiitide ning proliferatiivse neeruhaiguse esinemist Eesti põhjarannikult püütud täiskasvanud meriforellidel ning sealhulgas hinnata parasiitide võimalikku mõju kalade üldisele seisundile.

Töös kasutatud uurimismaterjal koguti kutseliste kalurite ning harrastuskalastajate poolt 2014. aasta detsembrist 2017. aasta novembrini Põhja-Eesti rannikumerest püütud meriforellidelt. Püügijärgselt fikseeriti kalade mõõdud ning võeti uurimiseks vajalikud proovid. Kogutud materjal töötati läbi Tartus, Eesti Maaülikooli VLI vesiviljeluse õppetooli laboratooriumis. Uurimustöös püstitatud eesmärkide täitmiseks saadud andmed analüüsiti statistiliselt.

Kalaproovide kogumist, kalade bioloogilist analüüsimist, vastava andmebaasi koostamist ja kalaproovide transportimist Tartusse parasitoloogiliseks analüüsimiseks ja uurimiseks korraldasid Eesti Maaülikooli töötajad Magnus Lauringson ning Priit Päck ja kalurite esindajana Lembo Pikamäe.

Aruande kirjutas kokku Priit Päck, kes sai parasitoloogilise analüüsi osa kirjutamisel asjatundlikku abi Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi töötajatelt. Meriforelli bioloogia ülevaate kirjutas ja laboratoorsed uuringud tegi Magnus Lauringson, statistilise analüüsi teostas Tanel Kaart. Geneetiliste analüüside tegemisel aitasid kaasa Lilian Pukk, Kerli Haugjärv ja Riho Gross. PKD leviku kohta koondas andmed Anti Vasemägi.

Töö autorid tänavad kõiki proovide kogumisel osalenud harrastuskalamehi ja rannakalureid

Töö kavandajad tänavad TÜ Eesti Mereinstituudi direktorit prof. Toomas Saati ja Kalanduse teabekeskuse juhti Toomas Armulikku ja Lembo Pikamäed usalduse ning meeldiva koostöö eest.

2. Meriforell

Meriforell ehk iherus (*Salmo trutta morpha trutta*) on lõheliste seltsi, lõhelaste sugukonda kuuluv röövkala. Tegu on forelli (*Salmo trutta*) anadroomse vormiga, kes elab täiskasvanuna meres ning käib jões kudemas. Meriforell koorub jões, kust rändab merre ning toitub seal suguküpsuse saavutamiseni (Kangur 2009). Forellide rühma põhivormiks peetakse kirjanduse andmetel meriforelli. Meriforelli alamvormid – jõeforell (*Salmo trutta morpha fario*) ja järveforell (*Salmo trutta morpha lacustris*) on välja kujunenud hiljuti, viimasel jääajal. Oletatakse, et ka enne viimast jääaega sigis meriforell magevees (Rannak jt 1983).

2.1 Meriforelli bioloogia

Anadroomse siirdekalana koeb meriforell sügisel merre suubuvates vooluveekogudes, kus on tingimused sigimiseks ning marja ja noorkala arenemiseks. Eestis leidub kõige rohkem selliseid jõgesid Soome lahe vesikonnas, kus asub teadaolevalt 45 kudejõge (populatsiooni), millest 38 on metsikud populatsioonid (ICES 2013). Meriforell koeb edukalt ka Liivi lahte suubuvates vooluveekogudes, aga samuti Saaremaa ning Hiiumaa loode- ja põhjarannikul (Kangur 2009). Meriforelli eduka sigimise esimeseks tingimuseks on kudealade kättesaadavus. Mitmetel jõgedel on inimtekkelised rändetõkked, looduslikud tõkked koprapaisude näol (näit. Piirsalu jõgi) või ummistunud jõesuudmed (näit. Kloostri jõgi). Enamik Eesti suurematest kudejõgedest on olnud või on ka praegu paisudega suletud. Ilmselt on see ka üheks asjaoluks, miks suuremates jõgedes käib kudemas vähem meriforelli kui väikestes jõgedes ning ojades (Kangur 2009).

Teine eduka sigimise tingimus on seotud vee voolukiiruse ja kudekoha sügavusega. Meriforell valib võimalusel sigimise paigana alati koha, kus voolukiirus 60% sügavusel veesambas on vähemalt 15 cm/s, kuid ei ületa emaskala kahte kehapiikkust sekundis. See on tähtis, kuna viljastatud ning põhjasubstraadiga kaetud mari vajab pidevalt voolavat hapnikurikast vett. Tavaliselt paiknevad kudepesad asukohas, kus aeglase vooluga jõelõik (võrendik) läheb üle kärestikuks, sest seal hakkab voolukiirus äkiliselt tõusma. Kuigi meriforellid on võimelised kudema ka madalas vees, kus nende seljad on veest väljas, eelistavad nad siiski sügavat vett (Kangur 2009).

Kolmandaks vajab meriforell kudemiseks kindla läbimõõduga peamiselt kruusast koosnevat substraati. Ideaalseks peetakse 2-3 cm läbimõõduga kruusa, peenefraktsioonilist setet ei tohi selles olla üle 15% (Kangur 2009).

Kuderänne algab sobiva veeseisu korral paljudesse suurematesse jõgedesse juba suveperioodil, väiksematesse jõgedesse ja ojadesse siirdub meriforell suve lõpus või sügisel, sest seal on ka veetemperatuuri kõikumised suuremad (Rannak jt 1983). Meriforelli jõkke siirdumist soodustavad tugevad meretuuled ning veetaset tõstvad sademed. Peale tuulte vaibumist ning jõgedest voolava magevee osakaalu tõusmist rannikuvees siirduvad kalad jõkke, seega orienteerumiseks saadakse signaale merevee soolsuse muutusest. Juhul kui veetase langeb alla kriitilise piiri kuderänne katkeb (Rannak jt 1983).

Sigimine algab oktoobris-novembris, kui veetemperatuur jões on langenud 5-6 kraadini. Massiline kudumine toimub 3-4 kraadise veetemperatuuri juures. Emaskala valib kudemiseks kruusase kiirevoolulise paiga, kuhu kaevab pesalohu (Rannak jt 1983). Peale esimese pesalohu kaevamist teeb emaskala sellest ülesvoolu veel ühe lohu, millest väljakaevatud materjaliga kaetakse viljastatud mari. Nii moodustub pesakühm. Pesalohk on ovaalse kujuga, umbes 3,5 korda emaskalast pikem ning laiusel 0,3-0,6 kehapikkust. Marja substraati matmise sügavus varieerub sõltuvalt kala suurusest - 20 cm pikkusel kalal 0,4 kehapikkust, kuni 0,3 kehapikkust 70 cm kalade puhul (Kangur 2009).

Meriforellid saavutavad suguküpsuse üldjuhul peale kolme meres veedetud eluaastat. Paljudes jõgedes saavutavad 30-40% isastest noorkaladest suguküpsuse juba kahe-või kolmesuviselt enne merre siirdumist. Lisaks sellele on dokumenteeritud, et mõned neist kaladest merre ei laskugi, vaid jäävad jõkke elama. Sama seaduspära kehtib ilmselt ka emaste forellide kohta (Kangur jt 2003).

Noorkalade ehk tähnike kasvualaks on kärestike ümbrused, kus asuvad ka koelmud (Rannak jt 1983). Elupaigana eelistavad noored forellid üle 20 cm sügavust vett ning voolukiirust kuni 25 cm/s (Kangur 2009). Asustustihedus võib jõeti olla väga erinev, jäädes ühe kuni rohkem kui 100 isendini 100 m² kohta (Rannak jt 1983).

Meriforelli tähnike toidubaas moodustub suures osas amfibiootiliste putukate vastsetest, nagu näiteks surusääsklaste, ehmostiivaliste ning ühepäevikuliste vastsed. Samuti on tähtsal kohal kirpvähilised, väikesed limused ning aerjalgsed (Rannak jt 1983).

Kalade kasvukiirust mõjutab veetemperatuur. Optimaalseim veetemperatuur on 13-14 °C, alla 4 °C vees on kasv väga aeglane. Kalad lakkavad toitumast, kui veetemperatuur on üle 19 °C, letaalseks piiriks on 21 °C veetemperatuur. Hapnikusisalduse alampiir on 5,0-5,5 mg/l, parimaks loetakse vähemalt 80% küllastust (Kangur 2009).

Meriforelli tähnikud laskuvad merre pärast 1-4 aastast jões kasvamist, kõige arvukam merre laskumine toimub kaheaastaselt. Noorkalad on jões viibides tumedad, laskumisel muutub nende värvus hõbedaseks, nagu on iseloomulik täiskasvanud kaladele. Merre siirdumise eel toimub tähnikute muutumine smoltideks – lisaks värvitooni muutusele läheb keha saledamaks, sabauim ning selle sälk suuremaks, see on ettevalmistus mereeluks. Laskumine leiab aset tavaliselt aprilli lõpust juuni teise pooleni ning toimub üldiselt öisel ajal, kõrgperioodil ka päeval (Rannak jt 1983).

Suurema osa elust veedavad täiskasvanud meriforellid meres. Kuigi enamik Soome lahe meriforellidest sooritab lühikesi, kuni 80 km pikkuseid toitumisrändeid, võivad mõned isendid sattuda isegi kuni 500 km kaugusele kodujõest. On tõendatud, et Läänemeres esineb kahe toitumisrände tüübiga meriforelle: 1) pika toitumisrändega ning 2) paikne vorm. Paikne vorm asustab kirjanduse andmetel Läänemere põhja- ja lõunaosa, pikema toitumisrändega populatsioonid pärinevad peamiselt Rootsi ranniku jõgedest (Rannak jt 1983). Laskunud tähnik hakkab meres aktiivselt toituma ning kasvab tempokalt. Meriforelli kõige tavalisemaks toiduobjektiks Läänemeres on räim ja kilu (Rannak jt 1983).

Täiskasvanud meriforell on korduvkudeja (Rannak jt 1983). Kuigi kirjanduse andmetel koeb enamik meriforellidest oma lühikesest toitumis- ja sigimisrändest tulenevalt igal aastal (Rannak jt 1983), siis harrastuskalastajate andmetele tabatakse suurel hulgal täiskasvanud meriforelle, kes ei ole kuderändele läinud. Samuti on paljud talvel püütud kalad heas toitumuses ning ilma tunnusteta, mis viitaksid äsjasele kudemisele nagu kuderändelt tulija iseloomulik tume värvus, halb toitumus, kinnine soomus jne. See tähendab, et täiskasvanud meriforellid ei pruugi siiski igal aastal kudedada.

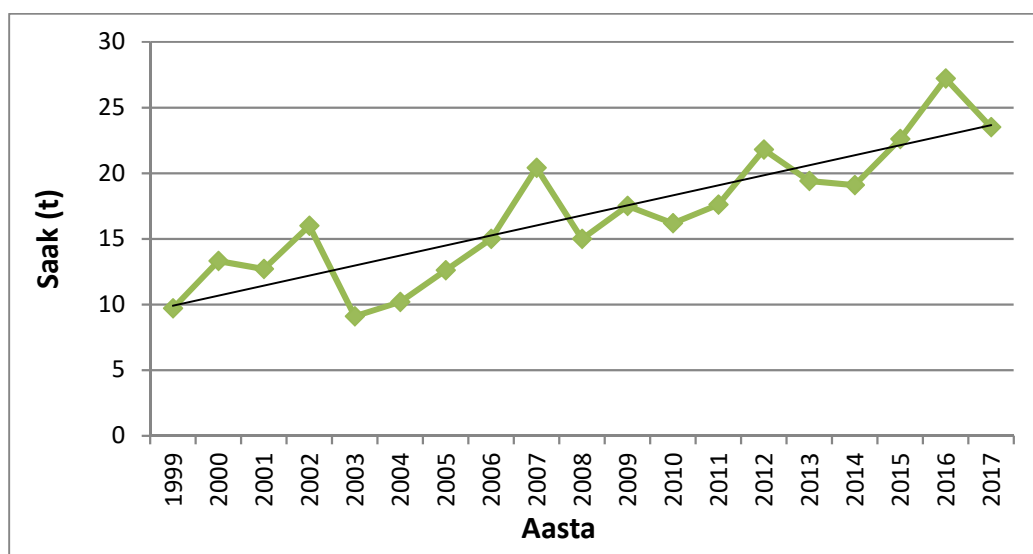
Suguküpseks saab meriforell peale merre laskumist paari aastaga. Üldiselt siirduvad kolmandal eluaastal merre laskunud kalad kudema peale kaheaastast meres viibimist, aasta varem laskunud kalad peale kolmeaastast mere-elu (Rannak jt 1983). Täiskasvanud meriforellid koevad üldiselt oma sünnijões, selle ülesleidmiseks on kaladel kasutada haistmismeel ning lõhnamälu. Kodujõgi leitakse üles kudepaigast merre kandunud lõhnade komplekti abil, kus kaltsiumi- ning teiste ionide kõrval on tähtsaks indikaatoriks ka kohalikku biotoopi iseloomustavad bioloogilised lõhnad (Rannak jt 1983).

