

Badania nad występowaniem zakaźnego zespołu owrzodzenia (EUS) u ryb ozdobnych w Polsce

AGNIESZKA PĘKALA, EWA PAŹDZIOR, ALICJA KOZIŃSKA, MACIEJ DRAGAN*,
MARCIN SUSZYŃSKI**, WIKTOR NIEMCZUK***, MICHAŁ REICHERT

Zakład Chorób Ryb, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Klinika Weterynaryjna „Orka”, ul. Mazańcowicka 36, 43-502 Czechowice-Dziedzice

**Graniczny Inspektorat Weterynarii w Warszawie, ul. Wirażowa 35, 02-158 Warszawa

***Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Chorób Egzotycznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Pękala A., Paździor E., Kozińska A., Dragan M., Suszyński M., Niemczuk W., Reichert M.

Studies of the occurrence of the epizootic ulcerative syndrome (EUS) in ornamental fish in Poland

Summary

The aim of this study was to diagnose the presence of the fungus *Aphanomyces invadans*, the etiological agent of the epizootic ulcerative syndrome (EUS), in ornamental fish in Poland. Thirteen species of ornamental fish from Polish culture, as well as imported from Asia, Africa and South America, exhibiting haemorrhages, ulcers, and skin lesions or mortality, were examined during three years of studies. Samples from skin lesions, muscles and internal organs (kidney, liver) were collected. Each sample was inoculated on GP medium to enable mycelia to grow, as well as diagnosed directly by the PCR method. Each specimen of mycelia grown on the GP medium was examined morphologically and by the PCR technique. In total, 481 muscle samples, 497 skin samples, 133 kidney samples, and 30 liver samples were examined. The fungus *A. invadans* was not observed in cultures on the GP medium. The tests of the samples collected from the tissues and organs showing pathological signs, performed by the PCR method, were also negative. One should bear in mind that the fish examined constituted a very small percentage of the total population of ornamental fish bred in Poland and imported into our country. These examinations, performed for the first time in Poland, made it possible to evaluate the epizootic situation concerning the EUS in our country.

Keywords: *Aphanomyces invadans*, EUS, ornamental fish

Zakaźny zespół owrzodzenia (EUS – epizootic ulcerative syndrome) jest jedną z najgroźniejszych jednostek chorobowych ryb, wymienionych zarówno w dokumentach Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt, jak też aktach prawnych Unii Europejskiej (3, 11, 12). Czynnikiem etiologicznym EUS jest grzyb *Aphanomyces invadans* (synonim *A. piscicida*) (2, 7, 9, 10).

Pierwszy na świecie przypadek zakaźnego zespołu owrzodzenia stwierdzony został w Japonii w 1971 r. u ryby aju (*Plecoglossus altivelis*) (5) oraz w Australii (13). EUS jest sezonową, endemiczną jednostką chorobową, diagnozowaną w 24 krajach świata, na 5 kontynentach: Ameryka Północna i Południowa, Afryka, Azja i Australia. Ostatnie poważne ogniska choroby wystąpiły w 2008 r. w Zambii oraz w 2011 r. w Kanadzie (12). Do wybuchu EUS dochodzi zwykle po silnych opadach deszczu, przy temperaturze wody wynoszącej 18-22°C (7). Bardzo ważnym czynnikiem

predysponującym do wystąpienia choroby jest stres, głównie środowiskowy (9).

Na inwazję *A. invadans* wrażliwych jest około 94 gatunków ryb, zarówno wolno żyjących, jak i hodowlanych, zamieszkujących wody słodkie oraz estuaria (12). W obrazie klinicznym zakaźny zespół owrzodzenia charakteryzuje się występowaniem owrzodzeń skóry, które zlokalizowane są przeważnie w części grzbietowej ryby. W wielu przypadkach dochodzi do uszkodzenia nerek (9), mózgu i rdzenia kręgowego (15). Zmiany wywołane przez *A. invadans* doprowadzają zwykle do śnięć ryb, a śmiertelność przekracza 50% obsady (11). Zakażenie następuje drogą horyzontalną, przez inwazyjne, czynnie pływające w wodzie zoospory (10).

