

Hankkeen loppuraportti 24.3.2015  
EKTR-hanke, hankenro: 1000087

# Microspora- ja Henneguya-loisten aiheuttamien elinkeinokalataloudellisten haittojen vähentämiseen tähtäävän tiedon hankkiminen

Hanna Ahonen ja Jouni Taskinen

Jyväskylän yliopisto  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos



Hanke on osittain Euroopan kalatalousrahaston (EKTR) rahoittama  
EU investoi kestävään kalatalouteen



**Suomen elinkeinokalatalouden  
toimintaohjelma  
2007-2013**



## Yhteenveto

Hankkeen taustalla oli kahden eri kalalajin aiheuttamat ongelmat. Eräissä kuhan kalastuksen kannalta tärkeissä järvissä havaittiin loisinfektio, jossa kuhan lihakseen ilmestyi vaaleita laikkuja. Ilmoituksia saastuneista kaloista tuli sekä kalastajilta että kalakaupasta. Toisaalta siialla esiintyvä rakkoloisio (*Henneguya zschokkei*) aiheutti huolta siian viljelyyn erikoistuneissa kalanviljelylaitoksissa. Molempia tapauksia yhdisti se, että infektion aiheuttajaa ei joko tunnettu lainkaan (kuhan lihasloinen) tai tunnettiin huonosti (siian rakkoloisio). Hankkeen tavoitteena oli sellaisen tiedon hankkiminen, jolla voitaisiin estää tai vähentää kyseisten loisten aiheuttamia elinkeinokalataloudellisia haittoja.

Kuhan (ja ahvenen) lihasloinen todettiin *Microspora*-pääjaksoon kuuluvaksi mikrosporidiloiseksi. Loisen esiintyvyyttä tutkittiin laajalla alueella (Pohjois-Päijänne, Haukivesi, Koirusvesi, Pielinen, Höytiäinen; yhteensä 494 kuhaa). Kuhista löydettiin sekä laikkuja aiheuttava muoto että pieninä kyseteinä (ksenoma) esiintyvä muoto, jotka geneettisten tutkimusten perusteella osoittautuivat kahdeksi eri lajiksi. Ksenoma-muoto oli yleisempi esiintyen tutkimusjärvissä Höytiäistä (inf.prevalenssi 0 %) ja Haukivettä (inf. prevalenssi 3.1 %) lukuun ottamatta joka neljännellä-viidennellä kuhalla. Sen sijaan laikkuja muodostava, paljain silmin näkyvä laji oli hyvin harvinainen tutkimusjakson aikana (korkeintaan 1-3 tapausta sadassa kalassa). Geneettiset tulokset osoittivat, että sama laikumuotoinen mikrosporidi esiintyy sekä kuhassa että ahvenessa. Vuosien 2010-2014 aikana kuhan lihaksessa esiintyvien mikrosporidien esiintymisessä ei nähty selkeitä lisääntymisen eikä vähentymisen trendejä. Laikkuja aiheuttavan itiöloisen esiintyminen näyttää olevan alhaista, mutta kalastajien havaintoihin perustuen se runsastuu joissakin järvissä ajoittain haitaten kuhan kalastusta ja myyntiä, mutta toistaiseksi paikalliset epidemiat ovat nopeasti rauhoittuneet. Vaikka loisia esiintyi myös nuorissa (< 37 cm) kuhissa, niin kuhan istutuspoikasista mikrosporidiloisia ei löydetty, joten loisten elämänsykli ja tarttuminen kalaan tapahtuneen todennäköisesti järvissä, eikä poikastuotantoyksiköissä.

Siian rakkoloisio esiintymistä ja kehittymistä tutkittiin sekä luonnossa että viljelyolosuhteissa. Kohteena olleella kalanviljelylaitokselta tutkittiin mikroskooppisesti yhteensä 549 siikaa vuosien 2011-2013 aikana. Yksivuotiaissa (1+) kaloissa loista ei vielä näkynyt. Ensimmäiset rakkoloisio kystit havaittiin 2+ -ikäisistä kaloista, kalan kolmantena kesänä heinäkuun lopussa. Sen jälkeen kyseisen ikäryhmän jokaisessa näyte-erässä kaloista oli loisittu yksi neljäsosa-puolet, 1-56 kystiä/loisittu siika (3-vuotinen seuranta). Luonnon siikasaaliissa (kolme järveä, n = 309 kalaa, 2010-2011) rakkoloisio esiintymisprevalenssi oli Koiterella 3 %, Haukivedellä 30 % ja Päijänteellä 43 %. Sukupuolten välillä ei ollut eroja loisinnan prevalensseissa tai kystien lukumäärissä, mutta rakkoloisio kystien lukumäärä kasvoi kalan pituuden kasvaessa. Haukivedellä rakkoloisio esiintyminen oli yleisempää lokkilapamadon infektoimilla siioilla, mutta muuten *H. zschokkei* -loisinta ei ollut yhteydessä lokkilapamadon tai haukimadon esiintymiseen, eikä riippunut siian siivilähampaiden lukumäärästä. Geneettiset tulokset osoittivat siassa ja muikussa esiintyvän rakkoloisio sekä merisiiasassa (Perämeri) että sisävesisiiasassa elävän rakkoloisio kuuluvan samaan lajiin.

Rakkoloisio elämänsykliä yritettiin selvittää lukuisin erilaisin kokein, joissa varioitiin rakkoloisio kystien käsittelyä (kokonainen kysti, hajotettu kysti, luonnollisesti hajonnut kysti), inkubointiaikaa (maksimissaan 2 vuoden seuranta), inkubointilämpötilaa (kuusi eri lämpötilaa välillä 4-22 °C, tasainen, vaihteleva), valaistusolosuhteita (jatkuva valo, 8 h valo, pimeä) sekä harvasukamatolajia (*Lumbriculus variegatus*, *Tubifex tubifex*, sekakannat luonnon populaatioista). Missään kokeessa harvasukamatoja ei kuitenkaan saatu tuottamaan rakkoloisio aktinospooreja eli

harvasukamadosta kalaan tarttuvia itiöitä. Ainakaan lajit *L. variegatus* ja *T. tubifex* eivät kuitenkaan ole rakkoloision isäntäharvasukamatoja.

Projektin tuloksena Microspora- ja Henneguya-loisista hankittu tieto auttaa osaltaan kyseisten loisten aiheuttamien elinkeinokalataloudellisten haittojen vähentämisessä. Hankkeen aikana saatiin käsitys mikrosporidiloisinnan tilanteesta kuhakannoissa Suomessa ja saadut tulokset toimivat hyvänä vertailupohjana tilanteen seuraamiselle tulevaisuudessa. Sekä mikrosporidiloisten (Prof. Simon Jones, Fisheries and Oceans Canada, Nanaimo) että siian rakkoloision (prof. Mansour El-Matbouli, University of Veterinary Medicine, Vienna) tutkimuksen suhteen muodostetut kansainväliset yhteydet sekä kotimainen tutkimusyhteistyö (Itä-Suomen yliopisto, Evira) ja yhteistyö kalastajien ja kalanviljelijöiden kanssa muodostaa arvokkaan verkoston, jonka avulla voidaan tarttua myös tulevaisuudessa esiin tuleviin lois- ja tautiongelmiin kalanviljelyssä ja kalataloudessa. Hankkeen tuloksista tiedotettiin kansallisissa ja kansainvälisissä kalanviljely- ja kalatautialan kokouksissa, esimerkiksi Eviran ja Suomen Kalankasvattajaliiton järjestämällä kalaterveyspäivillä. Hankkeen seurantaryhmän kautta tulokset ovat olleet myös Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen tietoon. Lisäksi hankkeen tuloksista tullaan tiedottamaan mm. Kalankasvattaja-lehdessä.

## 1. Tutkimuksen tausta

Hankkeen taustalla oli kahden eri kalaloinen aiheuttamat ongelmat. Eräissä kuhan kalastuksen kannalta tärkeissä järvissä havaittiin loisinfektio, jossa kuhan lihakseen ilmestyi vaaleita laikkuja. Ilmoituksia saastuneista kaloista tuli sekä kalastajilta että kalakaupasta. Toisaalta siialla esiintyvä rakkoloisio (*Henneguya zschokkei*) aiheutti huolta siian viljelyyn erikoistuneissa kalanviljelylaitoksissa. Molempia tapauksia yhdisti se, että infektion aiheuttajaa ei joko tunnettu laisinkaan (kuhan lihasloinen) tai tunnettiin huonosti (Siian rakkoloisio). Hankkeen tavoitteena oli sellaisen tiedon hankkiminen, jolla voitaisiin estää tai vähentää kyseisten loisten aiheuttamia elinkeinokalataloudellisia haittoja.

### 1.1. Microspora-loiset

Microspora pääjaksoon kuuluvat mikrosporidit ovat huonosti tunnettu loisryhmä. Esimerkiksi elämänkiertoa ei ole saatu selville kuin muutamalla lajilla. Nykytiedon valossa ne luokitellaan kuuluvaksi sienikuntaan. Aikaisemmin luokittelu perustui ainoastaan itiöiden rakenteisiin, mutta nykyosaamisen valossa luokituksia on tarkennettu molekyylibiologisten tutkimusten avulla. Yleensä nämä yksisoluiset mikrosporidit elävät kalan solujen sisällä ja tuottavat itiöitä joiden avulla ne leviävät uusiin isäntiin. Kaloissa esiintyvien mikrosporidien itiöiden koko vaihtelee 2-12 µm välillä, keskikoon ollessa 4 µm. Itiöt ovat hyvin kestäviä, sillä ne selviävät vedessä elinkykyisinä useita kuukausia. Elämänkierron uskotaan olevan suora eli loinen leviää kalasta kalaan ilman väli-isäntiä. Kala saa tartunnan yleisimmin suoliston kautta nieltyään itiön, joka on vapautunut infektoituneesta kalasta. Loinen voi joissain tapauksissa siirtyä myös siirtoisäntien välityksellä, jolloin kala saa tartunnan syötyään itiön sisältävän vesiselkärangattoman. Siirtoisännät lisäävät itiöiden mahdollisuuksia päästä uuteen kalaisäntään. On myös todettu, että itiö voi vapautua ja tarttua uudestaan samaan yksilöön, jonka se infektoi alun perin. Tämä selittää mikrosporidiloisille tyypillisen runsastumisen sopivassa kalayksilössä. Osa mikrosporideista kasvaa kohde-elimessä isännän kapseloiman solun (ksenoman) sisällä. Osa lajeista taas ei muodosta ksenomaa, vaan loisen solut vähitellen syrjäyttävät isäntäsolun sisällön (Valtonen ym., 2012, Lom & Dykova, 2005).

#### *Kuhan kalastus ja viljely Suomessa*

Kuha muodostaa perustan sisävesien ammattikalastukselle monilla alueilla Suomessa. Kuha on taloudellisesti arvokkaimpia lajejamme. Ankeriaan jälkeen kuhalla on kallein kilohinta kotimaisista kaloista. Vuonna 2012 ammattikalastajien kuhasaalis oli 317 tonnia (Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen, RKTL). Vapaa-ajankalastajat arvioivat kuhasaaliiden kolminkertaistuneen 2000-luvulla. Kuhakannat ovat selvästi hyötäneet lämpimistä kesistä (Raitaniemi & Manninen, 2014). Kuvanviljely on myös aloitettu ja kuhan uskotaan tulevaisuudessa kehittyvän myös tärkeäksi viljelylajiksi Suomessa. Tällä hetkellä se on suosituin istukaskala heti siian jälkeen.