Suurimad Eesti vetest tabatud meriforellid jäävad kaalult 10 kg lähedale. Suurim dokumenteeritud isend oli 116 cm pikk ning 11,4 kg kaalunud emane kala, kes püüti 1938. aasta sügisel Keila jõest. Vanus on määratud näiteks 1938. aastal Väana jõest tabatud isasel

kalal, kes kaalus 6,5 kg ning oli 9 aastat vana. Samas võib esineda isendeid, kelle kaalu ning vanuse suhe on hoopis teistsugune. Samast jõest aasta varem tabatud isane meriforell kaalus 8,5 kg ning mõõdetud täispikkusega 87 cm oli 5 aastat vana. Antud kala tuli kudema esmakordselt, olles peale esimest jõe-elu aastat merre laskunud, oli ta sarnaselt lõhele pikal toitumiskäigul ning kudema tulnuna proportsionaalselt suuremas kasvus ning toitumises võrreldes kaladega, kes varem koevad (Rannak jt 1983).

3. Meriforelli majanduslik tähtsus ja kalakasvatuse taastootmine

Meriforelli kasvatamine Eestis on toimunud ainult tema taastootmise eesmärgil. Iherusel on suur tähtsus nii harrastus- kui ka tööstuspüügis. (Kalakasvatuse taastootmine... 2017) Näiteks 2016. aastal püüti 27,2 tonni meriforelli, 1999. aastal 9,7 tonni (Lõhe ja meriforelli... 2017). Viimase viieteistkümne aastaga on saagikus tõusnud rohkem kui poole võrra (joonis 1). Lisaks on meriforell ka piiriülese tähtsusega liik, näiteks 14-15% Eesti põhjarannikult pärit meriforellist püütakse välja Soome lahe põhjarannikult (Koljonen jt. 2014).



Joonis 1. Meriforelli saagikus tonnides (kutseline ja harrastuspüük) 1999 – 2017 (Keskkonnaministeerium)

Keskkonnaministri poolt kinnitatud “Riiklikku kaitset vajavate ja ohustatud kalaliikide kaitse ja kalavarude taastootmise programmi 2002–2010” põhjal oli meriforelli asustamine vajalik nii liigi säilitamise kui püügivõimaluste loomise eesmärgil. Asustamisega alustati Põhja-Eesti rannikujõgedes 2001. aastal. RMK Põlula Kalakasvatusekeskusest asustusmaterjal pärines Selja, Püdisoo, Mustoja ning Kunda jõe kaladelt. 2005. aastal loodi kaheaastastest Mustoja ning Püdisoo kaladest Põlulasse ühendusgukari, kuhu hiljem lisandusid Kunda jõe kalad

(Kalade taastootmise... 2012). Kuna meriforellivarud on hetkel rahuldavas seisukorras, kaotati RMK Põlula Kalakasvatusteskuses forelli sugukari ning viimane asustamine toimus 2017. aasta kevadel Pudisoo jõkke. Siiski on võimalik, et varude halvenemisel luuakse taas sugukari ning alustatakse asustusmaterjali tootmisega (Kalakasvatustliku taastootmise... 2017).

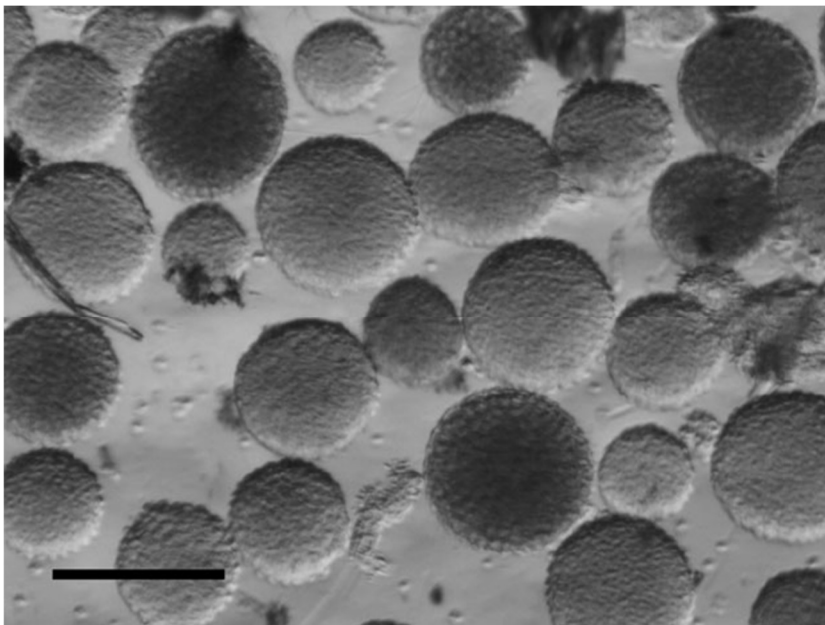
Hiiu- ning Läänemaa meriforelli varudele on positiivselt mõjunud Öngu kalakasvatustes taastoodetud kalade asustamine. Alates 1993. aastast on meriforelli noorjärke asustatud nii Hiiumaa rannikumerre, Öngu jõkke, Vanajõe jõkke ning 2002. aastast ka Läänemaa jõgedesse. Ebastabiilsete olude tõttu Hiiumaa jõgedes ning konkurentsi vältimiseks loodusliku populatsiooniga on kala asustatud ka rannikumerre. Öngu kasvandus on kasutanud meriforelli paljundamiseks peamiselt Öngu ojust püütud sugukalu, suur osa neist on vastavalt märgistusele sama kasvanduse päritoluga (Kalade taastootmise... 2012). Kuigi Öngu kalakasvatus lakkas töötamast 2014. aastal ning prognooside põhjal peaks Hiiu- ning Saaremaa saagid olema langustrendis, on viimastel aastatel antud regioonist saadud rekordilisi forellisaake (Lõhe ja meriforelli... 2017).

4. Meriforelli haigused ja parasiidid

4.1 Proliferatiivne neeruhaigus

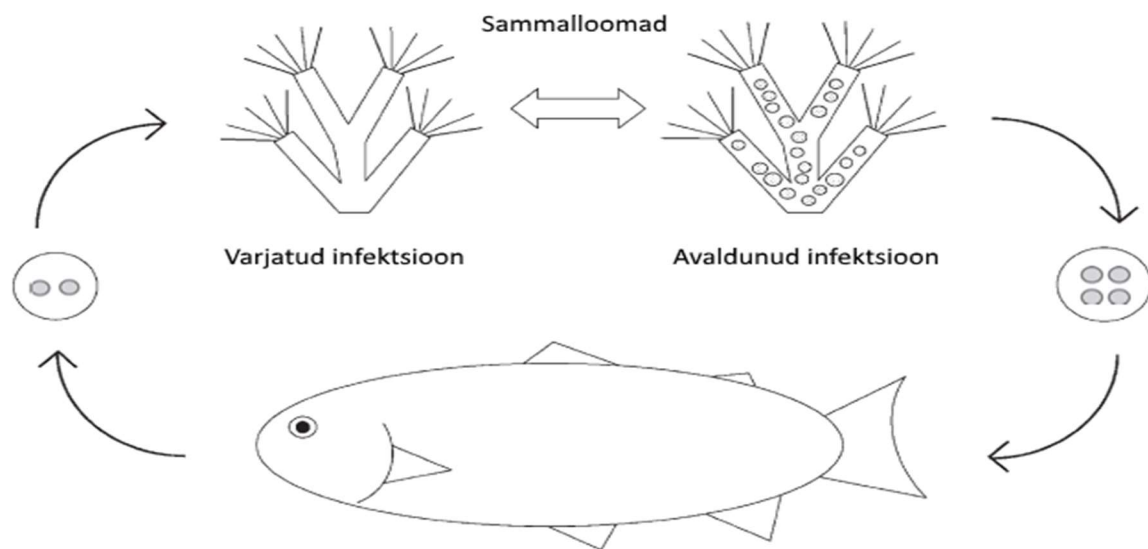
Proliferatiivne neeruhaigus (PKD – *proliferative kidney disease*) on parasitoloogiline haigus, mis ohustab lõhilasi nii Euroopas kui ka Põhja-Ameerikas (Feist jt. 2002). Proliferatiivse neeruhaiguse haigustekitajaks on limaeosloom *Tetracapsuloides bryosalmonae*, mille vaheperemeheks on magevee sammalloomad (Okamura jt. 2011) perekondadest *Plumatella* ja *Fredericella* (Okamura & Wood 2002). Sammalloomad eritavad veekeskkonna haigustekitajaga spoore, millega noorkalad tabanduvad läbi lõpuste (Morris jt. 2000, Grabner & El-Matbouli 2010) või läbi epiteelkoe (Longshaw jt. 2002). PKD on suureks ohuks forelli noorjärkudele (Dash & Vasemägi 2014). Haigustekitajad jõuavad väliskeskkonnast kala neerudesse, kus need hakkavad paljunema (proliferatsioon) (Feist jt. 2001). Märkideks kala haigestumisest on tumenenud keha värvus, kõhu suurenemine, paisunud neerud ning aneemia (Hedrick jt. 1993). PKD esinemisele ning arvukusele mõjub soodustavalt veetemperatuuride tõusmine (Dash & Vasemägi 2014), samuti on leitud, et eutrofeerumine võib haiguspuhangute tekkele kaasa aidata (Hartikainen jt. 2009). Kalade haigestumised tekivad tavaliselt suvisel ajal või varasügisel, siis kui veetemperatuur on üle 15 kraadi (Ferguson & Ball 1979). Kuigi

PKD patobioloogiat on põhjalikult uuritud, ei ole palju kirjeldatud PKD levikumustreid ning esinemist lõpp-peremehe erinevates elutsükli etappides (Dash & Vasemägi 2014). Proliferatiivset neeruhaigust on esimest korda kirjeldatud XX sajandi alguses ning selle põhjustajana identifitseeriti limaeoslased 25 aastat tagasi (Kent & Hedrick, 1985). 1999 aastal avastati, et üheks peremeheks on magevee sammalloomad (Anderson jt. 1999). Ühtlasi määrati haigustekitaja ning määratleti uus limaeosloomade klass (*Malacosporea*) (Canning jt. 2000), mis parasiteerib magevee sammalloomades. Limaeosloomad on selgroogsete ja selgrootute endoparasiidid. Mõned neist on äärmiselt patogeensed kaladele, põhjustades muutusi erinevates kudedes ning mitmeid haigusi, nagu näiteks pöörlemistõbi ja keratomükoos (Feist & Longshaw, 2006). Sammalloomade identifitseerimine haigustekitaja ühe peremeheena on aidanud paremini mõista *T. bryosalmonae* elutsükli. Magevee sammalloomad on bencilised, koloniaalsed filtreerijad, kes paljunevad pungumise teel. *T. bryosalmonae* seondub esmalt ainuraksena sammallooma kehaõõnsusesse, see on infektsiooni varjatud faas. Edasise avaldunud infektsiooni käigus arenevad hulkraksed kuni 350 µm läbimõõduga eoskotid (joonis 2), mis prolifereeruvad sammallooma kehaõõnsuses (Morris & Adams, 2007). Eoskottides tekivad läbi meioosi kuni 20 µm läbimõõduga spoorid (Canning jt. 2000), mis koosnevad kahest amöboidsest rakust ning neljast polaarsest kapslist. Üks 350 µm eoskott kannab endas 2800 kuni 4000 spoori (Martin jt. 1997).



Joonis 2. *T. bryosalmonae* spoore sisaldavad eoskotid. Mõõtkava = 350 µm (Okamura jt. 2011).

Sammalloomade poolt vette väljutatud spoorid kinnituvad kalade lõpuste või naha külge ning tungivad amööbsete rakkude abil läbi koe vaskulaarsüsteemi (Longshaw jt. 2002), mille kaudu jõuavad neerudesse, kuid võivad prolifereeruda ka teistes organites. Sporogoonia tulemusel paljunevad veres haigustekitaja rakud enne neerukoes prolifereerumist. Sporogoonia jätkub ka neerudes, kutsudes esile põletikulise reaktsiooni ning neerukoe kahjustuse (Feist & Longshaw, 2006). Neerukoes arenevad spoorid pseudoplasmas edasi, koosnedes ühest amööbsest rakust ning kahest polaarkapslist (Morris & Adams, 2008), väliskeskkonda jõuavad spoorid läbi uriini (De Kinkelin jt. 2004), olles võimelised sammalloomi tabandama (Grabner & El-Matbouli, 2008). *T.bryosalmonae* elutsükli kirjeldab joonis 3.

