

Przydatność badań serologicznych w diagnostyce zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego ryb łososiowatych (IHN)

MAREK MATRAS, JOANNA MAJ, MAGDALENA STACHNIK, EWA BORZYM, AGNIESZKA LEWANDOWSKA*, WITOLD MAZUR*

Zakład Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Zakład Higieny Weterynaryjnej w Szczecinie Oddział w Koszalinie, ul. Polczyńska 72, 75-816 Koszalin

Matras M., Maj J., Stachnik M., Borzym E., Lewandowska A., Mazur W.

Study on the usefulness of seroneutralization tests in the diagnostics of infectious haematopoietic necrosis (IHN)

Summary

The purpose of the project was to study the correlation between the presence of the IHN virus and the presence of antibodies against this virus in fish sera. Experimental infection of rainbow trout was performed at temperatures of $12^{\circ}\text{C}\pm 1$ and $15^{\circ}\text{C}\pm 1$. The trouts' sera were collected at 7-day intervals. Samples from farms naturally infected with IHNV were also tested. The presence of antibodies against IHNV was determined by seroneutralization and the virus was detected by isolation in cell culture. It was found that in the experimentally infected rainbow trout, antibodies against IHN were found earlier in the higher temperature, after 21 days post infection, whereas the presence of IHNV was observed to last longer in the lower temperature. In the study performed on 30 samples of sera from IHN-infected farms, antibodies were detected in 12 samples. Detection of antibodies against IHNV in fish serum can be a helpful tool supporting recommended techniques.

Keywords: salmonids, IHNV, antibodies, seroneutralization

Czynnikiem etiologicznym powodującym zakaźną martwicę układu krwiotwórczego (IHN) jest wirus zaklasyfikowany do rodzaju *Novirhabdovirus* z rodziny *Rhabdoviridae*. Jego wirion ma charakterystyczny kształt „pocisku”, a genom zawierający pojedynczą nić RNA koduje 6 białek. Wielkość genomu w przybliżeniu wynosi 11 000 nukleotydów, które kodują następujące białka: nukleoproteinę (N), fosfoproteinę (P), białko macierzy (M), glikoproteinę (G), białko NV (NV), polimerazę RNA (L) (12).

Zgodnie z dyrektywą Rady 2066/88/WE z dnia 24 października 2006 r. w sprawie wymogów w zakresie zdrowia zwierząt akwakultury i produktów akwakultury oraz zapobiegania niektórym chorobom zwierząt wodnych i zwalczania tych chorób, na zakażenie wirusem IHN wrażliwe są ryby następujących gatunków: łosoś keta (*Oncorhynchus keta*), kiżucz (*O. kisutch*), łosoś japoński (*O. masou*), pstrąg tęczowy (*O. mykiss*), łosoś nerka (*O. nerka*), łosoś chinook (*O. tshawytscha*) oraz łosoś atlantycki (*Salmo salar*).

Najbardziej wrażliwe na zakażenie wirusem IHN są młode osobniki, u których IHN przebiega najczęściej

w postaci ostrej, powodując do 90% śnięć. U starszych pstrągów i smoltów łososi choroba występuje sporadycznie (2). Czynniki warunkujące występowanie choroby jest wiek ryb i temperatura wody. Strefa występowania IHN jest ograniczona do terenów, gdzie temperatura wody spada okresowo przynajmniej do 10°C .

Zakaźną martwicę układu krwiotwórczego stwierdza się w Ameryce Północnej, Azji i Europie. W Polsce po raz pierwszy IHN stwierdzono w 2001 r. u wylęgu pstrąga tęczowego. W latach 2008-2011 odnotowano 17 przypadków IHN w województwach: pomorskim, zachodniopomorskim, śląskim, małopolskim i wielkopolskim. Z danych opublikowanych przez Główny Inspektorat Weterynarii w biuletynie „Stan zakaźnych chorób zwierzęcych” wynika, iż w 2008 r. odnotowano kolejny przypadek IHN w województwie wielkopolskim, a w 2009 r. stwierdzono 3 przypadki w województwach: zachodniopomorskim, śląskim i małopolskim. W 2010 r. wykryto obecność wirusa w 4 gospodarstwach rybackich w województwie zachodniopomorskim oraz 1 w województwie pomor-

skim. W 2011 r. odnotowano IHN w 6 gospodarstwach w województwie zachodniopomorskim oraz w 2 w województwie pomorskim (ryc. 1).

