

Inwazja *Bonamia ostreae* u ostryg jadalnych

AGNIESZKA PĘKALA

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

Pękala A.

Infection of flat oysters (*Ostrea edulis*) with *Bonamia ostreae*

Summary

Infection with *Bonamia ostreae* has significantly decreased the production of the European flat oyster (*Ostrea edulis*) in Europe. This pathogen came from North America and rapidly spread to almost the entire oyster farming areas in Europe. The etiological agent is a parasite, *Bonamia ostreae*, with an unclear taxonomy at present. This parasite is located intrahaemocytic but can be observed extracellularly between epithelial or interstitial cells in gills and stomach. Two cells types of the parasite are apparent: 2, 3 μm to 6 μm in diameter. Bonamiosis is a lethal infection. Dead or gaping oysters are the most common clinical signs. Most of the infected oysters appear normal, but sometimes lesions in the connective tissue of the gills, mantle, and digestive glands can be observed. Yellow discoloration appears when advanced infections become systemic. Direct transmission from host to host is the most possible. Life cycle outside the host is unknown. The disease is seasonal. Prevalence and intensity of infection tends to increase during the warm season. There is no chemotherapy and vaccination. An effective program to prevent the transfer of infected stocks is the sole method of controlling this disease, which should be connected with appropriate diagnostic methods to detect the etiological agent.

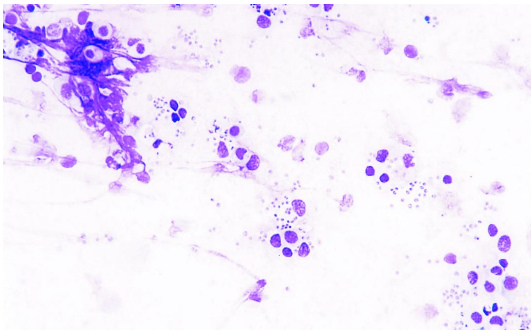
Keywords: *Bonamia ostreae*, molluscs

Niekontrolowany obrót ostrygami pod koniec lat sześćdziesiątych i na początku siedemdziesiątych ubiegłego stulecia doprowadził do zdziśiatkowania hodowli ostryg jadalnych (*Ostrea edulis*) w Europie. Problem ten dotknął głównie Francję, jako największego producenta tego gatunku ostryg. Spadek rocznej produkcji w tym kraju był bardzo drastyczny i wynosił około 90%, tj. z 20 000 ton w latach siedemdziesiątych do około 2000 ton na początku obecnego stulecia (9). Powodem takiej sytuacji były dwie jednostki chorobowe, a mianowicie inwazje powodowane przez *Bonamia ostreae* oraz *Marteilia refringens*. W latach sześćdziesiątych, w Kalifornii, opisywano inwazję *Bonamia ostreae* u ostryg jadalnych, która następnie rozprzestrzeniła się na zachodnie wybrzeże USA (16). Przypadki zachorowań notowano również na wschodnim wybrzeżu USA (7, 18). Na podstawie przeprowadzonych badań postawiono hipotezę, że do Europy *B. ostreae* została sprowadzona właśnie z Ameryki Północnej wraz z zarażonymi ostrygami i błyskawicznie rozprzestrzeniła się na prawie całe jej terytorium (12, 16). Zasięg występowania *B. ostreae* w Europie jest duży i obecnie ta inwazja jest notowana we Francji, Irlandii, Włoszech, Holandii, Hiszpanii oraz Wielkiej Brytanii z wyjątkiem Szkocji (2, 4, 10) (ryc. 1). Inwazja *Bonamia ostreae* została umieszczona na liście II załącznika A do dyrektywy Rady 91/67/EWG (15), części II załącznika III projektu nowej dyrektywy (23), a w polskim prawodawstwie, zgodnie z ustawą z dnia 7 stycznia 2005 r. o zmianie ustawy o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt oraz o zmianie niektórych innych ustaw, znajduje się w wykazie chorób zakaźnych podlegających obowiązkowi zwalczania (26).

