



Andrzej K. Siwicki¹, Elżbieta Terech-Majewska²

¹Zakład Patologii i Immunologii Ryb Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

²Katedra Epizootologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie

Zakaźna martwica układu krwiotwórczego ryb łososiowatych (IHN): aktualny stan wiedzy oraz wpływ wirusa IHN na układ odpornościowy

W ostatnich latach obserwuje się w Europie znaczny wzrost zachorowalności wylęgu podchowanego i narybku pstrąga tęczowego na zakaźną martwicę układu krwiotwórczego (Infectious haematopoietic necrosis – IHN). Podjęte badania wykazały, że wirus IHN izolowany w Europie posiada podobną strukturę do wirusa IHN izolowanego w USA (Essbauer i in. 2001). W Polsce stwierdzono występowanie wirusa IHN (Terech-Majewska i in. 2000, Antychowicz i in. 2001) jedynie w latach 2000-2001. W następnych latach nie notowano tej choroby w naszym kraju. Jednakże w ostatnich dwóch latach stwierdzono obecność wirusa IHN u narybku pstrąga tęczowego, u którego nie obserwowano objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych wskazujących na występowanie choroby. Przypuszcza się, że znaczący import ikry mógł być bezpośrednią przyczyną pojawienia się wirusa IHN w Polsce.

Wirus IHN posiada charakterystyczną budowę przypominającą pocisk z jednej strony zaokrąglony. Jest stosunkowo dużym wirusem, a długość wirionu mieści się w granicach 150-190 nm, przy średniej szerokości wynoszącej 70 nm. Posiada bardzo grubą otoczkę lipoproteinową, która w odróżnieniu od wirusa VHS ma igiełkowate wypustki przypominające szczotkę. Wirion zbudowany jest z pojedynczego łańcucha RNA. Badania właściwości antygenowych wirusa IHN wykazały, że nie jest on jednorodny. Dzięki zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych określono aż pięć typów wirusa. Intensywne badania nad molekularną budową wirusa IHN, ze szczególnym uwzględnieniem budowy genomu wykazały, że zawiera on swoisty gen NV, który odróżnia go od innych wirusów należących do rodziny *Rhabdoviridae*. W związku z powyższym zaliczono ostatecznie wirus IHN do rodzaju *Novirhabdovirus* (Ammayapan i in. 2010, Guz 2010).

Cechą charakterystyczną wirusa IHN jest bardzo duża oporność na niskie temperatury. W temperaturze od –20°C

do –90°C nie zmienia swoich właściwości oraz zachowuje zakaźność przez wiele lat. Badania własne wykazały, że nawet przetrzymywanie wirusa w ciekłym azocie przez ponad rok nie zmieniło jego właściwości. Jest natomiast bardzo wrażliwy na niskie pH. Już w pH 3 następuje natychmiastowa (po 1-2 sek.) inaktywacja wirusa, natomiast w pH 4 do pH 10 utrzymuje zdolność do zakażenia. Równocześnie jest wrażliwy na wysuszenie, gdzie następuje bardzo szybka jego inaktywacja. W temperaturze do 60°C inaktywacja następuje już po 30 min, natomiast w niższych temperaturach potrafi zachować swoją zakaźność przez wiele tygodni: w temperaturze 20-21°C przez 6 tyg., w 15°C przez 4 mies., w 10°C już 9 mies. oraz w temperaturze 4°C ponad 9 mies. Badania prowadzone w warunkach *in vitro* na hodowlach komórkowych wykazały, że wzrost i zmiany cytopatyczne stwierdza się w bardzo szerokim zakresie temperatur od 4°C aż do 18°C. Badania prowadzone przez różne zespoły badawcze oraz badania własne wykazały, że optymalne temperatury dla wzrostu wirusa IHN mieszczą się w przedziale 10-15°C. Ten szeroki zakres optymalnych temperatur świadczy o dużej zdolności adaptacyjnej tego wirusa (Ahne i Kurstak 1989).

