

Elżbieta Terech-Majewska<sup>1</sup>, Alicja Bernad<sup>2</sup>, Joanna Pajdak<sup>1</sup>, Patrycja Schulz<sup>3</sup>,  
Karolina Naumowicz<sup>4</sup>, Natalia Piotrowska<sup>5</sup>, Andrzej K. Siwicki<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Katedra Epizootiologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

<sup>2</sup>Pracownia Diagnostyki Chorób Ryb i Raków, Zakład Higieny Weterynaryjnej Wojewódzki Inspektorat Weterynarii w Olsztynie

<sup>3</sup>Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

<sup>4</sup>Katedra Patofizjologii, Weterynarii Sądowej i Administracji, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

<sup>5</sup>Studenckie Koło Naukowe Patologii Klinicznej Organizmów Zmiennocieplnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

<sup>6</sup>Zakład Patologii i Immunologii Ryb, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

## Ichtioftirioza – od diagnostyki do terapii

### Wstęp

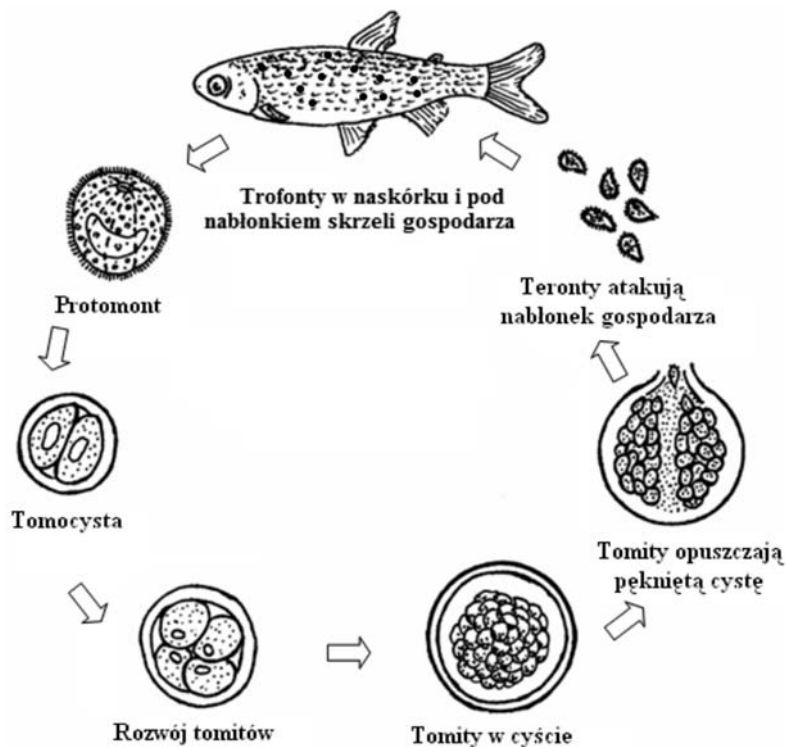
Ichtioftirioza (Ich) jest wywoływana przez pasożytniczego orzęska *Ichthyophthirius multifiliis* (*I. multifiliis*), nazwanego kulorzęskiem ze względu na kulistą budowę komórki wyposażonej w rzęski na całej powierzchni. Drugi człon łacińskiej nazwy „*multifiliis*” oznacza „dużo”, co bezpośrednio należy rozumieć jako „dużo potomstwa”, tzw. pływek (zwanych terontami) (Wei i in. 2013). Ze względu na główny objaw, nazywana jest „chorobą białej plamy” (ang. *white spot disease*, WSD), a także „ospą rybią”. „Plamy”, a właściwie „kropki” są efektem uszkodzenia skóry i obumierania tkanek wokół pasożyta. Jej przebieg zależy od gatunku ryb, intensywności i ekstensywności inwazji, warunków hodowli, wieku i ogólnej kondycji ryb oraz pory roku. Choroba dotyczy skóry i/lub skrzelii, wszystkich znanych obecnie gatunków ryb słodkowodnych. *I. multifiliis* po raz pierwszy został opisany w 1867 roku przez Forqueta i był znany hodowcom ryb już w X wieku, w Chinach i najprawdopodobniej stamtąd przywędrował do Europy. Aktualnie jest określany jako gatunek kosmopolityczny występujący na całym świecie, w większości stref klimatycznych (Alvarez-Pellitero 2004, Wei i in. 2013). Z uwagi na doskonałe przystosowanie do pasożytniczego trybu życia, stanowi stałe zagrożenie dla ryb hodowlanych, wolno żyjących oraz akwariowych. Nowoczesne technologie hodowli ryb, a zwłaszcza ich intensywność i duże zagęszczenia, mała wymiana wody oraz brak naturalnych wrogów biologicznych w zbiornikach, przyczyniają się do powstawania idealnych warunków bytowania dla kulorzęska. W Polsce choroba jest diagnozowana systematycznie, co prawdopodobnie jest spowodowane powszechnym wystę-

powaniem pasożyta w środowisku wodnym (Bernad 2013, Bernad i in. 2016a,b).

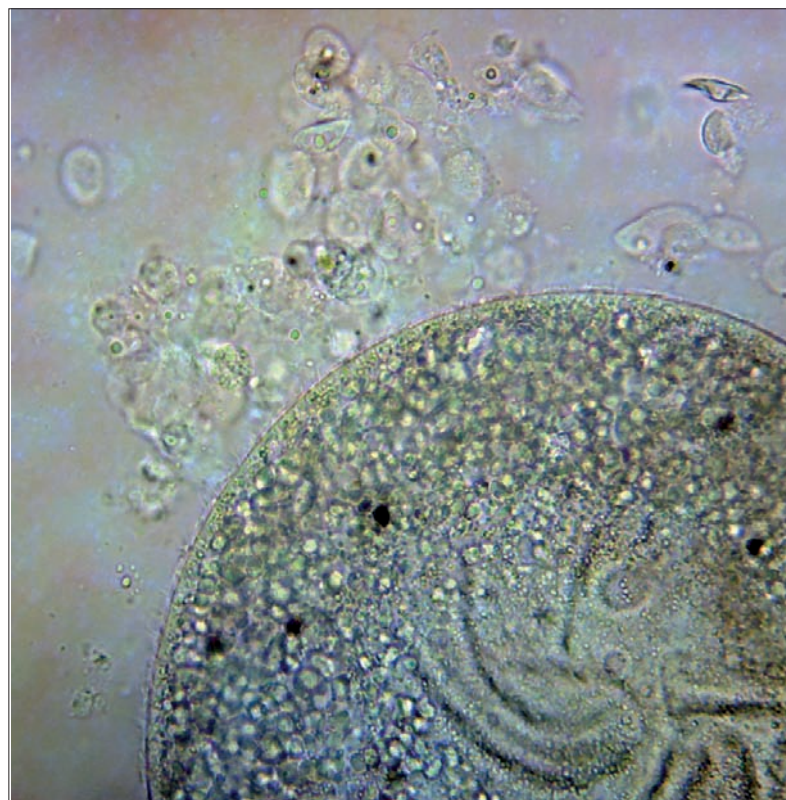
Celem pracy było przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat choroby, znaczenia diagnostyki w profilaktyce i terapii, wybranych aspektów patogenezы ze szczególnym zwróceniem uwagi na procesy immunologiczne oraz metody zwalczania pasożyta. W pracy wykorzystano wybrane pozycje literatury oraz doświadczenie własne zespołu autorskiego, jednocześnie analizę ograniczono do wybranych gatunków ryb hodowlanych.