Swobodne przekraczanie granic państwowych oraz praktycznie nieograniczone możliwości transportu spowodowały, że problem introdukcji zakaźnego zespołu owrzodzenia do Europy, w tym także do Polski, jest jak

najbardziej realny. Sprzyja temu wzmożony import ryb ozdobnych, szczególnie sprowadzonych z ich naturalnego środowiska (18). Wiedza z zakresu wrażliwości ryb hodowlanych występujących na terenie Polski na inwazję grzyba *A. invadans* oraz potencjalnej możliwości adaptacji i rozwoju tego czynnika chorobowego na obszarze naszego kraju jest wciąż niewielka. Z dostępnej literatury wiadomo jedynie, że występują u nas gatunki ryb, u których może rozwinąć się EUS. Należą do nich: karaś złocisty (*Carassius auratus auratus*), pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss*) oraz rodzina sumowatych (*Siluridae*) (8, 14, 17), a w przypadku ryb akwariowych – gurami dwupłame (*Trichogaster trichopterus*) (11).

Celem pracy jest przedstawienie wyników trzyletnich badań przeprowadzonych w celu wykrycia inwazji grzyba *A. invadans* u ryb ozdobnych w Polsce wykazujących objawy kliniczne charakterystyczne dla EUS.

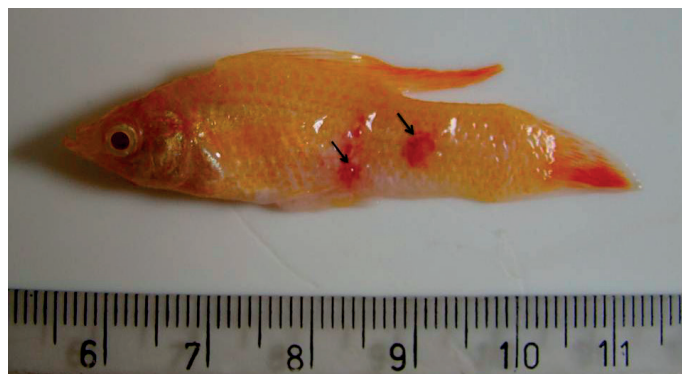
Materiał i metody

Zakład Chorób Ryb PIWet-PIB, jako krajowe laboratorium referencyjne chorób ryb, opracował i wdrożył metody diagnostyki EUS. Badania przeprowadzone w latach 2010-2012 dotyczyły trzynastu gatunków ryb ozdobnych, takich jak: gurami dwupłame (*Trichogaster trichopterus*), prętnik karłowaty (*Colisa lalia*), neon czerwony (*Paracheirodon axelrodi*), *Tropheus kiriza*, skalary (*Pterophyllum* spp.), dyskowce (*Symphysodon* spp.), molinezje (*Mollinnesia* spp.) i karpie koi (*Cyprinus carpio*). Badaniom poddawano tylko te osobniki, u których obserwowano wybroczyny, owrzodzenia i ubytki skóry oraz apatię i śnięcia (ryc. 1). Do Zakładu Chorób Ryb PIWet-PIB w Puławach przesyłane były ryby pochodzące z polskich hodowli oraz sklepów zoologicznych. Znaczną część próbek stanowiły również ryby pozyskane bezpośrednio z importu z Azji, Afryki oraz Ameryki Południowej, przesyłane za pośrednictwem Granicznego Inspektoratu Weterynarii lub też bezpośrednio przez hodowców.

W trzyletnim okresie badań pozyskano materiał od 453 ryb ozdobnych. Były to fragmenty zmienionych chorobowo tkanek i narządów, z których przygotowano 481 próbek mięśni, 497 próbek skóry, 133 próbek nerki oraz 30 próbek wątroby.

Diagnostyka EUS opierała się przede wszystkim na badaniu klinicznym ryb połączonym z analizą warunków środowiskowych. Do badań pobierano wycinki z chorobowo zmienionej skóry i mięśni oraz z narządów wewnętrznych (nerka, wątroba). Każda próba została podzielona na dwie części. Jedną posiewano na podłoże GP (agar glukozowo-peptonowy z dodatkiem penicyliny oraz kwasu oksolinoowego), a drugą wykorzystywano bezpośrednio do diagnostyki techniką PCR (11).

Wycinki tkanek i/lub narządów wielkości 2 mm² umieszczano bezpośrednio na pożywce GP przygotowanej przez Pracownię Pożywek PIWet-PIB i inkubowano w 27 ± 1°C, obserwując wzrost grzybni co 24 godziny. Po trzech dniach inkubacji wzrastające grzybnie przenoszono na nowe podłoże GP. Czynność tę powtarzano aż do pozbycia się zanieczyszczeń (11), po czym na podstawie morfologii wy-



Ryc. 1. Owrzodzenia i wybroczyny widoczne na skórze u mi-czyka. Fot. M. Dragan

rosłych grzybni przeprowadzono ich wstępną identyfikację. Ponadto każda z grzybni identyfikowana była metodą PCR celem potwierdzenia lub wykluczenia jej przynależności do gatunku *A. invadans*.