Badania dotyczące patogenności wirusa IHN wykazały, że poszczególne szczepy, a nawet izolaty pochodzące z różnych regionów wykazują znaczne różnice w zjadliwości, zarówno w zakażeniach naturalnych, jak i eksperymentalnych. Wirus IHN wykazuje swoją patogenność w temperaturze poniżej 18°C, ale stwierdzono, że niektóre serotypy stają się patogenne dopiero w temperaturze poniżej 14°C. Badania terenowe i eksperymentalne pozwoliły ustalić, że okres inkubacji choroby jest ściśle uzależniony od wieku ryby oraz temperatury wody i wynosi od 5 do 14 dni (Roberts 1978, Guz 2010).

Obserwacje prowadzone w wielu krajach, a szczególnie w Europie wykazały, że występują dwa sezony pojawiania się choroby:

- w okresie wiosennym, gdy następuje wzrost temperatury,
- w okresie jesiennym, gdy występują gwałtowne spadki temperatur.

W temperaturach pomiędzy 10°C a 15°C wirus wywołuje chorobę o przebiegu ostrym. Poniżej 10°C choroba przyjmuje postać przewlekłą, podczas gdy w temperaturze powyżej 15°C obserwuje się uspokojenie i zanik objawów chorobowych. Liczne badania wykazały, że gwałtowny zanik objawów chorobowych w temperaturze powyżej 15°C jest wynikiem aktywacji humoralnych mechanizmów obronnych z intensywną produkcją interferonu. I właśnie to zjawisko jest dziś wykorzystywane do opracowania skutecznych metod immunoprofilaktyki nieswoistej przy tej jednostce chorobowej.

W Europie obserwuje się gwałtowny wzrost zapadalności młodocianych form pstrąga tęczowego na tę chorobę wirusową. Szczególnie narybek jest bardzo wrażliwy na zakażenia. Wrażliwość gwałtownie spada przy wzroście masy ciała ryb. Ryby starsze mają wystarczający potencjał odporności przeciwwirusowej i są w stanie obronić się przed wirusem IHN. Ale w tym miejscu należy wyraźnie podkreślić, że inne gatunki ryb łososiowatych są mniej wrażliwe na ten wirus, który nie powoduje u nich tak dużych strat, jak w przypadku pstrąga tęczowego. Aktualnie prowadzone są intensywne badania nad wrażliwością różnych gatunków ryb łososiowatych na wirus IHN. Równocześnie wykazano, że bardzo wrażliwy jest szczupak, a szczególnie młodociane formy rozwojowe. W ostatnich latach duże straty w podchowach szczupaka były wiązane przyczynowo z wirusem IHN. Obserwacje prowadzone w ostatnich kilku latach wykazały, że na IHN zapadają dość często ryby będące w dobrej kondycji, intensywnie żerujące, charakteryzujące się dobrymi przyrostami masy ciała. W takich przypadkach wybuch choroby jest gwałtowny, przebieg ostry, ze stratami sięgającymi nawet 80-90% obsady. Wirus IHN może wywołać chorobę już u wylęgu, który posiada jeszcze woreczek żółtkowy, a obserwowane w tym okresie śnięcia sięgają 80-100% obsady. W ostatnich trzech latach w różnych krajach Europy największe śnięcia notowano u ryb w wieku do jednego roku, nie przekraczających masy jednostkowej 100 g. Natomiast ryby starsze, o wyższej masie ciała są wysoce odporne na wirus IHN, a śnięcia nie przekraczają 10-20% obsady.

