

# Izolacja wirusów posocznicy krwotocznej i zakaźnej martwicy trzustki ryb łososiowatych w Polsce

JERZY ANTYCHOWICZ, MARIA WEJMAN, EDWARD GRAWIŃSKI\*

Zakład Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy  
\*Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk

Antychowicz J., Wejman M., Grawiński E.

## The isolation of viral haemorrhagic septicaemia and infectious pancreatic necrosis viruses in trout in Poland

### Summary

For the first time in Poland viral examination of rainbow trout by applying cells lines (BF-2 and EPC) and ELISA tests approved in European Community Countries have shown the presence of VHS and IPN viruses existing in the country. VHS virus was isolated at 11 farms and IPN virus at 31 farms situated in northern Poland. VHS virus was isolated both in sick fish as well as in carriers and IPN virus in carriers only. The presence of VHS and IPN viruses did not appear in trout from farms in southern Poland. The experimental infection of rainbow trout demonstrated the high virulence of one of the VHS isolates. It was found that ELISA tests for VHS and IPN are very useful in detecting viruses in tissue supernatants of fish with clinical symptoms but are not as useful in detecting viruses present in cases of low titers. The results of this investigation showed that it is necessary to intensify the monitoring of the VHSV and IPNV presence in carriers and especially in fish planned to be transferred from the north to south of Poland. This should be done by using fish cell lines and immunological methods recommended in EU countries e.g. ELISA tests. The mutual co-operation of fish breeders, veterinary officers, regional fish disease laboratories and the Fish Disease Laboratory of the National Veterinary Research Institute is imperative for the effective control of fish viral diseases.

**Keywords:** trout diseases, VHS, IPN.

Wirusowa posocznica krwotoczna (VHS) i zakaźna martwica trzustki (IPN) należą do najczęściej występujących wirusowych chorób ryb łososiowatych w Europie. Do niedawna choroby te rozpoznawano w Polsce jedynie na podstawie objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych występujących u ryb. W 1996 r. w Zakładzie Chorób Ryb PIWet. do diagnostyki VHS, IPN oraz wiosennej wirerii karpi (SVC) zaczęto stosować testy ELISA produkcji czeskiej. Metodę tę Zakład przekazał następnie Pracowniom Chorób Ryb ZHW zainteresowanym diagnostyką wirusowych chorób ryb. Według producenta test ten pozwala na obiektywne rozpoznawanie najważniejszych wirusowych chorób ryb.

W latach 1997 i 1998 Zakład Chorób Ryb PIWet. prowadził na zlecenie Departamentu Weterynarii Ministerstwa Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej badania monitoringowe w zakresie VHS i IPN stosując testy ELISA. Przeważająca większość dodatnich wyników testów ELISA używanych do bezpośredniego wykrywania obecności wirusa w supernatancie z narządów wewnętrznych ryb dotyczyła przypadków terenowych, w których ryby wykazywały objawy chorobowe; jedynie w nielicznych przypadkach stwierdza-

no dodatni wynik badania u ryb nie wykazujących objawów chorobowych. Przy użyciu tych testów stwierdzono w 6 obiektach kliniczne przypadki zakaźnej martwicy trzustki, natomiast w 4 obiektach kliniczne przypadki posocznicy krwotocznej łososiowatych. Metodą ELISA wykryto nosicielstwo IPN u pstrąga tęczowego jedynie w dwóch obiektach, w dwóch próbkach na 150 pobranych prób. W latach 1997-1998 nie stwierdzono tą metodą ani jednego przypadku nosicielstwa wirusa VHS.

W 1999 r. Zakład Chorób Ryb PIWet. jako pierwszy w Polsce (brak jakichkolwiek danych krajowych z tego zakresu) zaczął stosować do diagnostyki wirusów ryb metody uznawane w krajach Unii Europejskiej. Do izolacji i namnożenia wirusa zastosowano stałe linie komórkowe, a do identyfikacji testy ELISA rekomendowane przez Główne Laboratorium Odwoławcze Unii Europejskiej w Danii (Statens Veterinære Serumlaboratorium, Denmark).