Isolację DNA, zarówno z grzybni, jak też z tkanek, przeprowadzono przy użyciu zestawu DNeasy Blood & Tissue Kit (firmy Qiagen), zgodnie z instrukcją producenta. Wyzolowany materiał został użyty do przeprowadzenia PCR w kierunku obecności *A. invadans*. Reakcję amplifikacji z użyciem pary starterów Ainvad-2F/Ainvad-ITSR1 przeprowadzono według procedury opisanej przez Vandersea i wsp. (19), wprowadzając własne modyfikacje dotyczące objętości mieszaniny reakcyjnej, stężenia starterów i jonów magnezu oraz optymalnej temperatury przyłączenia starterów. Po zoptymalizowaniu warunków reakcji w skład 25 µl mieszaniny reakcyjnej wchodziły: woda jałowa, 5 × bufor Green GoTaq (Promega), 2,25 mM MgCl₂ (Promega), 0,05 mM dNTPs (Invitrogen), 0,2 µM każdego ze starterów, 2,5 U GoTaq polimeraza (Promega) oraz wyizolowane DNA. Reakcja amplifikacji przebiegała według następującego profilu termicznego: denaturacja wstępna – 95°C przez 2 min., denaturacja – 95°C przez 30 s, przyłączanie starterów – 56°C przez 45 s, synteza nici DNA – 72°C przez 2 min. 30 s, końcowe wydłużanie nici DNA – 72°C przez 5 min. Reakcję amplifikacji przeprowadzono w 35 cyklach. Produkty PCR poddawano rozdzielni elektroforetycznej w 2% żelu agarozowym, zawierającym bromek etydyny o stężeniu 0,5 mg/ml w buforze 1 × TBE. Wielkość specyficznych produktów amplifikacji wynosiła około 234 pz.

Jako kontroli dodatniej używano inaktywowanych zoospor grzyba *A. invadans* pozyskane z The Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (CEFAS) w Wielkiej Brytanii.

Wyniki i omówienie

W posiewach wykonanych z wycinków tkanek i/lub narządów ryb ozdobnych na podłożu GP zaobserwowano wzrost różnych rodzajów grzybni. Żadna z nich morfologicznie nie była podobna do *A. invadans*, co potwierdziły ujemne wyniki PCR w kierunku wykrywania obecności kwasu nukleinowego *A. invadans*. Bezpośrednie badania próbek pobranych z chorobowo zmienionej skóry, mięśni oraz narządów wewnętrznych techniką PCR dały również wyniki ujemne.

Przeprowadzone badania nie wykazały obecności grzyba *A. invadans* w materiale pobranym od ryb, u których obserwowano objawy chorobowe podobne do tych, charakterystycznych dla EUS. Można więc przypuszczać, że na terytorium Polski nie występuje zakaźny zespół owrzodzenia. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że przebadane ryby stanowiły jedynie niewielki procent całej populacji ryb ozdobnych, hodowanych, ale głównie sprowadzanych do naszego kraju. Sytuacja ta wynika z trudności w pozyskaniu materiału do badań. Regulacje prawne dotyczące stanu zdrowia zwierząt akwakultury, opisane w dyrektywie Rady 2006/88/WE (3), które obowiązują wszystkie państwa Wspólnoty Europejskiej, nie obejmują bowiem kwestii dotyczących stanu zdrowotnego ozdobnych zwierząt wodnych hodowanych w akwariach niekomercyjnych (artykuł 2). Z przedstawionego zapisu wynika jednoznacznie, że ryby ozdobne mogą zostać sprowadzone z najodleglejszych i najbardziej egzotycznych zakątków świata, bez kontroli lekarsko-weterynaryjnej dotyczącej ich stanu zdrowia.