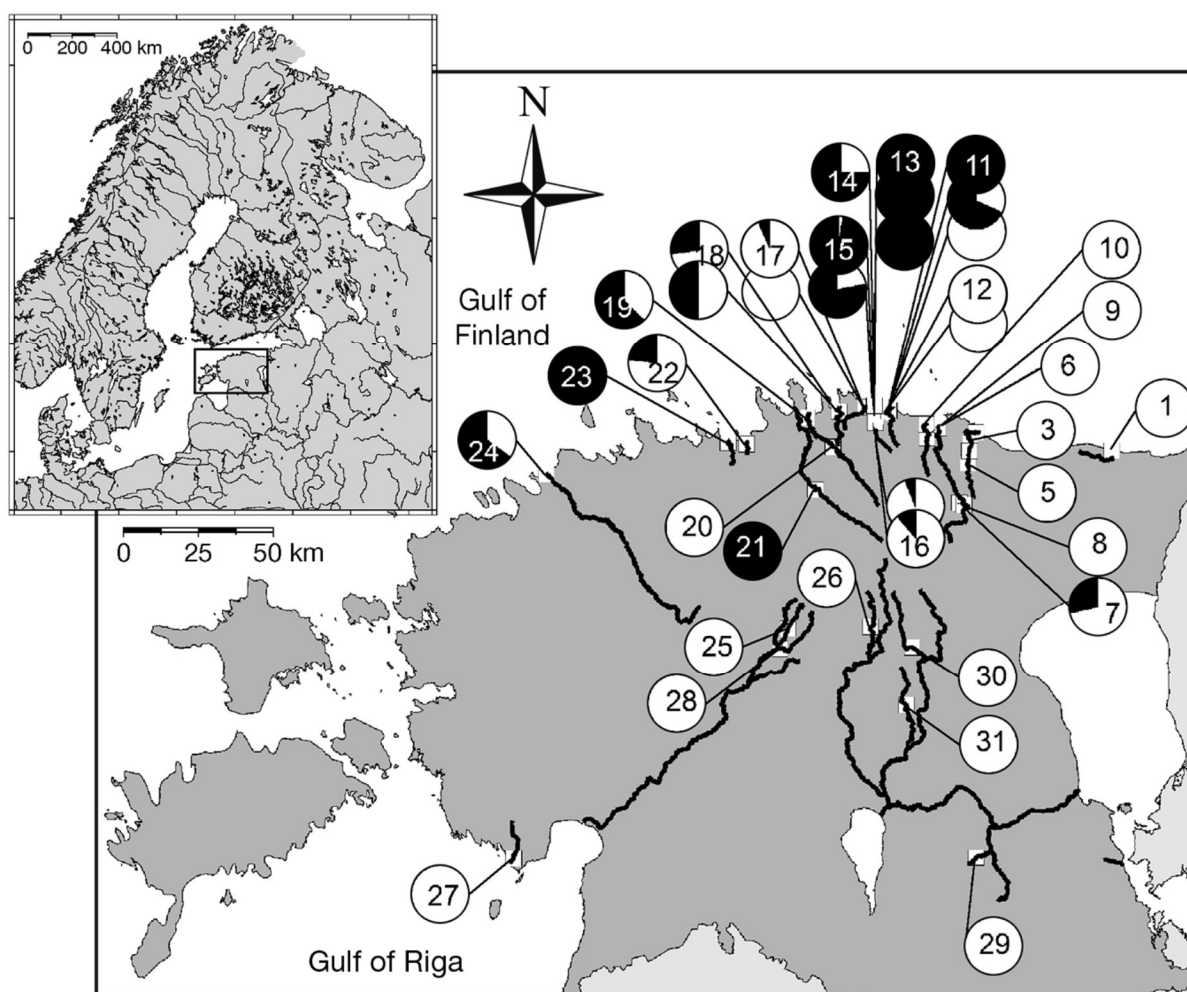


Joonis 3. *T. bryosalmonae* elutsükkel. Kala poolt väljutatud kahe polaarkapsliga spooriga tabandub sammalloom. Varjatud infektsiooni käigus jõuab haigustekitaja spoor sammallooma kehaõõnsusesse, kus avaldunud infektsiooni käigus prolifereerub. Eoskottides tekivad nelja polaarkapsli ning kahe amööboidse rakuga spoorid, mis väljutatakse vette ning läbi lõpuste ja epiteelkoe jõuavad kala vereringesse. Neerukoes tekivad sporogoonia käigus uued, kahe polaarkapsli ning ühe amööboidse rakuga spoorid, mis väljutatakse vette uriiniga (Okamura jt. 2011).

Tänu parasiidi arengule tekkiva proliferatiivse ja põletikulise immuunvastuse tõttu, tekib peremeesorganismis neerude ning põrna hüperplaasia (Hedrick jt. 1993) ehk limaskestade paksenemine. Kuna peremeesorganismi immuunvastus on alla surutud madalal temperatuuril (Le Morvan jt. 1998), on PKD arenemine sõltuvuses temperatuurist. PKD puhangu ajal on immuunsüsteemi reguleerivate tsütokiinide produktsioon madal ning ühtlasi toimuvad

patoloogilised muutused neerukoes – lümfotsüütide arvu suurenemine, granulamatoossed haiguskolded ning neerude atroofia (Chilmonczyk jt. 2002). Lisaks on pärsitud granulotsüütide aktiivsus, mistõttu tõuseb bakteriaalhaigustesse nakatumise oht (Chilmonczyk jt. 2002), seda eriti veetemperatuuride tõustes, mil suureneb ka teiste patogeenidega tabandumine (Okamura jt. 2011). Siiski näitavad vikerforellidega teostatud laborikatsed, et PKD infektsioon võib olla letaalne ka ilma teistest haigustekitajateta, seega võib *T. bryosalmonae* ka iseseisvalt kala surma põhjustada (Bettge jt. 2009).

PKD esinemist Eesti forellipopulatsioonides on viimastel aastatel uurinud prof. Anti Vasemägi uurimisrühm. 2009-2012 aastatel teostatud katsepüükide käigus uuriti 20 Eesti rannikujõe populatsioone, millest PKD leiti kümnes jões. Uuringu käigus püüti ja analüüsiti 984 forelli, peamiselt 0+ ja 1+ vanuserühmadest. PKD positiivsed olid 524 kala (53,25%) ning kümme jõge (joonis 4). Samuti leiti, et uuritud jõgedes oli *T. bryosalmonae* vaheperemeheks sammalloom *Plumatella fungiosa* (Dash & Vasemägi 2014).



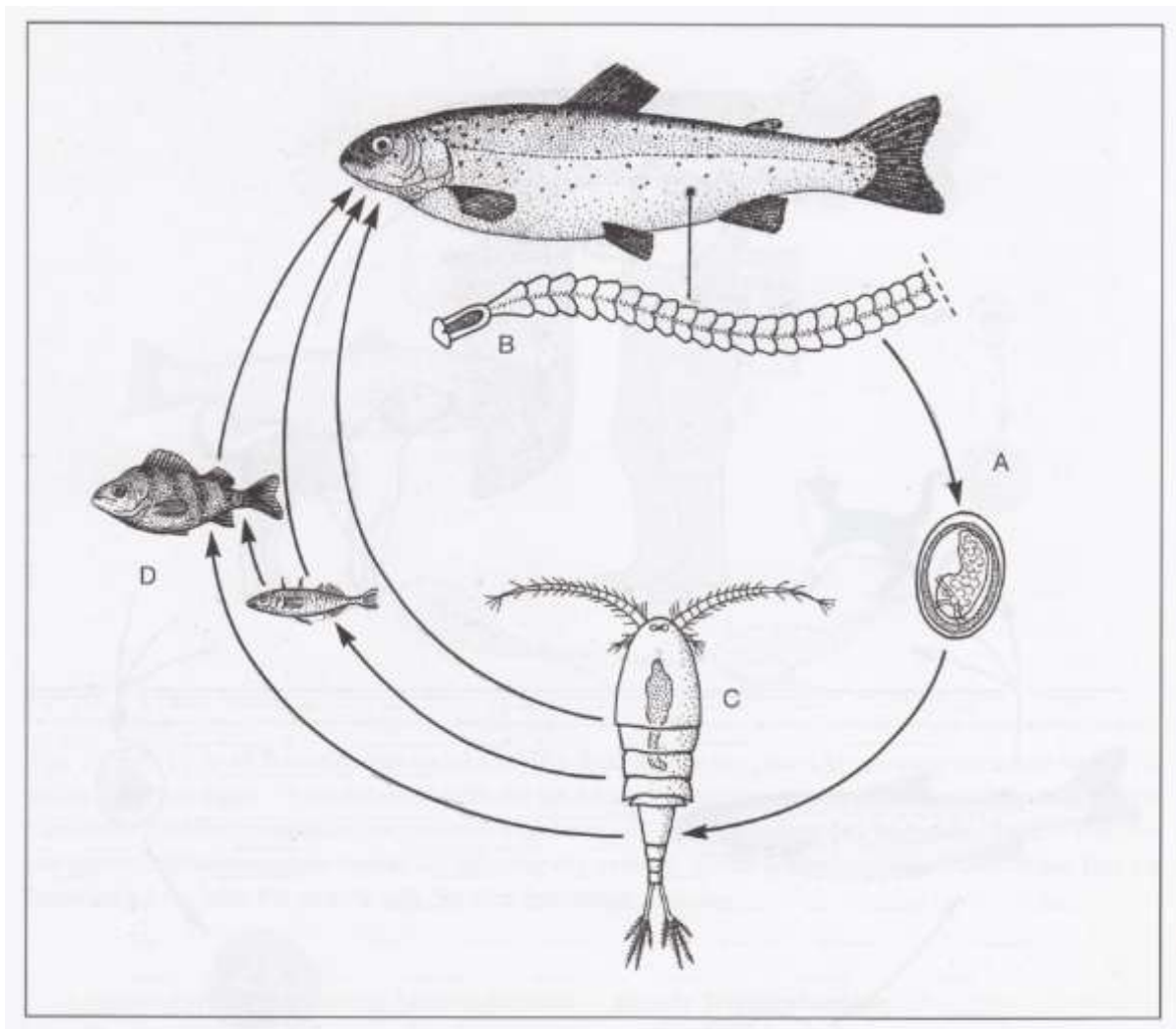
Joonis 4. *T. bryosalmonae* geograafiline levik ning tabandumise määr Soome lahe meriforellipopulatsioonides 0+ kalade näitel. Must ja valge osa sektordiagrammis näitavad tabandunud ja tabandumata kalade suhet, osaliselt kattuvad diagrammid viitavad kordusproovidele samas asukohas. 1 – Pühajõgi, 2/3/4/5 – Pada jõgi, 6/7/8 – Kunda jõgi, 9/10 – Toolse jõgi, 11/12 – Vainupea jõgi, 13/14/15/16 – Mustoja jõgi, 17 – Altja jõgi, 18 – Võsu jõgi, 19/20 – Loobu jõgi, 21 – Valgejõgi, 22 – Kuusalu oja, 23 – Valkla oja, 24 – Keila jõgi, 25 – Vodja jõgi, 26 – Preedi jõgi, 27 – Männiku oja, 28 – Esna jõgi, 29 – Tatra jõgi, 30 – Onga jõgi, 31 – Kaave jõgi.!?

4.2 Paeluss *Eubothrium crassum*

Eubothrium crassum on paelussiliik, mis parasiteerib lõhelistel perekonnast *Salmo* ning tegemist on ühe levinuma tsestoodiga forellide soolestikes (Kennedy, 1978). Kala tabandub parasiidiga, toitudes aerjalgsetest vaheperemeestest. *E. crassum* elab nii merevee- kui ka mageveelõheliste soolestikes, paiknedes täpsemalt püloorilistes ripikutes (Mitchell 1993). Lõhelised on *E. crassumi* lõpp-peremeesteks ning parasiit on ohtlik ainult kaladele. Inimest ning teisi püsisoojaseid organisme uss ei ohusta, pigem on kala puhastamisel probleem esteetilisest laadi (Merilo 2005).