#### *Kuhan lihaksessa esiintyvä mikrosporidi*

Mikrosporidihavainnot ovat muutaman viimeisen vuoden aikana lisääntyneet mm. Pohjois-Karjalan ja Pohjois-Savon alueella tietyissä järvissä kuhissa ja ahvenissa. Kuhassa ja ahvenessa esiintyvien mikrosporidien taksonomista asemaa, elämänkiertoa ja tartuntamekanismeja ei tunneta. Pienet mikrosporidit täyttävät kuhan ja ahvenen lihaskudoksen jopa niin pahoin, että loisittu kala ei esteettisistä syistä kelpaa myyntiin eikä jalostettavaksi. Koska etenkin kuha on sisävesien ammattikalastuksen kannalta monesti

tärkein saalislaji, uhkaa mikrosporidiloisten lisääntyminen kalastuselinkeinon tulevaisuutta kyseisillä alueilla. Loisten runsastuminen luonnon kuhapopulaatioissa voi johtaa tulevaisuudessa myös kyseisen loisen ilmaantumiseen kuhanviljely-yksiköihin. Tämä voisi haitata kuhanviljelyn kehittymistä Suomessa.

#### *Tavoitteet*

Hankkeen tavoitteena oli selvittää kuhassa ja ahvenessa esiintyvien mikrosporidiloisten taksonomista asemaa, lajia sekä loisen esiintymisen yleisyyttä eri järvissä ja vertailla esiintymistä pienissä, nuorissa, ja suurikokoisissa vanhoissa kuhissa eri vuodenaikoina.

### **1.2. Myxozoa-loiset (*Henneguya*)**

Myxozoa-loiset ovat monisoluisia, itiöitä muodostavia loisia, jotka ovat läheistä sukua polttiaiseläimille. Myxozoa-loiset jaetaan kahteen luokkaan pääisännän mukaan. Malacosporea-luokan pääisäntänä toimii sammaleläin. Kyseisestä luokasta tunnetaan neljä loista (mm. PKD-taudin aiheuttaja). Malacosporea -lajeja ei ole Suomessa. Toinen luokka, Myxosporea, on runsaslukuisempi ja niitä tunnetaan 2400 eri lajia, joista *Henneguya*-sukuun kuuluu ~200 lajia. Loisella on kaksi-isäntäinen elämänkierto ja kahdentyyppistä esiintymismuotoa (aktinospoorit ja myksospoorit). Elämänkierto on selvitetty ~35 Myxozoa-lajilta, joista neljä on *Henneguya*-suvun loisilta; *H. exilis* (Lin ym., 1999), *H. ictaluri* (Pote ym., 2000), *H. nuesslini* (Kallert ym., 2005) ja *H. mississippiensis* (Rosser ym., 2015). Pääisäntä toimii yleensä vesistöjen pohjalla elävä harvasukamato ja väli-isäntä on kala, mutta niitä on löydetty myös matelijoilta, linnuilta, hyönteisiltä sekä ihmisiltä. Myksospoorit ovat hyvin kestäviä. Ne säilyvät luonnossa infektiokykyisinä jopa vuosikymmeniä. Myksospoorin koko ilman ulokkeita on 8-20 µm. Loinen kehittyy pääisännän suolessa aktinospoori-itiöksi, joka parveilee kalaan. Hauraat aktinospoorit elävät vain muutaman päivän joten niiden on pian päästävä isäntään. Ne eivät liiku aktiivisesti vedessä vaan keijuvat virtauksen mukana. Kooltaan ne ovat suurempia kuin myksospoorit; koko voi olla ulokkeineen jopa 500 µm. Aktinospoori-itiön päästyä kalaan, joko kidusten, ruuansulatuskanavan tai ihon läpi, se vaeltaa kohde-elimeen. Siellä loinen alkaa jakautua ja sen ympärille muodostuu selvärajainen kysta (plasmodium). Loinen vapautuu kalasta kystan puhjetessa tai kalan kuoltua esimerkiksi joutuessa saaliiksi (Friedrich ym., 2000, Kent ym., 2001, Lom & Duková, 2006).

#### *Siian lihaksessa esiintyvä Henneguya zschokkei*

Siian rakkoloisio, *Henneguya zschokkei*, kuuluu Myxozoa-loisiin. Joissain määrin epäselvää ovatko *H. zschokkei* ja *H. salminicola*-loinen synonyymejä. Kumpaakin loista esiintyy lohikaloilla (Lom & Dykova, 1992, Kent ym., 2001). Siian rakkoloisio on huonosti tunnettu ja esimerkiksi sen elämänkierron vaiheita ei tunneta. Ensimmäiset havainnot Suomessa loisen esiintymisestä on kirjattu 1900-luvulta (Levander, 1914). Siian rakkoloisiota esiintyy nykyään yleisesti koko maassa. Sen on todettu tarttuvan myös muikkuihin (Hyvärinen ym., 2000). Rakkoloisio on siian viljelyn tulevaisuutta haittaava ja uhkaava tekijä. Se loisii kalan lihaksessa halkaisijaltaan muutamista millimetreistä jopa muutamien senttimetrien kokoisina vaaleina maitomaista nestettä sisältävinä kysteinä. Neste sisältää lukemattoman määrän pieniä myksospoori-itiöitä. Kystit ovat esteettisesti epämiellyttävän näköisiä ja aiheuttavat ainakin rikkoutuessaan makuhaittoja kalaan vaikeuttaen ja estäen sekä kalojen myynnin että syönnin.

### *Siian kalastus ja viljely Suomessa*

Siian viljely on uusi, kasvava elinkeino – ruokakalatuotannossa siika on tällä hetkellä Suomen toiseksi tärkein kalalaji. Vuonna 2013 Suomessa tuotettiin 1,2 miljoonaa kiloa siikaa ja 18 miljoonaa poikasta (Savolainen, 2014). Lähes koko vaellussiikakanta on istutusten varassa (Raitaniemi & Manninen, 2014).

### *Tavoitteet*

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää loisen elämänkiertoa kokeellisesti. Jotta loista pystyttäisiin torjumaan, on loisen ekologian tunteminen tärkeää. lisäksi tavoitteena oli tutkia loisen esiintymistä niin kalanviljelylaitoksilla kuin järvissä. On tärkeä tietää milloin loinen ilmestyy siikoihin ja kuinka nopeasti se kehittyy. Projektin tavoitteena oli myös loisen tunnistaminen molekyylibiologisin menetelmin. Lisäksi hankkeen tavoitteena oli kartoittaa menetelmiä loisen aktinospoorien torjumiseksi ja selvittää *H. zschokkei*-loisen esiintymistä siian valintajalostusohjelman yhteydessä, jotta tiedettäisiin onko siiolla mahdollisesti periytyvää resistenttiä loista vastaan.

## **2. Menetelmät**

### **2.1. Kuhan mikrosporidiloinen**

#### *Kalanäytteet*

Kuhanäytteitä kerättiin eri vuodenaikoina paikallisia kalastajia käyttäen viidestä järvestä, joissa on ammattimaista kuhankalastusta; Haukivedeltä Etelä-Savosta, Pohjois-Päijänteeltä Keski-Suomesta, Pieliseltä ja Höytiäiseltä Pohjois-Karjalasta sekä Koirusvedeltä Pohjois-Savosta. Elinkeino-, liikenne- ja ympäristökeskukselta (ELY) haettiin poikkeusluvut myös alamittaisten kuhien talteenottoon, jos niitä tulisi saaliiksi pyynnin yhteydessä. Ahvenien mahdollisista mikrosporiditartunnoista saatiin tietoa vastaavasti viideltä järveltä; Haukivedeltä, Pieliseltä, Pohjois-Päijänteeltä, Konnevedeltä sekä Leppävedeltä (Taulukko 1). Lisäksi tutkittiin kuhanpoikasia (n=133) eräältä luonnonravintolammikolta, josta poikasia toimitetaan mm. Haukivedelle.

Luonnonlammikkopoikaset toimitettiin happipussissa ja tutkittiin tuoreina. Keski-Suomen järvien kalanäytteet tuotiin tutkittavasti tuoreeltaan Osa kaloista tuli elävinä ja ne tapettiin iskulla päähän juuri ennen tutkimusta. Muiden järvien näytteet tulivat joko tuoreeltaan jäissä (kalastuspäivänä tai seuraavana) tai pakastettuna matkahuollon kautta. Jäiset kalat sulatettiin 5 asteessa yön yli. Kalasta merkittiin ylös pituus, paino ja sukupuoli sekä otettiin talteen somu-/otoliittinäytteet. Kala fileoitiin ohuiksi siivuiksi, jotka litistettiin kahden lasilevyn väliin ja lihas tutkittiin kokonaisuudessaan stereomikroskoopin avulla. Loisen itiötihentymät / ksenomat laskettiin ja merkittiin ylös. Ahventen lihakset fileoitiin ja itiötihentymät todettiin sekä laskettiin sil-määräisesti. Suurimmalta osalta ahvenista lihas tutkittiin myös mikroskooppisesti. Epäselvät tapaukset tarkistettiin aina mikroskoopilla 400x-suurennoksella, paitsi ne jotka otettiin näytteeksi.

Taulukko 1. Eri järvistä tutkittujen kuhien ja ahventen lukumäärät.

Järvi	Kuha (n)	Ahven (n)
Haukivesi	158	210
Pohjois-Päijänne	190	30
Pielinen	71	2
Höytiäinen	46	-
Koirusvesi	30	-
Konnevesi	-	5
Leppävesi	-	28
<b>yht.</b>	<b>495</b>	<b>275</b>

### *Molekyylimenetelmät ja lajinmääritys*

Mikrosporidi-itiöistä ja ksenomista otettiin näytteitä alkoholiin. Osa loisnäytteistä käsiteltiin TEM-protokollan (2,5 % glutaraldehydi + Sorensenin puskuri) mukaan ja ne tutkitaan läpäisyelektronimikroskoopilla (TEM, Transmission Electron Microscope). Lajinmääritys tehdään yhteistyökumppanin Prof. Simon Jonesin (Fisheries and Oceans Canada, Nanaimo, Kanada) laboratorioissa ja tulokset valmistuvat vuoden 2015 aikana.

## **2.2. Siian rakkoloisio**

### *Kalanäytteet laituskaloista*

Siikoja tutkittiin eräältä Pohjois-Suomessa sijaitsevalta kalanviljelylaitokselta. Ks. laitoksen siiat tulivat kalanviljelylaitokseen poikasina tai mätinä maaliskuuhun vaihteessa poikaslaitokselta. Siiat siirretään lasikuitualtaista verkkokasseihin ensimmäisen kesän ja syksyn aikana (Taulukko 2). Tutkimuksessa tutkittiin siikoja kolmesta ikäluokasta (2009, 2010 ja 2011) ja ikäryhmästä 1+ (n=151), 2+ (n=191) ja 3+ (n=206). Kalat tulivat pakastettuina ja ennen tutkimusta ne sulatettiin 5 asteessa yön yli. Data kerättiin 1,5 vuoden aikana (Taulukko 3).

Kaloista otettiin pituus, paino ja sukupuolitetiedot ylös. Kalat fileoitiin ja siivutettiin ohuiksi paloiksi mitkä tutkittiin stereomikroskoopilla kahden lasilevyn välissä. *H. zschokkei*-loisen kystit laskettiin ja kehitysvaiheet kirjattiin ylös. Epäselvät tapaukset tarkistettiin 400x-suurennuksella tutkimusmikroskoopilla. Itiöitä kuvattiin, mitattiin ja säilöttiin alkoholiin geneettistä tutkimusta varten.

Taulukko 2. Kalanviljelylaitokselta tutkittujen kolmen vuosiluokan historia. Kaksi vuosiluokkaa tulivat laitokselle poikasina, yksi mätinä ja verkkokasseihin siirtäminen tapahtui kesällä/syksyllä. Suluissa kalan keskikoko laitokseen tullessa/verkkokasseihin siirrettäessä.

