

Analiza epizootyczna wybranych wirusowych chorób ryb występujących w ośrodkach hodowlanych na terenie Pomorza Środkowego w latach 2010-2018

Wstęp

Pracownia Chorób Ryb Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Szczecinie - Oddział w Koszalinie jako jedna z czterech pracowni terenowych w kraju, prowadzi hodowlę wirusów chorobotwórczych dla ryb (VHSV, IHNV, IPNV), z użyciem hodowli komórkowych oraz dokonuje ich identyfikacji. W badaniach dominują pstrągi (tęczowy, źródlany, potokowy, palia, sparctic), trocie wędrowne i łososie. Sortyment jest bardzo zróżnicowany: od ikry (badany jest również płyn owarialny oraz mlecz) poprzez wylęg, narybek 0+, 1+, 2+ do selektów i tarlaków. Badania prowadzone są na zlecenie właścicieli ośrodków - w ramach nadzoru właścicielskiego oraz na zlecenie Inspekcji Weterynaryjnej – Powiatowego Lekarza Weterynarii – w ramach nadzoru urzędowego. Badania właścicielskie zlecane są w celach prewencyjnych lub interwencyjnych – przy wystąpieniu objawów chorobowych u ryb. Badania urzędowe zlecane są w ramach zwalczania chorób zakaźnych ryb – wirusowej posocznicy krwotocznej (VHS- *viral haemorrhagic septicaemia*) i zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego (IHN – *infectious hematopoietic necrosis*). Dość często hodowcy zlecają również badania w kierunku zakaźnej martwicy trzustki (IPN- *infectious pancreatic necrosis*). Istotną część próbek stanowią badania ryb przed zarybieniami wód otwartych i obrotem materiałem zarybieniomym.

Celem pracy jest prezentacja wyników badań wirusologicznych ryb łososiowatych z ośrodków hodowlanych na terenie Pomorza Środkowego - wykonanych w latach 2010-2018, w ZHW w Szczecinie - Oddział w Koszalinie oraz analiza epizootyczna uzyskanych wyników dotycząca ww. jednostek chorobowych ryb.

Materiał i metody

Materiałem do analizy są wyniki badań wirusologicznych przeprowadzonych w latach 2010-2018. W roku 2013 zbadano 103 próbki laboratoryjne (1 próbka laboratoryjna to próbka zbiorcza składająca się z 10 sztuk ryb), w następnych latach nastąpił wyraźny wzrost badanych prób (do 540 w roku 2015). Od kwietnia 2016 r. w przypadku badań w kierunku obecności wirusa VHS i IHN pracownia stosuje surowicę

wicie anty-IPNV, w celu wyeliminowania ewentualnego efektu cytopatycznego pochodzącego od wirusa IPN (zgodnie z Decyzją Wykonawczą Komisji (UE) 2015/1554 z dnia 11 września 2015 r. ustanawiającą przepisy dotyczące stosowania dyrektywy 2006/88/WE w odniesieniu do wymogów w zakresie metod nadzoru i metod diagnostycznych). W następnych latach liczba badań uległa zmniejszeniu do 425 w roku 2016 i 353 w roku 2017. Badane ryby pochodziły z 111 ośrodków hodowli ryb łososiowatych (pstrąg tęczy, źródlany, potokowy, palia, sparctic - mieszańce międzygatunkowe: *Salvelinus fontinalis* x *Salvelinus alpinus*, łosoś, troć wędrowna), z czego 61 z województwa zachodniopomorskiego i 50 z województwa pomorskiego. Ryby dostarczane były w partiach w minimalnej ilości 30 sztuk. Tarlaki łososia (*Salmo salar*) i troci wędrownej (*Salmo trutta m. trutta*) badano w okresie jesiennym w kierunku VHS i IHN. Ryby pochodziły z punktów odłowu tarlaków tych ryb zlokalizowanych w rzekach przybrzeżnych - Parsęta, Wieprza oraz Słupia. Materiał do badań stanowiły ikra i mlecz tarlaków, a w wypadku ryb martwych również narządy wewnętrzne – głównie nerka dogłowa oraz śledziona.

Metodyka badań wirusologicznych prowadzona była zgodnie z akredytowanymi procedurami badawczymi, obowiązującymi w Pracowni Chorób Ryb Oddziału ZHW w Koszalinie. Izolację wirusów prowadzono równolegle na 2 liniach komórkowych BF-2 i EPC, a identyfikację przeprowadzano metodą immunoenzymatyczną - ELISA.