Täiskasvanud paelussid vabastavad kala soolestikku tuhandeid mune, mis väljutatakse koos ekskrementidega väliskeskkonda. Munad sisaldavad juba väljaarenenud embrüot. Vees olles ujuvad need vabalt ringi, kuni süüakse ära aerjalgsete vähkide poolt või satuvad otse peremeesorganismi. Aerjalgsed vähid on *E. crassumi* esimeseks ja võimalik, et ka ainukeseks vaheperemeheks (Mitchell 1993). Vaheperemehes areneb munast vastne ehk plerotserkoid. Lõpp-peremees nakatub otse vaheperemeest (aerjalgset vähki) süües või läbi teise vaheperemehe. Viimasel juhul toitub paelussi vastsetega nakatunud aerjalgsest näiteks räim, kelle abil jõuab *E. crassum* meriforelli. Lõpp-peremehes kinnitub vastne püloorilise ripiku seina külge, kus areneb täiskasvanuks (Mitchell 1993). *E. crassumi* elutsükli kirjeldab joonis 5.

Kirjanduse andmetel on kirjeldatud 3 *Eubothrium crassumi* vormi: mageveevorm, mis parasiteerib ainult forellil (*Salmo trutta*) ning kaks soolase vee vormi, mis parasiteerivad lõhel (*Salmo salar*) Põhja-Atlandi regioonis (Bristow & Berland, 1991). Anadroomne meriforell võib *E. crassum*’iga tabanduda nii mage- kui merevees. Samuti on täheldatud, et samaaegselt võib meriforellide soolestikus elada nii paelussi mage- kui ka mereveevorm. Siiski on leitud, et paelussi mageveevorm ei suuda meriforelli soolestikus suguküpseks areneda (Mitchell 1993). Meres tabandub kala parasiitussiga mitmel moel.



Joonis 5. *Eubothrium crassumi* arengutsükkel. Kalade seedetraktis vabaneb vette tuhandeid paelussi mune (A, B), kus need süüakse ära aerjalgsete vähkide poolt (C). Vaheperemees satub otse või läbi teise vaheperemehe lõpp-peremehe organismi (D) (Buchmann jt. 2009)

Kuna räime vastsete toidus on valdavaks liigiks aerjalgne *Eurytemora affini* (Arula 2012), võib suure tõenäosusega meriforell parasiidiga nakatuda oma peamist toiduobjekti, so. räime, tarbides. Samuti võivad laskujad nakatuda merevett juues (osmoregulatsioon) (Mitchell 1993).

E. crassumi infektsioon ei ole lõpp-peremehele surmav, siiski võib suur paelusside hulk soolestikus pidurdada kala kasvu ning arengut (Merilo 2005). Kirjanduse andmetel on suurimaks leitud tsestodide koguseks ühe forelli soolestikus olnud 1700 isendit. Arvukuseks, mis avaldab tõsist mõju kala konditsioonile, loetakse keskmiselt 500 isendit (Mitchell jt 1993). Uuringud *E. crassumi* mõjust peremeesorganismile on näidanud, et lisaks tüsedusindeksi vähenemisele väheneb ka punaverelibledede arv ning hemoglobiinitase. Mida

suurem on täiskasvanud paelusside arv peremeesorganismis, seda suurem on hemosideriini (rauda sisaldav pigment kudedes) tase. Sellised muutused viitavad hemolüütilisele aneemiale ehk kehvveresusele. Juhul kui peremehe püloorilistes ripikutes on suur hulk täiskasvanud paelusse, võib invasioon soolesulguse tagajärjel lõppeda kala surmaga (Mitchell 1993). Muudatused verepildis võivad mõjutada kala konditsiooni, peamiselt raua ladestumine vereringes toob kaasa tüsedusindeksi languse (Bristow & Berland, 1991).

4.4 Parasitaarsed koinfektsioonid

Parasiidid esinevad sageli oma peremehega dünaamilises tasakaalus, kus parasiidi või parasiitide negatiivne mõju peremehele ei ole märgatav. Muutused keskkonnas võivad seejuures põhjustada selle tasakaalu muutumist, mille tulemusel tekivad haiguspuhangud (Mohamed jt. 2016). Seejuures võib erinevate parasiitide üheaegne eksisteerimine peremeesorganismis tekitada koinfektsioone, või parasiitide vahelist antagonismi. Tüüpiliselt mõjuvad koinfektsioonid konkureerivatele parasiitidele pärssivalt, seda peremehe piiratud ressursside tõttu või otsese omavahelise konkurentsi tulemusel peremeesorganismis. Samuti võib üks parasiit kutsuda peremeesorganismis esile immuunvastuse, mis pärsib teise parasiidi elutegevust. Koinfektsiooni geneetilise heterogeensuse kasvades tõuseb ka surve peremehe immuunsüsteemile (Klemme jt. 2016), mistõttu langeb immuunsüsteemi efektiivsus peremeest kaitsta ning tõuseb vajadus ressursside järele (Jokela jt. 2000). Peremehe suurem ressursitarve ning nõrgem immuunvastus võivad koinfektsioonis parasiteerivate parasiitide elutegevusele soodsates tingimustes ka positiivselt mõjuda. Selle tulemusel võib tekkida olukord, kus parasiitide negatiivne mõju *per capita* tõuseb ning koinfektsioon on edukam. Olenevalt erinevate parasiidi genotüüpide sarnasusest, võib ideaalolukorras nendevaheline suhe muutuda ka mutualistlikuks (Buckling & Brockhurst 2008).

T. bryosalmonae infektsiooni forellidel on uuritud võrdluses samaaegse ümarussi *Raphidascaris acus* tabandumisega. Leiti, et proliferatiivsest neeruhaigusest paranemine oli mõjutatud ümarusside vastsete olemasolust peremeesorganismis. Forellid ilma *R. acuse* vastseteta suutsid neeruhaiguse mõjudest täielikult paraneda kuid parasitaarse koinfektsiooniga forellide neeruhaigus muutus krooniliseks (Schmidt-Posthaus jt. 2013). On leitud, et parasiitidega nakatumine võib tõsta ka bakteriaalhaigustesse nakatumise tõenäosust, samuti võivad parasiidid bakteriaalhaigusi edasi kanda (Holzer jt. 2005). Parasitaarhaiguse esinemisel on organism teiste patogeenide suhtes palju vastuvõtlikum ning samuti on tõenäolisem, et haiguste kulg on organismile letaalne (Bowers jt. 2000).

5. MATERJAL JA METOODIKA

5.1 Proovide kogumine

Meriforellidelt proovide kogumine algas 2014. a. detsembris ning kestis 2017. a. novembrini. Selle perioodi jooksul aitasid merest püütud täiskasvanud meriforellidelt proove koguda nii harrastuskalastajad kui ka kutselised kalurid. Proove koguti kogu põhjarannikult püütud kaladelt, alates Rutjalt (Lääne-Virumaa) kuni Hara laheni (Läänemaa). Kolme aasta jooksul jõuti koguda proovid 159-lt meriforellilt.

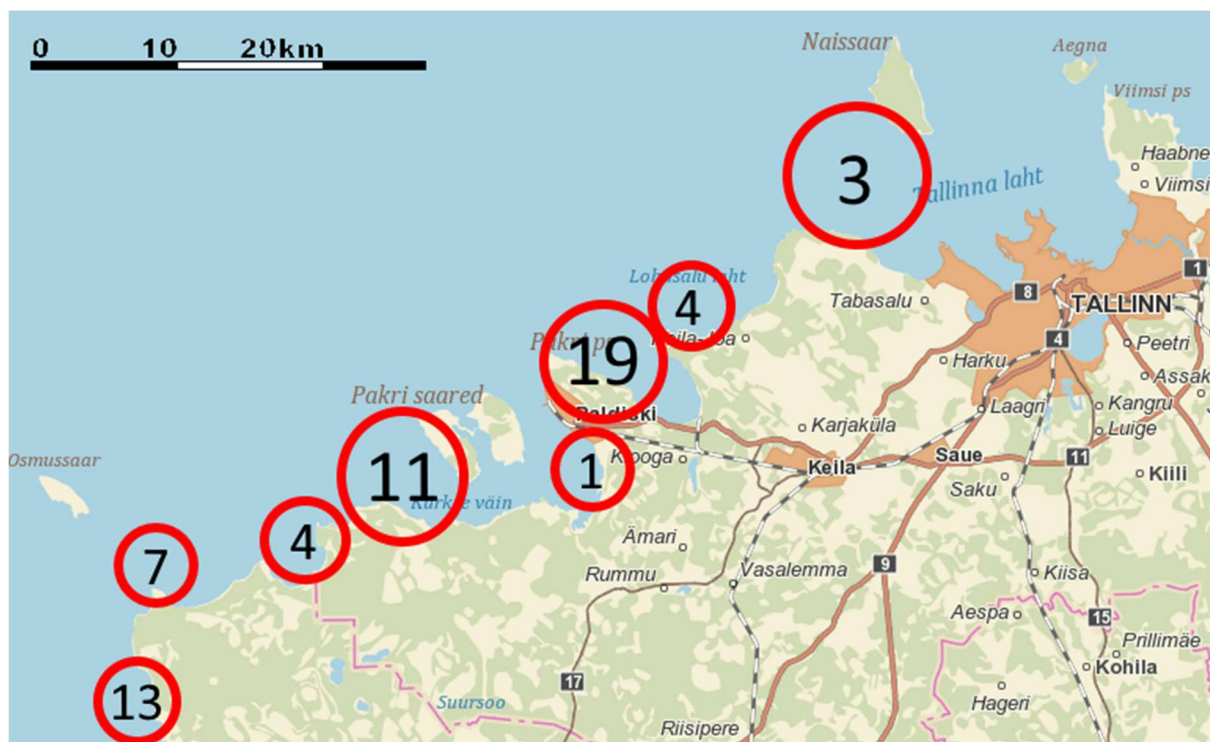
5.1.1 Proovide kogumine harrastuskalastajate ning teadlaste poolt

Alates 2014. aastast aitasid merest püütud täiskasvanud forellidelt proove koguda harrastuskalastajad. Selleks leiti kalastajad, kes nõustusid roogitud kalade siseorganeid koguma ja säilitama. Kolme aasta jooksul kogus proove 11 harrastuskalastajat. Meriforellide püügivahendina kasutati spinningut ning peibutiseks lanti. Tänu harrastuspüüdjate kaasamisele saadi geograafiliselt paiknemiselt mitmekesine kalade valim põhjaranniku erinevatest piirkondadest. Võrreldavate andmete saamiseks töötati välja proovide kogumise metoodika. Selle järgimiseks koostati kalastajatele 7 nõuandest koosnev abivahend:

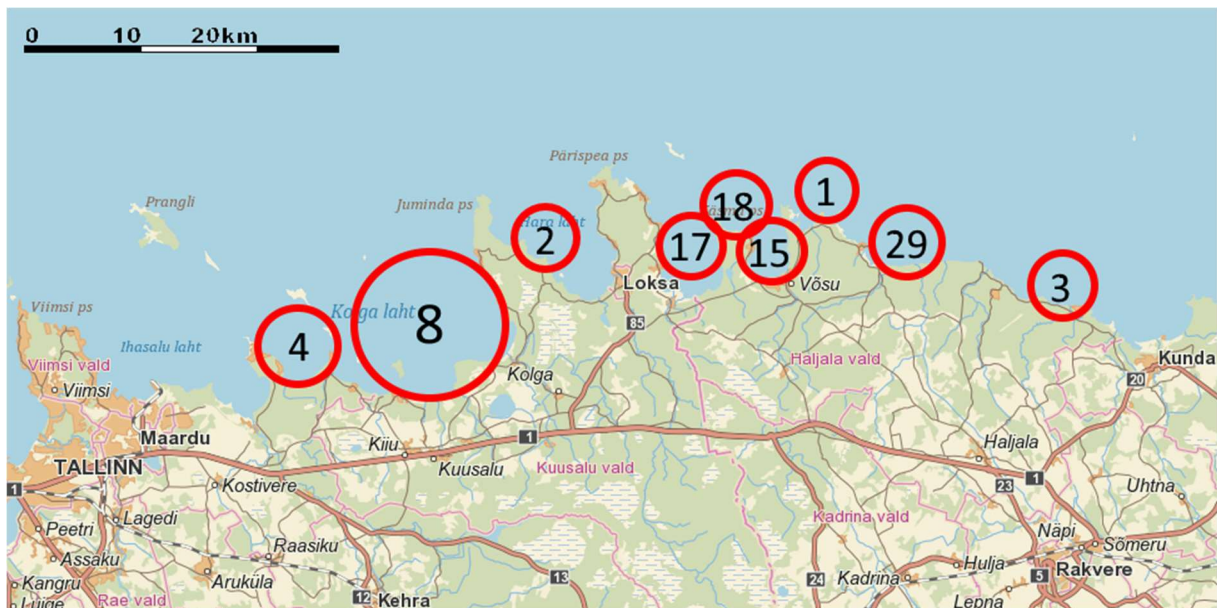
1. Kirjuta üles püügikuupäev ning -koht;
2. Kirjuta üles püütud kala täiskaal ning pikkus sabauime esimeste kiirteni;
3. Võta soomuseproovid, kraapides noaga mööda küljejoont ning paki need kokkuvolditud paberilehe vahele;
4. Eemalda kala sisikond, võimalusel fikseeri kala sugu ja aseta sisikond hästi suletavasse kilekotti;
5. Fileerimisnoa otsaga võta 1-2 cm tükid neerude esimesest ning tagumisest osast ning pane mõlemad neeruproovid alkoholiga täidetud Falconi tuubidesse (esimese ning tagumise neeruproovi võtmise vahepeal pese nuga puhtaks, et vältida DNA edasikandumist proovide vahel).
6. Kalalt eemalda pea ning aseta hästi suletavasse kilekotti;
7. Ühe kala kõik kogutud proovid koonda ühte kilekotti ning pane esimesel võimalusel sügavkülmikusse.

