



Andrzej K. Siwicki¹, Jarosław Dastych², Edward Głąbski¹, Ewelina Wójcik²,
Krzysztof Kazuń¹, Barbara Kazuń¹, Patrycja Schulz³

¹Zakład Patologii i Immunologii Ryb, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

²Proteon Pharmaceuticals SA

³Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wpływ preparatu bakteriofagowego Bafador-1 na organizm ryb – badania hematologiczne i biochemiczne u karpia (*Cyprinus carpio*)

Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się gwałtowny wzrost oporności patogennych dla ryb bakterii na antybiotyki i inne chemioterapeutyki dopuszczone do stosowania w akwakulturze. Zjawisko to nasila się szczególnie w intensywnych podchowach materiału zarybieniowego. Stosowanie antybiotyków czy innych chemioterapeutyków w obiegach zamkniętych jest ograniczone lub wręcz zabronione, gdyż doprowadzić może do całkowitego zniszczenia filtrów biologicznych. Zastosowanie w hodowli ryb naturalnych i syntetycznych stymulatorów nieswoistej odporności oraz wdrożenie do praktyki szczepionek czy autoszczepionek miało istotne znaczenie praktyczne. Ich wprowadzenie do rutynowych zabiegów w znaczący sposób ograniczyło ilość antybiotyków stosowanych w akwakulturze (Siwicki i in. 2011, Siwicki i in. 2014a, Siwicki i in. 2014b).

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania naturalnymi metodami walki z patogennymi bakteriami. Zalicza się do nich stosowanie bakteriofagów w leczeniu zakażeń wywołanych przez odporne bakterie. Bakteriofagi są wirusami, które atakują żywe i wrażliwe bakterie. Występują wszędzie tam, gdzie mogą rozwijać się ich żywicieli, czyli bakterie. Stwierdza się ich obecność w wodzie, glebie oraz w organizmach zwierząt i człowieka (Dąbrowska i in. 2005). Bakteriofagi są wirusami atakującymi tylko swoiste dla siebie bakterie. Elementy ich kapsydów wiążą się jedynie ze specyficznymi receptorami na powierzchni docelowych gospodarzy. Bakterie, które takiego receptora nie posiadają nie mogą zostać zaatakowane. Zdolność bakteriofagów do zabijania komórek bakteryjnych na koniec cyklu zakaźnego jest podstawą pomysłu wykorzystania

fagów jako środków terapeutycznych (Skurnik i Strauch 2006, Kutateladze i Adamia 2010, Drulis-Kawa i in. 2012). Lityczne bakteriofagi są najodpowiedniejszymi kandydatami do terapii, ponieważ ulegają szybkiemu namnożeniu i doprowadzają do lizy bakterii (Morrison i Rainnie 2004). Ukierunkowana terapia z zastosowaniem bakteriofagów jest bardzo efektywna i pozbawiona negatywnych skutków, nawet przy długiej ekspozycji na duże dawki (Matsuzaki i in. 2005, Hanlon 2007, Kumari i in. 2009). Ze względu na swoją specyficzność, leczenie za pomocą bakteriofagów ma wąskie spektrum przeciwbakteryjne o działaniu ograniczonym do jednego gatunku lub, w niektórych przypadkach do pojedynczego szczepu w obrębie gatunku.

Badania wstępne realizowane przez Proteon Pharmaceuticals we współpracy z Instytutem Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie oraz Wydziałem Medycyny Weterynaryjnej UWM pozwoliły na uzyskanie cennych danych, które posłużyły do utworzenia kolekcji bakteriofagów aktywnych względem wybranych bakterii, w tym tak istotnych z patogennego punktu widzenia jak *Aeromonas hydrophila*. Dla wyizolowanych bakteriofagów została określona specyficzność poprzez określenie ich zdolności litycznej wobec kolekcji izolatów wybranych gatunków bakterii. Na podstawie profilu specyficzności wybrano bakteriofagi o najwyższej aktywności litycznej, które scharakteryzowano na poziomie genetycznym.