Wykryty w 2008 r. wirus IHN w województwie wielkopolskim spowodował masowe śnięcia u pstrąga o masie ciała 30-50 g. Przypadek ten miał najprawdopodobniej związek z importem ikry z krajów Europy Zachodniej, gdzie IHNV występuje od wielu lat. Kolejne ogniska choroby, które wystąpiły w latach 2009-2011, są prawdopodobnie wynikiem rozprzestrzeniania się wirusa w obrębie polskich gospodarstw rybackich za pośrednictwem transportu zakażonej ikry, jak i zakażonego materiału obśadowego. Niepokojący jest fakt, iż pomimo wdrażania procedur natychmiastowego zwalczania choroby w gospodarstwie, w którym wykryto wirus IHN, choroba rozprzestrzeniła się na terenie kraju.

Wyjaśnieniem zaistniałej sytuacji może być fakt, iż w gospodarstwie rybackim tylko niewielki procent ziaren ikry oraz niewielki odsetek wylęgu zarażony wirusem IHN wystarczy, by choroba stale występowała w obiekcie. Ponadto bezobjawowe nosicielstwo u ryb poddanych stresowi transportowemu może stać się źródłem zakażenia dla obiektów rybackich.

Wspólnotowe Laboratorium Referencyjne w zakresie chorób ryb (EURL) oraz Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt, O.I.E., rekomendują do rutynowej diagnostyki izolację wirusa w hodowlach komórkowych, a następnie jego identyfikację przy użyciu metod: seroneutralizacji, immunofluorescencji, testu ELISA, metod biologii molekularnej (3, 12, 15). Przeprowadzone dotychczas badania w zakresie odpowiedzi humoralnej ryb łososiowatych na zakażenie wirusami z rodziny *Rhabdoviridae* potwierdziły skuteczność różnych metod diagnostycznych, tj.: seroneutralizacji, testu ELISA, immunofluorescencji, western blotting, które opierają się na wykrywaniu obecności swoistych przeciwciał (5, 6, 8, 9, 11, 13, 14). Pomimo zalet techniki wykrywania obecności przeciwciał u ryb, tj. w przypadku, gdy izolacja wirusa u ryb w temperaturze wody powyżej 15°C jest trudna oraz w przypadku endemicz-



Ryc. 1. Rozprzestrzenienie przypadków IHN w Polsce w latach 2008-2011. Dane oraz mapa Polski z podziałem na powiaty na podstawie biuletynu „Stan zakaźnych chorób zwierzęcych” (1)

nego występowania zakażenia IHN, nie są one rekomendowane do rutynowej diagnostyki z powodu braku dostatecznej ilości badań pozwalających na optymalizację oraz walidację tych metod. W związku z tym celem pracy było określenie przydatności badania poziomu przeciwciał swoistych w surowicy ryb do diagnostyki IHN oraz zależności pomiędzy występowaniem wirusa a obecnością przeciwciał w populacji ryb.

Materiał i metody

Do badań wykorzystano 160 sztuk narybku pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) o masie ciała 40-60 g, pochodzącego z gospodarstwa, w którym nie występowała choroba. Ryby zakażono wirusem IHN po uprzednio przeprowadzonym okresie kwarantanny trwającym 4 tygodnie. Ryby przetrzymywano w temperaturze wody 12°C ± 1 i 15°C ± 1. Zakażenie ryb przez kąpiel przeprowadzano w 10 l basenach, do których dodano około 5 ml zawiesiny wirusa IHN, o mianie TCID₅₀/ml wynoszącym 8,6 × 10⁶. Izolat wirusa pochodził z przypadku klinicznego zakażenia IHN stwierdzonego w 2008 r. w jednym z gospodarstw pstrągowych. Czas ekspozycji ryb na zawiesinę wirusa wynosił 30 minut, po czym ryby przeniesiono do basenów o pojemności 1000 l. W trakcie prowadzenia doświadczenia ryby przyjmowały pokarm w postaci granulatu. Grupy kontrolne stanowiły ryby pochodzące z tej samej populacji, co ryby zakażane. Prze-

bywały one w takich samych warunkach i poddawane były w równym stopniu działaniu stresu manipulacyjnego.