### Biologia pasożyta i cykl rozwojowy

Kulorzęsek jest blisko spokrewniony z wolno żyjącymi nieparazytycznymi orzęskami z rodzajów *Tetrahymena* i *Paramecium*, poprzez przynależność do rzędu *Hymenostomatida* (Dickerson 2012). Jego rozwój charakteryzuje się cyklem prostym (rys. 1), w którym 90% czasu trwania cyklu przebywa na powierzchni ciała żywiciela, pod postacią trofontu (fot. 1). W tym stadium chroni się pod nabłonkiem wyściełającym jamę gębową, skrzelia oraz pokrywającym rogówkę, jak również pod naskórką – zawsze powyżej warstwy podstawnej (Abowei i in. 2011). Bytowanie w tym miejscu chroni go przed działaniem czynników zewnętrznych i utrudnia jego eliminację. Cała komórka pasożyta pokryta jest rzęskami, które działają drażniaco, zwłaszcza w początkowym stadium inwazji. Pasożyt odżywia się komórkami naskórka, nabłonka, bakteriami oraz płynami tkankowymi. Żerujący na rybach trofont, rośnie do wielkości 0,5-1 mm, powodując hiperkeratozę, widoczną jako białe kropki – plamki.



Rys. 1. Cykl rozwojowy *Ichthyophthirius multifiliis*.

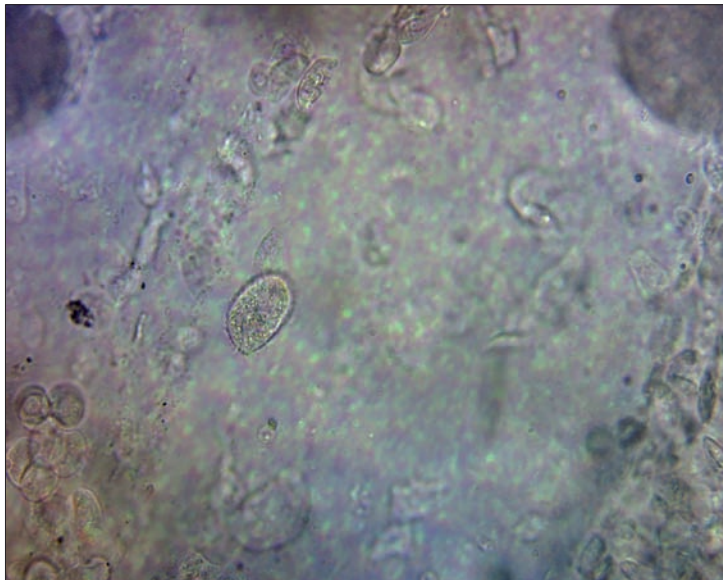


Fot. 1. Trofont w zeskróbinach ze skóry w otoczeniu różnych komórek.

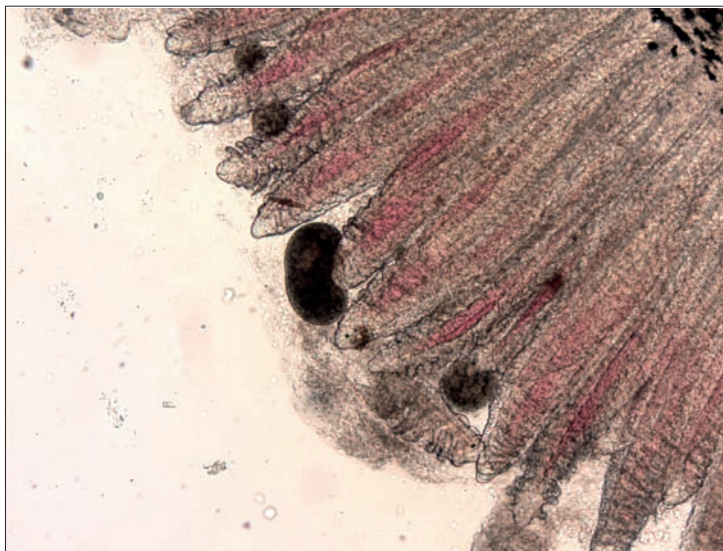
Znajomość cyklu rozwojowego jest podstawą monitoringu diagnostycznego, który stanowi ważny element w prowadzeniu zarówno profilaktyki, jak i terapii. Opisuje się trzy główne stadia rozwojowe pasożyta: inwazyjny teront (stadium inwazyjne, fot. 2), trofont (zależne od żywiciela, stadium wegetatywne), tomont (stadium reprodukcyjne

bytuje w wodzie, przechodzące w stadium tomocysty) (Abowei i in. 2011, Dickerson 2012, Wei i in. 2013). Teronty, nazywane „pływkami“ wykazują chemo- i fototaksję, co ułatwia im szybkie docieranie do powierzchni ciała ryb. Formy te „wyczuwają“ komponenty tkanek ryb, w tym immunoglobuliny i śluz. Prawdopodobnie wnikają przez komórki kolbkowe nabłonka i naskórka (Dickerson 2012). Dopiero po osiągnięciu odpowiednich rozmiarów i odpowiedniej struktury ciała, co trwa ok. 2 dni w temp. wody 25-28°C, 3-4 dni w temp. 21-24°C lub 10-14 dni w temp. 15°C, pasożyt gotowy jest do opuszczenia ryby i encystacji (Abowei i in. 2011, Klasius i Rogers 1995). Zanim to nastąpi jest wolno pływającym protomontem i jeśli przedwcześnie opuści żywiciela, przed zakończeniem pełnego rozwoju, nie przekształca się w cystę i ginie (Wei i in. 2013). W innym razie protomonty otaczają się cienką błoną i tworzą cystę, już po 15 min, do kilku godzin. Ocystowane pasożyty przytwierdzają się do roślin lub do stałych elementów w zbiorniku wodnym. Cysta jest kluczowym etapem w rozwoju i ze względu na dwuwarstwową budowę jej ściany trudna do zniszczenia. We wnętrzu cysty następuje równomierny, binarny podział na tomity (od 250 do 2000 osobników, stadium przedinwazyjne), które po opuszczeniu cysty stają się inwazyjnymi terontami. Penetrację tkanek żywiciela umożliwia enzym – hialuronidaza oraz perforatorium, co pozwala wniknąć do głębszych warstw naskórka, gdzie pasożyt rośnie i przybiera kształt kulisty, a jego makronukleus staje się podkowiasty (dojrzały trofont). Ten etap domyka rozwój pasożyta na rybach, po którym pasożyt wypada z ciała ryb i cykl się powtarza (rys. 1).