Wstępne wyniki badań jednoznacznie wykazały, że preparat bakteriofagowy Bafador-1 podawany w iniekcji dootrzewnowej oraz immersji wykazuje działanie ograniczające śnięcia po eksperymentalnych zakażeniach patogenną bakterią *Aeromonas hydrophila* u pstrąga tęczo-

wego (Siwicki i in. 2014). Istotnym elementem prezentowanych badań było wykazanie, że przyjęte dwa stężenia bakteriofagów w preparacie Bafador-1 wykazywały podobny efekt protekcyjny, określany na podstawie przebiegu śnięć po eksperymentalnym zakażeniu, co jednoznacznie sugeruje, że stężenie bakteriofagów 1×10^8 PFU/ml w preparacie Bafador-1 można przyjąć za optymalne do stosowania w immersji. Równocześnie wykazano, że czas przetrzymywania ryb w roztworze preparatu Bafador-1 powinien wynosić minimum 1 godzinę.

Istotnym elementem ukierunkowanych badań było określenie bezpieczeństwa podawania preparatu Bafador-1 oraz jego wpływu na organizm ryb. Celem niniejszej pracy była wstępna ocena wpływu preparatu bakteriofagowego (Bafador-1) na wybrane parametry hematologiczne i biochemiczne u karpia (*Cyprinus carpio*).

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 200 szt. narybku karpia o masie ciała 80-100 g. Ryby użyte do badań doświadczalnych były w dobrej kondycji, klinicznie zdrowe, a badaniami mikrobiologicznymi wykluczono obecność patogennych wirusów wiosennej wirerii karpia (SVC) i herpeswirusa karpia-3 (CypHV-3) oraz bakterii z rodzaju *Aeromonas*. Po adaptacji ryby do dalszych badań eksperymentalnych przetrzymywane były w temperaturze 22°C w obiegu zamkniętym z biofiltrem. Ryby karmiono paszą komercyjną (Aller Aqua Polska) w ilości odpowiedniej dla masy ciała i temperatury wody.

Do badań użyto preparatu Bafador-1 (Proteon Pharmaceuticals) zawierającego bakteriofagi wykazujące silne działanie lityczne wobec *A. hydrophila*. Preparat Bafador-1 (stężenie bakteriofagów 1×10^8 PFU/ml) stosowano w badaniach doświadczalnych, które przeprowadzono w warunkach kontrolowanych, w obiegach zamkniętych, zgodnie z wymogami Dobrej Praktyki Klinicznej Weterynaryjnej (GCVP). Preparat Bafador-1 był stosowany w kąpielach trwającej 60 min w stężeniu 1 l/m³ wody. Ryby grupy doświadczalnej poddano kąpielom przez 1 godz. w roztworze Bafadoru-1 w stężeniu 1l/ m³ wody. Krew do badań hematologicznych i biochemicznych pobierano z żyły ogonowej od 20 szt. ryb przed kąpielą (grupa 0) oraz 1, 2 oraz 3 dni po kąpielach. Grupę kontrolną stanowiły ryby poddane jedynie manipulacjom, jak w grupie doświadczalnej. Przed pobraniem krwi ryby były wprowadzane w stan znieczulenia ogólnego preparatem Propiscin (Kazuń i Siwicki 2001).

Badania hematologiczne obejmowały określenie liczby erytrocytów (RBC), wartości hematokrytu (Ht) i poziomu hemoglobiny (Hb) w pełnej krwi przy użyciu metod stosowanych rutynowo w Zakładzie Patologii i Immunologii Ryb IRS w Żabieńcu (Siwicki i in. 2003), zgodnie z wymogami dobrej praktyki laboratoryjnej (GLP). Z uzyskanych wartości obliczano średnią masę hemoglobiny (SCH) oraz średnie stężenie hemoglobiny (SSH) w krwince.

Badania biochemiczne wykonano z użyciem surowicy, którą uzyskano po wirowaniu pełnej krwi (400 x g przez 15 min). Następnie surowicę przetrzymywano do czasu oznaczeń w temperaturze -20°C. W surowicy oznaczano aktywność aminotransferazy asparaginianowej (AST) oraz aminotransferazy alaninowej ((ALT) metodą spektrofotometryczną przy użyciu aparatu Hach-Langer spectrophotometer DR 3900 (Niemcy), z wykorzystaniem zestawów odczynników do ilościowego oznaczania firmy PTH Hydrex (Polska). Poziom kortyzolu w surowicy oznaczano przy użyciu testu immunoenzymatycznego (Novatec Immunodiagnostica GmbH) oraz poziom glukozy zestawem odczynników do enzymatycznego, kolorymetrycznego oznaczania tego parametru w surowicy (PTH Hydrex, Polska).