Celem badań było wstępne określenie rozprzestrzenienia się wirusów VHS i IPN w wybranych rejonach Polski ze szczególnym uwzględnieniem nosicielstwa tych wirusów u pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss*).

## Materiał i metody

Próbki do badań pobierano w największych gospodarstwach pstrągowych województw: zachodnio-pomorskiego, pomorskiego, warmińsko-mazurskiego oraz na południu Polski. Sposób pobierania próbek był zgodny z instrukcją zawartą w Decyzji Komisji 96/240 EEC (1) przy uwzględnieniu minimum 10% nosicielstwa wirusów u ryb wg tabeli statystycznej opracowanej przez Ossiander i Wedemeyer (5). Łącznie badaniem objęto 56 obiektów hodowli pstrągów. Z każdego obiektu pobierano próbki od 30 do 45 ryb. Ogółem pobrano materiał od 2400 ryb – próbki stanowiły materiał od pojedynczych ryb (ryby 0,5-3-letnie) lub były to próbki zbiorcze (wylęg); łącznie zbadano 290 prób. W przypadku próbek zbiorczych materiał łącznie zgodnie z zasadami określonymi w Decyzji Komisji UE (1) i podręczniku OIE (2). Pobrane próbki – żywe ryby transportowano do laboratorium w workach foliowych z tlenem, natomiast ryby uśmiercone, czy też narządy wewnętrzne ryb transportowano w oddzielnych jałowych pojemnikach, w temperaturze  $4^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

Do izolacji wirusów (przy każdej próbce zbiorczej lub pojedynczej) używano dwie stałe linie komórkowe BF-2 i EPC, otrzymane z Głównego Laboratorium Odwoławczego Unii Europejskiej w Danii (Statens Veterinaere Serumlaboratorium, Denmark). Po stwierdzeniu zmian cytopatycznych w komórkach, materiał z zakażonych hodowli badano w kierunku VHS i IPN przy pomocy testów ELISA rekomendowanych przez wymienione Laboratorium Odwoławcze.

Preparaty do mikroskopii elektronowej (odwirowany materiał pochodzący z hodowli komórkowej BF-2, wykazującej efekt cytopatyczny) utrwalano 4% roztworem aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze kakodylowym o pH 7,0, następnie dotrwalano 1% roztworem czterotlenku osmu w takim samym buforze. Preparat nasycano żywicą, krojono, barwiono, a następnie oglądano w mikroskopie elektronowym Tesla BS-500 (Centralne Laboratorium Aparaturowe, Akademia Rolnicza w Lublinie).

W przypadku braku zmian cytopatycznych lub gdy zachodziło podejrzenie wystąpienia efektu toksycznego w hodowli komórkowej przeprowadzano dwukrotny pasaż.

Wyizolowanym szczepem wirusa VHS (szczep V<sub>1</sub>) zakażono 10 pstrągów tęczowych (o masie 150-220 g) pochodzących z obiektu wolnego od VHS i przetrzymywanych w przepływowym akwarium (300 l) z filtrowaną wodą o temperaturze  $14^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Dziesięć innych pstrągów pochodzących z tego samego stawu stanowiło grupę kontrolną (nie zakażoną). Wszystkie ryby przed doświadczeniem były przez trzy tygodnie adaptowane do warunków akwariowych, podczas których karmiono je regularnie granulatem pstrągowym firmy duńskiej. W jednym z dwóch małych (30 l) natlenianych akwariów sporządzono roztwór wirusa przez wlanie 10 ml płynu z hodowli komórkowej BF-2, w której stwierdzono obecność wirusa VHS metodą ELISA (średnia absorpcji wynosiła 0,716 i 0,924). W akwarium tym umieszczono 10 pstrągów na okres 30 minut. Po tym czasie ryby umieszczono ponownie w dużym akwarium. Podobnie postępowano z grupą kontrolną umieszczając ją na 30 minut w akwarium bez wirusa. Następnego dnia opisane czynności powtórzono po raz drugi. Ryby umieszczone w dużych akwariach obserwowano codziennie przez 20 dni.