VL	Tuotu laitokselle	Siirretty verkkokasseihin
2009	poikasina, 0.30g	23.9.2009 (38.4 g)
2010	mätinä	29.7.2010 (7.7g)
2011	poikasina 0.25g	22.6.2011 (3.6 g) ja 12.7 (5.6 g)

Taulukko 3. Ei vuosiluokkien siikojen lukumäärät ja tutkimuskuukausi/vuosi. Suluissa kalan ikä tutkimuspäivänä.

VL	07/11 n (ikä)	10/11 n (ikä)	02/11 n (ikä)	04/12 n (ikä)	08/12 n (ikä)	01/13 n (ikä)
2009	32 (2+)	55 (2+)	50 (3+)	50 (3+)	50 (3+)	
2010		50 (1+)			55 (2+)	106 (3+)
2011			51 (1+)	50 (1+)		

#### *Kalanäytteet luonnonkaloista*

Siikoja tutkittiin kolmelta järveltä: Haukivedeltä tutkittiin 159 siikaa, Pohjois-Päijänteeltä 86 kpl ja Koitereelta 64 kpl (Taulukko 4). Kalat tulivat paikallisilta ammattikalastajilta. Haukiveden ja Koitereen kalastajat lähettivät kalat matkahuollon kautta jäissä. Pohjois-Päijänteen kalastaja toi kalat tuoreeltaan tutkittavaksi yleensä jo kalastuspäivänä, korkeintaan seuraavana. Kalat tutkittiin samoin menetelmin millä laitossiiatkin (ks. *Kalanäytteet laituskaloista*). Lisäksi lokkilapamato- (*Diphyllobothrium dendriticum*) sekä haukimatoinfektiot (*Triaenophorus crassus*) kirjattiin ylös ja osalta kaloista laskettiin siivilähampaiden lukumäärä ylimmältä kiduskaarelta.

#### *Elämänkiertokokeet*

Rakkoloision elämänkiertoa tutkittiin usealla infektiokokeella. Myksospooreja saatiin siiasta loisen kysteistä. Infektiokokeissa harvasukamadoille annosteltiin myksospoori-vesiseosta. Kontrollipurkkeihin lisättiin sama määrä pelkkää vettä. Merkinä infektoinnin onnistumisesta on aktinospoorituotannon alkaminen harvasukamadoissa. Harvasukamatoja seurattiin tämän jälkeen 1-2 vuotta, minä aikana harvasukamatoviljelmien vesi seulottiin 20 µm seulalla viikoittain ja näyte tutkittiin tutkimusmikroskoopin avulla aktinospoorien löytämiseksi.

Infektoimme eri alkuperän harvasukamatoja (kalanviljelylaitokselta ja kalattomista lammista kerättyjä eri harvasukamatolajeja sekä puhdasta *Lumbriculus variegatus*-lajia), käytimme eri lämpötiloja (kuusi eri ylläpitolämpötilaa ja luonnon vesien lämpötilaa seuraava), teimme erilaisia käsittelyjä loiskysteille ennen kuin myksospoorit otettiin talteen infektoimista varten (eri lämpötiloissa säilyttäminen eri aikoja, kystin luonnollinen hajoaminen, mahdollisimman tuoreen kystin käyttäminen), käytimme kokeissa kahdenlaista valaistusolosuhdetta (8/24h valaistus tai ei valoa).

Toukokuussa 2014 lähetimme myksospooreja Itävaltaan Prof. El-Matboulin (University of Veterinary Medicine, Vienna, Itävalta) tutkimusryhmälle elämänkiertokokeisiin, jossa eri harvasukamatolajeja infektoitiin myksospooreilla. Viimeisen kokeen tulokset saadaan vuoden 2015 aikana.

#### *Molekyylimenetelmät*

Myksospooreista ja aktinospooreista otettiin näytteitä talteen 95–99 % etanoliin. Näytteet sekvensoitiin pienemmästä alayksiköstä 18S (n. 1700 emäsparia). Näytteistä saatuja sekvenssejä verrattiin keskenään (siika vs. muikku ja Perämeren siika vs. sisäveden siika) sekä geenipankista löytyneisiin tietoihin. Tutkimme myös luonnossa infektoitujen harvasukamatojen aktinospoorien sekvenssejä ja vertailimme niitä *H. zschokkei*-loisen sekvensseihin. Laitokselta haettujen harvasukamatoja sekvensointiin ja yritimme löytää harvasukamadoista myxozoan sekvenssejä PCR:n avulla.



### *Siian valintajalostusohjelma*

Tarkoituksena oli selvittää löytyykö siian valintajalostuspopulaatiosta vaihtelua *Henneguya*-loisiota vastaan Tervon kalanviljelylaitoksella. Siikojen iho muuttuu kutuaikaan karkeaksi ns. kutukyhmyjen takia. Kaloilla tämä ns. kutukarkeus voi indikoida immuunipuolustuksen tehokkuutta ja toisaalta kalan tautitilannetta. *H. zschokkei* -loisitut kalat saattavat siis erottua iholtaan sileämpinä verrattuna terveisiin siikoihin. Tästä syystä siikojen (n=514) kutukyhmyjä laskettiin kolmena syksynä (2009–11) siian valintajalostusohjelman emokaloilta kalanviljelylaitoksella. Kalat olivat ip-merkattuja ja jälkeinpäin yksilöitävissä. Kutukyhmyt laskettiin päästä toiselta puolelta silmästä sieraimen väliltä. Lisäksi kyljestä arvioitiin kylkikyhmien rivimäärä ja karkeusluokka (luokat: 0 - ei yhtään koholla, 1- vain vähän koholla, 2- selkeästi koholla, 3- selkeästi karkea) selkäevän kohdalta. Kalojen lopputeurastus oli joulukuussa 2011, jolloin pystyttiin toteamaan *H. zschokkei* -infektiot kyseisistä emokaloista.

## **3. Tulokset**

### **3.1. Kuhan *Microsporidia*-loiset**

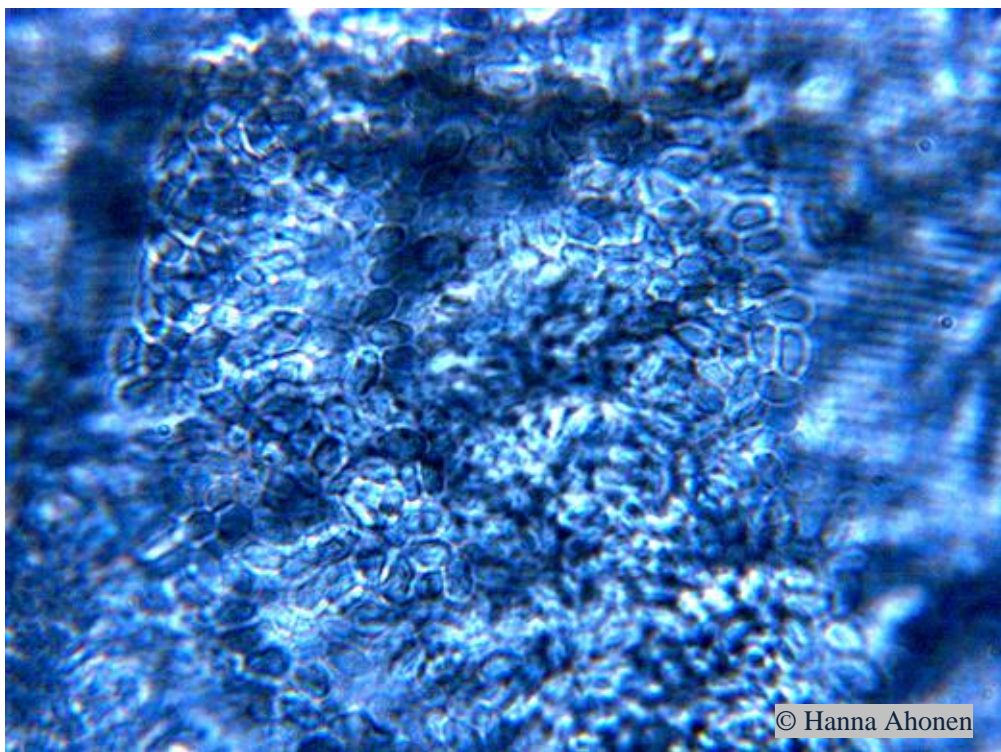
#### *Microsporidien lajinmääritys*

Kuhasta löydettiin kahta eri microsporidimuotoa lihaksesta. Ensimmäisessä muodossa itiöt esiintyvät lihaksessa ”vapaana”, ts. ne eivät ole ksenoman ympäröimiä vaan itiötihentyminä (Kuva 1). Ne näkyvät muutamasta millistä jopa 1-2 cm halkaisijaltaan olevina vaaleina laikkuina kalan läpikuultavassa lihaksessa. Yhdessä laikussa on lukematon määrä loisen itiöitä (Kuva 2). Toinen tutkimuksessa löytynyt muoto esiintyy pieninä 200-300 µm kokoisina ksenomina, jotka ovat täynnä loisen itiöitä (Kuva 3 ja 4). Ksenomien muoto vaihteli pitkulaisesta pyöreään. Niissä oli selkeä tiivis kuori joka erotti loisen kalan lihassolusta. Kummankin muodon itiön koko on n. 5 µm. Käytämme tässä raportissa lajeista nimitystä laikku muoto ja ksenomamuoto, koska lajinmääritys kummankin lajin osalta on vielä kesken.

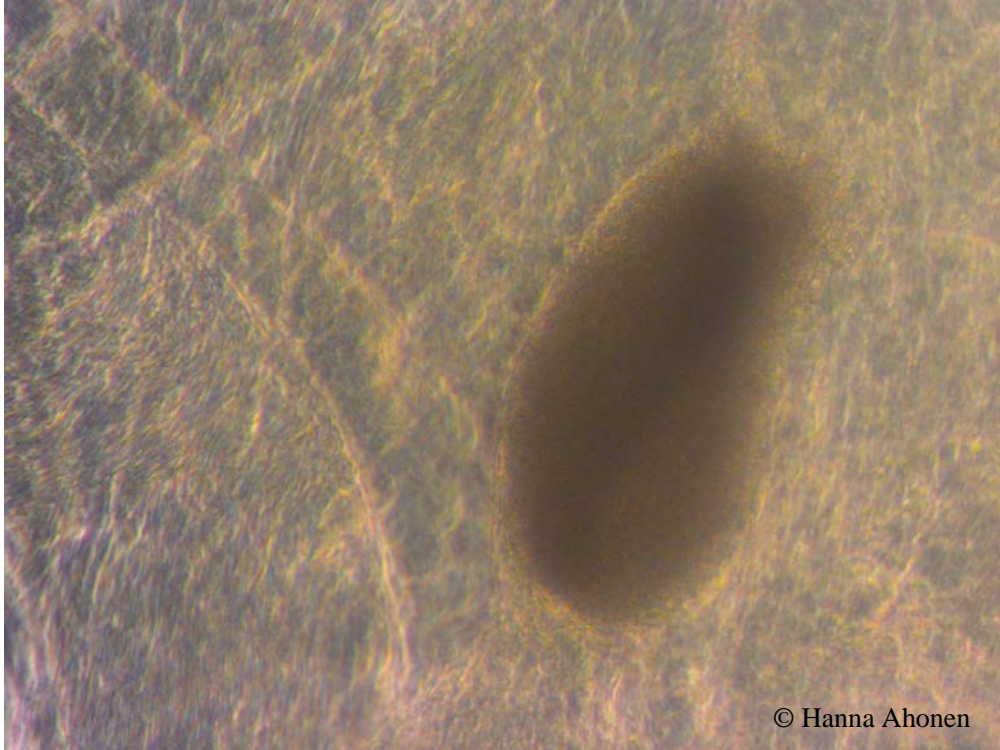
Lajinmäärityksen tekee microsporiditutkija prof. Simon Jones. Tarkemmat tulokset valmistuvat vuoden 2015 aikana. Olemme saaneet alustavasti varmistuksen siitä, että kyseessä on kaksi tieteelle uutta lajia. Ahvenessa ja kuhassa esiintyvä laikku muodon mikrosporidi on samaa lajia, mutta kuhassa esiintyvä ksenomamuoto on näistä poikkeava, oma lajinsa. Kyseessä on mitä todennäköisimmin kaksi tieteelle uutta, aikaisemmin kuvaamatonta loislajia. Lisäksi tutkimuksissa löytyi yksittäisen kuhan lihaksesta toinenkin ksenomamuotoinen mikrosporidiloinen, normaalisti mateessa esiintyvä, *Pleistophora ladogensis*.