Dużym zagrożeniem dla hodowli jest bezobjawowe nosicielstwo wirusa u ryb starszych. Stwierdza się go między innymi u tarlaków w płynie jajnikowym i w mleczu. Istnieje również możliwość transowaryjnego zakażenia ryb, choć dość często obserwuje się również wirus na powierzchni ikry. Jednakże liczne badania wykazały, że

przenoszenie wirusa IHN znajdującego się wewnątrz ikry jest zjawiskiem dość częstym, a kąpiele ikry, tak skuteczne w przypadku wirusa VHS, są mało przydatne i nie pozwalają na jego zniszczenie. Należy również podkreślić, że nosicielami wirusa mogą być pasożyty zewnętrzne (pijawki) i skrupiaki. Tę drogę przenoszenia wirusa stwierdzano między innymi w zaniedbanych gospodarstwach, które nie przestrzegały podstawowych zasad hodowli. Również odchody ryb chorych oraz ryby śnięte są głównym źródłem zakażenia, szczególnie w intensywnych systemach hodowli pstrąga tęczowego, gdzie zagęszczenia obsad są bardzo wysokie.

Wirus IHN wnika do organizmu kilkoma drogami:

- przez skrzela: w badaniach eksperymentalnych stwierdza się duże ilości wirusa IHN w pierwszych godzinach po zakażeniu. Następnie wirus wędruje do śródbłonna naczyń krwionośnych wielu narządów,
- przez przewód pokarmowy: po przełamaniu bariery jelitowej dostaje się do śródbłonna naczyń krwionośnych wielu narządów,
- przez skórę: ta droga wnikania wirusa jest najmniej rozważana. Jednakże istnieje wiele dowodów, że skóra jest jednym z głównych miejsc, gdzie następuje replikacja wirusa, a następnie po przełamaniu bariery skórnej dostaje się drogą naczyń krwionośnych do różnych narządów (Ahne i Kurstak 1989).

Wirus po wniknięciu do organizmu wędruje niemal do wszystkich narządów, a szczególnie do nerki, śledziony, mięśni, gardła, przełyku, żołądka, serca oraz opon mózgowych. Jednakże wykazano, że wirus IHN najdłużej utrzymuje się w nerce, a szczególnie w tkance krwiotwórczej nerek. Doprowadza to w krótkim czasie do zniszczenia jednego z najważniejszych narządów odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego.

Objawy kliniczne przy IHN są mało charakterystyczne i dość często mylone z innymi jednostkami chorobowymi tła wirusowego. Na szczególną uwagę zasługują takie objawy, jak:

- pociemnienie skóry,
- wzdęcie powłok ciała z nagromadzeniem się dużej ilości płynu wysiękowego,
- wysadzenie gałek ocznych,
- wybroczyny u podstawy płetw,
- bladeść skrzeli oraz błon śluzowych,
- dość często pseudoodchody (długie białe pasemka ciągnące się z otworu odbytowego),
- hiperaktywność naprzemienna z apatią, obserwowana szczególnie u starszych ryb.

Zmiany anatomopatologiczne również nie są charakterystyczne jedynie dla tej jednostki chorobowej. Na szczególną uwagę zasługują następujące zmiany: bladeść narządów wewnętrznych jako wynik niedokrwienia i zabu-

rzeń w prawidłowym funkcjonowaniu narządów hemopoetycznych. Dość często na otrzewnej trzewnej i częściowo ściennej oraz w tkance tłuszczowej międzynarządowej stwierdza się wybroczyny. Konsekwencją uszkodzenia narządów hemopoetycznych są zmiany w komórkach, takich jak erytrocyty (duży odsetek komórek niedojrzałych) oraz upośledzenie funkcjonowania limfocytów T i B, odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie komórkowych i humoralnych mechanizmów obronnych.

Diagnostyka IHN jest oparta na:

- izolacji i identyfikacji wirusa w hodowlach komórkowych,
- zastosowaniu metod immunologicznych: IF, IE, ELISA, ISPA oraz testu seroneutralizacji,
- zastosowaniu metod molekularnych (Siwicki 2000, Antychowicz i in. 2001)

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że pomimo wysoce rozwiniętych systemów kontroli oraz metod diagnostycznych, nie udało się uchronić wielu gospodarstw rybactw w Europie od wysokich strat spowodowanych IHN. Również w Polsce stwierdzono w latach 2000-2001 obecność wirusa IHN u narybku pstrąga tęczowego, co zmuszało hodowców do podjęcia wszelkich działań mających na celu ograniczenie lub wyeliminowanie tej jednostki chorobowej z hodowli ryb łososiowatych. Jest to dziś nadrzędny cel dla nas wszystkich – hodowców, państwowej służby weterynaryjnej i naukowców.