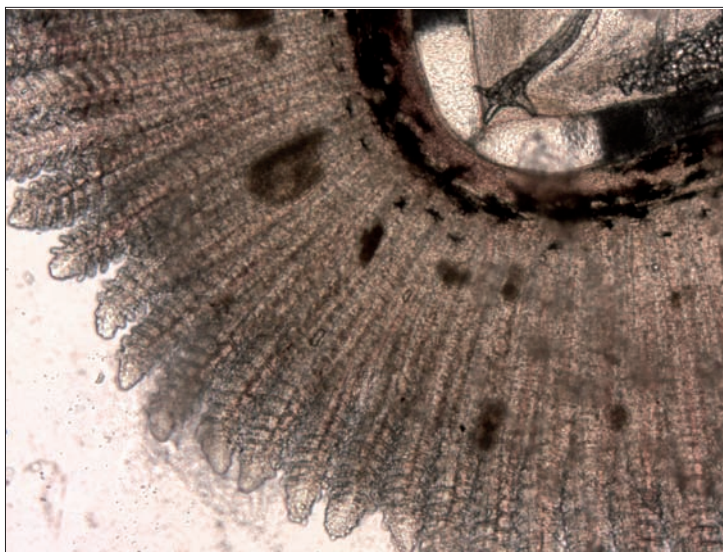
Ze względu na dużą podatność nieocystowanych stadiów wolno pływających na działanie chemioterapeutyków, pływki i protomonty są głównym stadium zwalczanym w kąpielach leczniczych. Każdorazowo częstotliwość kąpieli dopasowuje się do cyklu rozwojowego pasożyta w danych warunkach gospodarstwa. Najsilniejsze inwazje mają miejsce wiosną i latem, ze względu na sprzyjającą szybkości rozwojowi temperaturę wody. Jednakże pasożyt może być groźny w innych porach roku, szczególnie trudne jest postępowanie w miesiącach jesiennych, przy zbyt niskiej temperaturze do wykonywania kąpieli (Bernad 2016a,b, obserwacje własne, dane niepublikowane). Dodatkowo sprzyja temu zmniejszenie wysycenia wody tle-



Fot. 2. Młoda forma kolorzések, w początkowym stadium rozwoju w naskórku.



Fot. 3. Kolorzések w skrzelach, osadzone na wierzchołkach listków skrzelowych, widoczne przekrwienie.



Fot. 4. Kolorzések w skrzelach, osadzone u podstawy listków skrzelowych, widoczna anemizacja skrzeli.

nem, eutrofizacja zbiorników i brak naturalnych wrogów, jak np. oczlika (*Cyklops strenuus*) (Antychowicz i Pękała 2015).

## Patogeneza i przebieg choroby

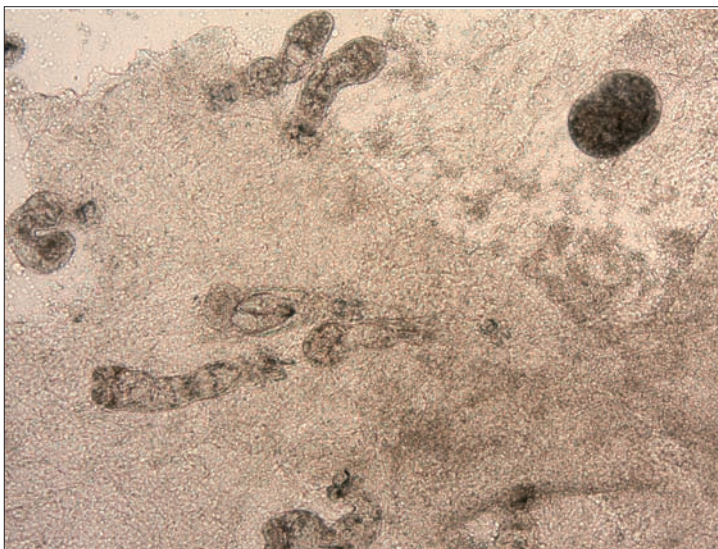
Pierwsze objawy choroby można obserwować w fazie zwiastunowej, tj. zaprzestanie pobierania pokarmu, osłabienie, wykonywanie gwałtownych ruchów, a także ocieranie się o dno, rośliny i elementy konstrukcyjne zbiornika (tzw. flashing). Taki efekt może powodować wiele innych czynników. Na skutek mechanicznych uszkodzeń ciała może dochodzić do utraty łusek i powstawania przekrwionych ubytków w skórze (Bernad i in. 2016b). Płetwy są często pozlepiane, bądź postrzępione, natomaist typowe białoszarawe „gruzelki” pojawiają po pewnym czasie, a często są niewidoczne. W gąbczastej warstwie skóry właściwej rozrasta się sieć naczyń krwionośnych. Pojawiają się w niej liczne leukocyty (zwłaszcza w miejscu osiedlenia się pasożyta). Po 15-19 dniach rozrost naskórka staje się mniej intensywny, a uszkodzone elementy skóry mogą oddzielać się i odpadać. Zmiany zwyrodnieniowe mogą także rozwijać się w warstwie gąbczastej skóry właściwej, która w dużym stopniu zanika. Skóra może być pokryta zwiększoną ilością śluzu. Jeśli pasożyt rozwija się w skrzelach, ryby mogą się grupować na płytcznach, pod powierzchnią wody, w miejscach o lepszym natlenieniu. Występuje duszność, jako efekt hipertrofii nabłonka listków skrzelowych. Blaszkki skrzelowe zlepiają się, ograniczając tym samym powierzchnię wymiany gazowej. Skrzela stają się ciemnoczerwone, obrzękłe, pokryte dużą ilością śluzu. W ich obrębie może dochodzić do zmian martwicowych (fot. 3 i 4).

Nie obserwuje się różnic międzygatunkowych w wyglądzie zmian histopatologicznych, aczkolwiek pojedyncze ryby lub grupy ryb tego samego gatunku wykazują znaczne różnice w podatności na zakażenie, a w konsekwencji w charakterze i stopniu nasilenia zmian histopatologicznych (Ventura i Paperna 1985, Elsayed i in. 2006). Komórki tkanki pozostającej pomiędzy pasożytem a błoną podstawną ulegają zwyrodnieniu mięszszowemu, szklistemu oraz martwicy. Czasami w preparatach histologicznych można zauważyć histolizę, kiedy trofnty migrują wewnątrz tkanki. Stopniowe złuszczenie się, postępujące zwyrodnienie, martwica i odrywanie komórek wierzchniej warstwy jest najbardziej widoczne w skórze, gdzie warstwy naskórka obejmujące trofnty wybrzuszą się powyżej powierzchni skóry i skrzeli (Ventura i Paperna 1985, Elsayed i in. 2006).