Harrastuskalastajatele kes proove kogusid, anti proovide kogumise juhend nii teksti- kui videoformaadis (https://youtu.be/WfdU_uIS-VI). 2014. a. detsembrist 2017. a. novembrini koguti proovid 159-lt meriforellilt. Valimis esines proove kaladelt kogu põhjarannikult -

Vihterpalust Karepani (joonised 6 ja 7). Siiski ei olnud kõik harrastuskalastajate poolt kogutud proovid täiskompleksed, esines mõningaid proovikomplekte, millel olid puudu neeruproovid, või sisikonnad. 2017. aastal viis Eesti Maaülikooli VLI vesiviljeluse osakond läbi nakkevõrkudega seirepüüke eripüügiloa alusel. Püügid toimusid Lääne-Harjumaal ning Läänemaal. Katsepüükidega koguti 17. võrguöö jooksul eelkirjeldatud metoodika alusel proovid 20-lt meriforellilt. Uuritud kalade püügikohad on kirjeldatud joonistel 6 ja 7.



Joonis 6. Uuringu jaoks püütud meriforellide püügikohad Tallinnast läänepool. Punane ring tähistab püügipiirkonda ning arv näitab kalade arvu antud piirkonnas (Lauringson & Päck 2018)



Joonis 7. Uuringu jaoks püütud meriforellide püügikohad Tallinnast idapool. Punane ring tähistab püügipiirkonda ning arv näitab kalade arvu antud piirkonnas (Lauringson & Päck 2018)

5.1.2 Proovide kogumine kutseliste kalurite poolt

2017. aastast osalesid proovide kogumisel kutselised kalurid. Euroopa Merendus- ja Kalandusfondi rakenduskava 2014-2020 meetme 1.3 "Teadlaste ja kalurite koostöötoetus" raames finantseeriti käesolevat uurimustööd kalurilt kalade ostmiseks ning töövahendite soetamiseks. Tänu kalurite kaasamisele õnnestus valimit märkimisväärselt suurendada. Kolm Lääne-Virumaa kalurit ning üks Läänemaa kalur nõustusid 2017. aasta sügishooajal nakkevõrkudega püütud meriforelle uuringu tarbeks müüma. Püütud kalad külmutati värskelt 20 kraadi juures. Kokku koguti kalurite abiga 70 täiskasvanud meriforelli Käsmu, Mustoja ning Hara (Läänemaa) piirkonnast. Külmutatud kalad koguti kalurilt kokku ning transporditi termokastis Eesti Maaülikooli VLI vesiviljeluse osakonda edasiseks uurimiseks.

Uurimise eel võeti sügavkülmutatud kalad 10-kaupa +4 °C juurde sulama. Üles sulanud meriforellid kaaluti ning mõõdeti täispikkus ja standardpikkus. Järgnevalt eraldati siseorganid, millest võeti võimalusel *Eppendorfi* tuubi sapiproov. Kuna tegu oli suures osas kuderändel olevate kaladega, kaaluti eraldi ka gonaad. Kõhuäärest eraldati 2 cm pikkune riba, mis asetati koos sapiprooviga grippkotti, kott märgistati vastava kala näitajate ning proovi numbriga. Skalpelliga eraldati neerude esimesest ning tagumisest osast 1 cm pikkune tükk, need asetati 96% etanooliga täidetud *Falconi* tuubidesse, tuubid märgistati vastavalt neeru asetusele „E“ ning „T“ (esimene ning tagumine). Esimese ning tagumise neeruproovi võtmise vahepeal puhastati nuga etanooliga. Järgnevalt eemaldati kalalt pea, mis pandi koos vastava

märgistusega eraldi grippkotti. Lihakehale tehti parasiitide esinemise kindlaks tegemiseks visuaalne ülevaatus. Forellide siseorganeid eraldi ei konserveeritud ja sooleparasiitide loendamine jätkus vahetult peale muu materjali eraldamist. Proovide võtmisest üle jäänud lihakeha läks VLI Suurloomakliiniku külmikusse ja seejärel hävitamisele AS Vireeni.

5.2. Kalade parasitoloogiline uurimine

5.2.1 Proliferatiivne neeruhaigus

Proliferatiivse neeruhaiguse (PKD – *proliferate kidney disease*) analüüsid viidi läbi EMÜ vesiviljeluse õppetooli kalageneetika laboris. See koosnes meriforelli neerukoest DNA eraldamisest, DNA fragmentide paljundamisest multipleks polümeraasahelreaktsiooni abil (PCR - *polymerase chain reaction*) ning PKDga tabandumise hindamisest geelelektroforeesiga. DNA amplifitseerimisel kasutati *T. bryosalmonae* ning lõhe- ja forellispetsiifilisi praimereid (Dash & Vasemägi, 2014).

DNA eraldamiseks kasutati kahte erinevat meetodit: 1) QIAcube® HT DNA puhastamise robotit (QIAGEN, Saksamaa), kasutades selleks QIAamp 96 DNA QIAcube HT kitti (QIAGEN, Saksamaa) ja 2) NucleoSpin Tissue kitti (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) ning sellega kaasas olevat DNA eraldamise protokollit.

Järgmisena mõlemast meetodist lühidalt:

1) Robotiväliselt teostati proovide inkubatsioon vastavalt kiti protokollile. Neerukoest lõigati väikesed (1-2 mm läbimõõduga) tükid, mis üleliigsest etanoolist kuivatati ning seejärel lisati igale proovile 180 µl ATL lüüsipuhvrit (ATL – *tissue lysis buffer*) ja 20 µl proteinaas K ensüümi lahust (20 mg/ml). Peale proovide korralikku segamist inkubeeriti neid üleöö 56°C juures. Järgmisel päeval tsentrifuugiti lüüsunud proove 5 minutit 11 000g juures ning kanti robotisse. Seejärel lisati proovidele 100 µl lüüsipuhvrit VXL ja inkubeeriti toatemperatuuril 1 minut. Pärast lüüsumist toimus DNA sadestamine 350 µl ACB puhvriga, millele oli eelnevalt lisatud isopropanooli. Siis tõsteti proovid filterplaadile, kus toimus DNA sidumine filtriga (vaakum 5 min 35 kPa). Järgmiseks DNA puhastati 600 µl pesupuhvri AW1ga (vaakum 2 min 35 kPa), 600 µl pesupuhvri AW2ga (vaakum 1 min 35 kPa) ning 600 µl 96% etanooliga (vaakum 30 sek 35 kPa). Seejärel kuivatati filterplaat vaakumiga: 1 min 55 kPa ja 2 min 35 kPa. Lõpetuseks lahustatakse filterplaadi filtrile seondunud DNA 100 µl AE (10 mM Tris-Cl,

0.5 mM EDTA, pH 9.0) ja 15 µl TopElute puhvris (inkubatsioon 2 minutit ja seejärel vaakum 8 minutit 70 kPa juures) ning proovid säilitati -20°C juures.

2) Igale koeproovile lisati 180 µl lüüsi puhvrit T1 ja 25 µl proteiinaas K ensüümi lahust. Seejärel inkubeeriti proove 56 °C juures kaks kuni kolm tundi koeproovide täieliku lahustumiseni. Tähtis on proove iga poole tunni tagant korralikult segada. Siis lisati proovidele 200 µl lüüsi puhvrit B3 ning inkubeeriti 10 minutit 70 °C juures. Pärast lüüsumist tsentrifuugiti proove 5 minutit (12 000 g) ning supernatant valati uude tuubi. DNA sadestamiseks lisati 210 µl etanooli (96%) ja loksutati tugevalt. Seejärel toimus DNA sidumine filtriga, kus saadud segu kanti NucleoSpin Tissue filterituubi, mida tsentrifuugiti üks minut (11 000 g). Järgmiseks puhastati DNA 500 µl pesupuhvri BWga ning 600 µl pesupuhvri B5ga (mõlemal korral tsentrifuugiti proove ühe minuti jooksul 11 000 g juures). Lõpetuseks lahustatakse filterituubi filtrile sadestatud DNA 100 µl 70 °C BE puhvris (5 mM Tris*HCl, pH 8.5) ning säilitati -20 °C juures. DNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni mõõdeti spektrofotomeetriselt, kasutades NanoDrop 2000 (Thermo scientific, USA).

DNA amplifitseerimisel kasutati kahte komplekti *T. bryosalmonae* ning lõhe- ja forellispetsiifilisi praimereid. PKX3F ja PKX4F (Kent jt. 1998) praimeritega amplifitseeriti 298 aluspaari ulatuses *T. bryosalmonae* 18s rRNA geen. PKD 166F ja PKD166R (Grabner & El-Matbouli 2009) praimeritega amplifitseeriti 166 aluspaari pikkune fragment *T. bryosalmonae* 18s rRNA geenist. PKD 166F ja PKX4R praimerid amplifitseerisid kombineeritult pikema, 756 aluspaari pikkuse fragmendi 18S rRNA geenist. Indel 183F ja 183R praimerid disainiti algselt Atlandi lõhe (*Salmo salar*) jaoks, aga need toimivad edukalt ka forelli (*Salmo trutta*) genoomi amplifitseerimiseks. (Dash & Vasemägi, 2014). Praimerite järjestused on kirjeldatud tabelis 1 .

Tabel 1. Praimerite järjestused ja lõppkontsentratsioonid ühes reaktsioonis

Praimer	Praimeri järjestus 5' -> 3'
PKX3F	5'-CTA AGT ACA TAC TTC GGT AGA-3'
PKX4R	5'-CCG TTA CAA CCT TGT TAG GAA-3'
PKD 166F	5'-TGT CGA TTG GAC ACT GCA TG-3'
PKD 166R	5'-ACG TCC GCA AAC CAG CT-3'
Indel 183F	5'-GCC CAA AAT GTA CAG GCA AT-3'
Indel 183R	5'-GAT TCT CAT GTT AGC CGT CCA-3'

Meriforelli neeruproovidest PKD geneetiliseks tuvastamiseks kasutati kolme mikrosatelliitmarkerit, mida amplifitseeriti nn. multipleksse PCR reaktsiooni abil, kasutades Biometra Tprofessional TProfessional termotsüklerit. Iga PCRi reaktsioon (6 µl) koosnes järgmistest komponentidest: 20-100 ng DNA-d, 2x multiplex PCR master mis (Qiagen), ning päri- ja vastassuunaliste praimerite segu. DNA amplifitseerimiseks kasutati järgmist temperatuuriprofiili:

- algne denaturatsioon 15 minutit 95 °C
- 36 tsükli: denaturatsioon 30 sekundit 94 °C, praimerite seondumine 90 sekundit 60 °C praimerite ekstensioon ja uute ahelate süntees 60 sekundit 72 °C
- lõplik ekstensioon 5 minutit 72 °C.

PCRi produktide visualiseerimiseks elektroforeesiti reaktsioone ~60 minutit 100V pinge juures 2% agarosgeelil, millele oli lisatud etiidiumbromiid (EtBr). EtBr seondub DNA, RNA ja valkudega ning muudab need nähtavaks ultraviolettkiirguse all. Fragmentide pikkuse määramiseks kasutati igal geelil GeneRuler 100 bp DNA Ladderit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Fragmendimustrite fotografeerimiseks kasutati videodokumentatsioonisüsteemi UVItec FireReader (UVItec Limited).