Materiałem do badań wirusologicznych pobieranym podczas sekcji ryb były: przede wszystkim dogłowa część nerki oraz śledziona, dodatkowo mózg oraz serce. W przypadku wylęgu z woreczkiem żółtkowym pobierano całe ryby, po odcięciu woreczka żółtkowego, a wylęgu żerującego do długości całkowitej 4 cm – całe ryby bez części ogonowej. Materiał do badań wirusologicznych pobierano w ilości minimum 0,5 g do próbek z płynem transportowym - z dodatkiem 10% surowicy płodu cielęcego (FBS), o objętości 4 ml. Tak pobrany materiał poddawano następnie rozdrobnieniu w homogenizatorach szklanych. Homogenat umieszczano w chłodni na 24-72 h. Po

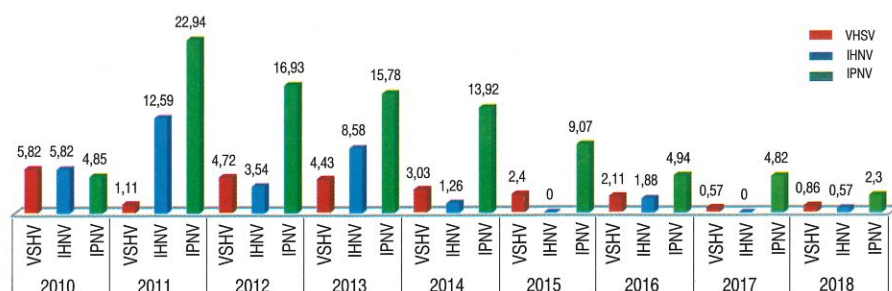
tym okresie przed wirowaniem rozcieńczano homogenizat płynem transportowym, aby otrzymać rozcieńczenie 1:10, a następnie materiał poddawano wirowaniu w wirówce z chłodzeniem (+ 4°C) przez 15 min, przy 3500 ob./min. Po odwirowaniu supernatant filtrowano przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 µm i umieszczano w kriotubkach w ilości 1 ml. Uzyskany materiał (od roku 2016 – po wstępnej inkubacji supernatantu z surowicą anti-IPNV) zakażano hodowle komórkowe (wcześniej przygotowane na 24 dołkowych płytkach do hodowli adherentnych). W ciągu 14-20 dni inkubacji, w komorach wilgotnych w temperaturze 15°C ± 1°C, płytki poddawano obserwacji pod mikroskopem NIKON Eclipse TS 100 F, w powiększeniu 40 x w celu stwierdzenia zmian. Wynik dodatni (obecność efektu cytopatycznego – CPE) był wskazaniem do identyfikacji wirusa metodą immunoenzymatyczną – ELISA.

Wyniki

W badaniach wirusologicznych dominujący jest wirus IPN, ale nie jest to wirus wywołujący chorobę zwalczaną z urzędu. Stwierdzano go w liczbie od 5 próbek dodatnich w 2010 r do 62 w roku 2011, co stanowi od 4,85% do 22,94 % wszystkich badanych w tym kierunku próbek. W następnych latach – 2012 do 2018, liczba wyników dodatnich wynosiła od 49 do 57, czyli od 9,07% do 16,93% wszystkich badanych w tym kierunku próbek. Od roku 2016 w badaniach wirusologicznych rozpoczęto stosowanie surowicy anti-IPNV w hodowlach komórkowych w celu wyeliminowania efektu cytopatycznego pochodzącego od wirusa IPN, stąd też znaczny spadek izolowanych przypadków wirusa IPN.

Wirus VHS diagnozowany był w liczbie od 2 próbek dodatnich w roku 2017 do 16 w roku 2013, co stanowi od 0,57% do 5,82 % wszystkich badanych w tym kierunku próbek. Wirus IHN nie był stwierdzany w latach 2015 i 2017, do 34 próbek dodatnich w roku 2011, co stanowi od 0 % do 8,58 % wszystkich badanych próbek w tym kierunku. (tab. 1, rys. 1).

W roku 2016 w dwóch próbach i 2017 również w dwóch próbach, przy współpracy z Zakładem Chorób Ryb PIWet



Rys. 1. Procentowy udział wyników dodatnich w badaniach w kierunku obecności: VHSV, IHN, IPNV w latach 2010-2018.