## Wyniki i omówienie

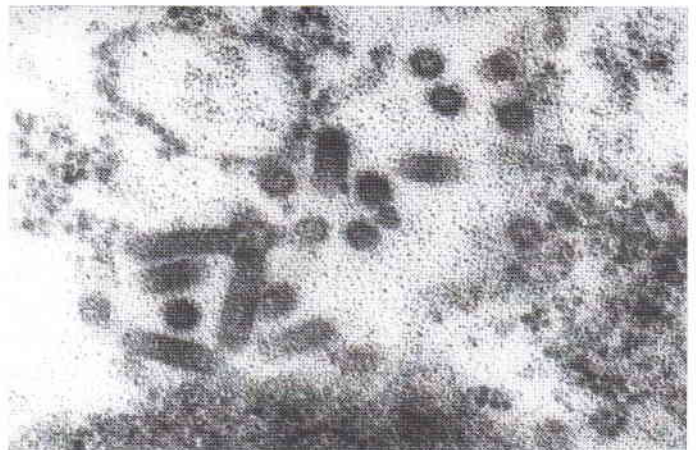
Wyniki badań ryb z wszystkich gospodarstw położonych w południowej części Polski (8 obiektów) były ujemne. W hodowlach komórkowych BF-2 i EPC stosowanych przy badaniu każdej z próbek ryb nie stwierdzono żadnych zmian cytopatycznych, zarówno w hodowlach pierwotnych, jak i po pasażowaniu.

W 11 obiektach (17 próbek zbiorczych) znajdujących się w województwach: zachodnio-pomorskim, pomorskim i warmińsko-mazurskim stwierdzono obecność wirusów VHS u pstrągów tęczowych (ryc. 1). W pięciu spośród jedenastu obiektów, w których badanie wirusologiczne w kierunku VHS było dodatnie, u ryb stwierdzono typowe objawy kliniczne i zmiany anatomopatologiczne. Najczęściej obserwowano pociemnienie skóry, wytrzeszcz gałek ocznych, wybroczyny w otrzewnej, mięśniach, pęcherzu pławnym i wątrobie. U poszczególnych ryb występowały objawy nerwowe znamionujące uszkodzenie centralnego układu nerwowego. W pozostałych sześciu obiektach, w których badaniem wirusologicznym również wykazano obecność wirusa VHS, nie zaobserwowano żadnych objawów chorobowych. Nosicielstwo wirusa VHS wykazano w wątrobie, śledzionie i nerkach u pstrągów tęczowych w różnym wieku.

Obecność IPN stwierdzono u ryb pochodzących z 31 obiektów hodowli ryb (ryc. 2). We wszystkich przypadkach wyników dodatnich badań w kierunku IPN (103 zbiorcze próbki) było to bezobjawowe nosicielstwo wirusa.

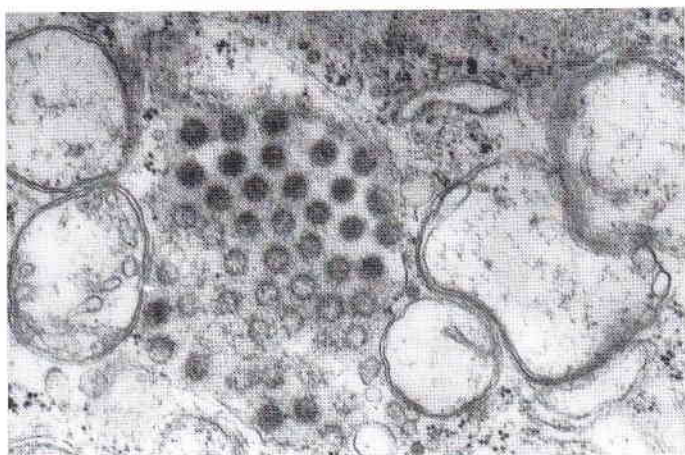
Na uwagę zasługuje fakt, że w próbkach pochodzących z 10 obiektów hodowli pstrągów, zarówno w próbkach pojedynczych jak i w próbkach zbiorczych stwierdzono równoczesne występowanie wirusa VHS i IPN. Obecność obu tych wirusów w próbkach pojedynczych świadczy, że wirusy te występowały równocześnie w jednej rybie.