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej określającej wartości średnie, odchylenie standardowe oraz istotność różnic na poziomie $P < 0,05$ przy użyciu testu ANOVA (Statistica 10).

Wyniki i dyskusja

Zakres badań przedstawiony w pracy był podyktowany potrzebą określenia wpływu preparatu bakteriofagowego Bafador-1 na podstawowe parametry hematologiczne i biochemiczne, odzwierciedlające stan zdrowotny oraz podstawowe procesy metaboliczne u ryb. W dostępnej literaturze brak jest danych na temat wpływu bakteriofagów na obraz czerwonokrwinkowy, aktywność enzymów wątrobowych oraz poziom glukozy i kortyzolu w surowicy. Aktywność enzymów wątrobowych oraz poziomy glukozy i kortyzolu (hormon stresu) były szczególnie istotne dla oceny aktualnego stanu fizjologicznego badanych ryb. Wpływ badanego preparatu bakteriofagowego Bafador-1 na podstawowe parametry hematologiczne oraz wybrane parametry biochemiczne przed kąpielą oraz 1, 2 i 3 dni po kąpielach przedstawiono w tabeli 1.

Natomiast w tabeli 1 nie przedstawiono wyników badań hematologicznych i biochemicznych uzyskanych u ryb z grupy kontrolnej, gdyż w badanych okresach nie uległy one istotnym zmianom w porównaniu z rybami przed kąpielą oraz po kąpielach. Uzyskane wyniki badań hematologicznych jednoznacznie wykazały, że badany preparat nie wpływał negatywnie na hematopoezę, czego wynikiem był brak statystycznie istotnych zmian do 3 dnia po kąpielach w liczbie erytrocytów, wartości hematokrytu oraz poziomu hemoglobiny. Nie stwierdzono istotnych zmian w średniej masie hemoglobiny oraz średnim stężeniu hemoglobiny w krwince.

Badania biochemiczne również wykazały, że badany preparat bakteriofagowy nie miał negatywnego wpływu na aktywność enzymów wątrobowych (AST, ALT) oraz nie zmieniał poziomu glukozy. Natomiast brak istotnych zmian w poziomie kortyzolu świadczy o niskim oddziaływaniu stresogennym badanego preparatu na organizm karpia.

Wpływ preparatu bakteriofagowego Bafador-1 podawanego w kąpeli na wybrane parametry hematologiczne i biochemiczne u narybku karpia (n= 20, wartości średnie ± odchylenie standardowe; istotność różnic na poziomie P<0,05)

Oznaczone parametry	Przed kąpielą	Okresy pobierania krwi po kąpeli:		
		1 dzień	2 dni	3 dni
Liczba erytrocytów (RBC) mln/mm	1,5 ± 0,4	1,6 ± 0,5	1,7 ± 0,3	1,6 ± 0,3
Wartość hematokrytu (Ht) %	32,5 ± 3,2	34,5 ± 3,4	34,9 ± 3,2	33,4 ± 2,9
Poziom hemoglobiny (Hb) g%	10,6 ± 1,4	11,4 ± 1,4	11,6 ± 1,6	10,8 ± 1,5
Średnia masa hemoglobiny (SCH) g/l	58,4 ± 7,5	56,5 ± 8,4	55,9 ± 7,5	57,9 ± 8,5
Średnie stężenie hemoglobiny (SSH) g/l	25,6 ± 5,5	26,4 ± 4,8	27,6 ± 5,2	26,8 ± 4,9
Poziom kortyzolu ng/ml	179 ± 27	185 ± 32	191 ± 45	187 ± 35
Poziom glukozy mg/l	110 ± 15	115 ± 14	114 ± 12	118 ± 16
Aktywność AST U/l	84,2 ± 12,5	86,5 ± 13,8	87,2 ± 14,5	88,9 ± 13,3
Aktywność ALT U/l	2,5 ± 0,8	2,7 ± 0,7	2,8 ± 0,6	2,9 ± 0,8

W podsumowaniu należy stwierdzić, że uzyskane wyniki badań hematologicznych i biochemicznych jednoznacznie wykazały, że badany preparat bakteriofagowy Bafador-1 podany w kąpeli jest bezpieczny i dobrze tolerowany przez organizm ryb.

Badania finansowane z Projektu POIG.01.04.00-10-098/12.