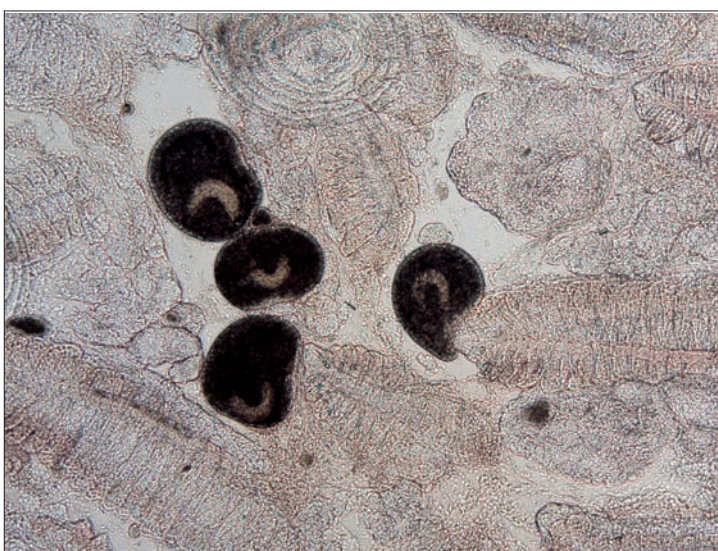
Należy również nadmienić, że skrzela pełnią kluczową rolę w utrzymaniu równowagi kwasowo-zasadowej płynów ustrojowych i właściwego ciśnienia osmotycznego. Upośledzenie ich funkcji może przyczynić się do wystąpienia uszkodzenia funkcji narządów, na skutek zatrucia szkodliwymi produktami przemiany materii, co objawia się ich bladością i zwiótnieniem mięśnia sercowego. Przy intensywnej inwazji, nieodpowiednich warunkach hodowlanych i słabej kondycji immunologicznej ryb może dochodzić do masowych śnięć, nawet do 12 godzin od wniknięcia pasożytów (Dikerson 2012, obserwacje własne, dane niepublik.). Ryby, które przechorowały, lub u których inwazja przebiegała ekstensywnie, stają się bezobjawowymi nosicielami pasożyta i mogą przyczyniać się do utrzymania zagrożenia. Dlatego też należy uważnie obserwować nawet nieznaczny stopień nosicielstwa, zwłaszcza w systemach zamkniętych. Dodatkowo uszkodzona skóra i skrzela mogą umożliwić przedostanie się czynnikom patogennym, jak również ułatwiać przenikanie do organizmu ryb substancji toksycznych (pestycydów), nasilając niekorzystne efekty ich oddziaływania (Szarek i in. 2006). Przy powikłaniach bakteryjnych obserwuje się rozwój dodatkowych zmian w tkankach. Trudniejsze w przebiegu są także inwazje mieszane, np. z *Gyrodactylus* spp. u pstrąga teczowego (fot. 5) (Bernad 2016b, obserwacje własne, dane niepublik.).

## Metody diagnostyczne stosowane do monitorowania inwazji kulożęska

Podstawą monitoringu pasożyta jest diagnostyka mikroskopowa preparatów niebarwionych zeszkrobów ze skóry lub skrzeli, w których poszukujemy charakterystycznych form rozwojowych kulożęska (rys. 1, fot. 1 i 2) (Abowei i in. 2011, Bernad i in. 2016b). Materiał do badań możemy pobierać przyżyciowo lub pośmiertnie, bezpośrednio po uśpieniu ryb do badań. Wykonując biopsję możemy pobierać małe fragmenty blaszek skrzelowych, skóry, śluzu i fragmenty płetw. Badania parazytologiczne obejmują na ogół obserwacje makro- i mikroskopowe. Makroskopowo zwraca się uwagę na widoczne zmiany anatomopatologiczne. Badania mikroskopowe przeprowadza się metodą obserwacji świeżych preparatów niebarwionych lub barwionych. W przypadku *I. multifiliis* stosowane są najmniejsze powiększenia 40x, 60x, 100x. Pasożyty są liczone na całej powierzchni preparatu (powierzchnia szkiełka nakrywkowego 22 mm x 22 mm), a stopień inwazji określa się szacunkowo. Wyniki obserwacji mogą być opisywane według poniższego schematu: pojedyncze pasożyty – od 1 do 3 pasożytów w całym



Fot. 5. Inwazja mieszana *Gyrodactylus* spp. i kulożęska w zeszkrobinach ze skóry.



Fot. 6. Różne stadia rozwoju w zeszkrobinach ze skóry.

preparacie (+), dość liczne pasożyty – od 1 do 3 pasożytów w polu widzenia (++) , liczne pasożyty – od 4 od 10 pasożytów w polu widzenia (+++), bardzo liczne pasożyty – powyżej 10 pasożytów w polu widzenia (niepoliczalne) (++++). Za nosicielstwo uznaje się stopień intensywności oceniany jako (+) i (++) , natomiast inwazję w stopniu (+++) oraz (++++) klasyfikuje się jako chorobę, bez względu na to, czy występują objawy kliniczne (Bernad i in. 2016a, b). Monitorowanie diagnostyczne ma na celu uchwycenie zależności pomiędzy obecnością form dojrzałych i niedojrzałych (fot. 6). Jeśli w preparatach nie stwierdza się form niedojrzałych przyjmujemy, że środki terapeutyczne są skuteczne, natomiast w przeciwnym razie przyjmujemy że nie działają. Możemy dzięki takiemu spojrzeniu zmodyfikować metodę terapii. Dodatkową zaletą badania jest możliwość oceny stanu skrzeli i skóry. Jeśli skrzela są bardzo zniszczone można ograniczyć liczbę kąpiele, wzmocnić procesy regeneracji lub zmienić procedurę terapii (fot. 3 i 4).

Preparaty histopatologiczne wykazują ograniczoną przydatność w monitorowaniu diagnostycznym. Mogą być barwione hematoksyliną (po utrwaleniu w formalinie), barwnikiem Giemsy (utrwalone, np. w płynie Bouina). Jeśli mogą być wykonane to pozwalają na lepsze zobrazowanie zmian w tkankach. Pasożyt umiejscawia się wewnątrz śródmiąższowej przestrzeni tkanki, zawierającej resztki komórkowe i białkowy płyn tkankowy. Komórki naskórka bezpośrednio sąsiadujące z pasożytem są hiperplastyczne, zdegenerowane. Posiadają pyknotyczne jądro, obserwuje się ich obrzęk i martwicę. Naskórek infiltrowany jest przez nacieki limfocytarne i inne komórki stanu zapalnego, w tym makrofagi i neutrofile. W leżącej poniżej warstwie gąbczastej skóry pojawia się obrzęk oraz komórki zapalne. W skrzelałach trofonty osiadające w okolicy blaszki podstawnej nabłonka listków skrzelowych pobudzają go do hiperplazji (fot. 4). Następuje również rozrost samych blaszek, a przy silnej inwazji cała przestrzeń międzyblaszkowa może być wypełniona hiperplastycznym nabłonkiem, co nadaje blaszkom drugorzędowym wygląd zbliżony do kija golfowego – ang. *clubbed appearance* (Antychowicz 2013a,b, 2015).

## Podstawy profilaktyki i terapii

Podstawą ogólnej profilaktyki jest ochrona przed wprowadzeniem pasożyta i nadmiernym rozwojem inwazji, poprzez systematyczną kontrolę i kwarantannę. Jednocześnie istotna jest ochrona przed stresem oraz właściwe zaspokojenie potrzeb pokarmowych. Obserwuje się pewną zależność pomiędzy podatnością na zarażenie i przebiegiem inwazji a jakością i składem paszy (Xuegin i in. 2012). Swoistym fenomenem jest utrzymywanie się odporności nabytej po przechorowaniu zarażenia, co sprzyja bezobjawowemu nosicielstwu i utrzymywaniu się inwazji w gospodarstwie. Szczepy pasożyta cechuje zróżnicowana patogenność, jak również immunogenność, wynikająca z właściwej reakcji immunologicznej organizmu ryb. Działanie terapeutyczne może przebiegać każdorazowo odmiennie, z uwagi na złożoność procesów zachodzących w organizmie, zróżnicowaną patogenność i wrażliwość pasożyta na środki terapeutyczne. Reakcje układu immunologicznego są dynamiczne i bardzo zróżnicowane. Jednakże są bardzo istotne dla przebiegu parazytozy.