Przy wystąpieniu zmian cytopatycznych w hodowlach komórkowych badanie testami ELISA wykazywało zwykle wyniki dodatnie. Stwierdzano obecność wirusów VHS lub IPN względnie równocześnie oby-

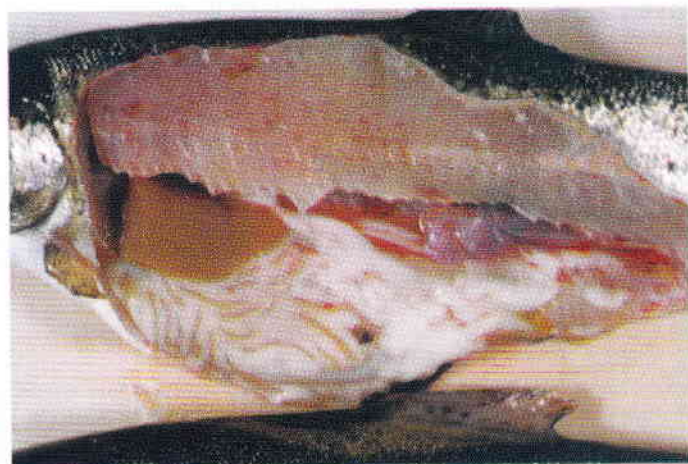


Ryc. 1. Wirus VHS w hodowli komórkowej BF-2, mikroskop elektronowy pow. 100 000 $\times$ , fot. Matusiewicz





Ryc. 2. Wirus IPN w hodowli komórkowej BF-2, mikroskop elektronowy pow. 100 000×, fot. Matusiewicz



Ryc. 3. Wybroczyny w mięśniach grzbietowych u pstrąga tęczowego zakażonego eksperymentalnie wirusem VHS, fot. Dutkiewicz



Ryc. 4. Wybroczyny w tłuszczu otrzewnym u pstrąga tęczowego zakażonego eksperymentalnie wirusem VHS, fot. Dutkiewicz

dwu. W jednym tylko przypadku przy wystąpieniu typowych zmian cytopatycznych (i wykluczeniu efektu cytotoksycznego przez dwukrotne pasażowanie) badanie metodą ELISA w kierunku VHS i IPN było ujemne. Badanie czynnika, który wywołał ten efekt cytopatyczny, głównie w kierunku IHN, jest w toku.

W wyniku eksperymentalnego zakażenia pstrągów tęczowych po 7 dniach u dwóch ryb wystąpiły pierwsze objawy chorobowe – brak pobierania pokarmu, pociemnienie skóry i pogłębiający się letarg na przemian z wykonywaniem gwałtownych ruchów. W ciągu kolejnych dni tj. po 10 dniach od zakażenia objawy chorobowe wystąpiły u następnych sześciu ryb. Sekcyjnie u ryb tych stwierdzono objawy charakterystyczne dla VHS, głównie wybroczyny na przekroju mięśni grzbietowych (ryc. 3), w pęcherzu pławnym oraz w tłuszczu otrzewnym (ryc. 4). Oprócz tego występowało przekrwienie otrzewnej ściennej i przewodu pokarmowego. U dwóch spośród 10 zakażonych ryb nie stwierdzono objawów klinicznych w ciągu 20 dni obserwacji. Badanie wirusologiczne zakażonych ryb wykazało obecność wirusa VHS u wszystkich 10 ryb. Ryby z grupy kontrolnej nie wykazywały żadnych objawów klinicznych w ciągu 20 dni obserwacji, a badania wirusologiczne nie wykazały u nich obecności wirusa VHS.