Literatura

- Dąbrowska K., Świtajła-Jeleń K., Opolskie A., Weber-Dąbrowska B., Górski A. 2005 – Bacteriophage penetration in vertebrates – J. Appl. Microbiol. 98: 7-13.
- Drulis-Kawa Z., Majkowska-Skrobek G., Maciejewska B., Delattre A.S., Lavigne R. 2012 – Learning from bacteriophages-advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications – Curr. Prot. Pept. Scien. 13: 699 -700.
- Hanlon G.W. 2007 – Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections – Inter. J. Antimicrob. Ag. 30: 118-128.
- Kazuń K., Siwicki A.K. 2001 – Propiscin – a new safe anaesthetic for fish – Arch. Pol. Fish. 9: 183-190.
- Kumari S., Harjai K., Chhibber S. 2009 – Bacteriophage treatment of burn wound infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO in BALB/c mice – Am. J. Biomed. Sci. 1: 385-394.
- Kutateladze M., Adamia R. 2010 – Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics – Trends Biotechnol. 28: 591-595.
- Matsuzaki S., Rashed M., Uchiyama J., Sakurai S., Ujihara T., Kuroda M., Imai S. 2005 – Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases – J. Infect. Chemoth. 11: 211-219.
- Morrison S., Rainnie D.J. 2004 – Bacteriophage therapy: an alternative to antibiotic therapy in aquaculture – Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 2532.
- Siwicki A.K., Zakęś Z., Trapkowska S., Kowalska A., Kazuń K., Głąbski E. 2003 – Selected hematological and biochemical parameters of pike-perch (*Sander lucioperca* L.) from intensive culture – Arch. Pol. Fish. 11(1): 17-22.
- Siwicki A.K., Kazuń K., Lepa A., Kazuń B. 2011 – Influence of 1,3-1,6-D-glucan (Leiber Beta-S) in diets on the effectiveness of anti-Enteric Red-mouth Disease (AquaVac ERM) vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – Centr. Eur. J. Immunol. 36: 212-214.
- Siwicki A.K., Lepa A., Robak S., Kazuń K., Kazuń B., Głąbski E. 2014a – Effects of methisoprinol on innate immunity parameters in intensively reared European eel (*Anguilla anguilla*) – Isr. J. Aquacult./Bamidgeh 66: 1-6.
- Siwicki A.K., Robak S., Kazuń K., Lepa A., Kazuń B., Głąbski E. 2014b – Influence of 1,3-1,6-β-D-glucan (Leiber Beta-S) in diets on the effectiveness of anti-furunculosis vaccine in european eel (*Anguilla anguilla*) – Centr. Eur. J. Immunol. 39: 71.
- Siwicki A.K., Dastyh J., Wójcik E., Schulz P., Kaczorek E., Kazuń K., Kazuń B., Lepa A., Terech-Majewska E. 2014c – Zastosowanie bakteriofagów w ukierunkowanej terapii chorób bakteryjnych ryb – badania doświadczalne – Komun. Ryb. 5: 11-15.
- Skurnik M., Strauch E. 2006 – Phage therapy: facts and fiction – Inter. J. Med. Microbiol. 296: 5-14.

Przyjęto po recenzji 01.04.2015 r.

INFLUENCE OF BACTERIOPHAGES SPECIMEN BAFADOR-1 ON FISH ORGANISM – HAEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES IN CARP

Andrzej K. Siwicki, Jarosław Dastyh, Edward Głąbski, Ewelina Wójcik, Krzysztof Kazuń, Barbara Kazuń, Patrycja Schulz

ABSTRACT. The growing problem of chemotherapeutic resistance has revived interest in the potential use of bacteriophages in specific therapy of bacterial diseases in fish. In the present study, we determined the influence of specific product Bafador-1 (concentrations of bacteriophages 1×10^8 PFU/ml) used in immersion (1 h) on the haematological and biochemical parameters in carp (*Cyprinus carpio*). The blood were separated from caudal vein before and 1, 2 and 3 days after immersion. The results showed that Bafador-1 do not change levels of red blood cells, haematocrit and haemoglobin in blood. The similar pattern were observed in biochemical parameters. After application of Bafador-1 no statistically significant difference in AST and ALT activity were observed. Also the levels of glucose and cortisol were similar, compared to control group. The results of this study showed, that Bafador-1 has not negative influence on haematological and biochemical parameters in carp.

Keywords: carp, bacteriophages, haematological and biochemical parameters