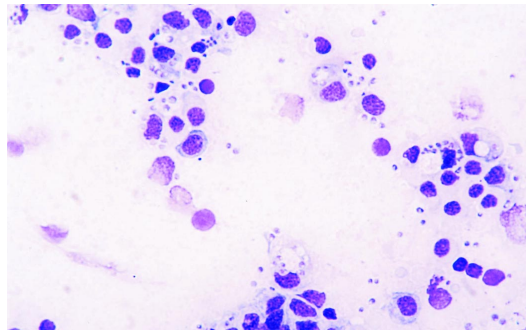
Inwazję *B. ostreae* wywołują pierwotniaki o nieustalonej jeszcze dokładnie taksonomii. Niektórzy autorzy (cyt. 21) uważają, że patogen ten posiada wiele cech charakterystycznych zarówno dla przedstawicieli rodzaju *Marteilia*, jak i *Haplosporidium*, innych czynników chorobowych mięczaków. Według tych autorów, nie można



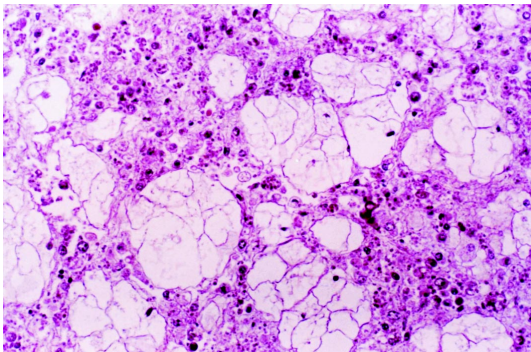
Ryc. 1. Rozprzestrzenienie *Bonamia ostreae* na kontynencie europejskim



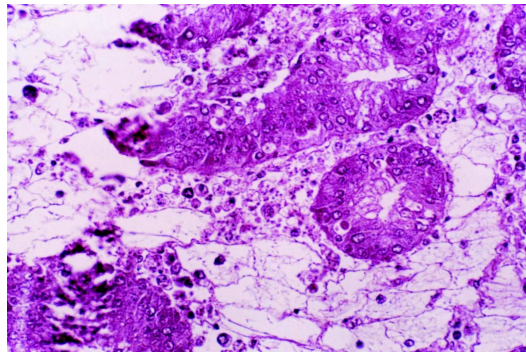
Ryc. 2. *Bonamia ostreae* obecna tak w cytoplazmie hemocytów, jak i poza nimi – preparat odciskowy przygotowany z serca ostrygi płaskiej (*O. edulis*) wybarwiony zestawem Hemacolor



Ryc. 3. *Bonamia ostreae* obecna w cytoplazmie hemocytów – preparat odciskowy przygotowany z serca ostrygi płaskiej (*O. edulis*) wybarwiony zestawem Hemacolor



Ryc. 4. Preparat histologiczny przygotowany z ostrygi płaskiej (*O. edulis*) wykazującej objawy chorobowe, wybarwiony hematoksyliną i eozyną – widoczna znaczna infiltracja tkanki łącznej przez hemocyty, a w ich cytoplazmie obecne są komórki *B. ostreae*



Ryc. 5. Preparat histologiczny przygotowany z ostrygi płaskiej (*O. edulis*), wybarwiony hematoksyliną i eozyną – wokół gruczołów trawiennych niewielka infiltracja tkanki łącznej przez hemocyty, a w ich cytoplazmie obecne są komórki *B. ostreae*

jednak z całą pewnością zaklasyfikować *B. ostreae* ani do rzędu *Occlusosporida*, ani do rzędu *Balanosporida*. Levine i wsp. (cyt. 21) zaproponowali przynależność tego pasożyta do gromady *Acetospora*, klasy *Stellatospora*, rzędu *Ballanosporida*, nie przesądzając jednoznacznie tej sprawy, a sugerując dyskusję na ten temat.

