

Andrzej K. Siwicki<sup>1</sup>, Barbara Kazuń<sup>1</sup>, Krzysztof Kazuń<sup>1</sup>, Edward Głąbski<sup>1</sup>,  
Ewa Szczucińska<sup>2</sup>, Elżbieta Terech-Majewska<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Patologii i Immunologii Ryb, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

<sup>2</sup>Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie

<sup>3</sup>Katedra Epizootiologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie

## Bakteryjna choroba skrzelii (BGD) – nowe zagrożenie w hodowli pstrąga tęczowego w Polsce

### Wstęp

W ostatnim dziesięcioleciu w krajach Unii Europejskiej oraz w USA i Kanadzie nasila się nowa jednostka chorobowa określana jako bakteryjna choroba skrzelii (Bacterial Gill Disease-BGD) wywoływana przez *Flavobacterium branchiophilum*. Dotychczas choroba ta była uważana za nową formę bakteryjnej choroby skrzelii, opisaną już w 1948 roku jako bakteryjna choroba zimnej wody (Bacterial Coldwater Disease). Początkowo w latach 80. ubiegłego stulecia śmiertelność narybku pstrąga tęczowego w gospodarstwach o intensywnym profilu produkcji wynosiła do 20%. Nowe zjawisko chorobowe u wylęgu w intensywnych podchowach określił Lorenzen (1994) jako syndrom wylęgu pstrąga tęczowego (Rainbow Trout Fry Syndrome). W ostatnim dziesięcioleciu obserwuje się gwałtowny wzrost śmiertelności wylęgu i narybku pstrąga tęczowego, dochodzący w niektórych krajach nawet do 80% (Dania, Francja). Intensywne badania wykluczyły to wirusowe, a za przyczynę śnięć uznano *Flavobacterium branchiophilum*. Od tego czasu podjęto liczne badania dotyczące charakterystyki czynnika etiologicznego oraz określenia czynników predysponujących do wystąpienia choroby (Daskalov i in. 2000). Czynnikiem patogennym *F. branchiophilum* to jasnożółta bakteria Gram ujemna, powszechnie występująca w wodach śródlądowych i morskich, zaliczana do bakterii warunkowo chorobotwórczych. Aktualnie uważa się, że bakterie te wchodzi w skład normalnej flory bakteryjnej śluzu zdrowych ryb. Bardzo istotnym zjawiskiem jest fakt, że wraz ze zwiększającym się stopniem eutrofizacji jezior oraz zanieczyszczeniem środowiska wodnego zwiększa się miano tych bakterii. Doskonale rozwijają się na zalegającej na dnie basenów karmie, w różnym pH i temperaturze wody (od 4 do 20°C). Bakteria ta jest patogenna nie tylko dla ryb łososiowatych, ale stwierdza się ją również u karpia, amura, lina, szczupaka, suma i węgorza. Jednakże najczęściej występuje

u ryb łososiowatych (pstrąg tęczowy, potokowy, źródlany, łosoś atlantycki). Atakuje ryby w pierwszym roku życia, a straty dochodzą nawet do 50%. Bardzo istotnym źródłem zakażenia są ryby wolno żyjące w rzekach przy których znajdują się gospodarstwa rybackie. Bezspornie udowodniono, że w wielu przypadkach jedynym źródłem zakażenia były dziko żyjące pstrągi tęczowe. Uważa się, że czynnikami predysponującymi do wystąpienia choroby są: intensywny podchów wylęgu, postępująca eutrofizacja oraz skażenie środowiska, stres manipulacyjny, niewłaściwa dieta pokarmowa, szczególnie u młodocianych form rozwojowych z niedoborem witamin i mikroelementów.

Wszystkie wyżej wymienione czynniki powodują zachwianie równowagi pomiędzy patogenem warunkowo chorobotwórczym, występującym w organizmie i środowisku, a układem odpornościowym, co predysponuje do uaktywnienia się *F. branchiophilum*. Liczne badania wykazały, że bakteria ta jest bardzo zmienna pod względem patogenności dla różnych wiekowiec ryb. Temperatura wody również determinuje pojawienie się choroby (Ekman i in. 1999, Kozińska i Pękala 2007).

Bakteryjna choroba skrzelii, nasilająca się w ostatnich latach w intensywnych hodowlach, pojawia się najczęściej na wiosnę w temperaturze wody powyżej 10°C. Objawy chorobowe u wylęgu dotyczą głównie skrzelii. Obserwuje się: błądź skrzelii, zwiększone wydzielanie śluzu, złuszczenie się nabłonka skrzelowego, ogniskową martwicę lub całkowite zniszczenie listków skrzelowych.