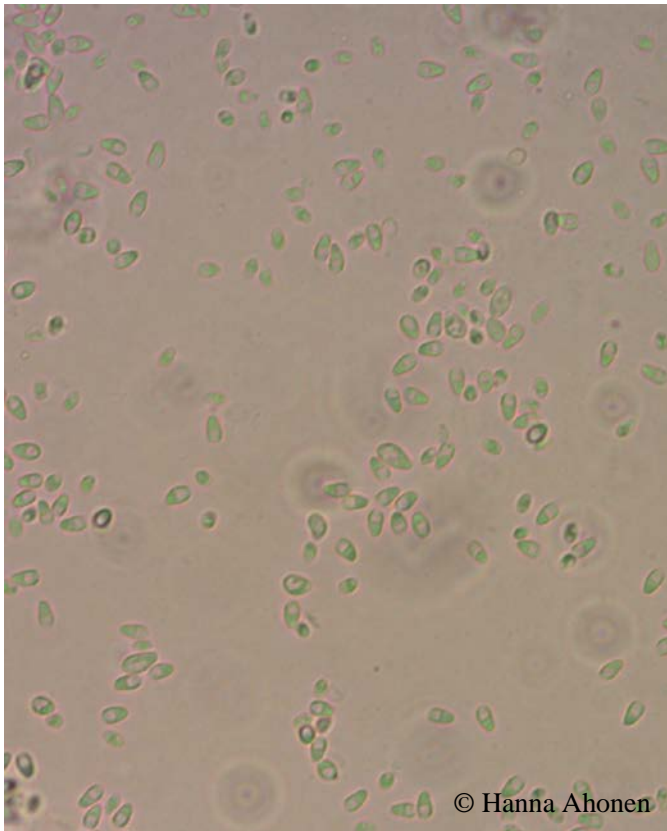
Kuva 1. Microsporidiloisen itiötiheyttä (laikkuja) ahvenen lihaksessa.



Kuva 2. Itiötiheymä sisältää lukemattoman määrän pieniä mikrosporidi-itiöitä, joiden läpimitta on 5  $\mu\text{m}$



Kuva 3. Kuhan lihaksessa mikrosporidiksenomien koot vaihtelivat 200-300  $\mu\text{m}$  välillä ja ne olivat usein pitkulaisia muodoltaan ja lihassyyn suuntaisia.



Kuva 4. Kuhan mikrosporidiksenoman sisällä on lukematon määrä pieniä itiöitä, joiden läpimitta on 5  $\mu\text{m}$ .

### *Mikrosporidien esiintyminen kuhassa ja ahvenessa*

Laikkumuodon mikrosporidi oli hyvin harvinainen. Sitä löydettiin tutkimusjärivistä ainoastaan Haukivedeltä ja Pieliseltä yksittäisistä kuhista vuonna 2010 (Taulukko 4). Myös kalastajien havainnot tukevat tätä havaintoa (n. 1-2 sadasta kuhasta loisittu). Ahvenessa laikkumuodon loista esiintyi vain yksittäistapauksessa Konnevedellä. Lisäksi kalastajat lähettivät tutkittavaksi muutaman laikkukuhan ja -ahvenen Haukivedeltä sekä Pieliseltä. Kaloja tutkiessa huomasimme, että laikut olivat heikoimmin havaittavissa mitä kauemmin kala oli ollut kuolleenä ennen tutkimusta jolloin muuten läpikuultava lihas oli alkanut muuttua vaaleammaksi ja vastasi väritykseltään enemmän laikkujen väriä.

Ksenomamuodon mikrosporidi esiintyi kuhalla yllättävän yleisenä, sitä tavattiin neljässä viidestä tutkimusjärvestä. Korkeimmat loisinnan prevalenssit olivat Koirusvedellä, Pielisellä ja Päijänteellä, missä lähes joka neljäs kuha oli loisittu. Haukivedellä infektioprevalenssi oli 5.1 %. Höytiäisen kuhista ei löytynyt kumpaakaan mikrosporidi -muotoa (tutkittiin joulukuussa 2010) (Taulukko 4). Tietoomme on tullut, että kesällä 2013 laikkumuodon mikrosporidia oli havaittu Höytiäiselläkin.

Tutkitun luonnonravintolammikon 0+ ikäisissä kuhan poikasissa (keskikoko 6.7g) ei tavattu kumpaakaan loismuotoa. Istukkaat tutkittiin tuoreeltaan syyskuun 2010 lopussa.

Taulukko 4. Viiden järven tutkimuskuhien lukumäärä, kalojen pituuden vaihteluväli ja keskiarvo sekä prevalenssit laikku- ja ksenomamuodon mikrosporidiloisen esiintymisestä.

Järvi	n	Pituus	Keskipituus	Laikku-%	Ksenoma-%
Haukivesi	158	15.5-56.0	40.7	0.6	5.1
Pohjois-Päijänne	190	20.0-57.0	40.2	0	25.2
Koirusvesi	30	34.6-46.4	40.4	0	23.3
Pielinen	70	26.7-53.7	39.4	2.8	21.1
Höytiäinen	46	31.5-53.2	46.5	0	0

Ksenomamuodon mikrosporidia ei pysty havaitsemaan ilman mikroskooppia. Jos kalassa oli satojatuhansia ksenomia, lihaksen rakenteesta saattoi huomata että siinä on jotain normaalista poikkeavaa. Löydettyjen mikrosporidiksenomien lukumäärien keskiarvot olivat korkeimmat Haukivedellä, Koirusvedellä ja Pielisellä (Taulukko 5). Korkeimmat ksenomamäärät tavattiin keskikokoisilla kaloilla, mutta alamittaisten (< 37.0 cm) ja yli 37 cm kalojen prevalensseissa eikä intensiteeteissä ollut tilastollisesti merkitseviä eroja. Järvikohtaisesti vuodenaikojen suhteen ja naaraiden sekä koiraiden välillä loisten esiintymisprevalensseissa ei havaittu mitään säännönmukaisuutta eikä eroavaisuuksia, mutta vuosien välillä (Taulukko 6) oli tilastollisesti merkitseviä eroja. Alamittaisissa kuhissa esiintyi ksenomia vain kesä-marraskuussa. Ksenomamuotoa ei löytynyt ollenkaan tutkituista ahvenista.

Haukivedellä oli 8 infektoitunutta kalaa. Pituudeltaan ne olivat 41.2-52.6 cm (ka 46.9 cm). Infektoituneet yksilöt saatiin helmi-kesäkuussa. Pohjois-Päijänteellä oli 48 infektoitunutta kalaa. Pituus vaihteli 29.0-53.4 cm ja keskipituus oli 40.9 cm.. Eniten infektoituneita kaloja saatiin kesä-elokuussa (60.4 % infektoituneista kaloista). Kolmasosa infektoituneesta kaloista oli alamittaisia (ka. 35.3 cm ). Yhtä alamittaista kalaa lukuun ottamatta (pyydetty lokakuussa -14, pituus 35.5 cm) kaikki alamittaiset infektoituneet kuhat löytyivät Pohjois-Päijänteestä kesäkuukausien aikana.

Koirusveden näytekalat pyydettiin syyskuussa 2011. Seitsemän kalaa oli infektoitunut. Pituudeltaan infektoituneet kalat olivat 38.6-45.1 cm (ka. 41.5 cm). Pieliseltä pyydettiin kaloja kahtena ajankohtana. Yhteensä löytyi 17 infektoitunutta kalaa, joista 11 kalastettiin syyskuussa -10 ja loput 6 marraskuussa -11. Infektoituneiden kalojen pituus vaihteli 33.5-48.0 keskipituuden ollessa 40.7 cm. Neljä infektoituneista kaloista oli alamittaisia.

Taulukko 5. Tutkimusjärvien ksenomamuodon mikrosporidin intensiteetit ja niiden keskiluvut. Intensiteettiä tarkasteltiin jakamalla kalat kahteen ryhmään: joissa on vähäisesti ksenomia (1-24) ja joissa on runsaasti ksenomia (>24). Loinen on aggregoitunut ja pahasti loisitut olivat vähemmistössä.

Järvi	Ksenomien lkm	Infektoidut(%)	Min-Max	Mean	Mediaani
Haukivesi	kaikki	8	1-300	85.0	8.0
	1-24	5 (62.5)	1-8	4.0	2.0
	>24	3 (37.5)	60-300	220.0	300.0
P.-Päijänne	kaikki	48	1-300	14.4	2.0
	1-24	45 (93.75)	1-24	5.1	2.0
	>24	3 (6.25)	60-300	153.3	100.0
Koirusvesi	kaikki	7	2-540	102.6	4.0
	1-24	5 (71.4)	2-16	5.6	3.0
	>24	2 (28.6)	150-540	345.0	345.0
Pielinen	kaikki	17	1-2000	167.7	9.0
	1-24	14 (82.35)	1-20	7.2	4.5
	>24	3 (17.65)	250-2000	916.7	500.0

Taulukko 6. Kuhanäytteiden vuosien väliset mikrosporidin infektioprevalenssit eri järvissä. Mikrosporidien prevalenssit vaihtelivat eri järvissä ja eri vuosina. \*Höytiäisen kuhissa laikkumuodon mikrosporidiasta havaintoja kesällä 2013.

Järvi	Vuosi	n	Laikku-%	Ksenoma-%
Haukivesi	2010	51	2.4	3.9
	2011	60	0	0
	2012	32	0	12.5
	2013	15	0	13.3
P.-Päijänne	2010	83	0	8.4
	2011	49	0	40.8
	2013	11	0	63.6
	2014	47	0	29.8
Pielinen	2010	31	6.5	32.3
	2011	39	0	15.4
Höytiäinen	2010	46	0*	0
Koirusvesi	2011	30	0	23.3

### *Geneettiset tulokset*

Kuhasta ja ahvenesta eristetyt itiötiheyntymänäytteiden (laikku) sekvenssit olivat identtiset. Myöskään morfologisesti tarkasteltuna kuhasta ja ahvenesta eristetyt laikku muodon itiöt eivät poikenneet toisistaan. Tulosten perusteella kuhassa ja ahvenessa esiintyvä laikku muodon mikrosporidi edustaa samaa mikrosporidilajia. Kujan itiötiheyntymästä (laikku) ja ksenomasta eristetyt näytteet taas poikkesivat toisistaan geneettisen sekvenssin suhteen, mikä viittaa siihen, että loisen kaksi eri esiintymismuotoa kuhassa ovat eri mikrosporidilajia.

Tietokantoihin tehdyt kirjallisuushaut eivät viitanneet siihen, että kyseisiä loisia olisi aikaisemmin tutkittu. Vertailu geenipankista löytyneisiin geenisekvensseihin paljasti, että vastaavia sekvenssejä ei löytynyt geenipankista kummankaan muodon osalta. Lajimäärityksen tarkemmat tulokset saadaan vuoden 2015 aikana.