Jeszcze do niedawna termin bonamioza obowiązywał jako wspólna nazwa jednostek chorobowych ostryg wywoływanych przez *Bonamia ostreae* na półkuli północnej, a także chorób ostryg wywoływanych przez *Bonamia exitiosus* i *Mikrocytos roughleyi* na półkuli południowej (1). Szczegółowe badania ultrastruktury wymienionych pierwotniaków połączone z zastosowaniem technik biologii molekularnej, takich jak PCR oraz hybrydyzacji *in situ* potwierdziły przynależności tych organizmów do rodzaju *Bonamia*. Od tego momentu *Bonamia ostreae* uważana jest za jedynego pierwotniaka występującego na kontynencie europejskim i wymienionego w dyrektywie Rady 91/67/EWG, natomiast pozostałe dwa gatunki – *B. exitiosa* i *M. roughleyi* – uznawane są za jednostki egzotyczne, występujące poza Europą (11). Jednocześnie zmianie uległo nazewnictwo jednostek chorobowych. Określenie bonamioza zostało zastąpione przez termin inwazja wywołana przez *Bonamia ostreae*. Znalazło to wyraz w projekcie nowej dyrektywy UE (23).

Ostryga jadalna (*O. edulis*) jest jedynym, naturalnym gatunkiem wrażliwym na tego pierwotniaka. Na podstawie przeprowadzonych badań okazało się, że wszystkie

gatunki rodzaju *Ostrea* wystawione na działanie *B. ostreae* mogą zostać zarażone tym pierwotniakiem. Wyjątkiem jest *O. conchaphila* = *O. lurida*, odnośnie do której istnieją jeszcze niepotwierdzone podejrzenia o wrażliwość na *B. ostreae* (13, 17, 20). Najbardziej podatne na zarażenie są osobniki starsze, powyżej 2. roku (3, 14, 25). Inwazja *B. ostreae* jest śmiertelna, połączona z długotrwałym nosicielstwem. Śnięcia ostryg zazwyczaj pojawiają się w czasie największego nasilenia inwazji (6, 14). Przebieg choroby zależy również od gatunku zaatakowanej ostrygi oraz warunków środowiskowych i hodowlanych.

Bonamia ostreae lokalizuje się w cytoplazmie hemocytów (ryc. 2, 3). Powoduje owrodożnienie skrzelii oraz uszkodzenie tkanki łącz-

nej połączone z masową infiltracją hemocytów (21) (ryc. 4, 5). Sporadycznie pierwotniak ten może również występować pozakomórkowo, pomiędzy komórkami nabłonka w jelicie, skrzelach i żołądku lub w miejscach martwicy tkanki łącznej (3) (ryc. 4, 5). Objawy kliniczne nie są charakterystyczne. Chore ostrygi może cechować osłabiona kondycja i/lub rozwarcie muszli. Przy ostrej inwazji *B. ostreae* ostrygi wykazują charakterystyczne żółtawe zabarwienie ciała oraz wrzody perforujące tkankę łączną skrzelii, płaszczu i gruczołów trawiennych, jednak rzadko są one obserwowane (21). Najczęściej jedy- ną, widoczną oznaką choroby są zwiększone, ponadnormatywne śnięcia ostryg.

Wielkość *B. ostreae* jest różna, zależnie od typu komórek. Rozróżnia się dwie formy tego pierwotniaka: komórki średnicy 2-3 μm , określane jako formy gęste, które uważane są za formy przetrwalnikowe, oraz komórki większe, do 6 μm średnicy, określane jako formy jasne, uważane za formy wegetatywne. Forma gęsta, którą cechuje zbita cytoplazma bogata w struktury rybosomopodobne, często obserwowana jest pozakomórkowo w zmienionych chorobowo tkankach (21).

Drogi zarażenia *B. ostreae* nie są jeszcze dokładnie poznane. Najbardziej prawdopodobna wydaje się droga horyzontalna, polegająca na bezpośrednim przenoszeniu się pasożyta z osobnika na osobnika (19). Pojawiło się dość kontrowersyjne, mało prawdopodobne i niepotwierdzone przypuszczenie, mówiące o obecności pierwotnia-

ka w tkance jajnikowej, co sugerowałoby możliwość przenoszenia się go drogą transowaryjną, z pokolenia na pokolenie (5). Dotychczas nie opisano również cyklu rozwojowego *B. ostrea*, dróg wejścia do organizmu ostryg, form inwazyjnych oraz potencjalnych wektorów biorących udział w przenoszeniu tego pierwotniaka (22). Choroba pojawia się i może się szerzyć przez cały rok, przy czym występuje sezonowa zmienność w inwazji *B. ostreae*. Intensywność inwazji narasta bowiem podczas ciepłych miesięcy, osiągając swój szczyt jesienią, we wrześniu, gdy temperatura wody w krajach produkujących ostrygi wynosi 12-20°C (6, 14).