Brak nadzoru nad przemieszczaniem ryb ozdobnych w zestawieniu z wartością ryb odłowionych z ich naturalnego środowiska, a co za tym idzie – wzmożonym ich importem powoduje, że otwarte są granice dla bardzo wielu czynników chorobowych (18). Szczególnie groźne jest to w odniesieniu do patogenów, które nie występują na terenie Europy, a do takich właśnie, zgodnie z obowiązującą dyrektywą Rady 2006/88/WE, zalicza się EUS (3). Według opinii Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA, European Food Safety Authority), istnieje duże prawdopodobieństwo, iż grzyb *A. invadans* został już wprowadzony na terytorium Unii Europejskiej, bezpośrednio z rybami ozdobnymi sprowadzanymi z krajów trzecich. Przypuszcza się nawet, że zainfekowane ryby mogły dostać się już do wód Wspólnoty (18). Na terytorium Unii Europejskiej nie odnotowano jednak żadnych ognisk zakaźnego zespołu owrzodzenia i brak jest dowodów na to, że *A. invadans* może mieć potencjalnie szkodliwy wpływ na środowisko. Na podstawie wniosków określonych przez EFSA, jak również dowodów naukowych wydana została dyrektywa wykonawcza Komisji nr 2012/31/WE z dnia 25 października 2012 r., mówiąca m.in. o wykreśleniu zakaźnego zespołu owrzodzenia z wykazu chorób egzotycznych części II załącznika IV do dyrektywy Rady 2006/88/WE (4). EUS nie jest już więc uważany za egzotyczną jednostkę chorobową w Europie.

Wpływ na stanowisko EFSA miał zapewne przypadek pierwszego w Europie zdiagnozowania zakaźnego zespołu owrzodzenia, które miało miejsce w Austrii w 2010 r. Grzyb *A. invadans* został wykryty u prętnika karłowatego (*Colisa lalia*), gurami dwupłamego (*Trichogaster trichopterus*) oraz gatunku *Paracheirodon axelrodi* sprowadzonych odpowiednio z Wietnamu, Tajlandii i Brazylii (6). Przypadek ten stanowi więc potwierdzenie realnego zagrożenia

dla szeroko rozumianego środowiska wodnego, jakie niesie ze sobą introdukcja egzotycznych i zakaźnych czynników chorobowych powszechnie obecnych w krajach, z których sprowadzane są ryby ozdobne. Zagrożeniu temu sprzyjają niewątpliwie nieadekwatne procedury weterynaryjne regulujące kwestie importu ryb ozdobnych z krajów trzecich, co wyraźnie podkreślają naukowcy zajmujący się obecnie występowaniem i rozprzestrzenianiem EUS (6, 16).

Czas pokaże, czy zakaźny zespół owrzodzenia stanowi zagrożenie dla stanu zdrowia ryb bytujących w wodach Europy, w tym również w wodach Polski. Jak wykazały badania, na terenie naszego kraju występują gatunki ryb hodowlanych wrażliwe na inwazję grzyba *A. invadans* (8, 14, 17). Biorąc pod uwagę stanowisko EFSA dotyczące EUS, jak również warunki środowiskowe potrzebne do rozwoju tej jednostki chorobowej, można stwierdzić, że prawdopodobieństwo wystąpienia zakaźnego zespołu owrzodzenia w Polsce realne jest jedynie w hodowlach sumów afrykańskich (*Claris geriepinus*) oraz sumowatych (*Siluridae*) (1). Czynnikiem sprzyjającym rozwojowi grzyba *A. invadans* jest w tym przypadku wysoka temperatura wody, w której prowadzona jest hodowla tych ryb.

Podsumowując należy podkreślić, iż dzięki opracowaniu i wdrożeniu w ZCHR PIWet-PIB odpowiednich metod diagnostycznych umożliwiających wykrywanie grzyba *A. invadans* możliwe było przeprowadzenie, po raz pierwszy w Polsce, badań nad występowaniem zakaźnego zespołu owrzodzenia na terenie naszego kraju. Badania te umożliwiły wstępne zorientowanie się w sytuacji epizootycznej dotyczącej tej jednostki chorobowej. Fakt, że nie wykryto *A. invadans* w pobranych próbkach, nie oznacza, że zakaźny zespół owrzodzenia nie występuje na terenie naszego kraju. W Zakładzie Chorób Ryb PIWet-PIB z pewnością prowadzone będą dalsze badania nad sytuacją epizootyczną w odniesieniu do tej jednostki chorobowej.