### **3.2. Siian rakkoloisio**

#### *Esiintyminen laitoskaloissa*

Siian rakkoloisio oli yleinen loinen tutkittavalla kalanviljelylaitoksella. 1-vuotiaissa kaloissa loista ei vielä näkynyt. Ensimmäiset havainnot tulivat nähtäviin 2+ -ikäisistä kaloista kalan kolmantena kesänä heinäkuun lopussa. Sen jälkeen jokaisessa näyte-erässä osa kaloista oli loisittu (26.0-54.0 %). Intensiteetti vaihteli 1-56 kystiin/loisittu kala (Taulukko 7).

Taulukko 7. Tutkittujen laitosiikojen ikä, lukumäärä (n), keskipituus, keskipaino, rakkoloisio-prevalenssi ja -intensiteetti eri vuosiluokissa (VL). \* Huhtikuu-12 näyte-erän tutki eri tutkija ja hän laski mukaan tyhjätkin kystit, joten prevalenssi ei ole täysin vertailukelpoinen tässä näytteessä.

VL	Näytteenotto	Ikä	n	Pituus	Paino	Prev. (%)	Intensiteetti
2009	heinäkuu -11	2	32	32.1	440.1	3.1	1
	lokakuu -11	2	55	328	405.4	30.9	5.5 (1-13)
	helmikuu -12	3	50	36.6	580.3	46.0	5.4 (1-30)
	huhtikuu -12	3	50	36.1	531.4	54.0*	9.3 (1-33)*
	elokuu -12	3	50	38.6	656.8	26.0	3.9(1-18)
2010	lokakuu -11	1	50	29.6	294.2	0	0
	elokuu -12	2	55	31.0	334.5	43.6	4.0 (1-24)
	tammikuu -13	3	106	35.6	499.9	36.8	7.3 (1-56)
2011	helmikuu -12	1	50	28.6	258.9	0	0
	huhtikuu -12	1	51	29.5	275.3	0	0

Kaloissa oli havaittavissa kahden kehitysvaiheen kystejä (Kuva 5): Limamaisia kystejä, joilla ei ollut selkeää kuorta. Käytämme tästä nimeä LK-kysti. Toinen tyyppi oli selkeäkuorinen kysti. Käytämme siitä nimeä K-kysti. Neulalla painaessa K-kysti meni rikki ja sisältö valui ulos (Kuva 6), kun taas LK-kystiä pystyi pyörittelemään neulan alla sitä hajottamatta. Iän myötä osalla kaloista K-kystien sisältö saattoi muuttua tiiviimmäksi, jolloin

neulalla painamalla sisältö ei tullut ulos, mutta kyseessä oli kuitenkin selkeä kysti. Lisäksi osassa kaloissa esiintyi pieniä tyhjiä kystejä, jotka eivät sisältäneet loista lainkaan.

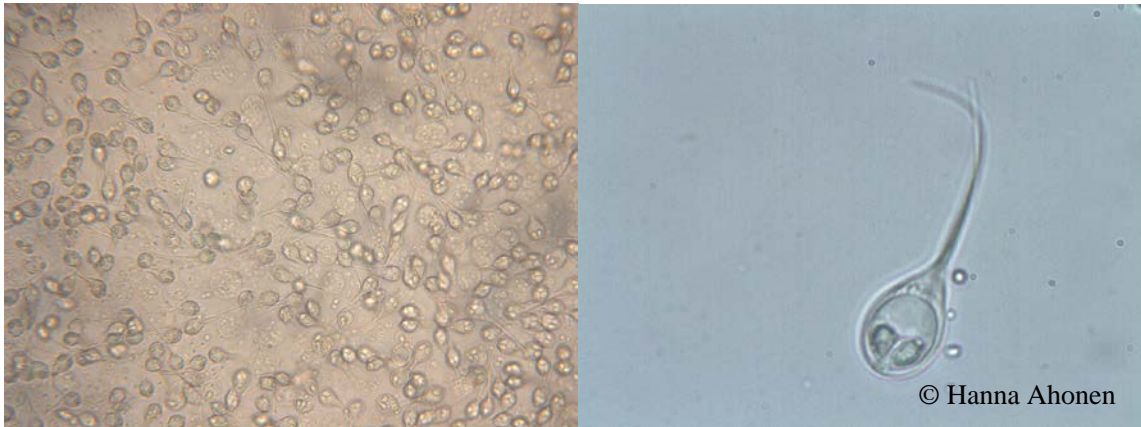
K-kystien koot vaihtelivat 0.4 -8 mm, keskitöön ollessa 1.55 mm. LK-kystien koko vaihteli 0.6-8.7 mm keskitöön ollessa 1.67 mm (Taulukko 8). Osa kysteistä oli melanisoitunut. Melanisaatiota tavattiin kaiken kaikkiaan 13.9 %:lla infektoiduneita kaloja. Kaloissa ei näkynyt tulehduksia eikä muita loisia silmämääräisessä tarkastuksessa.

Taulukko 8. K-kystien (selkeäkuorinen kysti) ja LK-kystien (limamainen kysti) keskimääräiset koot millimetreinä kussakin näytteenottoerässä vuosiluokilla 2009 ja 2010 (n = mitattujen kystien lukumäärä) \* Huhtikuussa 2012 eri tutkija, mukana myös tyhjä, itiöttömät kystit.

Näytteenotto	n	K2009	n	LK2009	n	K2010	n	LK2010
Heinä-11	0	0	1	1.00				
Loka-11	16	0.51	32	1.23	0	0	0	0
Helmi-12	15	1.93	82	1.62	0	0	0	0
Huhti-12	251*	1.50	1	1.35	0	0	0	0
Elo-12	15	1.49	22	1.98	15	1.73	60	2.06
Tammi-13					29	2.00	124	1.65



Kuva 5. Siian rakkoloision K-kystillä (selkeäkuorinen kysti, vasen kuva) oli havaittavissa kuori, kun taas L-kysti (limakuorinen kysti, oikean puoleinen kuva) oli rakenteeltaan limamainen.



Kuva 6. Siian rakkoloision myksospooreja kystien sisältä. Myksospoorin koko on ilman häntää on 8-14 µm ja hännän pituus on 26-40 µm (Lom and Dyková 1992).

### *Esiintyminen luonnonkaloissa*

Kaikissa kolmessa tutkimusjärvessä esiintyi rakkoloisiota kummassakin sukupuolella eikä loisinnan prevalensseissa tai intensiteeteissäkään ollut eroa (Taulukko 9). Prosentuaalisesti koiraisissa esiintyminen oli yleisempää kuin naarailla (koiraat / naaraat; Haukivedellä 37.5 / 33.8%, Koitereella 6.1 / 0.0 % ja Päijänteellä 48.5 / 36.7 %), mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä minkään järven kohdalla ( $\chi^2$ -test,  $P > 0.229$ ). Pituudella oli positiivinen riippuvuus loisinnan intensiteettiin eli suurimmat kystimäärät löytyivät isoimmista kaloista (Kuva 7). Yhdistetyssä Haukiveden ja Päijänteen siika-aineistossa rakkoloision kystien lukumäärä loisituilla kaloilla korreloi positiivisesti kalan pituuden kanssa (Spearmanin järjestyskorrelaatiokerroin = 0.310,  $P = 0.010$ ,  $n = 69$ ). Pohjois-Päijänteellä prevalenssi oli korkein, 43.0 %, Haukivedellä vähän alhaisempi 29.6 % ja Koitereella alhaisin, 3.1 % (Taulukko 9). Järvet erosivat toisistaan tilastollisesti merkitsevästi rakkoloision esiintymisenprevalenssin suhteen ( $\chi^2$ -test; Päijänne / Haukivesi  $P = 0.034$ , Päijänne / Koitere  $P < 0.001$ , Haukivesi / Koitere  $P < 0.001$ ). Loisinnan intensiteeteissä ei sen sijaan ollut tilastollisesti merkitsevää eroa järvien välillä (1-ANOVA).

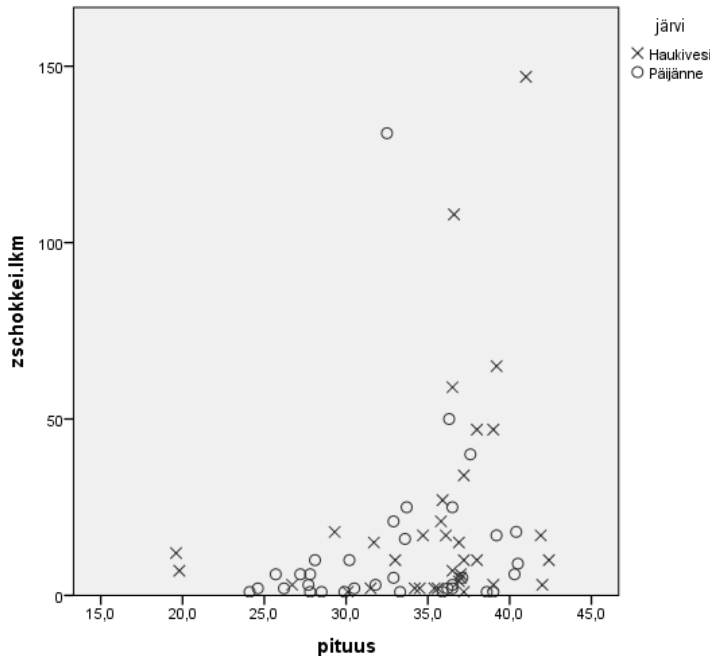
Suurimmassa osassa loisituista kaloista oli vähäisesti rakkoloision kysteitä, 1-20 kpl. Haukivedellä 75.6 % rakkoloisituista kaloista oli vain 1-20 kystiä (ka. 7.4). Lopuissa, pahemmin loisituissa sioissa oli 21-147 kystiä (ka. 57.2 kystiä). Lisäksi lihaksessa oli haukimatoa hyvin yleisesti (71.7 % tutkituista kaloista) ja lokkilapamatoa ruumiinontelossa sisäelimiä ja suoliston ympärillä 62.3 %:lla tutkituista kaloista (Taulukko 10).

Pohjois-Päijänteen sioilla esiintyi haukimatoa 12.8 % ja lokkilapamatoa 69.8 %:lla tutkituista kaloista (Taulukko 10). Lisäksi Pohjois-Päijänteeltä löytyi yhteensä neljästä siiasta mikrosporidiksenomia lihaksesta. Rakenteeltaan ja ulkonäöltään ksenomat muistuttivat kuhan lihaksessa esiintyvää ksenomamuodon mikrosporidiloista. Koitereen 64 tutkitusta kalasta vain kahdella esiintyi rakkoloista (intensiteetti 3), mutta haukimatoa taas suurimmalla osalla (78.1 %) ja lokkilapamatoakin reilulla puolella (56.3 %) (Taulukko 10).

Haukimadolla ja rakkoloisinfektiolla ei ollut keskinäistä riippuvuutta missään tutkimusjärvessä. Sen sijaan Haukivedellä rakkoloision esiintyminen oli yleisempää lokkilapamadon infektoimilla sioilla (36.4 %) kuin ei-lokkilapamatoa sisältävillä sioilla (18.3 %) ( $\chi^2$ -test,  $P = 0.016$ ).



Siivilähampaita laskettiin Haukiveden 70 kalasta; keskiarvo oli 46.4 kpl ja vaihteluväli 28-60. Pohjois-Päijänteeseen siioilla keskiarvo oli 47.3 (n=28) ja vaihteluväli 32-64. Koitereen siioilta ei laskettu siivilähampaiden lukumääriä (Taulukko 9). Siivilähampaiden lukumäärällä ja *H. zschokkei* -kystien lukumäärän välillä ei ollut korrelaatiota.