Badanie wirusologiczne przeprowadzone w 1999 r. przy użyciu hodowli komórkowych (izolacja wirusów) i testu ELISA (identyfikacja wirusów) nie tylko potwierdziło obecność klinicznych postaci VHS w Polsce (w 5 obiektach), ale również wykazało liczne przypadki nosicielstwa wirusa VHS (6 innych obiektów). Oprócz tego metoda ta pozwoliła wykryć nosicielstwo wirusa IPN w 31 obiektach. W latach 1997-1998, kiedy Zakład Chorób Ryb PIWet. stosował do diagnostyki wirusowych chorób ryb jedynie test ELISA (bezpośrednio do badania obecności antygeny w supernatancie z narządów wewnętrznych ryb bez namnażania wirusa w hodowlach komórkowych) stwierdzono tylko 2 przypadki nosicielstwa IPN. Na tej podstawie można przypuszczać, że użycie do diagnostyki stałych linii komórkowych (pozwalających na izolację i namnażanie wirusów ryb) zwiększyło znacznie prawdopodobieństwo wykrycia nosicielstwa tych mikroorganizmów. Rodak i wsp. (6) również uważają, że pomimo ogromnej pracochłonności pełne badanie wirusologiczne jest niezastąpione w przypadku badania obecności u ryb wirusów o niewielkim mianie. Pogląd taki znalazł także wyraz w przepisach OIE (2) i dyrektywach UE (1). Badania własne potwierdziły wcześniejsze wyniki badań Rodaka i wsp. (6, 7), że stosowanie testu ELISA (produkcji czeskiej) do badania obecności wirusów bezpośrednio w supernatancie z narządów wewnętrznych ryb jest bardzo pewną metodą diagnostyki klinicznych przypadków choroby. Metoda ta jest natomiast często zawodna w badaniu przypadków nosicielstwa, szczególnie nosicielstwa wirusów u ryb lososiowatych.

Na podstawie dotychczasowych badań sądzić można, że ryby na południu Polski wykazują znacznie lepszą zdrowotność w zakresie VHS i IPN niż ryby pochodzące z północnej części Polski. Na podstawie stosunkowo nielicznych badań monitoringowych przeprowadzanych w gospodarstwach południowej Polski



nie można jednak całkowicie wykluczyć obecności wirusów VHS i IPN na tym terenie (badania w toku). Częste występowanie wirusów u ryb pochodzących z północnej części Polski jest prawdopodobnie związane z większą intensyfikacją produkcji ryb w poszczególnych gospodarstwach tego regionu kraju oraz z większym zagęszczeniem obiektów na poszczególnych ciekach wodnych. Innym czynnikiem, który przyczynił się do rozprzestrzenienia wirusów VHS i IPN w województwach pomorskich były również częste niekontrolowane przerzuty ryb i ikry oraz niewystarczające zabiegi sanitarno-higieniczne przeprowadzane w stawach i środkach transportu (dane nieopublikowane, Grawiński).

Wyizolowany w badaniach własnych szczep wirusa okazał się silnie patogenny i przy zakażeniu za pośrednictwem wody wywołał, po typowym dla VHS okresie inkubacji, chorobę u 8 na 10 pstrągów.