Zapobieganie i zwalczanie tej jednostki chorobowej jest bardzo trudne. W tym miejscu należy wyraźnie podkreślić, że przechorowanie pozostawia po sobie trwałe nosicielstwo. Szczególnie istotne jest wprowadzanie nowych metod profilaktyki, przestrzeganie podstawowych zasad higieny w hodowli oraz przepisów dotyczących postępowania przeciwepizootycznego. Liczne obserwacje oraz badania doświadczalne pozwoliły wypracować w USA i Europie kilka modeli postępowania profilaktycznego, ograniczającego do minimum możliwość wystąpienia choroby (Guz 2010). Na szczególną uwagę zasługuje:

- stała dezynfekcja sprzętu rybackiego oraz środków transportu,
- dezynfekcja zaptodnionej ikry – szczególnie zalecane są kąpiele w preparatach jodoforowych (powyżej 100 ppm aktywnego jodu) przez minimum 10 min,
- inkubacja ikry w obiektach odizolowanych od hodowli tuczowej oraz zbiorników wodnych, w których mogą występować nosiciele,
- podchów wylęgu w temperaturze powyżej 15°C,
- szczególna kontrola stanu kondycyjnego tarlaków,
- stosowanie przeciwwirusowej immunoprofilaktyki nieswoistej u tarlaków w okresie potarłowym oraz 2-3 miesiące przed tarłem (Bioimmuno IRS).

Wpływ wirusa IHN na nieswoiste komórkowe mechanizmy obronne u narybku pstrąga tęczowego

W dostępnej literaturze niewiele jest doniesień określających wpływ wirusa IHN na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne oraz odporność przeciwzakaźną (Siwicki i in. 2000a,b, Siwicki i in. 2008). Poznanie mechanizmów immunotropowego oddziaływania tego wirusa w znaczący sposób pozwoli na podjęcie ukierunkowanych badań nad opracowaniem skutecznych metod profilaktycznych. Celem prezentowanych badań było określenie wpływu *in vitro* wirusa IHN na aktywność fagocytów i limfocytów u narybku pstrąga tęczowego.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w warunkach *in vitro* na narybku pstrąga tęczowego o masie ciała 80-100 g, który na podstawie badań klinicznych nie wykazywał zmian wskazujących na toczący się proces chorobowy. Również przy zastosowaniu metody PCR nie stwierdzono u badanych ryb obecności wirusa IHN. Do badań immunologicznych pobrano jałowo narządy: nerkę głowową oraz śledzionę, z których izolowano makrofagi i limfocyty po wirowaniu komórek w gradiencie Gradisolu (Polfa, Polska). Wirus IHN użyty do badań *in vitro* pochodził z Laboratorium LDA 39 (Francja), który namnażano na komórkach RTG-2 (Francja) w temperaturze 14°C, a po zmianowaniu do badań użyto 1×10^7 PFU IHN/ 1 ml podłoża RPMI-1640 (Sigma). Grupę kontrolną stanowiły komórki izolowane oraz hodowane *in vitro* bez dodatku wirusa IHN.

Badania immunologiczne obejmowały określenie wpływu wirusa IHN na aktywność metaboliczną (RBA) oraz bójczą (PKA) makrofagów izolowanych ze śledziony i nerki głowowej przy użyciu metody opisanej przez Siwickiego i in. (2008). Natomiast wpływ wirusa IHN na aktywność limfocytów izolowanych z nerki głowowej określano na podstawie poziomu odpowiedzi proliferacyjnej na mitogeny ConA (Sigma) i LPS (Sigma) metodą spektrofotometryczną (Siwicki i in. 2008).