## Mechanizmy odporności wrodzonej miejscowej i ogólnoustrojowej

Naturalna bariera śluzowa skóry i skrzeli jest ważnym czynnikiem ograniczającym inwazyjność pasożyta. U karpia *Cyprinus carpio*, już po 36 godz. od ekspozycji rośnie ekspresja silnego czynnika zapalnego, interleukiny – 1 beta (IL-1  $\beta$ ). U pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*), w 4 dniu zarażenia znacząco wzrasta zarówno poziom IL-1  $\beta$ ,

jak również czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha). Cytokiny te są produkowane prawdopodobnie przez makrofagi, komórki nabłonkowe lub fibroblasty. W przypadku karpia odpowiedź układu białokrwinkowego została dokładnie zbadana i opisana (Dickerson 2012). Przy pierwszej ekspozycji na teronty w populacji dotąd niezarażonej dochodzi do infiltracji skóry przez neutrofile, które pojawiają się w nieunaczynionych obszarach skóry otaczających pasożyta. Widoczny jest wzrost ekspresji genów chemokin CXCa, CXCR1, CXCR2, będących istotnym czynnikiem regulującym procesy immunologiczne, np. wczesny napływ neutrofilii. W ciągu 2-3 dni komórki zapalne otaczają trofont, 5-6 dnia wiele leukocytów – eozynofile, neutrofile i bazofile – jest związanych z pasożytem w naskórku i w skórze bezpośrednio poniżej miejsca jego umiejscowienia. W tym momencie odpowiedź komórkowa jest zdominowana przez eozynofile, choć limfocyty też są obecne zwłaszcza w skórze. W populacji ryb, które zetknęły się już wcześniej z pasożytem, dominującymi komórkami w 5-7 dniu odpowiedzi zapalnej są eozynofile (EGCs) i makrofagi, które otaczają pasożyta i przyległe tkanki. Zwiększone wydzielanie chemokin CXCa, CXCR1, CXCR2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  po zarażeniu kulorzęskim świadczy o tym, że molekuly te mają duże znaczenie dla stymulacji funkcji obrony skóry. Obumarłe granulocyty, błony komórkowe i uwolnione ziarnistości otaczają urzęsionego i bardzo ruchliwego pasożyta, nie wykazującego żadnych uszkodzeń (fot. 1). Co więcej, komórki nacieku zapalnego mogą stanowić pożywienie dla pasożyta. W reakcji uwalniane są enzymy, które stanowią istotny element odpowiedzi zapalnej. Uszkodzenia tkanek i zniszczenia komórek mogą być również powodowane przez enzymy wydzielane przez samego pasożyta, takie jak fosfatazy i niespecyficzne esterazy. U karpia proces zapalny zaczyna się od limfopenii i neutrofilii. Naturalne komórki cytotoksyczne (NCCs, natural cytotoxic cells) przemieszczają się z nerki głowowej do układu krążenia.

U pstrąga tęczowego ichtioftirioza wywołuje spadek ekspresji genów w nerce głowowej dla C3 dopełniacza już w ciągu 24 godz. W śledzienie ekspresja dla C3 rośnie dopiero w 26 dniu, a nawet w 28, jeśli ryba została zaszczepiona żywymi terontami. Wczesna ekspresja genów dla IgM, MHC II i składnika dopełniacza C3 w skórze ma miejsce już po 48 godz., co potwierdza aktywność reakcji miejscowej, a w drugiej kolejności ogólnej (w 4 dniu). U tego gatunku ryb ekspresja cytokin IL-1  $\beta$  i TNF- $\alpha$  w nerce głowowej utrzymuje się na podwyższonym poziomie przez 26 dni. Wiadomo także, że w kontakcie z pasożytem jest aktywowana odporność humoralna jako zwiększenie aktywności lizozymu oraz wzrost aktywności białek ostrej fazy w wątrobie.

## Mechanizmy odporności nabytej, miejscowej i ogólnej (adaptacyjnej)

Wiadomym jest, że ryby z populacji naiwnej, które przechorowały ichtiofiriозę zyskują odporność na kolejne zachorowania, a przeciwciała są ważnym czynnikiem ochrony immunologicznej przy tej inwazji (Klesius i Rogers, 1995). Uznaje się, że przeciwciała w osoczu, jak i obecne w śluzie, skórnym i skrzelowym, są odpowiedzialne za ochronę. Nabyta odporność przeciwko *I. multifiliis* u suma kanałowego, w warunkach laboratoryjnych utrzymuje się przez okres 2 lat, a wyniki badań sugerują, że komórki B pamięci są obecne w skórze odpornych ryb. Inwazja kulo-rzędka powoduje w skórze wzrost ekspresji genów odpowiedzialnych za odporność adaptacyjną, tj. dla IgM i MHC II. Odpowiedź zapalna wywołana przez pasożyta skutkuje napływem fagocytów do śluzu, a antygeny uwalniane przez pasożyta najprawdopodobniej są pobierane, przetwarzane i prezentowane limfocytom B i T w skórze oraz w tkance limfaticznej śledziony i nerki głowowej. Komórki plazmatyczne produkujące przeciwciała swoiste anty – *I. multifiliis* są wykrywane w skórze i w nerce głowowej.

Za odpowiedź immunologiczną odpowiada I-antygen pasożyta (antygen rzęskowy, I – immobilisation antigen). Uwalniane przeciwciała możemy wykorzystywać do oceny kontaktu ryb z pasożytem, które powodują zlepianie się rzęsek i zaburzenia w poruszaniu się kulo-rzędka. W przebiegu inwazji we krwi obserwuje się znaczną neutrofilię z przesunięciem obrazu w lewo, zwłaszcza we wczesnym stadium. Może to świadczyć o znacznym udziale odporności nieswoistej w procesie zwalczania choroby. Co ciekawe, liczba limfocytów jest zmienna w zależności od stopnia inwazji, może ulegać zmniejszeniu (Witeska i in. 2010). U karpia spada również poziom jonów Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> i Mg<sup>++</sup>, rośnie natomiast poziom NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Dickerson 2012). Witeska i in. (2010) nie stwierdzali zmian w obrazie czerwonokrwinkowym. Jednakże w przeprowadzonych badaniach u karpia, w grupie o niespecyficznych objawach występowała silna leukocytoza (w tej grupie przeżyło inwazję 30% ryb), w grupie z wyraźnymi objawami stwierdzano silną leukopenię (po 4 dniach ryby w 100% usnęły). Trzy tygodnie po przeprowadzonej terapii (0,2 ml L<sup>-1</sup> formaliny oraz obniżeniu temp. do 16°C) ryby nie wykazywały statystycznie istotnych różnic tych parametrów w stosunku do grupy kontrolnej. Jednakże w każdej grupie doświadczenia obserwowano obniżenie funkcji metabolicznych fagocytów (NBT).