Z badań terenowych oraz laboratoryjnych przeprowadzonych przez pracowników Zakładu Chorób Ryb PIWet. przy współpracy z Pracowniami Chorób Ryb ZHW w Gdańsku (Grawiński), Koszalinie (Mazur) i Olsztynie (Bernad) wynika konieczność częstszych badań w kierunku wymienionych wirusowych chorób ryb celem niedopuszczenia do dalszego rozprzestrzeniania się wirusów VHS i IPN na terenie Polski, szczególnie zaś z rejonów północnej Polski do rejonów południowych. Hodowcy ryb łososiowatych, szczególnie w północnych rejonach Polski, powinni ściślej współpracować z Państwową Inspekcją Weterynaryjną w zakresie polepszenia warunków higieny zbiorników hodowlanych, środków transportu oraz żywienia ryb. Wydaje się również, że w celu zmniejszenia strat spowodowanych występowaniem VHS i IPN należy albo zmniejszyć intensyfikację produkcji i ograniczyć do minimum przerzuty ryb i ikry, albo zachowując nadal wysoki poziom produkcji, przystąpić do realizacji programu zwalczania VHS (również IPN) wzorując się na metodach zapoczątkowanych w 1965 r. w Danii (3, 4).

## Wnioski

1. Testy ELISA do wykrywania wirusów VHS i IPN, produkcji czeskiej, używane do badania supernatantu z narządów wewnętrznych ryb są przydatne do rozpoznawania klinicznych postaci tych chorób, mogą być natomiast zawodne w przypadku nosicielstwa wirusów o niskim mianie.

2. Należy zintensyfikować badania w kierunku nosicielstwa wirusów IPN i VHS u ryb łososiowatych – szczególnie w przypadku planowanych przewozów tych ryb z rejonów północnej Polski na południe kraju – poprzez stosowanie do diagnostyki stałych linii komórkowych oraz testów ELISA zalecanych przez UE.

3. Przy zwalczaniu wirusowych chorób ryb niezbędna jest ścisła, wzajemna współpraca hodowców ryb, państwowych lekarzy weterynarii, Pracowni Chorób Ryb ZHW i Zakładu Chorób Ryb PIWet.

## Piśmiennictwo

1. Commission Decision 96/240 EC: amending Decision 922/532/EEC laying down the sampling plans and diagnostic methods for the detection and confirmation of certain fish diseases. OJ 1996, 79, 19-28.
2. Office international des Epizooties: Diagnostic manual for aquatic animal diseases, O.I.E., 1997.
3. Olesen N. J., Korsholm H.: Control measures for viral diseases in aquaculture: eradication of VHS and IHN. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 1997, 17, 229-233.
4. Olesen N. J.: Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) J. Appl. Ichthyol. 1998, 14, 173-177.
5. Osslander F. J., Wedemeyer G.: Computer program for sample size required to determine disease incidence in fish populations. J. Fish. Res. Board Can., 1973, 9, 1383-1384.
6. Rodak L., Pospisil Z., Tomanek J., Vesely T., Obr T., Valicek T.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in culture fluids and tissue homogenates of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Dis. 1988, 11, 225-235.
7. Rodak L., Pospisil Z., Tomanek J., Vesely T., Obr T., Valicek T.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) in tissue homogenates of the carp, *Cyprinus carpio* L. J. Fish Dis. 1993, 16, 101-111.

Adres autora: prof. dr hab. Jerzy Antychowicz, ul. Norwida 3/6, 24-100 Puławy

## Zakład Chorób Zwierząt Mięsożernych i Futerkowych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego

informuje, że w dniach 27-28 maja 2000 roku w Puławach odbędzie się Konferencja dla lekarzy praktyków zajmujących się chorobami małych zwierząt, z udziałem wykładowców zagranicznych i krajowych, na temat:

### „Choroby zakaźne psów i kotów”

Osoby zainteresowane udziałem w Konferencji proszone są o kontakt telefoniczny lub listowny:

lek. Wet. Artur Rzeżutka  
Zakład Chorób Mięsożernych i Futerkowych  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy  
Tel. 081 886-30-51 w. 209  
e-mail: [arzez@piwet.pulawy.pl](mailto:arzez@piwet.pulawy.pl)