Krew do badań serologicznych oraz narządy wewnętrzne ryb do badań wirusologicznych pobierane były w odstępach tygodniowych od dnia zakażenia wirusem IHN przez 5 tygodni. Krew, pobraną z naczyń ogonowych ryb umieszczano w próbkach, które przetrzymywano 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie przez 12 godzin w temperaturze $4^{\circ}\text{C} \pm 1$. Po tym czasie oddzielono powstały skrzep i wirowano w temperaturze $4^{\circ}\text{C} \pm 1$, przy obrotach $2000 \times \text{g}$ przez 30 minut. Otrzymaną w ten sposób surowicę inaktywowano w temperaturze $45^{\circ}\text{C} \pm 1$ przez 30 minut.

Poziom przeciwciał w testach oznaczono przy użyciu metody seroneutralizacji (SN). Do testu użyto stałej dawki wirusa IHN oraz wzrastających rozcieńczeń surowicy. Materiałem pochodzącym z narządów wewnętrznych ryb zakażano wrażliwe linie komórkowe, a wystąpienie zmian cytopatycznych spowodowanych namnożeniem się wirusa IHN potwierdzano testem ELISA oraz techniką RT-PCR.

W kolejnym etapie doświadczenia przeprowadzono badanie surowic krwi ryb (9-11 osobników) pochodzących z 3 gospodarstw rybackich, w których wcześniejsze badania wykazały obecność wirusa IHN. W gospodarstwie nr 1 wystąpiły nieznaczne śnięcia przy braku objawów chorobowych, natomiast w gospodarstwie nr 2 i 3 zaobserwowano objawy chorobowe charakterystyczne dla IHN oraz śnięcia wynoszące, odpowiednio, 40% i 60% obsady. Krew oraz narządy wewnętrzne do badań wirusologicznych zostały pobrane po 4-6 tygodniach od wystąpienia objawów chorobowych u ryb. Z pobraną krwią postępowano analogicznie, jak w wyżej opisanym doświadczeniu laboratoryjnym. Materiałem pochodzącym z narządów wewnętrznych ryb zakażano wrażliwe linie komórkowe, a wystąpienie zmian cytopatycznych spowodowanych namnożeniem się wirusa IHN potwierdzano testem ELISA oraz techniką RT-PCR. Temperatura wody w trakcie pobierania próbek do badań z gospodarstw rybackich wynosiła $15-17^{\circ}\text{C}$.

Wyniki i omówienie

Na podstawie eksperymentalnego zakażenia pstrąga tęczowego wirusem IHN w temperaturze $12^{\circ}\text{C} \pm 1$ stwierdzono obecność przeciwciał przeciwko wirusowi IHN u 4 z 20 badanych. W próbkach pobranych z narządów wewnętrznych ryb wykazano obecność tego wirusa w 7., 14., 21., 28. i 35. dniu od zakażenia, natomiast pierwsze przeciwciała anty IHNV pojawiły się w 28. dniu po zakażeniu.

Z kolei u zakażonych w temperaturze $15^{\circ}\text{C} \pm 1$ pstrągów tęczowych stwierdzono u 5 ryb obecność przeciwciał,

Tab. 1. Wyniki badań w kierunku obecności swoistych przeciwciał (SN) oraz izolacji wirusa u pstrągów po eksperymentalnym zakażeniu wirusem IHN w temperaturze $12^{\circ}\text{C} \pm 1$ i $15^{\circ}\text{C} \pm 1$