U starszych ryb (narybek) objawy chorobowe oraz zmiany dotyczą również skóry, gdzie pojawiają się najpierw odbarwienia, a następnie w bardzo krótkim czasie ogniska martwicze, głównie w okolicy płetw grzbietowych i ogonowych. Śnięcia rozpoczynają się już w kilkadziesiąt godzin po pojawieniu się odbarwień.

Rozpoznawanie tej jednostki chorobowej oparte jest na badaniach klinicznych, anatomopatologicznych i bakte-

riologicznych. Leczenie jest bardzo trudne i wymaga długotrwałego podawania chemioterapeutyków, a efekty w wielu przypadkach są mało zadowalające.

Zakład Patologii i Immunologii Ryb IRS we współpracy z Katedrą Epizootologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie podjął badania nad opracowaniem skutecznych metod profilaktyki i terapii bakteryjnej choroby skrzelii wywołanej przez *F. branchiophilum*. Celem badań było określenie wpływu patogennej bakterii *F. branchiophilum* na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne.

## Materiał i metody

Badania przeprowadzono na narybku pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) o masie ciała ok. 20 g, przechowywanym w temperaturze 10-11°C, u którego stwierdzono objawy kliniczne wskazujące na rozwój bakteryjnej choroby skrzelii. Wykonane badania bakteriologiczne (wymaz ze skrzelii) wykazały obecność na listkach skrzelowych bakterii *Flavobacterium branchiophilum*. Grupę kontrolną stanowiły ryby klinicznie zdrowe, u których nie stwierdzono zmian wskazujących na toczący się proces chorobowy, a badania bakteriologiczne nie wykazały obecności bakterii *Flavobacterium branchiophilum* na listkach skrzelowych.

Od 20 ryb ze zmianami chorobowymi na skrzelach oraz od 20 ryb zdrowych (grupa kontrolna) pobierano krew do badań immunologicznych, które pozwolą na określenie wpływu zakażenia *Flavobacterium branchiophilum* na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne. W tym celu izolowano leukocyty z pełnej krwi po wirowaniu zawiesiny komórek w gradiencie Gradisolu G (Polfa). Aktywność metaboliczną fagocytów określano na podstawie wewnątrzkomórkowego wybuchu tlenowego (RBA (Respiratory Burst Activity), aktywność bójczą fagocytów (PKA – Potential Killing Activity) oznaczano metodą spektrofotometryczną opisaną przez Siwickiego i in. (1993). W surowicy oznaczano aktywność lizozymu oraz poziomy białka całkowitego i gammaglobulin (Ig) metodą spektrofotometryczną opisaną przez Siwickiego i in. (1993).

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej wykorzystując program Statistica for Windows 7.1 (Stat-Soft, Inc. 2004). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Za statystycznie istotne przyjęto różnice na poziomie istotności  $P < 0,05$ .

## Wyniki badań i dyskusja

Flawobakteriozy uważane są za mało poznane jednostki chorobowe wywołane przez bakterie z rodzaju *Flavobacterium*, które charakteryzują się dużą patogennością dla ryb. Najbardziej rozpowszechnioną jest choroba kolumnowa wywoływana przez *F. columnaris*, która występuje

u wielu gatunków ryb na całym świecie. Bakteria *F. psychrophilum* wywołująca tzw. chorobę zimnej wody (CWD – cold water disease) powoduje również duże straty, szczególnie w hodowli ryb łososiowatych. Najmniej poznana jest *F. branchiophilum*, która w ostatnich latach powoduje znaczące straty ekonomiczne w hodowli różnych gatunków ryb. Pojawienie się różnych gatunków *Flavobacterium* w ostatnim czasie może być związane zarówno z niekorzystnym wpływem anomalii pogodowych, jak też wzrostem zanieczyszczenia środowiska wodnego. Trudno jest ocenić dokładną przyczynę zwiększonej zachorowalności ryb oraz źródeł zakażeń, ponieważ badania nad tą grupą drobnoustrojów prowadzone są w Polsce w ograniczonym zakresie (Bernad i in. 2004). Opisane przypadki flawobakterioz w Polsce wskazują na potrzebę podjęcia szerszych badań diagnostycznych i epizootologicznych (Kościńska i Pękała 2007). Szczególnie istotne są badania mające na celu określenie mechanizmów patogenności tych bakterii dla różnych gatunków ryb.

Badania własne miały na celu określenie wpływu zakażenia *F. branchiophilum* na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne u narybku pstrąga tęczowego. Uzyskane wyniki badań, które przedstawiono w tabeli 1 jednoznacznie wykazały, że w czasie przebiegu choroby stwierdzono statystycznie istotny ( $P < 0,05$ ) spadek aktywności metabolicznej i bójczej fagocytów izolowanych z krwi. Równocześnie obserwowano statystycznie istotny ( $P < 0,05$ ) spadek aktywności lizozymu oraz poziomów białka całkowitego i Ig w surowicy.