## Wykorzystanie immunoprofilaktyki swoistej

Powstawanie odporności nabytej na skutek inwazji *I. multifiliis* dowodzi, że stworzenie szczepionki jest możliwe. Starania o to rozpoczęto wkrótce po tym, gdy odkryto, że ryby po przechorowaniu stają się odporne na ponowne

zarażenie. Użycie szczepionki rozważane było jako korzystna ekonomicznie i środowiskowo metoda ochrony zdrowia ryb. Należy jednak pamiętać, że kulo-rzędka nie jest jednolitym biologicznie i genetycznie pasożytem i dlatego prace nad opracowaniem skutecznej szczepionki nadal trwają. Za najlepiej sprawdzającą się metodę immunizacji uznano ekspozycję ryb na kontrolowaną liczbę pasożytów, bądź iniekcję żywych terontów do jamy ciała. Fakt, że wstrzyknięcie pasożytów wywołuje silną odpowiedź w śluzie okrywającym rybę, a inwazja powierzchniowa indukuje powstawanie przeciwciał we krwi świadczy o swoistej reakcji krzyżowej między ogólnoustrojowymi i śluzowymi elementami układu odpornościowego.

Szczepionki zawierające inaktywowane pasożyty (teronty i trofonty) lub podjednostki strukturalne (rzęski, białka błonowe, oczyszczone antygeny) wywołują niejednakowy stopień odporności. Najważniejszym utrudnieniem w opracowaniu biopreparatów jest obligatoryjne uzależnienie pasożyta od żywiciela, co utrudnia masową produkcję antygenów. Aby pokonać ten problem geny kodujące antygen „I” zostały poddane transformacji i wbudowane do genomu wolno żyjącego, łatwego w hodowli orzędka *Tetrahymena pyriformis*, co miałoby ułatwić uzyskanie odpowiedniej ilości antygeny szczepionkowego. Próby stosowania szczepień drogą *per os*, bądź poprzez kąpiele i imersje, dotychczas nie przyniosły efektów. Wykryto występowanie antygenów innych organizmów wykazujących odporność krzyżową, np. obecność *Tetrahymena* podnosi stopień odporności przeciwko *I. multifiliis*. Chociaż możliwe, że powszechnie występujące antygeny różnych pasożytów i orzędków wywołują odporność, to wydaje się, że jest jej bliżej do odporności wrodzonej, jako odpowiedzi na obecność białka i taka reakcja „daje czas” rybie na rozwinięcie odporności adaptacyjnej przeciwko pasożytom. Niemniej jednak zaangażowanie obu typów odporności – wrodzonej i nabytej jest niezbędne, by szczepienie przeciwko *I. multifiliis* okazało się skuteczne (Buchman i in. 2001, Dickerson 2012).

## Metody terapii

Metody terapii ichtiofiriозy są głównie związane ze skutecznością niszczenia form rozwojowych, wspomaganie organizmu ryb oraz stymulacji mechanizmów obronnych w celu ochrony przed zakażeniami wtórnymi. Możemy wyodrębnić 4 główne kierunki działań w celu zwalczania pasożyta (Picon-Camacho i in. 2007, modyfikacja własna):

- działania mające na celu wyeliminowanie pasożyta bez użycia leków,
- użycie chemioterapeutyków – stosowanych w formie kąpiele, bądź też podawanych drogą *per os*,
- wykorzystanie naturalnych ekstraktów roślinnych,

Środki stosowane w zwalczaniu inwazji kulszyska. Preparaty likwidujące 50-80% badanych form rozwojowych określono jako „częściowo skuteczne”, likwidujące ponad 80% jako „skuteczne”  
(Picon-Camacho i in. 2012, modyfikacja własna)

Środek	Droga podania	Dawka	Gatunek	Skuteczność
Ascorbinian-2-fosforanu (wit. C)	<i>per os</i>	5000 mg kg <sup>-1</sup> paszy przez 9 dni	pszczerz tęczowy	częściowo skuteczny – 2-16% śnięcia ryb
		50 mg na 200 kg <sup>-1</sup> paszy	pszczerz tęczowy	częściowo skuteczny
		50 mg na 2000 kg <sup>-1</sup> paszy	pszczerz tęczowy	częściowo skuteczny
Bronopol	kąpiel	2 mg l <sup>-1</sup> przez 36 dni po zakażeniu	pszczerz tęczowy	skuteczny
		2 mg l <sup>-1</sup> 24 h przed zakażeniem oraz 72 h po zakażeniu	pszczerz tęczowy	częściowo skuteczny
		5 mg l <sup>-1</sup> przez 36 dni po zakażeniu	pszczerz tęczowy	skuteczny
Chloramina-T	kąpiel	100 mg l <sup>-1</sup> 30 min dziennie przez 10 dni	pszczerz tęczowy	skuteczny
Chloramina-T + formaldehyd	kąpiel	8 + 125 mg l <sup>-1</sup> trzy razy w tygodniu przez 5 tygodni	łośń atlantycki	skuteczny
Chlorek sodu	kąpiel	20 g l <sup>-1</sup> przez 20 minut	pszczerz tęczowy, pszczerz źródłany, pszczerz potokowy	skuteczny
		20 g l <sup>-1</sup> na godzinę przez 5 dni	pszczerz tęczowy	częściowo skuteczny
	<i>per os</i>	0,30-1,0% paszy przez 3-11 dni	karp	skuteczny
Formaldehyd	kąpiel	80 µl l <sup>-1</sup> 2 h przez 5 dni	karp	skuteczny
		110 µl l <sup>-1</sup> 2 h przez 5 dni	karp	skuteczny
		110 µl l <sup>-1</sup> 1 h, raz dziennie przez 5 dni (18°C)	pszczerz tęczowy	skuteczny
		110 µl l <sup>-1</sup> 1 h, raz na dwa dni przez 5 dni (10°C)	pszczerz tęczowy	skuteczny
		0,1, 0,15 oraz 0,2 ml l <sup>-1</sup> przez 1 h	pszczerz tęczowy, pszczerz źródłany, pszczerz potokowy	skuteczny
		25 mg l <sup>-1</sup> raz na dzień przez 20 dni	łośń atlantycki	częściowo skuteczny – śmiertelność ryb 20-60%
Formaldehyd + Desirox (13% kwasu nadoctowego, 20% kwasu octowego, 20% nadtlenku wodoru)	kąpiel	25-50 + 10 mg l <sup>-1</sup> 3-4 razy przez 4 tygodnie	łośń atlantycki	skuteczny
Ketokonazol	<i>per os</i>	40 g kg <sup>-1</sup> paszy przez 10 dni	pszczerz tęczowy	częściowo skuteczny
Kwas humusowy	kąpiel	100-150 µl l <sup>-1</sup> na 2 h przez 5 dni	pszczerz tęczowy	skuteczny
		150 µl l <sup>-1</sup> na 2 h (co drugi dzień) przez 5 dni (10°C)	pszczerz tęczowy	skuteczny
		150 µl l <sup>-1</sup> na 2 h (codziennie) przez 5 dni (18°C)	pszczerz tęczowy	częściowo skuteczny – śmiertelność ryb 30%
Kwas octowy (4%)	kąpiel	10 ml l <sup>-1</sup> przez 3 min	pszczerz tęczowy, pszczerz źródłany, pszczerz potokowy	częściowo skuteczny
Kwas nadoctowy (40%)	kąpiel	1 mg l <sup>-1</sup> przez 4 dni	karp	skuteczny
Detarox (kwas nadoctowy+kwas octowy + nadtlenek wodoru)	kąpiel	10 mg l <sup>-1</sup> przez 25-45 min, powtórzyć po 4-7 dniach	łososiowate	skuteczny
Siarczan miedzi (CuSO <sub>4</sub> )	kąpiel	0,1 mg l <sup>-1</sup> dziennie przez 17 dni	okoń srebrny	skuteczny
Nadmanganian potasu	kąpiel	10-20 mg l <sup>-1</sup> przez 30 minut	pszczerz tęczowy, pszczerz źródłany, pszczerz potokowy	skuteczny – działanie toksyczne na ryby
Nadmanganian potasu + dimetrazol	kąpiel + <i>per os</i>	3 mg l <sup>-1</sup> co drugi dzień, pięć powtórzeń + 25 mg/rybę dimetrazolu w paszy przez 10 dni	pszczerz tęczowy	skuteczny
Seknidazol	<i>per os</i>	40 mg kg <sup>-1</sup> paszy przez 10 dni	pszczerz tęczowy	częściowo skuteczny
Sól sodowa salinomycyny	<i>per os</i>	47 mg kg <sup>-1</sup>	pszczerz tęczowy	skuteczny
Triclabendazol + β-cyklodekstran (1:2)	<i>per os</i>	10-20 g kg <sup>-1</sup> paszy przez 10 dni	pszczerz tęczowy	częściowo skuteczny