Piśmiennictwo

1. Antychowicz J., Matras M., Borzym E.: Epizootyczny zespół wrzodowy (EUS), [w:] Diagnostyka i zwalczanie zakaźnych chorób ryb. PIWet-PIB, Puławy 2009, 47-61.
2. Blazer V. S., Lilley J. H., Schill W. B., Kiryu Y., Densmore C. L., Panyawachira V., Chinabut S.: Aphanomyces invadans in Atlantic menhaden along the East Coast of the United States. J. Aquat. Anim. Health 2002, 14, 1-10.
3. Dyrektywa Rady 2006/88/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. Dz. U. L 328/44 z 24. 11. 2006.
4. Dyrektywa wykonawcza Komisji 2012/31/UE z dnia 25 października 2012 r. zmieniająca załącznik IV do dyrektywy Rady 2006/88/WE w odniesieniu do wykazu gatunków ryb podatnych na wirusową posocnicę krwotoczną oraz do wykreślenia wpisu dotyczącego zakaźnego zespołu owrzodzenia. Dz. U. L 297/26 z 26. 10. 2012.
5. Egusa S., Masuda N.: A new fungal disease of Plecoglossus altivelis. Fish Pathol. 1971, 6, 41-46.
6. El-Matbouli M., Saleh M., Soliman H.: Biosecurity risk associated with EUS and Iridovirus in ornamental fishes. 14th Annual meeting of the National Reference Laboratories for Fish Diseases and workshop on reagents and diagnostics kit for the detection of fish diseases. Arhus, Denmark 2010, s. 33-34.
7. Fraser G. C., Callinan R. B., Calder L. M.: Aphanomyces species associated with red spot disease: an ulcerative disease of estuarine fish from eastern Australia. J. Fish Dis. 1992, 15, 173-181.

8. Khan M. H., Marshall L., Thompson K. D., Lilley J. H.: Susceptibility of five fish species (Nile tilapia, rosy barb, rainbow trout, stickleback and roach) to intramuscular injection with the Oomycete fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 1998, 18, 192-197.
9. Kiryu Y., Shields J. D., Vogelbein W. K., Zwerner D. E., Kator H., Blazer V. S.: Induction of skin ulcers in Atlantic menhaden by injection and aqueous exposure to *Aphanomyces invadans*. J. Aquat. Anim. Health 2002, 14, 11-24.
10. Lilley J. H., Callinan R. B., Chinabut S., Kanchanakhan S., MacRae I. H., Phillips M. J.: Epizootic ulcerative syndrome (EUS) technical handbook. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand 1998, 17-24.
11. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. World Organization for Animal Health, Paris 2009.
12. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. World Organization for Animal Health, Paris 2012.
13. McKenzie R. A., Hall W. T. K.: Dermal ulceration of mullet (*Mugil cephalus*). Aust. Vet. J. 1976, 52, 230-231.
14. Miyazaki T.: Comparison among mycotic granulomatosis, saprolegniasis and anaaki-byo in fishes: a Japanese experience, [w:] Roberts R. J., Campell B., MacRae I. H.: Proc. of the ODA Regional Seminar on epizootic ulcerative syndrome. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand 1994, s. 253-270.
15. Miyazaki T., Egusa S.: Studies on mycotic granulomatosis in fresh water fishes. Mycotic granulomatosis in goldfish. Fish Path. 1972, 7, 15-25.
16. Oidtmann B.: Diagnosis of *Aphanomyces invadans* (Epizootic ulcerative syndrome, EUS). 14th Annual meeting of the National Reference Laboratories for Fish Diseases and workshop on reagents and diagnostics kit for the detection of fish diseases. Arhus, Denmark 2010, s. 40.
17. Oidtmann B., Steinbauerv P., Geiger S., Hoffmann R. W.: Experimental infection and detection of *Aphanomyces invadans* in European catfish, rainbow trout and European eel. Dis. Aquat. Org. 2008, 82, 195-207.
18. Scientific opinion on Epizootic Ulcerative Syndrome. EFSA Panel on Animal Health and Welfare. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy (EFSA Journal 2011, 9 (10), 2387).
19. Vandersea M. W., Litaker R. W., Yonish B., Sosa E., Landsberg J. H., Pullinger Ch., Moon-Butzin P., Green J., Morris J. A., Kator H., Noga E. J., Tester P. A.: Molecular assays for detecting *Aphanomyces invadans* in ulcerative mycotic fish lesions. App. Environ. Microbiol. 2006, 72, 1551-1557.

Adres autora: dr Agnieszka Pękala, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy; Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: A.Pekala@piwet.pulawy.pl