Hodowla ostryg prowadzona jest w otwartych wodach mórz i oceanów. Z tego powodu leczenie tej jednostki chorobowej nie jest możliwe ze względu na ilość chemioterapeutyków potrzebnych do zastosowania oraz ich wpływu na środowisko. Stosowanie szczepień jest również niemożliwe z uwagi na fakt, że ostrygi nie wytwarzają przeciwciał (9). Jedynym sposobem walki z inwazją *B. ostreae* jest stosowanie efektywnego programu kontroli nad rozprzestrzenianiem się tej jednostki chorobowej i postępowanie epizootyczne wyrażone w odpowiednich dyrektywach i decyzjach Komisji Europejskiej oraz kodeksie OIE, minimalizujące możliwość rozprzestrzenienia się tej choroby. Dodatkowo, ważne znaczenie w zwalczaniu tej inwazji ma odpowiednia hodowla ostryg. Śnięcia spowodowane przez *B. ostreae* mogą bowiem zostać zredukowane poprzez rozrzedzenie hodowli lub hodowlę ostryg jadalnych wraz z ostrygami pacyficznymi (*Crassostrea gigas*), które nie są wrażliwe na tę inwazję (8).

Diagnostyka *B. ostreae* opiera się na stosowaniu technik badawczych pozwalających na bezpośrednie wykrycie pierwotniaka w badanym materiale. Znajdują tu zastosowanie: szybka metoda odciskowa i badanie histopatologiczne (1). Obie te metody wykonywane są jednocześnie i uważane są za standardowe. Szybka metoda odciskowa jest metodą przesiewową, polegającą na wykonaniu odcisku skrzelii lub komory serca na szkiełku podstawowym, a następnie utrwaleniu i zabarwieniu preparatu zestawem służącym do barwienia krwi. Badanie histopatologiczne, oprócz bezpośredniego wykrycia *B. ostreae*, dostarcza informacji o strukturze komórek i tkanek. Składa się ono z wielu etapów, takich jak: utrwalanie tkanki, odwadnianie, nasycenie (impregnacja), zatapianie w parafinie, przygotowanie skrawków do barwienia oraz zabarwienie hematoksyliną i eozyzną. Badanie histopatologiczne jest badaniem odwoławczym. Obserwację ultrastruktury pierwotniaków i morfologicznych różnic w jej obrębie umożliwia badanie w mikroskopie elektronowym. Stosowane jest ono jednak bardzo rzadko, ze względu na koszty, czaso- i pracochłonność (1). W diagnostyce *B. ostreae* wykorzystywane są również techniki biologii molekularnej. Z powodzeniem stosuje się metodę PCR oraz hybrydyzację *in situ*. Mają one jednak ograniczone zastosowanie z uwagi na fakt, że nie są jeszcze zwalidowane (24).

Z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że Polska jest krajem wolnym od *Bonamia ostreae*, gdyż w polskiej strefie Morza Bałtyckiego nie występują gatunki mięczaków wrażliwe na tego pierwotniaka. Teza ta

wymaga jednak potwierdzenia poprzez badanie stanu zdrowia mięczaków występujących w Bałtyku. Rozpoczęcie tego rodzaju pilotażowych badań planowane jest przez Zakład Chorób Ryb PIWet-PIB na wiosnę tego roku.