TABELA 1

Liczba badań w kierunku VHSV, IHN, IPNV i liczba wyników dodatnich w latach 2010-2018.

Lp.	Rok	Liczba badań	Izolowany i identyfikowany wirus	Wynik dodatni	Uwagi
1	2010	103	VHSV	6	
			IHN	6	
			IPNV	5	
2	2011	270	VHSV	3	
			IHN	34	
			IPNV	62	
3	2012	254	VHSV	12	
			IHN	9	
			IPNV	43	
4	2013	361	VHSV	16	
			IHN	31	
			IPNV	57	
5	2014	395	VHSV	12	
			IHN	5	
			IPNV	55	
6	2015	540	VHSV	13	
			IHN	0	
			IPNV	49	
7	2016	425	VHSV	9	W 2016 r. rozpoczęto stosowanie surowicy – IPNV w hodowlach komórkowych. SDV*
			IHN	8	
			IPNV	21	
8	2017	353	VHSV	2	SDV**
			IHN	0	
			IPNV	17	
9	2018	349	VHSV	3	2+ przypadki stwierdzone i niepotwierdzone w badaniach urzędowych
			IHN	2+	
			IPNV	8	

SDV* - SDV** (sleeping disease virus). Wyizolowane wirusy, niezidentyfikowane jako VHSV, IHN i IPNV przekazywano do Zakładu Chorób Ryb PIWet. – PIB Puławy do dalszej identyfikacji. W roku 2016 stwierdzono dwa przypadki SDV i w roku 2017 również dwa przypadki SDV.

–PIB w Puławach potwierdzono występowanie wirusa SD (sleeping disease virus).

Podsumowując okres badań, przeprowadzonych w latach 2010 – 2018, wyizolowano wirusa VHS: u pstrąga tęczowego w 76 próbkach, łosia w 1 próbce i u palii w 1 próbce. Wirusa IHN stwierdzono tylko u pstrąga tęczowego w 93 przypadkach. Natomiast wirusa IPN stwierdzono u pstrąga tęczowego w 308 próbkach, pstrąga źródlanego w 9 próbkach, palii w 4 próbkach, pstrąga potokowego i łosia po 1 próbce (tab. 2).

Dyskusja

Epizootia to zjawisko występowania dużej ilości zachorowań zwierząt na daną jednostkę chorobową na większym terytorium.

TABELA 2

Liczba wyników dodatnich VHSV, IHNV i IPNV u poszczególnych gatunków ryb w latach 2010-2018.

Rok/ wirus	VHSV	IHNV	IPNV
2010	pstrąg tęczy - 6	pstrąg tęczy - 6	pstrąg tęczy - 4 pstrąg źródlany - 1
2011	pstrąg tęczy - 3	pstrąg tęczy - 34	pstrąg tęczy - 56 pstrąg źródlany - 6
2012	pstrąg tęczy - 14	pstrąg tęczy - 9	pstrąg tęczy - 43
2013	pstrąg tęczy - 16	pstrąg tęczy - 31	pstrąg tęczy - 54 pstrąg źródlany - 2 palia - 1
2014	pstrąg tęczy - 12	pstrąg tęczy - 5	pstrąg tęczy - 51 pstrąg źródlany - 2 palia - 1 pstrąg potokowy - 1
2015	pstrąg tęczy - 11 łosoś - 1 palia - 1	0	pstrąg tęczy - 44 pstrąg źródlany - 1 łosoś - 1 pstrąg potokowy - 1 palia - 2
2016	pstrąg tęczy - 9	pstrąg tęczy - 8	pstrąg tęczy - 21
2017	pstrąg tęczy - 2	0	pstrąg tęczy - 17
2018	pstrąg tęczy - 3	pstrąg tęczy - 2*	pstrąg tęczy - 8

W przypadku opisywanych i analizowanych chorób wirusowych ryb mamy do czynienia z terenem Pomorza, zawartym między Odrą na zachodzie, Wisłą na wschodzie i Notecią na południu. Koniecznym warunkiem powstania i rozwoju choroby zakaźnej i zaraźliwej oraz rozwoju epizootii, jest istnienie i współdziałanie wielu czynników. Jako najważniejsze z nich należy uznać: źródło zarazki, drogi jego transmisji i wrażliwość organizmu. Brak jednego z tych czynników uniemożliwia powstanie choroby zakaźnej i zaraźliwej oraz epizootii. W przypadku analizowanych jednostek chorobowych mamy do czynienia z czynnikiem zakaźnym i zaraźliwym – wirusem, źródłem zarazki – homologicznym, pochodzącym od tego samego gatunku – czyli ryb, drogami transmisji zarazki – z osobnika na osobnika lub innymi drogami za pomocą innych wektorów, np. ptaki drapieżne, ssaki drapieżne, i co najważniejsze wrażliwością organizmu zwierzęcia – ryb na ten czynnik zakaźny.