TABELA 1

Wpływ zakażenia *Flavobacterium branchiophilum* na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne u narybku pstrąga tęczowego

Parametry immunologiczne	Ryby zdrowe	Ryby z objawami BGD
Aktywność metaboliczna fagocytów (RBA) (OD 620 nm)	0,36 ± 0,05	0,20 ± 0,03*
Aktywność bójczą makrofagów (PKA) (OD 620 nm)	0,43 ± 0,04	0,24 ± 0,04*
Aktywność lizozymu w surowicy (mg/l)	21,0 ± 1,8	13,5 ± 2,5*
Poziom gammaglobulin (Ig) w surowicy (g/l)	9,8 ± 1,2	6,5 ± 0,8*
Poziom białka całkowitego w surowicy (g/l)	58,5 ± 3,5	51,5 ± 2,0*

$n=10$ ; średnie wartości ± SD; \*statystycznie istotne  $P < 0,05$

Analiza uzyskanych wyników badań immunologicznych sugeruje, że bakteria *F. branchiophilum* indukuje silną immunosupresję na poziomie komórkowym i humoralnym. Dotyczy to aktywności fagocytów krwi oraz humoralnych czynników odporności wrodzonej, odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego. Wyniki badań sugerują, że wysoka patogenność i ostry przebieg choroby z masowymi śnięciami, sięgającymi nawet 100% obsady, są spowodowane silnym negatywnym oddziaływaniem tych bakterii na nieswoiste mechanizmy obronne i odporność przeciwwakaźną. Obserwowane

zjawisko obniżenia nieswoistych komórkowych i humoralnych mechanizmów obronnych w przebiegu bakteryjnej choroby skrzelii wywołanej przez *F. branchiophilum* wymaga odpowiedniego postępowania profilaktycznego i terapeutycznego. Badania w tym kierunku są prowadzone w Zakładzie Patologii i Immunologii Ryb IRS, a uzyskane wstępne wyniki są wysoce zadowalające.

## Literatura

Bernad A., Terech-Majewska E., Siwicki A.K. 2004 – Choroba zimnej wody – przypadek w jednym z gospodarstw rybackich na terenie wojewódz-

stwa warmińsko-mazurskiego – Ochrona Zdrowia Ryb – aktualne problemy – Wyd. IRS, Olsztyn: 168.

Daskalov H., Robertson P.A., Austin B. 2000 – Influence of oxidized lipids in diets on the development of rainbow trout fry syndrome – J. Fish Dis. 23: 7-14.

Ekman E., Borjeson H., Johansson N. 1999 – *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic salmon *Salmo salar* brood fish and their offspring – Dis. Aquat. Organ. 37: 159-163.

Kozińska A., Pękala A. 2007 – Przypadki flawobakterioz u pstrągów i karpia hodowanych w Polsce – Med. Weter. 63: 858-863.

Lorenzen E. 1994 – Studies of *Flavobacterium psychrophilum* in relation to rainbow trout fry syndrome (RTFS) – PhD thesis, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.

Siwicki A.K., Anderson D.P. 1993 – Nonspecific defence mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs, and total immunoglobulin (Ig) level in serum. Fish Diseases Diagnosis and Prevention Methods, FAO-Project GCP/INT/526/JAN, IFI Olsztyn: 105-112.

Przyjęto po recenzji 24.11.2010 r.

---

## BACTERIAL GILL DISEASE (BGD) – A NEW THREAT TO REARING RAINBOW TROUT IN POLAND

Andrzej K. Siwicki, Barbara Kazuń, Krzysztof Kazuń, Edward Głąbski, Ewa Szczucińska, Elżbieta Terech-Majewska

**ABSTRACT.** The aim of the study was to determine the influence of infection induced by *Flavobacterium branchiophilum* on the nonspecific cell-mediated and humoral-mediated immunity in rainbow trout fingerlings. Rainbow trout (20 g body weight) with dystrophic changes in the gills were examined. *Flavobacterium branchiophilum* was isolated from the gills and bacterial gill disease (BGD) syndrome was observed. When the first symptoms of BGD appeared, blood from 20 diseased and 20 healthy fish was drawn to examine the respiratory burst activity (RBA) and potential killing activity (PKA) of blood phagocytes. The lysozyme activity and total protein and gammaglobulin (Ig) levels were also examined. A strong immunosuppressive effect was observed in fish with BGD during the present immunological studies, and all immunological parameters were statistically significantly lower in fish with BGD syndrome in comparison to those of healthy fish. The preliminary study indicated that BGD has a strong suppressive effect on blood phagocyte activity and nonspecific humoral-mediated immunity.

**Keywords:** rainbow trout, *Flavobacterium branchiophilum*, cell-mediated and humoral-mediated immunity