Kuva 7. Siian rakkoloision (*Hennegya zschokkei*) kystien lukumäärän riippuvuus kalan pituudesta Haukiveden ja Päijänteeseen siika-aineistossa.

Taulukko 9. Tutkimusjärvilta pyydettyjen siikojen lukumäärä, siivilähampaiden lukumäärän vaihteluväli sekä keskiarvo, kalan pituuden vaihteluväli ja keskipituus sekä rakkoloisinfection prevalenssi.

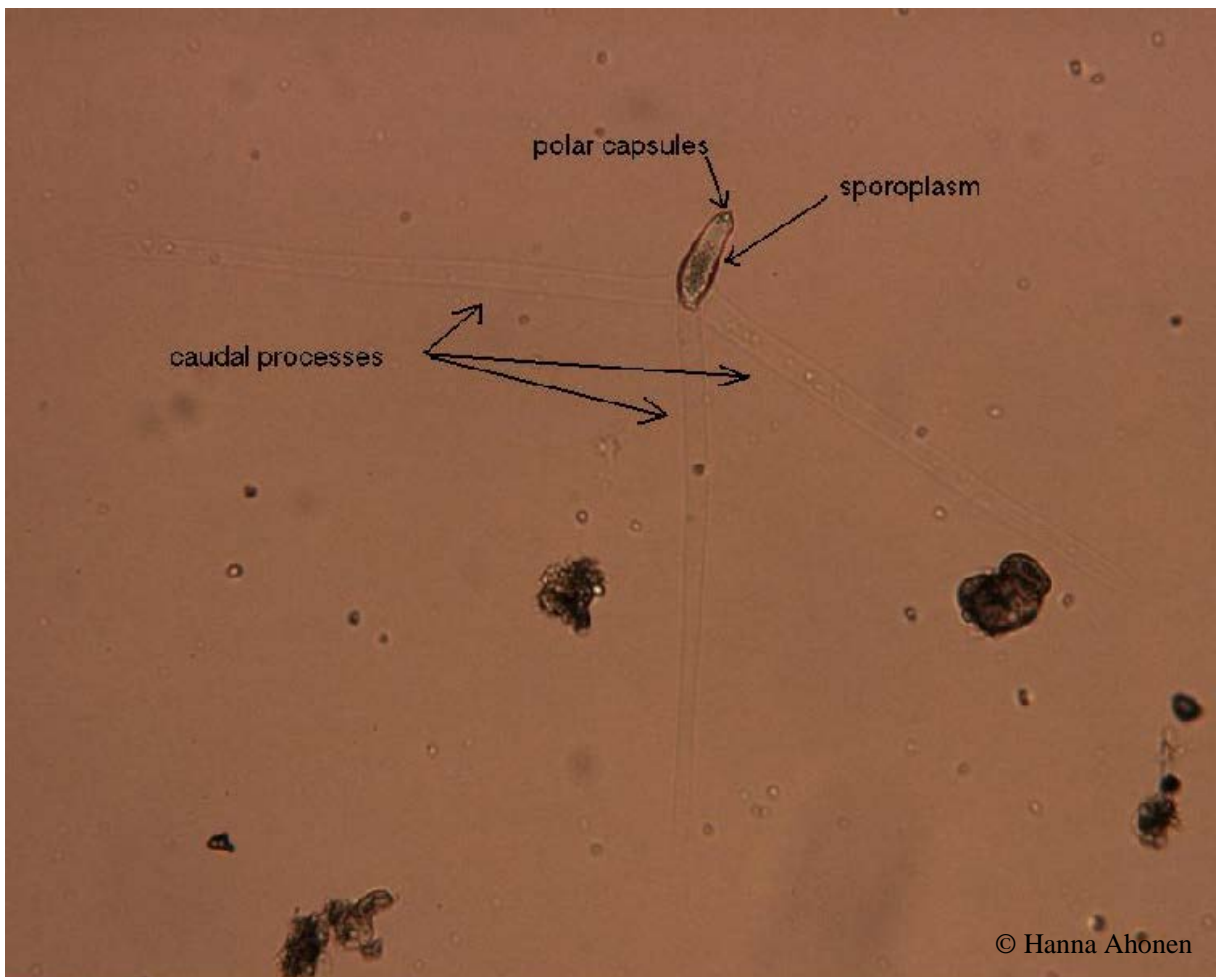
Järvi	n	Siiviläh.lkm	Siiviläh. ka	Pituus (cm)	Keskipituus	Prev. (%)
Haukivesi	159	28-60	46.4	15.0-42.4	29.7	29.6
P.-Päijänne	86	32-64	47.3	23.1-42.2	32.5	43.0
Koitere	64	-	-	22.8-43.0	31.0	3.1

Taulukko 10. Tutkimuskalojen haukimato- ja lokkilapamatoinfektioiden prevalenssit (%) eri järvissä.

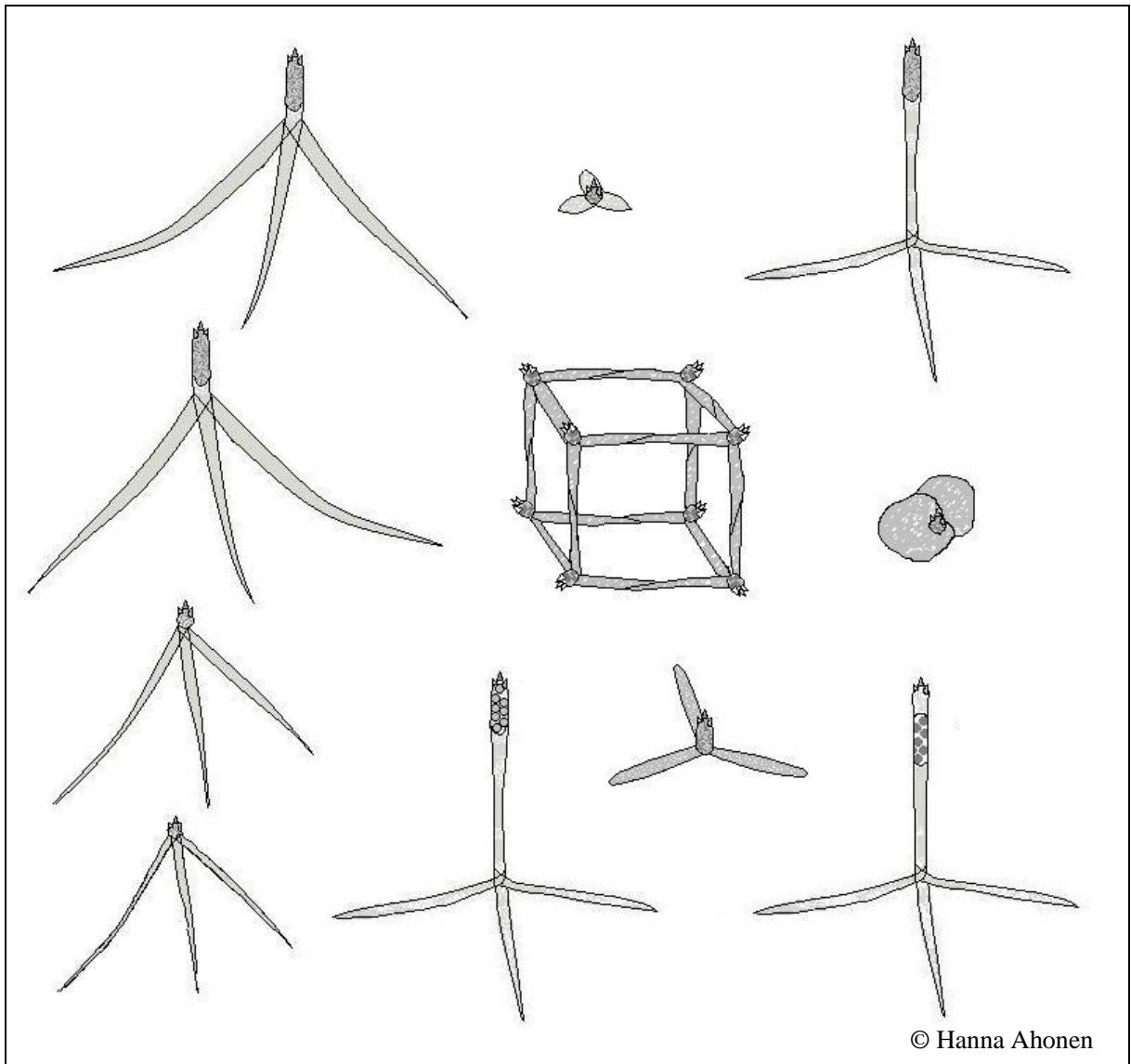
Järvi	Haukimato	Lokkilapamato
Haukivesi	71.7	62.3
P.-Päijänne	12.8	69.8
Koitere	78.1	56.3

### Elämänkiertokokeet

Rakkoloision elämänkiertokokeita tehtiin koko hankkeen ajan. tästä huolimatta elämänkiertokokeissa ei löytynyt siian rakkoloision pääisäntänä toimivaa harvasukamatolajia. Ensimmäisessä kokeessamme vuonna 2008 tullut aktinospooriin (Kuva 8) sekvenssit vastasivat 100 % siian rakkoloision myksospooriin sekvenssejä, mutta saimme sekvensoitua vain 332 emäspäriä (bp). Se ei vielä riitä todistamaan, että kyseessä tosiaan oli rakkoloision aktinospoori. Emme onnistuneet toistamaan koetta. Kokeissa, joissa käytimme luonnosta kerättyjä harvasukamatolajeja, saimme yhteensä 11 erilaista (Kuva 9) aktinospooria, joista mikään ei osoittautunut *H. zschokkei*-lajin aktinospooriksi. *Lumbriculus variegatus*-lajin infektiokoetta on seurattu nyt 9 kk kahdessa lämpötilassa eikä aktinospooreja ole näkynyt. Itävallassa tehdyt elämänkiertokokeet jatkuvat vielä.



Kuva 8. Ensimmäisestä infektiokokeesta löytyneellä aktinospoorilla oli kolme pitkää läpikuultavaa uloketta (caudal processes), kolme polaarikapselia sekä useita soluja sporoplasmassa. Läpimitta ulokkeiden kanssa oli 500 µm eli aktinospooriksi isohko. Aktinospoori oli echinactinomyxon-tyyppiä.



Kuva 9. Elämänkiertokokeiden aikana harvasukamadoista parveili 11 erilaista aktinospoorityyppiä.

#### *Geneettiset tulokset*

Siian rakkoloision myksospooreista saadut sekvenssit eivät vastanneet 100 % geenipankissa olevaa *H. zschokkei*-loisen sekvenssejä. Geenipankin sekvenssit ovat peräisin Pohjois-Amerikkalaisessa vuoripyörösiassa esiintyvistä rakkoloisiosta (Kent ym., 2001). Jotta lajit pystyttäisiin varmentamaan joko samaksi tai eri lajeiksi, olisi tehtävä tarkempia sekvensointia loisten osalta. Sen sijaan saimme selville, että muikussa ja siassa esiintyvä rakkoloisio on samaa lajia. Lisäksi Oulujoen suulta pyydetyn Perämeren siian ja sisämaan siikojen rakkoloision sekvenssit vastasivat toisiaan.