5.2.2 Sooleparasiidid

Paelusside esinemise määramiseks võeti 4 °C juures sulanud siseorganid või terve kala ning avati skalpelli ning kääridega magu ja soolestik (joonis 8). Kuna suur osa paelussidest paiknes lukutiripikutes, eemaldati need ükshaaval või kimbuna ning loendati. Järgnevalt asetati paelussid edasiste uuringute tarbeks etanooliga täidetud *Falconi* tuubidesse (joonis 9)



Joonis 8. Paelussid meriforelli soolestikus (Lauringson & Päck 2015)



Joonis 9. Paelussid Falconi tuubis (Lauringson & Päck 2018)

Saadud tulemused kanti ihtüopatoloogilise uuringu kaartidele (joonis 10), millele kirjutati proovi number, kala püügikoht, kala liik, täiskaal, gonaadi kaal (kuderändel kalade puhul), püügikuupäev, kala pikkus ning sugu.

Parasiitide lahtrisse kirjutati leitud parasiitide arv ning paiknemine.

Ihtüoparasitaarse uuringu kaart nr. 1

Veekogu: Peldi (Lõunasadam)

Kalaliik: _____ Vanus: _____ Kaal 1.55

Kuupäev: 10.05.2015 Pikkus (L): 55 Sugu: ♀

Parasiidi liik	Paiknemine	Hulk
<i>Eubothrium crassum</i>	luktiripikol	3

Joonis 10. Ihtüoparasiitide uuringukaart (Lauringson & Päck 2015)

Falconi tuubides ning etanoolis säilitatud paelusside liik määrati mikroskoobivaatlusel. Parasiitusside liik määrati paelussi morfoloogiliste tunnuste alusel. Edaspidi määratakse usside liik nende kudede DNA põhjal.

5.3 Statistiline andmetöötlus

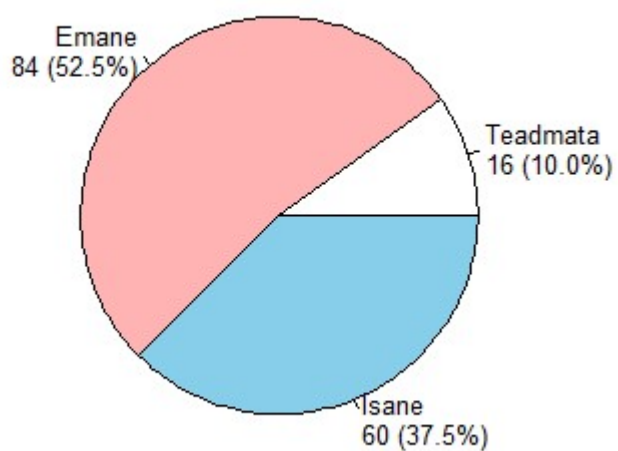
Proliferatiivse neeruhaiguse positiivsete ja negatiivsete kalade keskmisi pikkusi ja kaale võrreldi t-testiga. Proliferatiivse neeruhaiguse esinemissageduse sõltuvust kala soost testiti χ^2 -testiga. Parasiitusside arvu sõltuvust kala täispikkusest ja kaalust ning püügikoha pikkus- ja laiuskraadidest modelleeriti lineaarse regressioonanalüüsiga, proliferatiivse neeruhaiguse esinemissageduse sõltuvust püügikoha pikkus- ja laiuskraadidest modelleeriti logistilise regressioonanalüüsiga.

Tulemused loeti statistiliselt oluliseks $p \leq 0,05$ korral. Statistilised analüüsid teostati tabelarvutussüsteemis MS Excel ja statistikaprogrammis R 3.3.3.

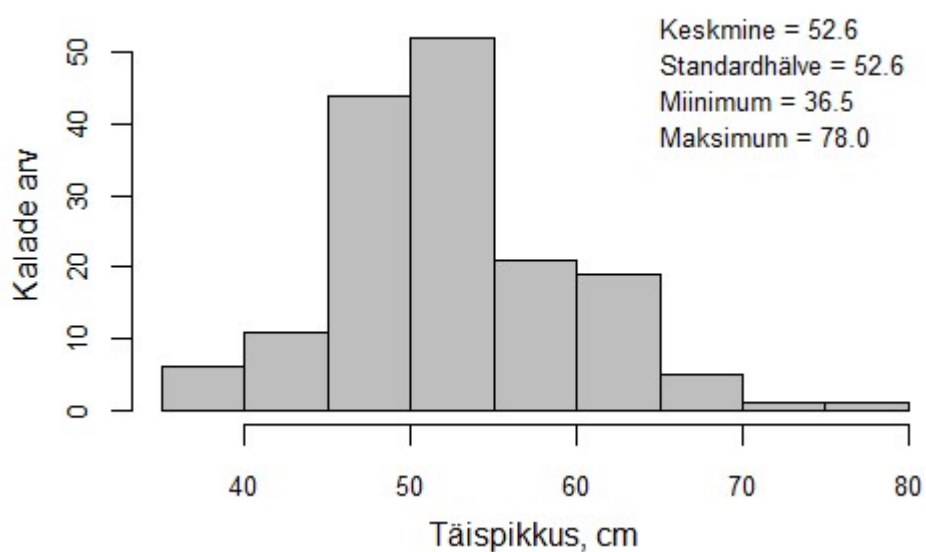
6. Tulemused

6.1 Uuritud kalade iseloomustus

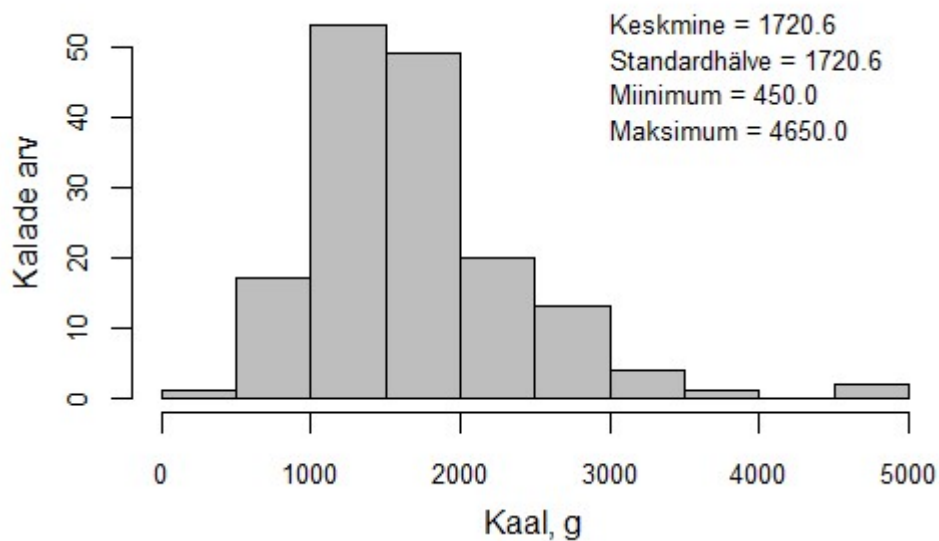
Kalade sooline jaotus on esitatud joonisel 11 ning pikkuste ja kaalude jaotus on toodud joonistel 12 ja 13.



Joonis 11. Uuritud kalade sooline jaotus.



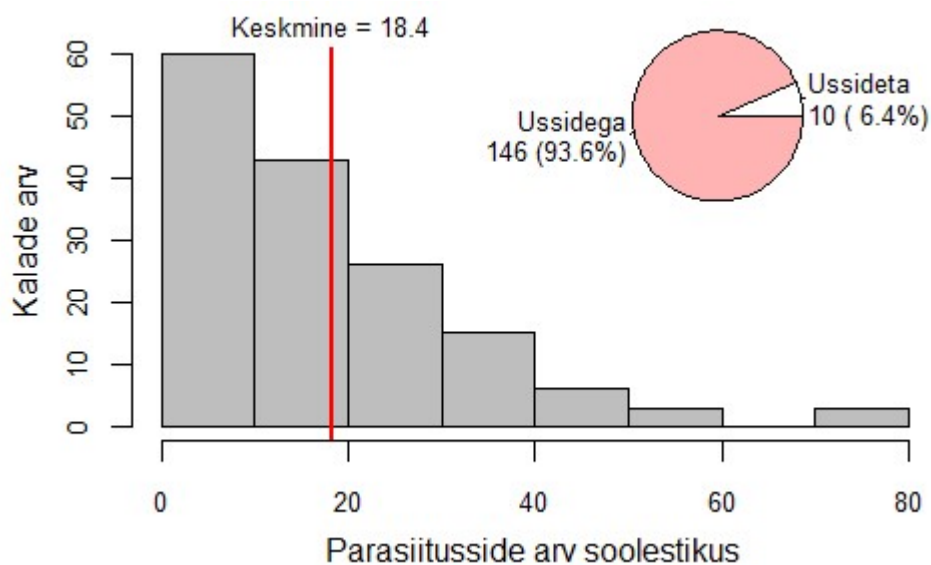
Joonis 12. Uuritud kalade täispikkuse jaotus ja olulisemad arvkarakteristikud.



Joonis 13. Uuritud kalade kaalu jaotus ja olulisemad arvkarakteristikud.

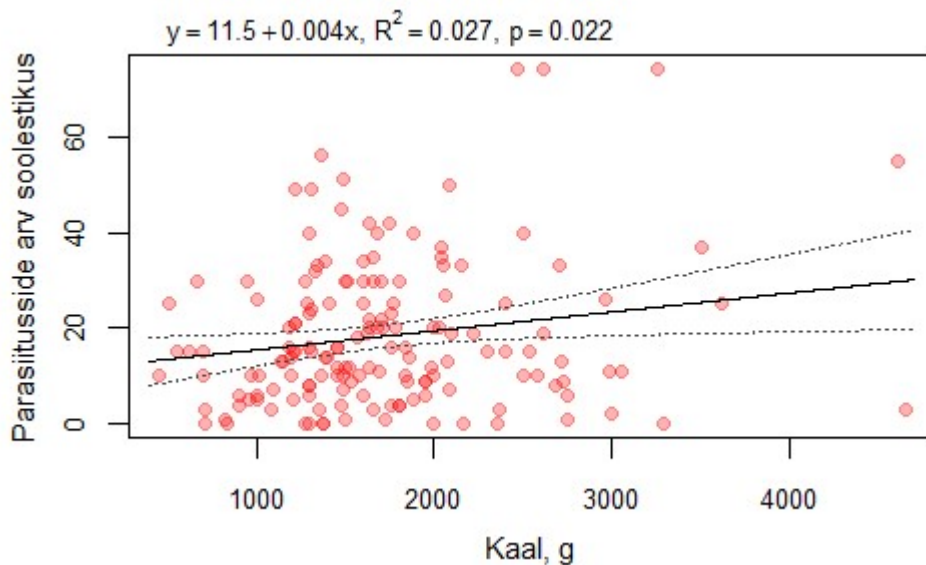
6.2 Parasiitusside arv

Parasiitusse esines 146-l kalal (93,6% kõigist uuritud kaladest), keskmine parasiitusside arv kala kohta oli 18,4 (keskmine üksnes parasiitussidega kaladel 19,6), mediaan 15,0 ja maksimum 74 ussi (joonis 14).

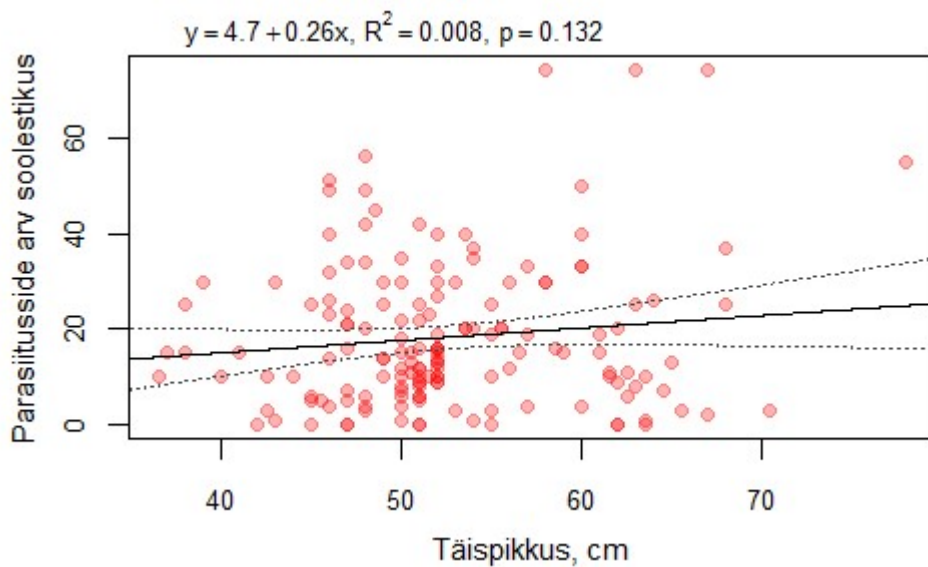


Joonis 14. Parasiitusside arvu jaotus uuritud kaladel ning parasiitussidega ja ilma kalade osakaal

Parasiitusside arv soolestikus sõltuvalt kala kaalust ja pikkusest on esitatud joonistel 15 ja 16. Kõigil juhtudel ilmnas kala mõõtmete ja usside arvu vahel nõrk positiivne seos – mida suurem oli kala, seda rohkem tal keskmiselt usse esines. Parasiitusside arvu seos kala kaaluga osutus statistiliselt oluliseks ($p = 0,022$). See tähendab, et usside hulk kala soolestikus on positiivses seoses kala kaaluga.