Dni od zakażenia	$12^{\circ}\text{C} \pm 1$			$15^{\circ}\text{C} \pm 1$			
	Numer ryby	Wynik izolacji wirusa w hodowlach komórkowych	Wynik SN	Dni od zakażenia	Numer ryby	Wynik izolacji wirusa w hodowlach komórkowych	Wynik SN
7	1	+	-	7	1	+	-
	2		-		2		-
	3		-		3		-
	4		-		4		-
14	5	+	-	14	5	+	-
	6		-		6		-
	7		-		7		-
	8		-		8		-
21	9	+	-	21	9	+	-
	10		-		10		-
	11		-		11		+
28	12	+	-	28	12	-	+
	13		+		13		-
	14		-		14		-
	15		-		15		-
35	16	+	+	35	16	-	-
	17		-		17		+
	18		+		18		-
	19		-		19		+
	20		+		20		-

które pojawiły się już w 21. dniu po zakażeniu. W badanych narządach stwierdzono obecność wirusa IHN w 7., 14., 21. dniu od zakażenia (tab. 1).

U ryb z grup kontrolnych nie stwierdzono obecności przeciwciał przeciwko wirusowi IHN, jak również nie wyizolowano wirusa w liniach komórkowych.

Wśród 30 badanych metodą seroneutralizacji surowic pochodzących z 3 obiektów rybackich, w których stwierdzono obecność wirusa IHN, przeciwciała przeciwko IHN wykryto w 12 próbkach (tab. 2). W 30% próbek surowicy pobranych od pstrągów z gospodarstwa nr 2 po 4 tygodniach od wystąpienia objawów chorobowych stwierdzono obecność przeciwciał anty IHN. W próbkach pobranych w 5. (gospodarstwo nr 3) i 6. (gospodarstwo nr 1) tygodniu od momentu obserwacji objawów chorobowych wykryto obecność przeciwciał anty IHN w 45% przebadanych surowic. W próbkach pobranych z narządów ryb w celu izolacji wirusa nie stwierdzono obecności patogenu.

Wyniki badań próbek terenowych potwierdzają zatem rezultaty uzyskane w doświadczeniach laboratoryjnych dotyczących obecności przeciwciał przeciwko wirusowi IHN u pstrągów.

Dane przedstawione w tab. 1 wskazują na zależność pomiędzy temperaturą a odpowiedzią humoralną u ryb.

Tab. 2. Wyniki badania surowic w kierunku obecności przeciwciał anty IHN u pstrągów pochodzących z gospodarstw rybackich, w których stwierdzono IHN

Numer gospodarstwa	Miano przeciwciał stwierdzone u poszczególnych ryb	Czas od wystąpienia objawów chorobowych	Gatunek
1	-	6 tygodni od stwierdzenia objawów klinicznych	Pstrąg tęczowy
	160		Pstrąg źródłany
	-		Pstrąg źródłany
	-		Pstrąg tęczowy
	2560		Pstrąg tęczowy
	-		Pstrąg źródłany
	-		Pstrąg źródłany
	1280		Pstrąg tęczowy
	80		Pstrąg źródłany
	-		Pstrąg tęczowy
2	-	4 tygodnie od stwierdzenia objawów klinicznych	Pstrąg tęczowy
	160		
	-		
	-		
	320		
	-		
	-		
	160		
	-		
3	160	5 tygodni od stwierdzenia objawów klinicznych	Pstrąg tęczowy
	320		
	-		
	80		
	80		
	-		
	-		
	-		
	-		
	-		

Z badań eksperymentalnych wynika, iż w wyższej temperaturze przeciwciała anty IHN pojawiają się wcześniej, jak również obecność wirusa jest możliwa do zidentyfikowania w krótszym czasie aniżeli w niższej temperaturze. W porównaniu do zwierząt stałocieplnych u ryb obecność przeciwciał stwierdza się później około 4.-6. tygodnia od momentu zakażenia i w dużej mierze jest to uzależnione od temperatury (10). Rezultaty naszych badań przeprowadzonych na rybach zakażonych w warunkach eksperymentalnych, jak i terenowych potwierdzają wyniki wyżej opisane, dotyczące czasu, w jakim u ryb pojawiają się pierwsze przeciwciała. Wykrywanie przeciwciał anty IHN u ryb ma przewagę

w porównaniu do metody izolacji wirusa w hodowli komórkowej, ponieważ patogen można stwierdzić jedynie w początkowej fazie zakażenia. Natomiast ślad infekcji w postaci przeciwciał u ryb można obserwować nawet rok od kontaktu z wirusem (6). Dodatkowym atutem stosowania metod wykrywających obecność przeciwciał jest możliwość przyżyciowego pozyskania materiału do badań oraz jego większa stabilność podczas transportu i przechowywania w stosunku do próbek pobieranych w celu izolacji wirusa (7).