Diagnostyka laboratoryjna patogenów zakaźnych występujących u ryb w ośrodkach hodowlanych na terenie Pomorza Środkowego ma szczególne znaczenie w procesie produkcji ryb konsumpcyjnych, produkcji materiału zarybieniowego oraz hodowlanego. Właściwa i trafna diagnoza, a następnie ukierunkowane działanie i eliminacja czynników zakaźnych wpływa na osiąganie lepszych efektów hodowlanych i gospodarczych poprzez ograniczenie i minimalizowanie strat.

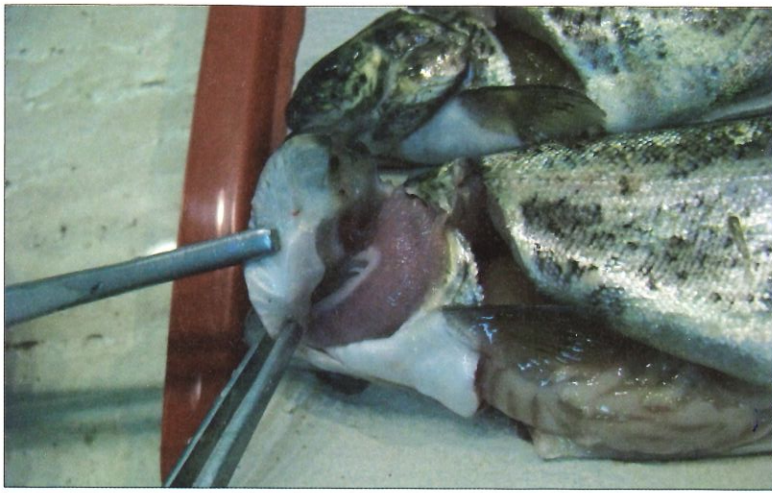
Wynika to z dużego zagęszczenia ośrodków hodowlanych na ciekach oraz z przyjętej technologii hodowli (głównie wykorzystujących ciągły – grawitacyjny przepływ wody rzecznej). W zlewni rzeki Grabowa – w cieku głównym i w dopływach – działa 20 ośrodków hodowli ryb łososiowatych (Lewandowska i wsp. 2017). Odległości pomiędzy ośrodkami są często bardzo niewielkie, a odległości pomiędzy punktami poboru wody i spustem wody poprodukcyjnej sprzyjają przemieszczaniu się patogenów z nurtem wody z ośrodka na ośrodek. Liczne zwierzęta wodne: bobry, nutrie, ptaki, a także ryby wędrownie występujące w rzekach przymorskich są wektorami patogenów w drugim kierunku – pod prąd wody. Niedopełnienie wymogów lekarsko-weterynaryjnych w zakresie badań materiału hodowlanego i wymogów w zakresie transportu ryb, także sprzyja rozprzestrzenianiu się chorób również wirusowych. Stąd w badaniach Pracowni Chorób Ryb Oddziału ZHW w Koszalinie badania wirusologiczne mają taki znaczny wymiar ilościowy.

Stwierdzona po raz pierwszy na Pomorzu Środkowym infekcja wirusem VHS u pstrąga tęczego przez lek. wet. Witolda Mazura pod koniec lat 70. XX wieku, była postawiona na podstawie zmian w zachowaniu – słaba ruchliwość ryb ustawionych po bokach stawu w okolicy odpływu oraz zmian anatomopatologicznych – pociemnienie ciała ryb, wytrzeszcz gałek ocznych, płyn w jamie ciała, wybroczy i wylewy krwawe na otrzewnej i w mięśniach grzbietowych. Aby zapobiec stratom związanym z zakażeniem wirusem VHS hodowcy stopniowo zmieniają gatunek hodowanych ryb na gatunki mniej wrażliwe na tego wirusa – pstrąga źródlanego, palie lub sparctica. Liczba stwierdzonych przypadków VHS w latach 2013-2016 jest liczna, od 16 w roku 2013 do 9 w roku 2016, a tendencja spadkowa jest dość znaczna.