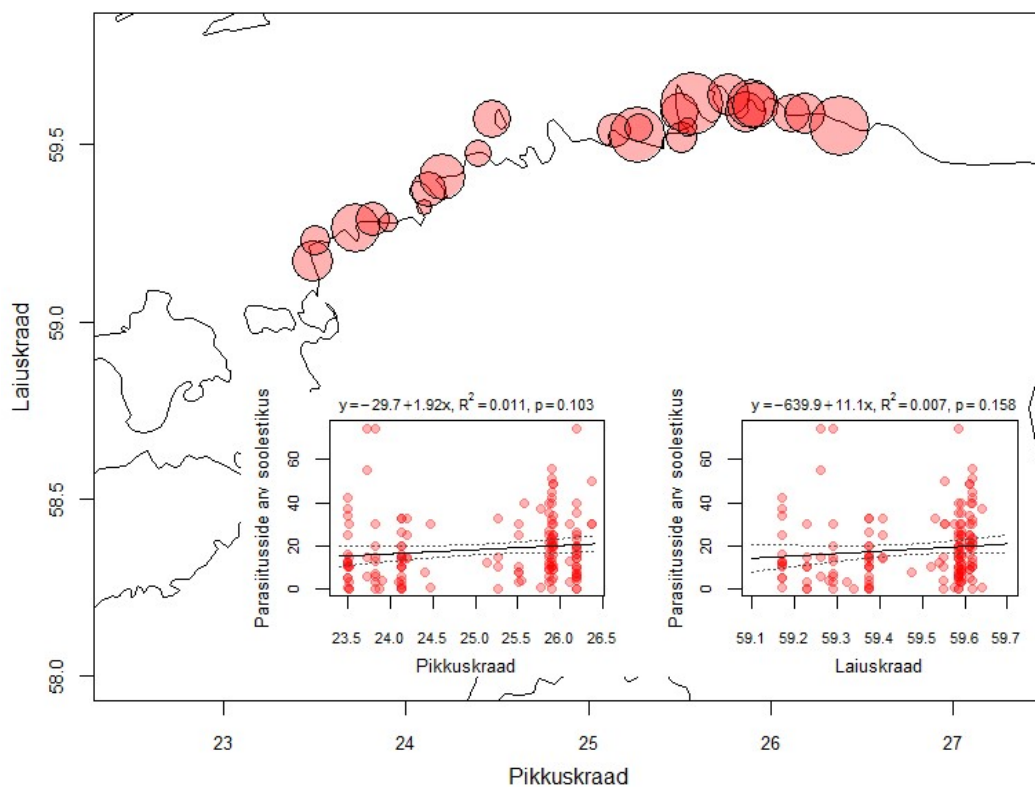


Joonis 15. Parasiitusside arv soolestikus sõltuvalt kala kaalust (iga kala on märgitud eraldi punktiga, pidev joon märgib lineaarse regressioonivõrrandi graafikut koos 95%-lise usaldusintervalliga, arvuliselt on esitatud regressioonivõrrand ning R^2 ja p -väärtused).



Joonis 16. Parasiitusside arv soolestikus sõltuvalt kala täispikkusest (iga kala on märgitud eraldi punktiga, pidev joon märgib lineaarse regressioonivõrrandi graafikut koos 95%-lise usaldusintervalliga, arvuliselt on esitatud regressioonivõrrand ning R^2 ja p -väärtused).

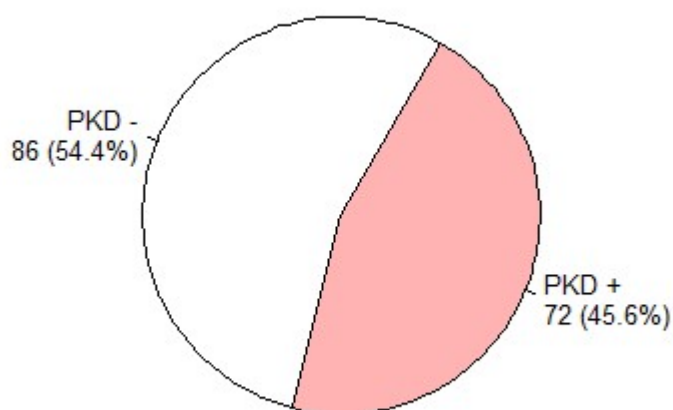
Parasiitusside arv soolestikus sõltuvalt püügikohast ning püügikoha pikkus- ja laiuskraadist on esitatud joonisel 17. Usside hulk Loode-Eestis oli pisut väiksem, laius- ning pikkuskraadi kasvades suurenes ka keskmine parasiitusside arv.



Joonis 17. Parasiitusside arv soolestikus sõltuvalt püügikohast – mida suurem on ring kaardil, seda rohkem oli parasiitusse keskmiselt sellest kohast püütud kalade soolestikes – ning parasiitusside arv sõltuvalt püügikoha pikkus- ja laiuskraadist (iga kala on alamjoonistel märgitud eraldi punktiga, pidev joon märgib lineaarse regressioonivõrrandi graafikut koos 95%-lise usaldusintervalliga, arvuliselt on esitatud regressioonivõrrand ning R^2 ja p-väärtused).

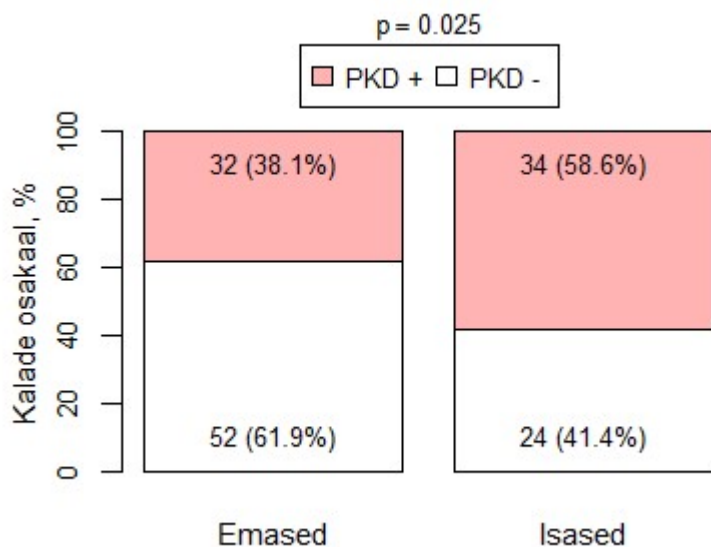
6.3 Proliferatiivse neeruhaiguse esinemine

Proliferatiivne neeruhaigus esines 72-l kalal, so 45,6%-l kõigist kaladest (joonis 18), seejuures oli üksnes neeru eesmine osa tabandunud kahel kalal (1,3% kõigist ja 2,8% proliferatiivse neeruhaigusega kaladest), üksnes neeru tagumine osa oli tabandunud 59-l kalal (37,3% kõigist ja 81,9% proliferatiivse neeruhaigusega kaladest) ja nii neeru eesmine kui ka tagumine osa olid tabandunud 11-l kalal (7,0% kõigist ja 15,3% proliferatiivse neeruhaigusega kaladest).



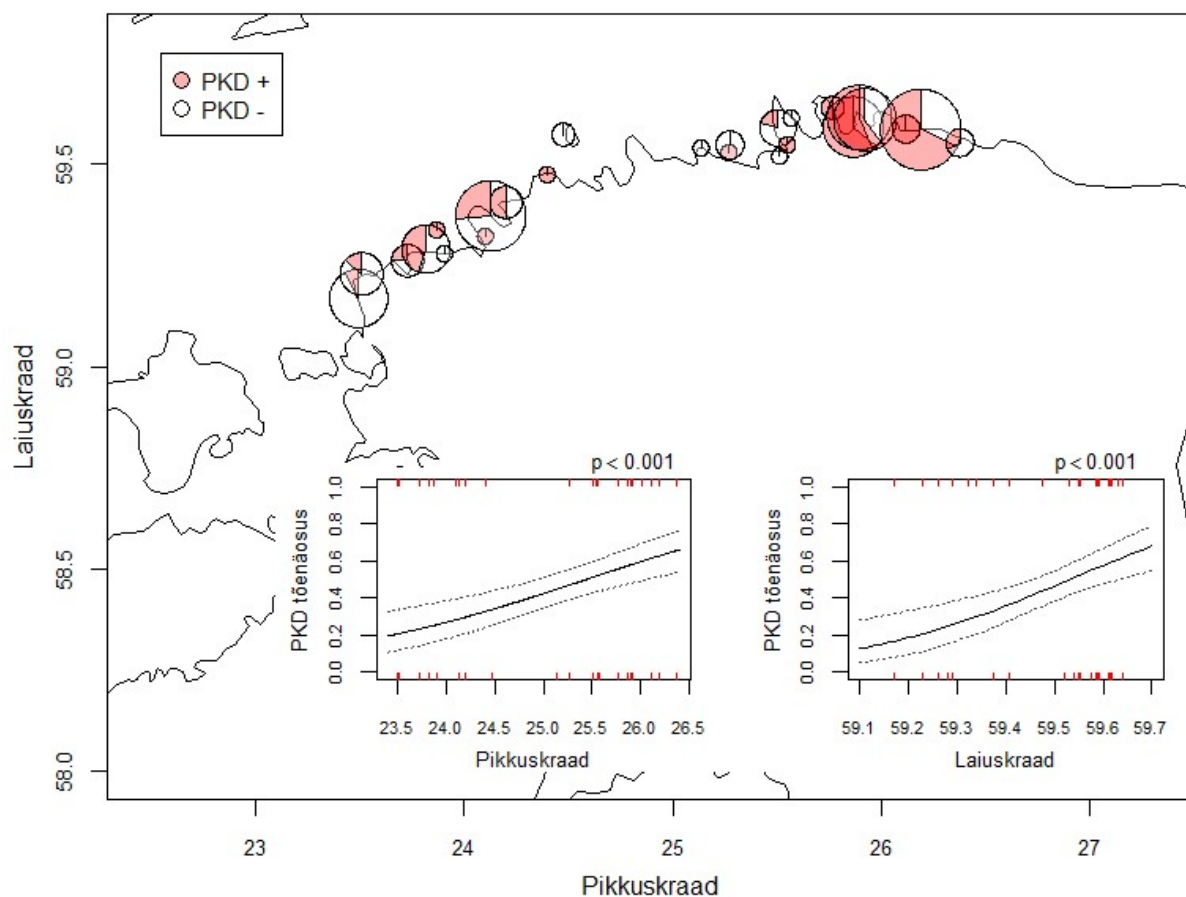
Joonis 18. Proliferatiivse neeruhaigusega (PKD +) ja ilma (PKD -) kalade osakaal.

Sugude lõikes esines haigust isastel statistiliselt oluliselt enam kui emastel kaladel (vastavalt 58,6% ja 38,1%, $p = 0,025$; joonis 19).



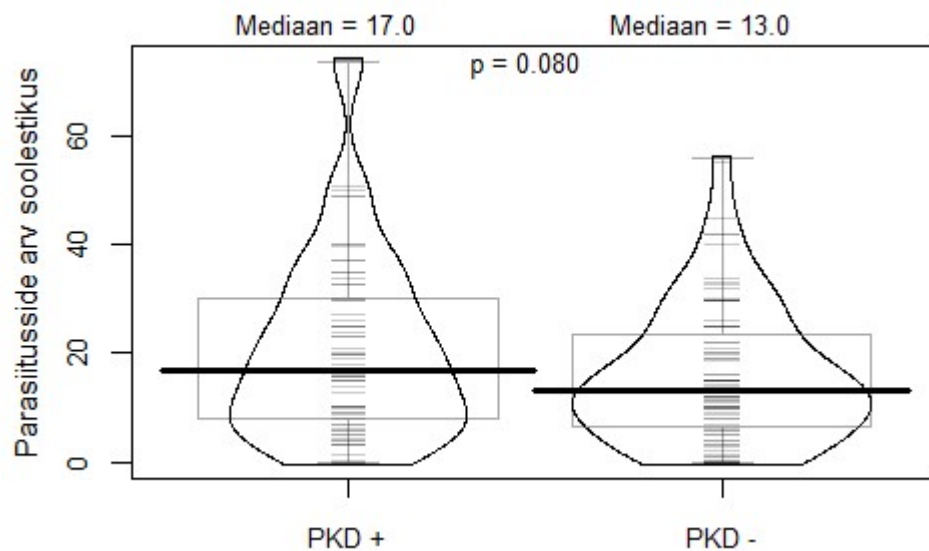
Joonis 19. Proliferatiivse neeruhaigusega (PKD +) ja ilma (PKD -) kalade osakaal sõltuvalt soost, p -väärtus näitab sugude vahelise erinevuse statistilist olulist (χ^2 -test).