#### *H. zschokkei –aktinospoorin hävittäminen*

Projektissa oli tavoitteena selvittää, voidaanko *H. zschokkei*-loisen aktinospooreja tuhota esimerkiksi ultraäänellä tai torjua suodatuksen avulla. Ultraäänihajotusta ei voitu tutkia, koska kokeellisissa infektoinneissa harvasukamadoilla ei onnistuttu tuottamaan *H. zschokkei*

–aktinospooreja. Jos aikaisemmassa, vuonna 2008 tehdyssä infektiokokeessa löydetty aktinospoori (Kuva 8) on lajia *H. zschokkei*, viittaa tulos siihen, että siian rakkoloision aktinospoori on niin iso (ulokkeineen 500 µm), että sitä pystyttäisiin joissakin olosuhteissa torjumaan suodatuksen avulla.

#### *Siian valintajalostusohjelma*

Siian rakkoloisiota ei löytynyt loppuperkauksessa, joten mahdollisen periytyvän *H. zschokkei* -resistenssin olemassaolosta ei saatu tietoa.

## **4. Tulosten tarkastelu**

### **4.1. Kuhan mikrosporidit**

#### *Kuhan mikrosporidien esiintyminen*

Kuhissa esiintyi kahta eri mikrosporidiloista; paljain silmin nähtävä tihentymä (harvinaisempi laikkumuoto) ja mikroskooppisesti havaittava ksenomamuoto. Ksenomamuodon loista esiintyi yllättävän yleisesti suurissa tutkimusjärvissä; kolmessa järvessä enemmän kuin joka viides kuha oli infektoitunut. Pohjois-Päijänteellä tilanne oli pahin, kun joka neljänestä kuhasta löytyi ksenomia. Tutkimuksen aikana infektioprevalenssi vaihteli vuosien välillä, mutta selvää muutostrendiä vähenevään tai lisääntyvään suuntaan ei näytä tämän tutkimuksen perusteella olevan. Tutkimuksessa löytyi harvinaisempaa laikkumuotoa vain muutamalla ahvenella ja kuhalla Konnevedeltä, Haukivedellä ja Pieliseltä.

Tutkimuksen aikana yksittäisiltä kalastajilta eri puolilta Suomea on tullut harvakseltaan havaintoja laikkumuodon mikrosporidista kuhassa. Höytiäiseltä ei loista löytynyt tutkimuskaloista, mutta kalastajilta tuli myöhemmin ilmoituksia, että loista on alkanut näkyä sielläkin. Laikkumuoto ei kalastajien eikä tämän tutkimuksen mukaan ole yleistynyt viime vuosien aikana merkittävästi. Kalastajien arviot loisen esiintymisestä on pysynyt samana (~1-2 loisittu kalaa sadassa pyydettyssä kuhassa). Kalastajilla on havaintoja laikkumuodon mikrosporidista kuhassa Haukivedeltä, Pieliseltä, Höytiäiseltä, Nilakasta, Pielavedeltä ja Pyhävedeltä. Infektiota esiintyy siis laajalla alueella. Laikkumuodon havaitsemisessa on ongelmana se, että kalan kuollessa lihas vaalenee ja alkaa väritykseltään muistuttaa laikun väriä. Näin ollen on mahdollista, että tutkimuksessa sekä kalastajilla on jäänyt osa lievästi loisituista kuhista havaitsematta. Osa kalastajista havainnoi loisitun kalan lihaksen ”puuroutuvan” eli rakenne ei ollut kiinteä. Ksenomamuodon loisesta ei ole kalastajilta tullut havaintoja, mikä on sopusoinnussa tämän tutkimuksen tulosten kanssa; ksenomamuoto on havaittavissa vain mikroskooppisesti.

Ulkonäöllisesti kuhan ja ahvenen laikkumuotoinen mikrosporidia muistuttaa kelta-ahvenessa esiintyvää *Heterosporis* sp.- mikrosporidiloista. Kyseisen loisen infektiossa kalan lihas ei ole laikukas vaan suurempi yhtenäinen ala on vaalentunut ja itiöt ovat kalvon ympäröimänä muutaman itiön ryppäissä (Sutherland ym., 2004). Haukiveden kuhasta löytyi yksittäisessä tapauksessa myös mateen mikrosporidi, *P. ladogensis*, jota Haukiveden mateissa esiintyy runsaasti.

Hanke tuotti paljon uutta tietoa kuhan ja ahvenen lihaksissa esiintyvistä, uusista mikrosporidi-loisista. Hankkeen tulokset muodostavat hyvän vertailupohjan loisen esiintymisen ja yleistymisen/vähenemisen seurannalle tulevaisuudessa, varsinkin kalataloudellisesti tärkeiden kuhapopulaatioiden kohdalla (esimerkiksi Pielinen ja Koirusvesi).

### *Kuhan mikrosporidien lajinkuvaus*

Lajien kuvaamiseksi tehdään yhteistyötä Kanadalaisen ekspertin, Prof. Simon Jonesin kanssa. Lajinkuvaus on tärkeää, jotta tietäisimme, esiintyykö loista myös muualla, vai onko kyseessä vain Suomessa esiintyvät lajit. Geneettiset tulokset osoittivat tähän mennessä sen, että ahvenessa ja kuhassa esiintyvä laikkumuodon mikrosporidi on samaa lajia, mutta kuhassa esiintyvä ksenomamuoto on näistä poikkeava, oma lajinsa. Kyseessä on mitä todennäköisimmin kaksi tieteelle uutta, aikaisemmin kuvaamatonta loislajia. Tarkemmat tulokset valmistuvat vuoden 2015 aikana. Tutkimuksemme perusteella ei voi sanoa, että mikrosporidiloiset olisivat vaikuttaneet kalan kuntoon, sukukypsyyteen tai elinkykyyn negatiivisesti. Lajinmäärittäminen ja näiden kahden kuhassa esiintyvän loismuodon kuvaus on kuitenkin oleellista kalatalouden ja jatkotutkimuksien kannalta. Jotta loista voitaisiin ehkäistä, esimerkiksi kuhanviljelyssä, on sen ekologian tunteminen tärkeää.

Hankkeen seurauksena alkanut tieteellinen, kansainvälinen (Suomi/Kanada ja Suomi/Itävalta) sekä kansallinen (Jyväskylän yliopisto/Itä-Suomen yliopisto) yhteistyö muodostaa niin ikään erinomaisen pohjan kyseisen loisongelman jatkotutkimuksille.

### **4.2. Siian rakkoloisio**

#### *Siian rakkoloisio kalanviljelylaitoksella ja luonnossa*

Tutkimallamme kalanviljelylaitoksella rakkoloisio esiintyminen oli yleistä. Loista alkoi näkyä kolmannen kesän heinäkuussa (pyydetty heinäkuun lopussa) kalan iän ollessa 2+. Seuraavalla näytekerralla lokakuussa jo yli 30 % siioista oli loisittuja. Rakkoloisio esiintyminen siioissa oli lievästi aggregoitunut. Loisitusta kaloista suurimmalla osalla oli vain yksi tai muutama loiskysti ja iso osa loisista oli keskittynyt muutamaan vahvasti loisittuun yksilöön. Etenkin laitosolosuhteissa aggregoitumisen voisi luulla johtuvan enemmän yksilön alttiudesta kuin käyttäytymiseroista, koska kalat ovat samoissa olosuhteissa samalla ravinnolla.

Havaitsemamme ns. limakysti (LK-kysti) on luultavasti loisen ensimmäinen näkyvä muoto, joka kehittyy tiivimmäksi ja selväkuorisemmaksi K-kystiksi, joka oli suurimmaksi osaksi täynnä kehittyneitä myksospooreja, toisin kuin LK-kystit. Kummatkin kystimuodot olivat alussa hyvin pieniä. Meidän tutkimusmenetelmien avulla ne olivat kuitenkin jo varhain havaittavissa, vaikka silmämääräisessä tarkastelussa ei kystinalkuja huomannut. Kalan iän myötä saattoi kystin sisältö muuttua maitomaisesta enemmän tiiviimmäksi koon kuitenkin pysyessä pienehkönä. Myös kystien melanisaatiota esiintyi osalla kaloista, mikä on merkki immuunipuolustuksen toimimisesta (Valtonen ym., 2012).

Tutkimuksestamme ei pysty päättelemään, onko rakkoloisio tartunta tapahtunut poikasvaiheessa vai kasvatettaessa siikoja verkkoaltaissa. Aktinospoorit pystyvät kulkemaan vesitysjärjestelmien kautta myös sisäaltaisiin, koska aktinospoorit keijuvat vesivirtojen mukana vapaasti. Maa-altaat ja verkkokassilaitosten ympäristö taas voivat olla ns. myksospooripankkeja, koska ne ovat oivia elinympäristöjä loisen pääisännälle, harvasukamadoille. Myksospoorit ovat hyvin kestäviä. Ne säilyvät infektiokykyisinä vesistöjen sedimenteissä jopa useita vuosia. Kalanviljelylaitoksilta kerätyistä harvasukamatonäytteistä on tutkimuksissa löytynyt useampia erilaisia aktinospoorilajeja, jotka parveilevat eri aikoihin vuodesta. Loisen torjunnan kannalta on tärkeitä pitää kalat hyvässä kunnossa, välttää stressiä ja ylikuormitusta, pitää altaat siistinä sekä poistaa kuolleet kalat mahdollisimman pian, jotta loinen ei pääsisi jatkamaan elämänsäkiertoansa ainakaan laitoksen sisällä.

Luonnonkaloissa rakkoloision esiintyminen vaihteli eri järvissä. Loista on ollut kautta aikojen Suomessa siialla ja muikuilla. Tiedossamme on, että esimerkiksi Haukivedellä Itä-Savossa rakkoloisio-ongelma yhdessä haukimadon kanssa on jo koitunut niin pahaksi, ettei siian kalastus ole ammatillisessa mielessä enää kannattavaa. Vaikka loinen ei ole vaaraksi ihmiselle, se estää kalan myynnin.

Loista esiintyi kummallakin sukupuolella suurin piirtein samassa määrin eikä loisinnassa ollut eroa suhteessa siian siivilähampaiden lukumäärään. Mitä isompi siika oli kysymyksessä, sitä todennäköisemmin se oli loisittu. Suuremmat kalat ovat myös vanhempia, jolloin altistumisesta rakkoloisioille on tapahtunut kauemmin. Koska loinen leviää veden mukana, joko kiduksien, suun kautta tai ihon läpi, on mahdollista, iso koko sinällään altistaa kalan rakkoiloisioinfektioille. Ympäristötekijät voivat vaikuttaa kalan puolustuskykyyn ja kalan kuntoon, mutta tämän tutkimuksen perusteella ei tiedetä johtuuko rakkoloision korkea prevalenssi Pohjois-Päijänteessä ja Haukivedessä kalojen alentuneesta vastustuskyvystä. Päästyään kalaan loinen alkaa jakautua ja alkuperäisen isäntäsolun rikkoutuessa se pääsee leviämään viereisiin soluihin (Valtonen ym., 2012), jolloin immuunipuolustukseltaan heikommat kalat ovat mahdollisesti alakynnessä loispesäkkeiden kapseloinnissa. Muutamalla kalalla oli havaittavissa myös paikallista tulehdusta ts. kystin ympärillä oli verenpurkautumia. Tämä voi mahdollisesti myös liittyä immuunipuolustuksen aktivoitumiseen, jolloin alueen verenkierron kiihtyessä kalan puolustusolut lisääntyvät paikallisesti.

Pohjois-Päijänteeltä löytyi siiasta mikrosporidiksenomia lihaksesta. Kirjallisuuden mukaan siiassa ei ole aikaisemmin havaittu ksenomamuodon mikrosporidiaa eikä Suomessa ollenkaan mikrosporidiaa siiassa. Vuoripyörösiialla (*Prosopium williamsoni*) on tavattu aikaisemmin lihaksessa vapaana esiintyvää *Microsporidium* sp. lajia (Kent ym., 1999). Rakenteeltaan ja ulkonäöllisesti ksenomat muistuttivat kuhan lihaksessa esiintyvää ksenomamuodon mikrosporidi-loista.