Piśmiennictwo

1. Anon.: OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Paris 2003, s. 221-229, 230-234.
2. Ardle J. F. Mc, McKiernan F., Foley H., Jones D. H.: The current status of Bonamia diseases in Ireland. Aquaculture 1991, 93, 273-278.
3. Balouet G., Poder M., Cahour A.: Haemocytic parasitosis: morphology and pathology of lesions in the French flat oyster, *Ostrea edulis* L. Aquaculture 1983, 34, 1-14.
4. Banning P. Van: Further results of the Bonamia ostreae challenge tests in Dutch oyster culture. Aquaculture 1987, 67, 191-194.
5. Banning P. Van: The life cycle of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* with a presumptive phase in the ovarian tissue of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Aquaculture 1990, 84, 189-192.
6. Banning P. Van: Observations on bonamiosis in the stock of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Netherlands, with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen. Aquaculture 1991, 93, 205-211.
7. Barber B. J., Davis C. V.: Prevalence of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* populations in Maine. J. Shellfish Res. 1994, 13, 298.
8. Bec C. Le, Mazurie J., Cochenec N., Le Coguic Y.: Influence of *Crassostrea gigas* mixed with *Ostrea edulis* on the incidence of *Bonamia ostreae*. Aquaculture 1991, 93, 263-271.
9. Berthe F. C. J., Thebault A.: E. U. Directives for control of diseases affecting bivalve molluscs: current state and prospects, Acquaculture International Conference 2003, Fish farming in mediterranean Europe: quality for developing markets, Verona 15-16. 10. 2003.
10. Bucke D., Hepper B., Key D., Bannister C. A.: A report on *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* in the UK. Cons. Inter. Explor. Mer., CM 1984/K 1984, 9, 1-7.
11. Carnegie R. B., Cochenec-Laureau N.: Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. Aquat. Living Resour. 2004, 17, 519-528.
12. Cigarría J., Elston R.: Independent introduction of *Bonamia ostreae*, a parasite of *Ostrea edulis*, to Spain. Dis. Aquat. Org. 1997, 29, 157-158.
13. Cochenec N., Renault T., Boudry P., Chollet B., Gerard A.: *Bonamia*-like parasite found in the Sumioe oyster *Crassostrea rivularis* reared in France. Dis. Aquat. Org. 1998, 34, 193-197.
14. Culloty S. C., Mulcahy M. F.: Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiosis in flat oysters (*Ostrea edulis*) on the south coast of Ireland. Aquaculture 1996, 144, 53-63.
15. Dyrektywa Rady 91/67/EWG z dnia 28 stycznia 1991 roku dotycząca warunków zdrowotnych zwierząt obowiązujących przy wprowadzaniu na rynek zwierząt i produktów akwakultury. O.J. 1991, L 46, 19. 02. 91, p. 1.
16. Elston R. A., Farley C. A., Kent M. L.: Occurrence and significance of bonamiosis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. Dis. Aquat. Org. 1986, 2, 49-54.
17. Farley C. A., Wolf P. H., Elston R. A.: A long-term study of „microcell” diseases with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g.n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp.n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp.n.). Fishery Bull. 1988, 86, 581-593.
18. Friedman C. S., Perkins F. O.: Range extension of *Bonamia ostreae* to Maine, USA. J. Invertebr. Pathol. 1994, 64, 179-181.
19. Hervio D., Bachere E., Boulo V., Cochenec N., Vuillemin V., Le Coguic Y., Cailletaux G., Mazurie J., Mialhe E.: Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster *Ostrea edulis* with the intrahaemocytic protozoan parasite *Bonamia ostreae*: application in the selection of parasite-resistant oyster. Aquaculture 1995, 132, 183-194.
20. Katkansky S. C., Dahlstrom W. A., Warner R. W.: Observations on survival and growth of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California. Calif. Fish Game 1969, 55, 69-74.
21. Kinne O.: Diseases of Marine Animals. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg 1983, s. 521, 577-580.
22. Montes J.: Lag time for the infestation of flat oyster (*Ostrea edulis* L.) by *Bonamia ostreae* in estuaries of Galicia (N.W. Spain). Aquaculture 1991, 93, 235-239.
23. Projekt Dyrektywy Rady dotyczącej wymagań zdrowotnych zwierząt i produktów akwakultury, zapobiegania i zwalczania niektórych chorób u zwierząt wodnych. COM 2005, 362, 11880/05.
24. Projekt Podręcznika Testów Diagnostycznych OIE dla Zwierząt Wodnych: OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2006, Chapter 1.2, Chapter 3.1.1.
25. Robert R., Borel M., Pichot Y., Trut G.: Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). Aquat. Living Resour. 1991, 4, 265-274.
26. Ustawa z dnia 7 stycznia 2005 roku o zmianie ustawy o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt oraz o zmianie niektórych innych ustaw. Dz. U. 2005, Nr 23, poz. 188.

Adres autora: lek. wet. Agnieszka Pękala, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: A.Pekala@piwet.pulawy.pl