IHN – *infectious hematopoietic necrosis*, zakaźna martwica układu krwiotwórczego, stwierdzona po raz pierwszy w badaniach laboratoryjnych prowadzonych



Fot. 1. Zmiany anatomopatologiczne w przebiegu IHNV u pstrąga tęczego. Powiększenie śledziony, anemizacja końcowego odcinka przewodu pokarmowego, wypełnionego treścią konsystencji żelowej, o barwie kremowej.



Fot. 2. Zmiany anatomopatologiczne w przebiegu IHN u pstrąga tęczowego. Anemizacja skrzel, wątroby i wyrostków pylorycznych przewodu pokarmowego.

w Pracowni Chorób Ryb O.ZHW w Koszalinie w roku 2010, po wprowadzeniu do izolacji wirusów hodowli komórkowych. Najwięcej przypadków IHN stwierdzono w roku 2011 – 34, najmniej w roku 2015 i 2017 – 0. Epizootia IHN ma tendencję spadkową, ale co drugi rok w badaniach liczba wyników dodatnich znacząco się zwiększa, np. rok 2010 – 6, rok 2011 – 34, rok 2012 – 9, a rok 2013 – 31. Od roku 2014 liczba wyników dodatnich jest wyraźnie zmniejszona.

W roku 2018 stwierdzono dwa przypadki IHN potwierdzone podczas badań wirusologicznych mimo tego, że ryby skierowane były tylko do badań bakteriologicznych (zlecenie usługowe od klienta). Obraz zmian anatomopatologicznych u badanych ryb oraz wywiad wskazywał na podejrzenie wystąpienia infekcji wirusowej (dostarczone ryby poddawane były długotrwałemu leczeniu chemioterapeutykami bez widocznych efektów). Badanie wirusologiczne dało efekt cytopatyczny, a identyfikacja metodą ELISA dała dwa wyniki dodatnie w kierunku IHN.

IPN- *infectious pancreatic necrosis*, zakaźna martwica trzustki, uzyskane wyniki badań potwierdzają obecność w wielu ośrodkach wirusa IPN, który dominuje w badaniach i dotyczy ryb małych – wylęgu i narybku o masie do 2 g. Wirus ma silne działanie immunosupresyjne, co powoduje ujawnianie się również chorób bakteryjnych u zakażonych ryb. Powoduje to znaczne straty hodowlane sięgające nawet do 90% obsad. Liczba stwierdzonych wyników dodatnich w kierunku IPNV w roku 2013 wynosiła 57, w roku 2014 – 55, w 2015 – 49, a w roku 2016 – 21.

W badaniach ryb dzikich – tarlaków troci wędrowniej i łososia w okresie jesiennych ciągów tarłowych i sztucznego tarła, czyli w październiku i listopadzie, nie stwierdzono występowania wirusa VHS i IHN. Nie badano ryb potarłowych tzw. „keltów”, które przeżyły naturalne tarło i zostały złowione przez wędkarzy w okresie zimowo - wiosennym.

W roku 2016 i 2017 wyizolowane wirusy, nieidentyfikowane jako VHSV, IHNV i IPNV, przekazywano do Zakładu Chorób Ryb PIWet – PIB w Puławach do dalszej identyfikacji. W roku 2016 i 2017 stwierdzono po dwa przypadki SDV.

Analiza przebiegu epizootii ww. chorób wirusowych ryb wskazuje na to, że: stadium epizootii jest w okresie wygaszania, potencjał epizootyczny ma tendencję spadkową, a wskaźnik epizootii jest malejący, ale z dużym dynamizmem, szczególnie w przypadku IHN. Ponadto VHS – to „stara epizootia”, ciągle utrzymująca się w hodowlach, ale wygasająca, obecnie na niskim poziomie. IHN – epizootia przebiegająca falistnie – sinusoidalnie, naprzemiennie w mniejszym lub większym nasileniu w kolejnych latach, ale z tendencją spadkową, wygasającą. IPN –

intensywna epizootia od roku 2011 i systematycznie spadkowa, ale jeszcze na wysokim poziomie, choć jej obraz może być zaburzony z powodu stosowania w badaniach surowicy anti- IPNV. Stwierdzono pierwsze potwierdzone wypadki występowania wirusa SDV (*sleeping disease virus*). Trudno jest określić, jak występowanie tego wirusa wpłynie na rozwój choroby i ewentualny rozwój epizootii w hodowlach.