W ostatnich latach liczba gospodarstw rybackich w Polsce, w których stwierdzono obecność wirusa IHN, wykazuje tendencję wzrostową. Szczególnie niepokojące jest niosące zagrożenie bezobjawowe nosicielstwo u ryb, u których wrażliwość na zakażenie wraz z wiekiem zwiększa się. Wydaje się, iż w zaistniałej sytuacji badanie obecności przeciwciał anty IHN u ryb jest przydatnym uzupełnieniem rekomendowanych metod diagnostycznych.

Piśmiennictwo

1. Biuletyn Głównego Inspektoratu Weterynarii. Stan chorób zakaźnych zwierząt 2008-2011, Warszawa.
2. *Burke J., Grischkowsky R.*: An epizootic caused by infectious hematopoietic necrosis virus in an enhanced population of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), smolts at Hidden Creek, Alaska. *J. Fish Dis.* 1984, 7, 421-429.
3. Decyzja Komisji 2001/183/WE z dnia 22 lutego 2001 r. ustanawiająca plany pobierania próbek i metody diagnostyczne do celów wykrywania i potwierdzania występowania niektórych chorób ryb oraz uchylająca decyzję 92/532/EWG.
4. Dyrektywa Rady 2066/88/WE z dnia 24 października 2006 r. w sprawie wymogów w zakresie zdrowia zwierząt akwakultury i produktów akwakultury oraz zapobiegania niektórym chorobom zwierząt wodnych i zwalczania tych chorób.
5. *Enzmann P. J., Konrad M.*: Antibodies against VHS in whitefish of the Lake of Constance, West Germany. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 1990, 10, 24-25.
6. *Enzmann P. J., Konrad M.*: Longevity of antibodies in brown trout and rainbow trout following experimental infection with VHS-virus. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 1993, 13, 193-194.
7. *Fregeneda-Grandes J. M., Olesen N. J.*: Detection of rainbow trout antibodies against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) by neutralisation test is highly dependent on the virus isolate used. *Dis. of Aquat. Org.* 2007, 74, 151-158.
8. *Hattenberger-Baudouy A. M., Dalton M., Merle G., Kinkelin P. de*: Serum neutralization test for epidemiological studies of salmonid rhabdoviruses in France. *Vet. Res.* 1995, 26, 512-520.
9. *Jørgensen P. E. V., Olesen N. J., Lorenzen N., Winton J. R., Ristow S.*: Infectious hematopoietic necrosis (IHN) and Viral hemorrhagic septicemia (VHS): detection of trout antibodies to the causative viruses by means of plaque neutralization, immunofluorescence, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Aquat. Anim. Health* 1991, 3, 100-108.
10. *Lorenzen N., Lapatra S. E.*: Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response. *Fish Shellfish Immunol.* 1999, t. 9, nr 4, 345-360.
11. *Lorenzen N., Olesen N. J., Jørgensen P. E. V.*: Antibody response to VHS virus proteins in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* 1993, 3, 461-473.
12. O.I.E., Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt: International Aquatic Animal Health Code, 2011, 14 ed.
13. *Olesen N. J., Lorenzen N., Jørgensen P. E. V.*: Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF), and plaque neutralization tests (50% PNT). *Dis. Aquat. Org.* 1991, 10, 31-38.
14. *St-Hilaire S., Ribble C., Traxler G., Davies T., Kent M. L.*: Evidence for a carrier state of infectious hematopoietic necrosis virus in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. of Aquat. Org.* 2001, 46, 173-179.

Adres autora: Marek Matras, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: marek.matras@piwet.pulawy.pl