Sarnaselt parasiitusside arvule on ka proliferatiivse neeruhaigusega kalu Tallinnast ida pool enam kui Tallinnast lääne pool (joonis 20). Aga see erinevus võib olla tingitud ka kalade erinevast soolisest jaotusest kahes püügipiirkonnas – Tallinnast ida poolt püütud kalade hulgas on emaseid ligikaudu 20% vähem võrreldes Tallinnast lääne poolt püütud kaladega ja emastel esines jällegi haigust vähem.



Joonis 20. Proliferatiivse neeruhaigusega kalade osakaal sõltuvalt püügikohast. Iga püügikoht on tähistatud proliferatiivse neeruhaigusega (PKD +) ja ilma (PKD -) kalade osakaalu näitava sektordiagrammiga, kusjuures diagrammi suurus peegeldab püütud kalade arvu. Alamjoonised esitavad proliferatiivse neeruhaigusega kalade esinemise tõenäosust sõltuvalt püügikoha pikkus- ja laiuskraadist – väikesed punased kriipsud märgivad üksikuid kalu, pidev joon märgib logistilise regressioonivõrrandi graafikut koos 95%-lise usaldusintervalliga ja p-väärtus näitab logistilise regressioonivõrrandi statistilist olulisust.

Jooniselt 21 ilmneb, et kuigi proliferatiivse neeruhaigusega kaladel on parasiituse pisut enam kui proliferatiivse neeruhaiguseta kaladel, ei ole see erinevus statistiliselt oluline ($p = 0,080$) ja väikese usside arvuga kalu leidub nii haigete kui ka tervete hulgas. Siiski on enam kui 60 parasiitussiga kaladel kõigil ka proliferatiivne neeruhaigus.



Joonis 21. Parasiitusside arv soolestikus proliferatiivne neeruhaigusega (PKD +) ja ilma (PKD -) kaladel. Väikesed horisontaalsed kriipsud tähistavad üksikuid kalu, taustal olev hall ristkülik märgib ala, kuhu jäävad keskmised 50% kaladest (kvartiilide vahe), must tugev joon koos joonise kohal olevate arvväertustega esitab parasiitusside arvu mediaani ja p-väärtus näitab gruppide vahelise erinevuse statistilist olulist (Wilcoxon test).

Meriforelli lihaskoest parasiite ei leitud.

7. Kasutatud kirjandus

1. Arula, T. (2012) Ecology of early life-history stages of herring *Clupea harengus* membras in the northeastern Baltic Sea, Tartu: University of Tartu Press, 65 lk.
2. Buchmann, K., Bresciani, J., Pedersen, K., Ariel, E., Dalsgaard, I., Madsen, L. (2009). Fish Diseases: An Introduction, Frederiksberg: Biofolia, 131 lk.
3. Kangur, M. (2009) Meriforelli raamat, Tallinn: Kalastaja Raamat. 160 lk.
4. Kangur, M., Paaver, T., Drevs, T., Turovski, A. (2003). Fishes of Estonia. Tallinn. 416 lk.
5. Merilo, Z. (2005). SININE RIST Parasiidid lõheliste kõhuõõnes. - Ajakiri Kalastaja. Nr. 37, lk 37 - 39.
6. Mitchell, C., G. (1993). Eubothrium. - 14. number of Aquaculture information series, lk 1-5.
7. Rannak, L., Arman, J., Kangur, M. (1983). Lõhe ja meriforell. Tallinn: Valgus. 152 lk.
8. Saksvik, M., Nilsen, F., Nylund, A., Berland, B. (2001) Effect of marine Eubothrium sp. (Cestoda: Pseudophyllidea) on the growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. - Journal of Fish Diseases. Vol. 24, pp. 111-119
9. Bristow, G. and Berland, B. (1991). The effect of long term, low level Eubothrium sp. (Cestoda: Pseudophyllidea) infection on growth in farmed salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 98(4), pp.325-330.
10. Feist, S., Peeler, E., Gardiner, R., Smith, E. and Longshaw, M. (2002). Proliferative kidney disease and renal myxosporidiosis in juvenile salmonids from rivers in England and Wales. *Journal of Fish Diseases*, 25(8), pp.451-458.
11. OKAMURA, B., HARTIKAINEN, H., SCHMIDT-POSTHAUS, H. and WAHLI, T. (2011). Life cycle complexity, environmental change and the emerging status of salmonid proliferative kidney disease. *Freshwater Biology*, 56(4), pp.735-753.
12. Okamura, B. and Wood, T. (2002). Bryozoans as hosts for Tetracapsula bryosalmonae, the PKX organism. *Journal of Fish Diseases*, 25(8), pp.469-475.
13. Morris, D., Adams, A. and Richards, R. (2000). In situ hybridisation identifies the gill as a portal of entry for PKX (Phylum Myxozoa), the causative agent of proliferative kidney disease in salmonids. *Parasitology Research*, 86(12), pp.950-956.

14. Grabner, D. and El-Matbouli, M. (2010). Tetracapsuloides bryosalmonae (Myxozoa: Malacosporea) portal of entry into the fish host. *Diseases of Aquatic Organisms*, 90(3), pp.197-206.
15. Longshaw M., LeDeuff R.M., Harris A.F. & Feist S.W. (2002) Development of Proliferative Kidney Disease (PKD) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, following short-term exposure to *Tetracapsula bryosalmonae* infected bryozoans. *Journal of Fish Diseases*, 25, 443–449.
16. Dash, M. and Vasemägi, A. (2014). Proliferative kidney disease (PKD) agent *Tetracapsuloides bryosalmonae* in brown trout populations in Estonia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 109(2), pp.139-148.
17. Feist, S., Longshaw, M., Canning, E. and Okamura, B. (2001). Induction of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* via the bryozoan *Fredericella sultana* infected with *Tetracapsula bryosalmonae*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45, pp.61-68.
18. Hedrick, R., MacConnell, E. and de Kinkelin, P. (1993). Proliferative kidney disease of salmonid fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, pp.277-290.
19. Tops S., Hartikainen H. & Okamura B. (2009) The effects of infection by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) and temperature on *Fredericella sultana* (Bryozoa). *International Journal for Parasitology*, 39, 1003–1010.
20. FERGUSON, H. and BALL, H. (1979). Epidemiological aspects of proliferative kidney disease amongst rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson in Northern Ireland. *Journal of Fish Diseases*, 2(3), pp.219-225.
21. Kent M.L. & Hedrick R.P. (1985) PKX, the causative agent of Proliferative Kidney Disease (PKD) in Pacific salmonid fishes and its affinities with the Myxozoa. *Journal of Parasitology*, 32, pp.254–260.
22. ANDERSON, C., CANNING, E. and OKAMURA, B. (1999). Molecular data implicate bryozoans as hosts for PKX (Phylum Myxozoa) and identify a clade of bryozoan parasites within the Myxozoa. *Parasitology*, 119(6), pp.555-561.
23. CANNING, E., CURRY, A., FEIST, S., LONGSHAW, M. and OKAMURA, B. (2000). A New Class and Order of Myxozoans to Accommodate Parasites of Bryozoans with Ultrastructural Observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX Organism). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(5), pp.456-468.
24. Feist S.W. & Longshaw M. (2006) The Phylum Myxozoa. In: *Fish Diseases and Disorders Vol. 1.* (Ed P.T.K.Woo), pp. 230–296. CABI. Publishing, Wallingford,UK.

25. Morris, D. and Adams, A. (2007). Sacculogenesis and sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) within the bryozoan host *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Parasitology Research*, 100(5), pp.983-992.
26. Martin, I., Dozin, B., Quarto, R., Cancedda, R. and Beltrame, F. (1997). Computer-based technique for cell aggregation analysis and cell aggregation in in vitro chondrogenesis. *Cytometry*, 28(2), pp.141-146.
27. MORRIS, D. and ADAMS, A. (2008). Sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* in the brown trout *Salmo trutta* and the role of the tertiary cell during the vertebrate phase of myxozoan life cycles. *Parasitology*, 135(09).
28. De Kinkelin, P., Okamura, B., Hedrick, R. and Baxa, D. (2004). Malacosporean-like spores in urine of rainbow trout react with antibody and DNA probes to *Tetracapsuloides bryosalmonae*. *Parasitology Research*, 92(1), pp.81-88.
29. Grabner, D. and El-Matbouli, M. (2008). Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) to *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata) by various fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79, pp.133-139.
30. Le Morvan C., Troutaud D. & Deschaux P. (1998) Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *Journal of Experimental Biology*, 201, pp. 165–168.
31. Chilmonczyk S., Monge D. & de Kinkelin P. (2002) Proliferative kidney disease: cellular aspects of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), response to parasitic infection. *Journal of Fish Diseases*, 25, pp.217–226.
32. Bettge K., Wahli T., Segner H. & Schmidt-Posthaus H. (2009) Proliferative kidney disease in rainbow trout: time- and temperature-related renal pathology and parasite distribution. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83, pp.67–76.
33. Kotob, M., Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Abdelzaher, M. and El-Matbouli, M. (2016). The impact of co-infections on fish: a review. *Veterinary Research*, 47(1).
34. Klemme, I., Louhi, K. and Karvonen, A. (2016). Host infection history modifies co-infection success of multiple parasite genotypes. *Journal of Animal Ecology*, 85(2), pp.591-597.
35. Schmidt-Posthaus, H., Steiner, P., Müller, B. and Casanova-Nakayama, A. (2013). Complex interaction between proliferative kidney disease, water temperature and concurrent nematode infection in brown trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, 104(1), pp.23-34.

36. HOLZER, A., SOMMERVILLE, C. and WOOTTEN, R. (2005). Molecular studies on the seasonal occurrence and development of five myxozoans in farmed *Salmo trutta* L. *Parasitology*, 132(02), p.193.
37. Bowers, J., Mustafa, A., Speare, D., Conboy, G., Brimacombe, M., Sims, D. and Burka, J. (2000). The physiological response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to a single experimental challenge with sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*. *Journal of Fish Diseases*, 23(3), pp.165-172.
38. Kennedy, C.R. 1978a. Studies on the biology of *Eubothrium salvelini* and *E. crassum* in resident and migratory *Salvelinus alpinus* and *Salmo trutta* and *S. salar* in North Norway and the islands of Spitsbergen and Jan Mayen. *J. Fish Biology*. 12:147–162.
39. ICES 2013. Report of the Baltic Salmon and Trout Assessment Working Group 2013 (WGBAST), 3 – 12 April, Tallinn, Estonia. – ICES CM 2013/ACOM:08.
40. Kalakasvatusliku taastootmise raames Eesti vetesse asustatud kalade andmestik (2016). Keskkonnaministeerium
http://www.envir.ee/sites/default/files/lisa_1_asustamise_tabelid_tegevuskavale.pdf
(20.04.2018)
41. Kalade taastootmise alased uuringud, 2012. aasta aruanne. (2013). Tartu: Eesti Maaülikooli Veterinaarmeditsiini ja Loomakasvatuse Instituudi Kalakasvatuse osakond.
http://www.envir.ee/sites/default/files/2012_kalade_taastootmise_lepingu_aruanne_16plik_0.pdf (20.04.2018)
42. KALAKASVATUSLIKU TAASTOOTMISE TEGEVUSKAVA 2017 – 2019, perspektiiviga kuni 2023. (2017). Tartu.
http://www.envir.ee/sites/default/files/kalakasvatusliku_taastootmise_tegevuskava_2017-2019.pdf (20.04.2018)
43. Kent ML, Khattra J, Hervio DML, Devlin RH (1998) Ribosomal DNA sequence analysis of isolates of the PKX myxo - sporean and their relationship to members of the genus *Sphaerospora*. *Journal of Aquatic Animal Health* 10: 12–21