Istnieje potencjalne niebezpieczeństwo wystąpienia ISA (*infectious salmon anemia*) - zakaźnej niedokrwistości łososi od ryb hodowanych w sadzach w norweskich fiordach, pochodzących z terenów, które nie są uznane za wolne od chorób zakaźnych ryb. Od pewnego okresu importowane z Norwegii do przetwórstwa łososie, nie posiadają takiego świadectwa. Odpady poprodukcyjne pochodzące od tych ryb są przekazywane do zakładów produkujących z nich mączkę rybną i olej rybny. Taka przetwórnia znajduje się w górnym biegu jednej z rzek przymorskich i może być potencjalnym źródłem chorób wirusowych ryb (w tym ISA) znajdujących się w obiektach hodowlanych zlokalizowanych w tej rzece i jej zlewni.

Wnioski

1. Wirusy VHS , IHN , IPN nadal są obecne w hodowlach pstrągów na Pomorzu i stanowią źródło rozprzestrzeniania się i występowania chorób zakaźnych ryb.
2. Działania hodowców zmierzają do zmiany gatunków hodowanych ryb w kierunku wyboru tych, które są mniej wrażliwe, szczególnie na wirus VHS - zamiana pstrąga tęczowego na palię, pstrąga źródlanego lub mieszańca międzygatunkowego – sparctica.
3. Intensywne wykorzystanie odpadów rybnych do przetwórstwa – produkcja oleju rybnego i mączki rybnego – może stanowić nowe źródło rozprzestrzeniania się chorób wirusowych, w tym nowej jednostki chorobowej – ISA.

4. Identyfikacja niektórych chorób wirusowych ryb w badaniach laboratoryjnych nie odpowiada stanowi faktycznemu występującemu w hodowlach ryb, szczególnie w odniesieniu do IPN.
5. Istnieje pilna konieczność wdrożenia szybkiej diagnostyki obecności kwasów nukleinowych wirusów chorób zakaźnych ryb poprzez zastosowanie techniki PCR – Real Time w badaniach laboratoryjnych.

Literatura

Antychowicz J. 1997 – Choroby ryb śródlądowych. PWRiL Warszawa .
 Lewandowska A., Mazur W., Nyk J. 2014- Choroby ryb wywołane czynnikami zakaźnymi, powodujące straty w ośrodkach hodowlanych i populacjach ryb łososiowatych żyjących w rzekach pomorskich – W :

Zrównoważone wykorzystanie rzek Doliny Radwi, Chocieli i Chotli, skrypt konferencyjny. Wyd . Starostwo Powiatowe Koszalin.
 Lewandowska A., Bogurska A., Choraży R., Nyk J., Mazur W. 201 – 7 Patogeny infekcyjne i inwazyjne diagnozowane u ryb pochodzących z ośrodków hodowlanych na terenie Pomorza Środkowego w latach 2013-2016 – Kom. Ryb. 4:19-27.
 Matras M. , Stachowiak M., Borzym E., Maj-Paluch J., Reichert M. 2015 – Sytuacja epizootyczna w zakresie wirusowych chorób ryb – W: A. Kowalska (Red.). Materiały szkoleniowe XL Konferencji Hodowców Ryb Łososiowatych, Gdynia , 8-9 października 2015 : 129-138.
 Matras M. , Stachowiak M., Borzym E., Maj-Paluch J., Reichert M. 2015 – Sytuacja epizootyczna w zakresie wirusowych chorób ryb – W: A. Kowalska , R. Kowalski(Red.) Materiały XLI Szkolenia - Konferencji Hodowców Ryb Łososiowatych, Gdynia, 13-14 października 2016: 68-75.
 Mazur W., Paszowska K. 1999 – Maszynopis: Sytuacja epizootyczna w zakresie wirusowych chorób ryb łososiowatych w rejonie zachodnio-pomorskim w okresie ostatniego dziesięciolecia oraz przypuszczalne przyczyny rozprzestrzeniania się tych chorób.
 Stryszak A. 1954 – Epizootologia ogólna – PWRiL Warszawa.