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej określając wartości średnie oraz odchylenie standardowe (SD). Wykorzystano program Statistica for Windows 7.1 (Stat-Soft, Inc 2004). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Istotność różnic określano na poziomie $P < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Wpływ wirusa IHN na aktywność metaboliczną i bójczą makrofagów izolowanych ze śledziony i nerki głowowej oraz poziom odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów nerki głowowej na mitogeny ConA i LPS przedstawiono w tabeli 1. Analiza uzyskanych wyników badań *in vitro* jednoznacznie wykazała, że wirus IHN statystycznie istotnie obniża

aktywność metaboliczną i bójczą makrofagów izolowanych ze śledziona i nerki główowej. Równocześnie obserwowano statystycznie istotne obniżenie aktywności limfocytów stymulowanych mitogenami izolowanych z nerki główowej. Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały, że wirus IHN ma silne działanie supresyjne na komórki immunokompetentne odpowiedzialne za prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego ryb.

TABELA 1

Wpływ wirusa IHN na aktywność metaboliczną (RBA) i bójczą (PKA) makrofagów izolowanych ze śledziona i nerki główowej oraz na poziom odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów (LP) nerki główowej na mitogeny ConA i LPS u narybku pstrąga tęczowego – badania *in vitro* (średnie wartości \pm SD; n = 10; * istotność różnic $P < 0,05$)

Parametry immunologiczne	Kontrola	Komórki + wirus IHN
Aktywność metaboliczna (RBA) makrofagów izolowanych z nerki (OD 620 nm)	0,48 \pm 0,04	0,28 \pm 0,03*
Aktywność metaboliczna (RBA) makrofagów izolowanych ze śledziona (OD 620 nm)	0,41 \pm 0,05	0,24 \pm 0,04*
Aktywność bójczą (PKA) makrofagów izolowanych z nerki (OD 620 nm)	0,36 \pm 0,04	0,21 \pm 0,02*
Aktywność bójczą (PKA) makrofagów izolowanych ze śledziona (OD 620 nm)	0,35 \pm 0,04	0,23 \pm 0,03*
Odpowiedź proliferacyjna limfocytów nerki na mitogen ConA (OD 620 nm)	0,46 \pm 0,05	0,18 \pm 0,02*
Odpowiedź proliferacyjna limfocytów nerki na mitogen LPS (OD 620 nm)	0,38 \pm 0,04	0,19 \pm 0,03*

Makrofagi i limfocyty zaliczane są do najistotniejszych komórek odpowiedzialnych za komórkowe mechanizmy obronne i odporność przeciwważną. Działanie obniżające aktywność tych komórek doprowadzić może do załamania się odporności i rozwoju chorób bakteryjnych czy grzybiczych, najczęściej wiktających choroby wirusowe u ryb. W związku z powyższym, jednym z podstawowych działań profilaktycznych powinno być stosowanie immunostymulatorów naturalnych czy syntetycznych w podchowach pstrąga tęczowego, które powodują aktywację nieswoistych komórkowych i humoralnych mechanizmów obronnych. Tego typu działania określane jako immunoprofilaktyka nieswoista, mają na celu stymulowanie odporności

przeciwwirusowej nie tylko u narybku, ale szczególnie u tarlaków, co gwarantuje, że uzyskane od nich potomstwo będzie w stanie zwalczyć wirus IHN dzięki indukcji interferonu, głównego czynnika obrony przed tym wirusem (Siwicki i in. 2000b, Siwicki i in. 2008). Wstępne badania doświadczalne wykazały, że preparat Bioimmuno (IRS Olsztyn) produkowany dla potrzeb praktyki rybackiej jest wysoce przydatny w stymulowaniu odporności przeciwwirusowej, szczególnie przeciwko IHN u pstrąga tęczowego (Siwicki i in. 2008).