#### *Siian rakkoloision elämänkiertokokeet*

Tutkimusryhmämme teki aikaisemmin yksittäisen havainnon potentiaalisesta *H. zschokkei* –aktinospoorista (vuodelta 2008—100% varmuutta ei saatu molekyylibiologisin menetelmin), jonka läpimitta haarakkeineen oli 500 µm. Jos tämä pitää paikkansa, on aktinospoori kooltaan sellainen, että sen torjuminen suodatuksen avulla voisi tulla jossakin tilanteissa kysymykseen. Lukuisista erilaisista infektiokokeiluista huolimatta siian rakkoloisiota ei onnistuttu tartuttamaan harvasukamatoihin siten, että madoista olisi erittynyt rakkoloision aktinospooreja. Mitään infektiio- ja elämänkiertokokeista tulleet aktinopsooreja ei pystytty todentamaan rakkoloision aktinospooreiksi. Tutkimuksessa käyttämämme harvasukamadot oli kerätty kalanviljelylaitokselta, Alvajärvestä ja muutamasta kalattomasta lammesta. Näistä kaikista parveili yhteensä 11 erilaista aktinospooria. Puhdasta *L. variegatus*-kantaa käyttäessämme infektiokokeessa emme saaneet yhtään aktinospooria, joten sen todennäköisesti sulkea pois isäntäehdokkaista. Myöskään *T. tubifex* –laji ei luultavasti ole siian rakkoloision isäntä, koska sitä kokeiltiin ilman onnistumista yhteistyökumppanimme toimesta 2008 Saksassa. Itävallassa yhteistyönä tehtävä elämänkiertokoe on vielä käynnissä. Tuloksia on odotettavissa tämän vuoden aikana.

#### *Geneettiset tulokset rakkoloisioista*

Tutkimuksessamme varmentui, että muikussa ja siiassa esiintyvä rakkoloisio on samaa lajia. Myös Perämeren ja sisävesien siikojen rakkoloisio ei eronnut toisistaan. Tosin ei ole

varmaa, missä nämä Perämeren siiat ovat saaneet infektion, sisämaassa vai meressä. Geenipankissa oleva *H. zschokkei*-loisen sekvenssit erosivat meidän tuloksista. Kyseiset sekvenssit oli saatu vuoripyörösiasta eristetyistä *H. zschokkei*-loisen itiöistä. Jotta pystyisimme erottelemaan lajit, tai toteamaan ne samoiksi pitäisi tehdä tarkempia analyyseja. Kirjallisuudessa on myös esitetty, että *H. zschokkei* ja *H. salminicola* olisivat synonyymejä (Kent ym 2001), joten *H. salminicola* olisi hyvä ottaa mukaan lajivertailuun.

## 5. Tulosten merkitys

Vaikka siian rakkoloision elämänkiertoa ei saatu selvitettyä, auttaa projektin tuloksena Microspora- ja *Henneguya*-loisista hankittu tieto osaltaan kyseisten loisten aiheuttamien elinkeinokalataloudellisten haittojen estämisessä. Rakkoloision elämänkierronkin osalta hankkeen tulokset osoittivat, että ainakaan *Lumbriculus variegatus*-laji ja Saksassa v.2008 kokeellisesti testattu *Tubifex tubifex*-laji eivät ole rakkoloision isäntäharvasukamotoja. Hankkeen aikana saatiin käsitys Microsporidi-loisinnan tilanteesta kuhakannoissa Suomessa ja saadut tulokset toimivat hyvänä vertailupohjana tilanteen seuraamiselle tulevaisuudessa. Sekä Microsporidi-loisten (Prof. Simon Jones, Fisheries and Oceans Canada, Nanaimo) että siian rakkoloision (prof. Mansour El-Matbouli, University of Veterinary Medicine, Vienna) tutkimuksen suhteen muodostetut kansainväliset yhteydet sekä kotimainen tutkimusyhteistyö (Itä-Suomen yliopisto, Evira) ja yhteistyö kalastajien ja kalanviljelijöiden kanssa muodostaa arvokkaan verkoston, jonka avulla voidaan tarttua myös tulevaisuudessa esiin tuleviin lois- ja tautiongelmiiin kalanviljelyssä ja kalataloudessa. Hankkeen tuloksista tiedotettiin kansallisissa ja kansainvälisissä kalanviljely- ja kalatautialan kokouksissa, esimerkiksi Eviran ja Suomen Kalankasvattajaliiton järjestämällä kalaterveyspäivillä. Hankkeen seurantaryhmän kautta tulokset ovat olleet myös Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen tietoon. Lisäksi hankkeen tuloksista tullaan tiedottamaan mm. Kalankasvattaja-lehdessä.

## 6. Esitelmät

### **Kotimaiset seminaarit**

- EVIRA:n Kalaterveyspäivät 26.3-27.3.2015 Tampere: Hanna Ahonen” Siian rakkoloisio (*Henneguya zschokkei*) viljelyssä siassa; esiintyminen kalan iän ja vuodenajan mukaan” (esitelmä)
- EAFP (European Association of Fish Pathologists) Suomen osaston ja Kalatautitutkijat ry:n vuosikokous 11.3. -12.3.2015 Kuopio: Hanna Ahonen ”Kuhan mikrosporidit” (esitelmä)
- Naisten tiedesäätiö - Mitä naiset tutkivat? 19.5.2014 Helsinki: Hanna Ahonen “Microsporidi- ja Myxosporea-loiset kalataloudellisesti merkittävässä kalalajeissa” (esitelmä)
- EAFP (European Association of Fish Pathologists) Suomen osaston vuosikokous 1.2.2.2012 Oulu: Jouni Taskinen ”Myxozoa- ja Microsporidia-loiset I: esiintyminen eräissä kalalajeissa sekä löydettyjä Myxozoa aktinospoorityyppejä” (esitelmä)
- EAFP (European Association of Fish Pathologists) Suomen osaston vuosikokous 1.2.2.2012 Oulu: Jouni Taskinen ”Myxozoa- ja Microsporidia-loiset II: identifiointi molekyylimenetelmillä” (esitelmä)

- Aquatic Sciences Spring Seminar 2010, Jyväskylän yliopisto. 7.5.2010 Konnevesi: Hanna Ahonen "Life-cycle of *Henneguya zschokkei* and development in oligochaete and fish host" (esitelmä)
- EVIRA:n Kalaterveyspäivät 25.3.2010 Jyväskylä: Hanna Ahonen "Siian rakkoloision elämänkierto ja kehittyminen kalassa" (esitelmä)
- European Association of Fish Pathologist Suomen osaston kokous 4.2.2010 Kuopio: Hanna Ahonen "Tuloksia siian rakkoloisio *Henneguya zschokkei* -tutkimuksista"(esitelmä)

#### **Kansainväliset kokoukset**

- 16<sup>th</sup> International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 2-5 September, 2013, Tampere: Hanna Ahonen "An Unknown Microsporidian parasite of pikeperch (*Sander lucioperca*) and Perch (*Perca fluviatilis*) in Finnish lakes" (poster)
- 15<sup>th</sup> International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 12-16 September, 2011, Split, Hanna Ahonen "Development rate, location of plasmodia, and genetic differences of the myxozoan parasite *Henneguya zschokkei* in fish" (poster)
- International meeting on Biology and Transmission of *Henneguya zschokkei* s.l. - a parasite of wild and cultivated whitefish in brackish - and freshwater regions, 4-5 March, 2010, Turku: Hanna Ahonen "*Henneguya zschokkei*; development in whitefish and oligochaete host" (esitelmä)



## 7. Kirjallisuus

- Hyvärinen P., Sutela T., & Korhonen P. 2000. Combining fishery prohibition with stocking of landlocked salmon, *Salmo salar* L.: an effort to gain bigger yield and individual size. *Fisheries Management and Ecology* 2000, 7, 503–514.
- Kent M. L., Andree K. B., Bartholomew J. L., El-Matbouli M., Desser S. S., Devlin R. H., Feist S. W., Hedrick R. P., Hoffmann R. W., Khattra J., Hallett S. L., Lester R. J. G., Longshaw M., Palenzeula O., Siddall M. E. & Xiao C. 2001. Recent advantages in our knowledge of the myxosporea. *J Eukaryot Microbiol.* 48: 395-413.
- Kent M. L., Docker M., Khattra J., Vossbrinck C. R., Spearet D. J. & Devlin R. H. 1999. A New *Microsporidium* sp. (Microsporidia) from the musculature of the Mountain Whitefish *Prosopium Williamsoni* from British Columbia: Morphology and phylogeny. *J. Parasitol.*, 85(6), 1999 p. 1114-1119.
- Kallert D. M., Eszterbauer E., El-Matbouli M. Erséus C. & Haas W. 2005. The life cycle of *Henneguya nuesslini* Schuberg & Schröder, 1905 (Myxozoa) involves a triactinomyxon-type actinospore *JfDis* 2005, 28: 71-79.
- Lin D., Hanson L. A., Pote L. M. 1999: Small subunit ribosomal RNA sequence of *Henneguya exilis* (Class Myxosporea) identifies the actinosporean stage from an oligochaete host. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46: 66–68.
- Lom J, & Dyková I. 2006: Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol* 2006,53(1):1–36.
- Lom J. & Dykova I. 2005. Microsporidian xenomas in fish seen in wider perspective. *Folia Parasitol* 52:69-81.
- Lom J. & Dyková I. 1992. Protozoan parasites of fishes. Elsevier Science Publishers.
- Levander K.M. 1914. Myxosporidie-sjukdom hos mujka och sik. *Soc. F. Fl. Fenn.*, h. 40 (1913-1914): p. 14-17.
- Pote L., M., Hanson L., A., Shivaji R. 2000: Small subunit ribosomal RNA sequences link the cause of proliferative gill disease in channel catfish to *Henneguya ictaluri* (Myxozoa: Myxosporea). *J. Aquat. Anim. Health* 12: 230–240.
- Raitaniemi J. & Manninen K. 2014. Kalakantojen tila vuonna 2013 sekä ennuste vuosille 2014 ja 2015: Silakka, kilohaili, turska, lohi, siika, kuha ja ahven. *Finnish Game and Fisheries Research Institute*. Helsinki 2014, ISBN 978-952-303-141-8 (Verkkojulkaisu).
- Rosser T., G., Griffin M., J., Quiniou S., M., A., Khoo L., H., Greenway T., E., Wise D., J. & Pote L., P. 2015. Small subunit ribosomal RNA sequence links the myxospore stage of *Henneguya mississippiensis* n. sp. from channel catfish *Ictalurus punctatus* to an actinospore released by the benthic oligochaete *Dero digitata*. *Parasitol Res* 2015. 114:1595–1602
- Savolainen R, 2014. Aquaculture 2013. *Finnish Game and Fisheries Research Institute. Tilastoja, nro 5*, 2014.
- Sutherland D., R.; Cooper S.; Stelzig P.; Marcquenski S.; Marcino J.; Lom J.; Dyková I.; Nilsen F.; Hsu H.-M.; Jahns W.; Hoyle J.; Penney R. 2004. *Heterosporis* sp. (Microspora): a new parasite from yellow perch (*Perca flavescens*) and walleye (*Stizostedion vitreum*) in Minnesota, Wisconsin and Lake Ontario, North America. In 13th International Conference on Aquatic Invasive Species, Ennis, County Clare, Ireland; 2004.
- Valtonen E., T., Hakalahti-Sirèn T., Karvonen A. & Pulkkinen K. Suomen kalojen loiset, 2012.