– immunomodulacja i działanie wspomagające procesy odbudowy tkanek.

Metody bez wykorzystania środków chemicznych skupiają się głównie na stosowaniu ozonu, UV oraz wysokiej temperatury. Próby Farleya i Heckmanna (za Picon-Camacho i in. 2012) z wykorzystaniem 5-sekundowych impulsów elektrycznych, wywołujących najprawdopodobniej elektrolizę wody i uwalnianie wolnych jonów, powodowały unieszkodliwienie tylko części pasożytów w stadium protomontu. Próby wykorzystania tej techniki do oderwania trofontów od

ciała ryby zakończyły się fiaskiem, ze względu na to, że natężenie prądu niezbędne do wywołania tego zjawiska okazywało się letalne dla ryb. Skuteczna wobec form pływających okazała się metoda z wykorzystaniem zbiorników połączonych, w których woda poddawana była wyjąławianiu z użyciem lampy UV. Średnia dawka promieniowania UV dla formy troficznej to 100 mWs cm<sup>2</sup>, jednakże tomity poddają się działaniu >300 mWs cm<sup>2</sup> (Timmons i Ebeling 2007). Inną metodą mogłaby być mechaniczna filtracja wody wprowadzanej do obiegu, jednakże z uwagi na

małe rozmiary terontów (57,4 x 28,6 µm w temp. 5°C, czy 28,6 x 20,0 µm w temp. 30°C) nie stanowi skutecznej ochrony przed zarażeniem. Użycie filtrów o porowatości 80 µm uzupełnione środkami chemicznymi, np: nadwęglanu sodu (OXYPER), zapobiega przedostawaniu się protomonotów do hodowli i niszczy teronty. W 2009 roku Shinn (za Picon-Camacho i in. 2012) udowodnił, że regularne odmulanie zbiornika przy jednoczesnym użyciu polimerów o niskiej adhezji w miejscach przepływania pstrągów tęczy może pomagać w usuwaniu tomocyst i powodować zmniejszenie ryzyka zarażenia o 55-99% w porównaniu z grupą kontrolną. Dotychczas żadna z alternatywnych metod nie jest wykorzystana na przemysłową skalę w akwakulturze.

Pomimo wysiłku wielu zespołów badawczych w praktyce metody chemiczne nadal przeważają, zarówno w działaniu profilaktycznym, jak i terapeutycznym. W tabeli 1 zestawiono środki oraz procedury o potwierdzonej skuteczności, bezpieczne dla ryb (za Picon-Camacho i in. 2012). Z uwagi na ograniczenia technologiczne i rosnące wymagania związane z ochroną środowiska dąży się do spopularyzowania aplikacji *per os*, która wydaje się najmniej stresująca i pozwalająca na zindywidualizowanie terapii. W tabeli 1 zostały wyszczególnione środki, które można rozważyć do stosowania w paszy. Metody leczenia i środki używane w terapii chorób ryb są dobrze opisane w powszechnie dostępnych źródłach (Antychowicz 2007, Grudniewska i Terech-Majewska 2015, Noga 2010, Własow i Guziur 2008, Żelazny i Gomułka 2015). Jednakże w kontekście omawianej parazytozy należy je dostosowywać do specyfiki gospodarstwa. Jedynym środkiem dopuszczonym do stosowania u ryb, który wykazuje działanie przeciw kulorzęskowi jest bronopol w preparacie PYCESE (Novartis), zarejestrowany w Unii Europejskiej do kąpieli ikry przeciwko saprolegniozie. Stosowane środki nie wymagają zachowania karencji zgodnej z zasadą kaskady (Żelazny i Gomułka 2015a). Środkami z wyboru są: formalina, chloramina T i siarczan miedzi (Noga 2010, Grudniewska i Terech-Majewska 2015). Pomimo efektów ubocznych dla organizmu ryb i środowiska są stosowane powszechnie na całym świecie (Picon-Camacho i in. 2012).

## Podsumowanie

Podsumowując należy podkreślić, że pomimo znaczącego rozwoju badań nad biologią tego pasożyta i jego oddziaływaniem na organizm, problematyka jego eliminacji oraz leczenia ichtiofitriazy jest nadal niepełna. Jest to problem dotyczący wielu aspektów terapii ryb. Stale poszukuje się takich metod, które niszczyłyby patogeny i uniemożliwiły utrzymywanie się choroby. Jednakże z uwagi na patomechanizm ich działania w metodach trzeba uwzględnić także ochronę organizmu ryb przed skutkami ich obecności w tkankach. Metody polegające na

stosowaniu środków biobójczych w ochronie zdrowia ryb są jak dotąd najbardziej powszechne, pomimo tego, że są kosztochłonne i nieobojętne dla ryb, środowiska oraz konsumenta. Aktualnie nabiera znaczenia zmiana podejścia do ochrony zdrowia ryb w odniesieniu do systemów zamkniętych (typu RAS), w których przez długi czas mogą utrzymywać się metabolity tych związków.