Literatura

- Ammayappan A., LaPatra S.E., Vakharia V.N. 2010 – Molecular characterization of the virulent infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) strain 220-90 – *Virology* 51: 7-10.
- Ahne W., Kurstak E. 1989 – *Viruses of Lower Vertebrates* – Springer-Verlag New York: 411-441.
- Antychowicz J., Reichert M., Pękala A., Matusiewicz J. 2001 – Przypadek zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego i wirusowej posocznicy krwotocznej u wylęgu pstrąga tęczowego – wprowadzenie metody RT-PCR do diagnostyki tych wirusów w Polsce – *Medycyna Wet.* 12: 894-898.
- Guz L. 2010 – Zakaźna martwica układu krwiotwórczego ryb łososiowatych (Infectious Hematopoietic Necrosis). *Choroby Ryb Podlegające Obowiązkowi Zwalczenia oraz Inne Choroby Zagrożające Hodowli – Diagnostyka, Profilaktyka, Terapia.* Wyd. IRS, Olsztyn: 55-70.
- EssbauerEssbauer S., Ahne W. 2001 – *Viruses of lower vertebrates* – *J. Vet. Med.* 48: 403-475.
- Roberts R.J. 1978 – *Fish Pathology* – Bailliere Tindall London: 115-143.
- Siwicki A.K. 2000 – Application of RNase protection assays for rapid assessment of genetic variation of IHNV in fish – *W: Biologia molekularna w diagnostyce chorób zakaźnych i biotechnologii*, SGGW Warszawa: 85-86.
- Siwicki A.K., Małaczewska J., Kaziński B., Wójcik R. 2008 – Immunomodulating effect of methisoprinol on the pronephros macrophages and lymphocytes activity after suppression induced by infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – *Acta Vet. Brno* 77: 631-635.
- Siwicki A.K., Morand M., Klein P. 2000a – Badania porównawcze nad wpływem dimeru lizozymu (KLP-602) na produkcję interferonu i TNF przez fibroblasty zakażone wirusami IHN, VHS, SVC oraz Iridowirusem ryb – *W: Mikrobiologia na przełomie wieków.* Wyd. UWM Olsztyn: 135-136.
- Siwicki A.K., Morand M., Terech-Majewska E., Pozet F. 2000b – Influence of IHNV on cell-mediated immunity and interleukin-like protein production in fish. *Infectious Immunity and Vaccines – EFIS 2000*: 38.
- Siwicki A.K., Studnicka M., Antychowicz J., Kaziński K., Głowacka H., Głębki E. 1995 – Przeciwciała monoklonalne w badaniach immunologicznych i diagnostyce chorób ryb – *W: Przeciwciała monoklonalne w immunologii i diagnostyce.* Wyd. IRS Olsztyn: 65-80.
- Terech-Majewska E., Siwicki A.K., Kaziński K., Głębki E. 2000 – Izolacja i identyfikacja wirusa zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego (IHN) u pstrąga tęczowego w Polsce – *Annales UMCS, DD*, 390 s.

Przyjęto po recenzji 24.11.2011 r.

INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS (IHN) IN SALMONID FISHES: CURRENT STATE OF KNOWLEDGE AND IMPACT OF IHN ON THE IMMUNE SYSTEM

Andrzej K. Siwicki, Elżbieta Terech-Majewska

ABSTRACT. The IHN virus induces high mortality among fishes, especial rainbow trout fingerlings. This study focuses on the *in vitro* influence of IHN virus on spleen phagocyte activity and the proliferative response of pronephros lymphocytes stimulated by mitogens ConA and LPS. The results indicate that the IHN virus decreased the metabolic activity (RBA) and potential killing activity (PKA) of spleen phagocytes statistically significantly ($P < 0.05$). A similar pattern was observed in lymphocyte activity, with the IHN virus statistically significantly ($P < 0.05$) decreasing the proliferative response of pronephros lymphocytes stimulated by mitogens ConA and LPS. The results of this study showed that IHN virus suppressed cell-mediated immunity in rainbow trout.

Keywords: IHN, rainbow trout, etiology, pathogenesis, phagocyte and lymphocyte activity