## Literatura

- Abowei J.F.N., Briyai O.F., Bassey S.E. 2011 – A Review of Some Basic Parasite Diseases in Culture Fisheries Flagellids, Dinoflagellides and Ichthyophthiriasis, Ichtyobodiasis, Coccidiosis Trichodiniasis, Helminthiasis, Hirudinea Infestation, Crustacean Parsite and Ciliates – Br. J. Pharmacol. Toxicol. 2(5): 213-226.
- Alvarez-Pellitero P. 2004 – Report about fish parasitic diseases – W: Alvarez-Pellitero P., Barja J.L., Basurco B., Berthe F., Toranzo A.E. (Eds.). Mediterranean aquaculture diagnostic laboratories. Zaragoza CIHEM: 103-130.
- Antychowicz J. 2007 – Leczenie ryb – W: Choroby ryb śródlądowych, PWRiL. Warszawa: 366-382.
- Antychowicz J. 2013a – Patologiczne zmiany w skrzelach karpia – przyczyny i skutki – Życie Wet. 88 (5): 380-385.
- Antychowicz J. 2013b – Zastosowanie badania skrzeli do diagnostyki chorób zakaźnych i pasożytniczych oraz zatruc u pstrągów i innych gatunków ryb – Życie Wet. 88 (8): 636-643.
- Antychowicz J., Pękala A. 2015 – Pasożyty i komensale najczęściej stwierdzone w mikroskopowym badaniu skóry i skrzelii ryb śródlądowych – interpretacja badań parazytologicznych – Życie Wet. 90 (1): 18-28.
- Bernad A. 2013 – Choroby infekcyjne i inwazyjne występujące na terenie województwa warmińsko – mazurskiego w latach 2010-2012 – W: A. Kosińska, A. Pękala (Red.) Występowanie infekcyjnych i inwazyjnych chorób ryb w Polsce w świetle najnowszych badań. Wyd. PIWet-PIB, Puławy: 7-16.
- Bernad A., Terech-Majewska E., Pajdak J., Schulz P., Siwicki A.K. 2016a – Sytuacja zdrowotna ryb hodowlanych w województwie warmińsko-mazurskim w 2015 roku – Komun. Ryb. 1: 16-21.
- Bernad A., Terech-Majewska E., Szypczyńska K., Pajdak J., Schulz P., Siwicki A.K. 2016b – Występowanie inwazji kulorzęska *Ichthyophthirius multifiliis* u ryb hodowlanych w województwie warmińsko-mazurskim w latach 2014-2015 – Komun. Ryb. 3: 6-12.
- Buchman K., Sigh J., Nielsen C.V., Dalgaard M. 2001 – Host responses against the fish parasiting ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* – Vet. Parasitol. 100: 105-116.
- Grudniewska J., Terech-Majewska E. 2015 – Metody dezynfekcji w hodowli ryb. Zwalczenie ektopasożytów ryb – W: Hliwa P., Woźniak M., Król J., Gomułka P. (Red.) Ochrona zdrowia ryb w aspekcie jakości i bezpieczeństwa żywności: 72-88.
- Dickerson H.W. 2012 – *Ichthyophthirius multifiliis* – W: Woo P.T.K. i Buchmann K. (Eds.) Fish parasites: Pathobiology and protection. Wyd. CAB International: 55-72.
- Elsayed E.E., El Dien N.E., Mahmoud A.M. 2006 – Ichthyophthiriasis: Various fish susceptibility or presence of more than one strain of the parasite – Nature and Science, 4 (3): 5 -13.
- Klesius P., Rogers W. 1995 – Parasitisms of catfish and other farm – raised food fish – J. Ann. Vet. Med. Asnt. 207 (11): 1473-1478.
- Noga E.J., 2010 – Fish Disease: Diagnosis and treatment, 2 nd ed. – Wiley-Blackwell: 345-420.
- Picón-Camacho S.M., Marcos- Lopez M., Bron J.E., Shinn A.P. 2012 – An assessment of the use of drug and non-drug interventions in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, a protozoan parasite of freshwater fish – Parasitol. 139: 149-190.
- Szarek J., Babinska I., Truszczynska M., Kolman R., Siwicki A. K., Kowalski I. M., Skibniewska K.A. 2006 – Effect of the herbicide Avans 330 SL on the liver pathomorphology of clinically healthy carp (*Cyprinus carpio* L.) and carp infected by *Ichthyophthirius multifiliis* – Arch. Pol. Fish. 14 (2): 169-182.
- Timmons M.B., Ebeling J.M. 2007 – Ozonation and UV – irradiation – W: Recirculating aquaculture. Chapter 11, Cayuga Aqua Ventures, LLC: 387-426.
- Xuejin J., Kania P.W., Buchmann K. 2012 – Comparative effects of four feed types on white spot disease susceptibility and skin immune parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) – J. Fish Dis. 35: 127-135.



- Ventura M., Paperna I. 1985 – Histopathology of *Ichthyophthirius multifiliis* infections in fishes – J. Fish Biol. 27: 185-203.
- Wei J.Z., Li H., Yu H. 2013 – Ichthyophthiriasis: emphases on the epizootiology – Lett. Appl. Microbiol. 57: 91-101.
- Witeska M., Kondera E., Ługowska K. 2010 – The effects of ichthyophthiriasis on some haematological parameters in common carp – Turk. J. Vet. Anim. Sci. 34 (3): 267-271.
- Własow T., Guzi J. 2008 – Ważniejsze środki terapeutyczne – W: Higiena ryb i środowiska hodowlanego z profilaktyką chorób raków. Wyd. Oficyna Wydawnicza „Hoża”, Warszawa: 100-104.
- Żelazny J., Gomułka P. 2015 – Specyfika i zasady stosowania leków u ryb w UE i w Polsce. Dozwolone i zakazane substancje lecznicze w akwakulturze – W: Hliwa P., Woźniak M., Król J., Gomułka P. (Red.) Ochrona zdrowia ryb w aspekcie jakości i bezpieczeństwa żywności: 12-39.

Przyjęto po recenzji 3.08.2016 r.

---

## WHITESPOT – FROM DIAGNOSIS TO THERAPY

Elżbieta Terech-Majewska, Alicja Bernad, Joanna Pajdak, Patrycja Schulz, Karolina Naumowicz, Natalia Piotrowska, Andrzej K. Siwicki

**ABSTRACT.** Whitespot (also commonly known as ich) is caused by the parasitic protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* from the order Hymenostomatida. This parasite occurs throughout the world in all species of freshwater fish. Modern fish husbandry methods, especially high-intensity rearing, high stocking densities, low levels of water exchange, and the lack of the parasite's natural predators, facilitate the sustained occurrence of this parasite in aquaculture. In Poland, this disease is diagnosed systematically, and it is likely caused by the common occurrence of the parasite in the aquatic environment. Despite having a good understanding of the parasite's biology and its impact on its host and its immune system, to date, no effective immunoprophylactic therapies have been developed. The foundation of protecting fish against *I. multifiliis* is diagnostic monitoring and the application of biocides. In practice, formalin, chloramine T, and copper sulphate are used most frequently in various therapeutic procedures. The effectiveness of these therapies is highly dependent on environmental conditions and parasite susceptibility. However, the course of treatment often depends on the overall condition of the fish and the duration of the treatment. This paper presents selected aspects of the impact the parasite has on fish and the development of the disease. Additionally, a literature review was done to draw attention to the necessity of searching for alternative prophylaxis and treatment methods for this widespread, troublesome parasitic disease.

**Keywords:** *Ichthyophthirius multifiliis*, pathogenesis of whitespot, treatment